



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Centro de Estudios de Postgrado*

Trabajo Fin de Máster

# **MODULACIÓN POR ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO DE LAS LIPOXIGENASAS EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

**Alumno/a: Pacheco Carrillo, Iván**

Tutor/a: Prof. D. Jose Rafael Pedrajas Cabrera  
Cotutor/a: D.<sup>a</sup> María de las Nieves Padilla Serrano

Departamento de Biología Experimental

**Julio, 2018**



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

# MODULACIÓN POR ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO DE LAS LIPOXIGENASAS EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Pacheco Carrillo, Iván

**Tutor/a:** Jose Rafael  
Pedrajas Cabrera

**Cotutor/a:** M<sup>a</sup> de las  
Nieves Padilla Serrano

# ÍNDICE

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN/ABSTRACT.....                                                                                 | 1  |
| 2. INTRODUCCIÓN.....                                                                                     | 2  |
| 2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                                                                   | 2  |
| 2.2. Óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ).....                                                             | 3  |
| 2.2.1. Funciones fisiológicas del óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ).....                                | 6  |
| 2.2.2. Modificaciones post-traduccionales por RNS.....                                                   | 7  |
| 2.2.3. Papel del S-nitrosoglutation (GSNO).....                                                          | 9  |
| 2.3. Lipoxigenasas.....                                                                                  | 11 |
| 2.3.1. Papel fisiológico de las lipoxigenasas.....                                                       | 13 |
| 3. OBJETIVOS.....                                                                                        | 15 |
| 4. MATERIAL Y MÉTODOS.....                                                                               | 16 |
| 4.1. Material vegetal: cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                           | 16 |
| 4.2. Síntesis de GSNO.....                                                                               | 17 |
| 4.3. Síntesis de ácido linolénico.....                                                                   | 18 |
| 4.4. Obtención de extractos de cultivo celular.....                                                      | 18 |
| 4.5. Determinación de actividad enzimática.....                                                          | 19 |
| 4.5.1. Determinación de actividad lipoxigenasa.....                                                      | 19 |
| 4.5.2. Determinación de actividad lipoxigenasa de extractos de cultivos celulares tratados con GSNO..... | 19 |
| 4.6. Determinación de proteínas.....                                                                     | 20 |
| 4.6.1. Determinación de la concentración de proteínas del extracto mediante Bradford.....                | 20 |
| 4.6.2. Determinación de cantidad de proteínas por BCA.....                                               | 20 |
| 4.7. Detección de proteínas nitrosiladas mediante la técnica del biotin-switch.....                      | 21 |
| 4.7.1. Tratamiento de los cultivos celulares.....                                                        | 22 |
| 4.7.2. Técnica biotin-switch.....                                                                        | 22 |
| 4.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....          | 24 |

|        |                                                                                                          |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.9.   | Western-Blot.....                                                                                        | 25 |
| 4.9.1. | Transferencia semiseca de proteínas tras electroforesis.....                                             | 25 |
| 4.9.2. | Bloqueo e inmunodetección por quimioluminiscencia.....                                                   | 26 |
| 5.     | RESULTADOS.....                                                                                          | 27 |
| 5.1.   | Alineamiento de lipoxigenasas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                                       | 27 |
| 5.2.   | Determinación de actividad lipoxigenasa en extractos de cultivos celulares tratados con GSNO.....        | 30 |
| 5.3.   | Determinación de la nitrosilación de proteínas en extractos de cultivos celulares tratados con GSNO..... | 32 |
| 6.     | DISCUSIÓN.....                                                                                           | 34 |
| 7.     | CONCLUSIONES.....                                                                                        | 36 |
| 8.     | BIBLIOGRAFÍA.....                                                                                        | 37 |
| 9.     | RESUMEN ASIGNATURAS CURSADAS DEL MÁSTER.....                                                             | 43 |
| 10.    | CV.....                                                                                                  | 47 |

## **AGRADECIMIENTOS**

Durante la realización de este trabajo he estado rodeado de multitud de personas que de una forma u otra han contribuido a que lo pudiese realizar en las mejores condiciones posibles. Por eso he de otorgarles mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer enormemente el esfuerzo a mi supervisora D.<sup>a</sup> María de las Nieves Padilla Serrano, por su orientación científica, su continuo aporte de ideas, y por la inversión de su tiempo en mí, sin duda lo más valioso de este mundo.

A los compañeros del laboratorio de bioquímica y biología molecular (grupo BIO-286, dirigido por Juan Bautista Barroso Albarracín), ya que siempre han prestado su colaboración y atención cuando los he necesitado: Raquel, Juan Carlos, Lorena, Antonio, Mounira, Paco, Rubén, Vanesa, María, Jose Rafa, Salomé, Jesús.

A todos los compañeros/amigos del máster en biotecnología y biomedicina, gracias por tanto en tan poco tiempo.

Al director del máster, Juan Peragón Sánchez, por recomendarme la inscripción en él, y por ser siempre una persona amable y gentil.

Con especial hincapié: infinitas gracias a mis padres y hermano, pilares fundamentales de lo que hoy soy, sin ellos estas palabras jamás hubiesen sido escritas.

Por todos mis amigos que se hallan repartidos en casi todas las coordenadas de la geografía.



## 1. RESUMEN/ABSTRACT

El óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) es un radical libre gaseoso que participa en un amplio rango de funciones celulares como son el crecimiento y desarrollo de las plantas.

El  $\cdot\text{NO}$  y las moléculas que derivan del mismo se conocen como especies de nitrógeno reactivo (RNS), que en función de su concentración en la célula, pueden actuar como moléculas señalizadoras en modificaciones post-traduccionales (S-Nitrosilación o nitración de tirosinas proteicas) o bien, generar efectos tóxicos y perjudiciales para la planta.

En este trabajo hemos analizado el efecto nitrosativo que producen las RNS como es el GSNO (S-Nitrosoglutation) a distintas concentraciones para observar la nitrosilación que se genera en los aminoácidos de cisteínas de las enzimas lipoxigenasas que están presentes en extractos celulares de *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se utilizaron técnicas espectrofotométricas para medir actividades enzimáticas, el ensayo biotin-switch y western-blotting.

Los resultados de este estudio indicaron modificaciones en la actividad de las enzimas lipoxigenasas que disminuía cuando incrementábamos los niveles de GSNO, pudiendo observarse un estrés nitrosativo a altas concentraciones de esta RNS.

-----  
Nitric oxide ( $\cdot\text{NO}$ ) is a gaseous free radical that participates in a wide range of cellular functions such as the growth and development of plants.

$\cdot\text{NO}$  and the molecules derived from it are known as reactive nitrogen species (RNS), which, depending on their concentration in the cell, can act as signaling molecules in post-translational modifications (S-Nitrosylation or nitration of protein tyrosines ) or, generate toxic and harmful effects for the plant.

In this work we have analyzed the nitrosative effect produced by RNS such as GSNO (S-nitrosoglutation) at different concentrations to observe the nitrosylation that is generated in the amino acids of cysteines of lipoxigenase enzymes that are present in cellular extracts of *Arabidopsis thaliana*. For this, spectrophotometric techniques were used to measure enzymatic activities, the biotin-switch assay and western-blotting.

The results of this study indicated modifications in the activity of the lipoxygenase enzymes that decreased when we increased GSNO levels, being able to observe a nitrosative stress at high concentrations of this RNS.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, biotin-switch, GSNO, lipoxygenase, S-nitrosylation.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. *Arabidopsis thaliana*.

*Arabidopsis thaliana* es una planta de carácter herbáceo, clasificada dentro de la familia Brassicaceae y perteneciente a la especie crucífera. Comparte familia con una gran variedad de especies de interés agrícola como es la col, el nabo, el rábano, la mostaza, la rúcula, etcétera, de ahí el gran interés que suscita su estudio. Es autóctona de Asia, noroeste de África y Europa, predominando fundamentalmente en los bordes de los caminos y suelos secos que estén sin apelmazar – (*Proyecto Anthos, Universitat de Barcelona*).

Tiene las características de ser una planta anual, con un ciclo relativamente breve que dura menos de un año, y cuya altura puede llegar a valores de 10-30 cm sin incluir la raíz. Posee un tallo erecto cubierto por pelos ramificados que desaparecerán cuando nos acercamos a las inflorescencias; las hojas son simples, ovales o elípticas, con los bordes enteros, por lo que pueden diferenciarse en hojas basales y caulinares; posee flores hermafroditas que se componen de cuatro pétalos blancos que forman inflorescencias en racimos, situados en los extremos de las ramas o del tallo; tienen un fruto que es una silicua linear, que podemos encontrar en el interior de las flores y que tiene una forma cilíndrica, poco curvada y sin pelos, en cuyo interior puede albergar unas 30 semillas que se dispersarán por el viento cuando se abra la silicua madura - (*Blamey y Grey-Wilson, 1989*).

Por otro lado, *Arabidopsis thaliana* no es una especie de gran interés agrícola, pero proporciona importantes avances en la investigación básica llevados a cabo en las áreas de biología molecular y genética, debido al conocimiento que se tiene de la completa secuenciación de su genoma desde el año 2000, que está compuesto por 25498 genes. Es por ello que *Arabidopsis thaliana* es considerada como una especie modelo en investigación molecular, además de por tener mapas genéticos y físicos de sus 5 cromosomas, su ciclo de vida relativamente corto, su alta producción de semillas, su fácil mantenimiento en un medio de cultivo idóneo, la existencia de múltiples líneas mutantes, y la participación de numerosas instituciones y laboratorios interesados en mejorar su enfoque - (*Meyerowitz, 1989*).



**Figura 1.** *Arabidopsis thaliana* en el hábitat natural.  
*Proyecto Anthos/Universitat de Barcelona.*

## 2.2. Óxido nítrico (·NO)

El óxido nítrico o también hallado como monóxido de nitrógeno (·NO), es un gas inorgánico e incoloro, de pequeño tamaño, que tiene propiedades como la de ser un radical libre debido a la presencia de un electrón desapareado en su orbital externo, lo que nos indica su alta capacidad reactiva - (Stamler et al., 1992).

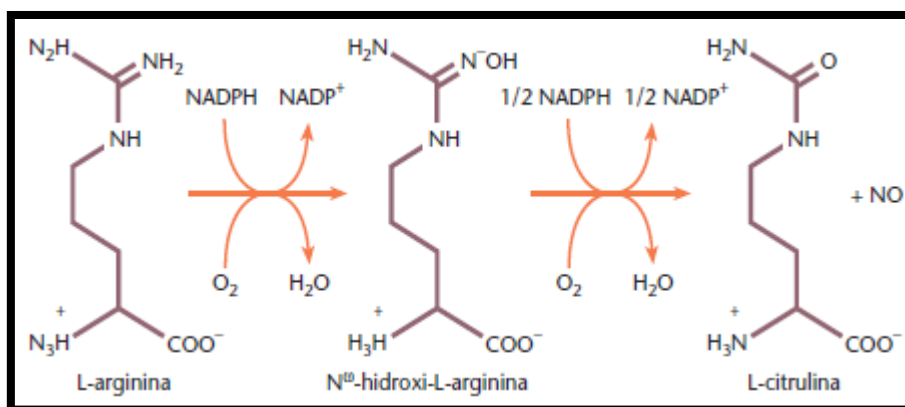


**Figura 2.** Molécula de óxido nítrico – (Centelles et al., 2004).

El ·NO presenta unos valores medios de vida significativamente pequeños que oscilan en torno a los 10 segundos, pudiendo ser soluble en agua y algo más soluble en solventes orgánicos, de ahí que pueda llegar a todas las zonas de la planta, desde la raíz hasta la parte más superficial, que dependiendo de la especie que se trate y el momento de su crecimiento, hablaremos de hojas o flores (frutos) - (Stamler et al., 1992; Hughes, 1999; Wojtaszek, 2000).

El ·NO es formado a partir de la oxidación del átomo de nitrógeno terminal del grupo guanidino del aminoácido L-arginina que dará L-citrulina y ·NO, gracias a la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Para que esta reacción tenga lugar, necesitamos también la presencia de calmodulina (CaM), un grupo hemo y 4 cofactores como son el flavín mononucleótido

(FMN), flavín adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobioptenina (THB) y de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) - (Palmer *et al.*, 1988).



**Figura 3.** Reacción de la óxido nítrico sintasa (NOS), que produce óxido nítrico y L-citrulina a partir de L-arginina – (Centelles *et al.*, 2004).

Es lógico que el óxido nítrico busque distintas conformaciones estructurales que sean energéticamente más favorables, existiendo 3 especies distintas en función de la ganancia o pérdida de un electrón, teniendo finalmente la formación de un anión nitrosilo ( $\text{NO}^-$ ) o catión nitrosonio ( $\text{NO}^+$ ), que tendrán composiciones físico-químicas distintas – (Astier *et al.*, 2011).

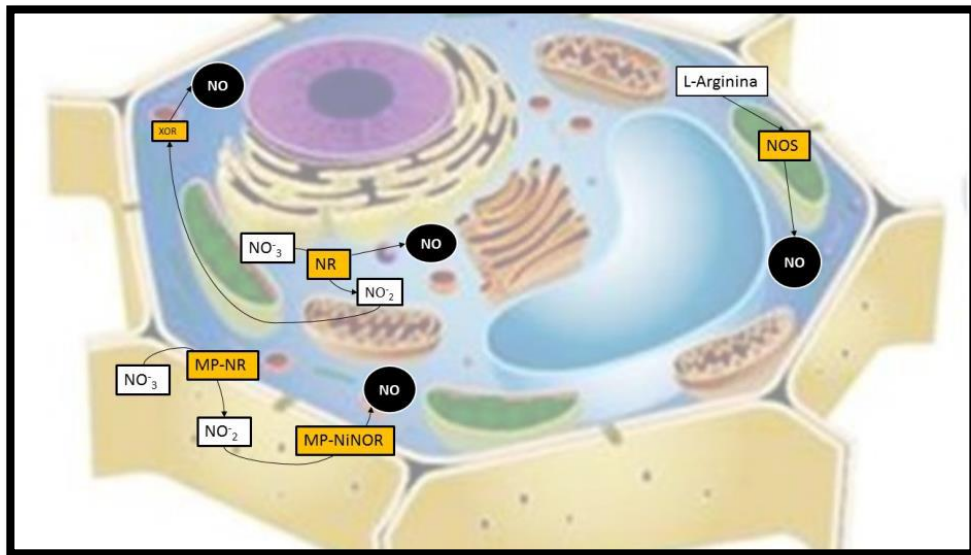
El óxido nítrico se encuentra en elevadas proporciones en tejidos en fase de crecimiento como es el eje embrionario y los cotiledones, teniendo por el contrario los niveles más bajos en órganos senescentes y maduros – (Beligni y Lamattina, 2001).

La producción de óxido nítrico en plantas puede desempeñarse por procedimientos enzimáticos y no enzimáticos.

Aquellos procedimientos no enzimáticos de producción de NO son la reducción de  $\text{NO}_2$  a NO se lleva a cabo con un pH ácido, reacciones que pueden verse beneficiadas si existen compuestos reductores como el ácido ascórbico o el glutatión - (Bethke *et al.*, 2004). O bien, mediante la reducción llevada a cabo por la luz solar que pasará el  $\text{NO}_2$  hacia la formación de NO en la que intervienen compuestos tales como los carotenoides - (Durner y Klessig, 1999).

Los procedimientos o vías enzimáticas de síntesis de óxido nítrico son los que proporcionan la mayoría de NO a la planta, y podemos visualizar las siguientes fases:

- Rutas dependientes de nitrito. En las plantas, el nitrito como norma general se reduce a amonio por la enzima nitrito reductasa (NiR) en la membrana plasmática, pero a su vez esta enzima está encargada de la producción de NO. Otra enzima que puede encargarse de la reducción del nitrito es la nitrato reductasa (NR), pero genera menos NO que la anterior, aunque éste está implicado en el cierre de los estomas, en la respuesta de la planta a sobre los agentes patógenos que inciden en ella, en la respuesta al estrés osmótico, y en el desarrollo de las flores o la inducción de raíces laterales. Por último, en el peroxisoma también se pueden encontrar otro tipo de enzimas como es la xantina-óxido-reductasa (XOR) que también puede reducir el nitrito a NO – (Godber *et al.*, 2000).
- Rutas dependientes de arginina. En plantas se genera L-citrulina a partir de L-arginina, mediante la acción de los cofactores presentes en la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) como son el FAD, FMN, BH<sub>4</sub>, calmodulina, Ca<sup>+2</sup>, oxígeno y NADPH, y que a partir de la generación de esa L-citrulina, se podrá obtener el NO. Ese NO formado actuará como molécula mensajera - (Corpas *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Síntesis enzimática de NO. NR:nitrato reductasa. XOR: xantina-óxido-reductasa. NOS: óxido nítrico sintasa de plantas.

### 2.2.1. Funciones fisiológicas del NO.

Tiene funciones tan importantes en la planta como son fomentar su desarrollo y crecimiento, inducir la germinación de la semilla, regular el metabolismo de la planta y su senescencia, inducir la muerte celular, regular el movimiento estomático, regular la fotosíntesis, desarrollar las flores y la dominancia apical, además de un largo etcétera – (Corpas, 2006).

Dependiendo de su concentración en la célula, puede tener efectos tóxicos o actuar como molécula señal - (Neill, 2003; Del Rio et al., 2004).

El NO actúa como molécula señal en múltiples procesos de carácter biológico, como cuando la planta lucha frente a situaciones de estrés o en la codificación de proteínas relacionadas con la transducción de señales, donde también puede interferir en la expresión de algunos genes que guardan una estrecha relación con el estrés oxidativo - (Begara-Morales et al., 2014).

Hay ejemplos de la función del NO como molécula señalizadora, como pueden ser su acción durante la inducción y desarrollo de la respuesta hipersensible de la planta en la interacción planta-patógeno - (Durner et al., 1998), su papel en el proceso de lignificación de la pared celular - (Hong et al., 2008), incluso su presencia aumenta el nivel de ácido salicílico (SA), que es una molécula señal de la resistencia sistémica adquirida (SAR) - (Klessig et al., 2000), por lo que, tanto el NO como el ácido salicílico tienen la potestad para inhibir de forma reversible la catalasa y la ascorbato peroxidasa, regulando así los niveles de peróxido de hidrógeno durante la respuesta de la planta a situaciones de estrés - (Clark et al., 2000). El NO activa a los genes de defensa (fenilalanina amonio liasa, PAL) y a proteínas relacionadas con la patogénesis en Arabidopsis. Está inmerso en las respuestas de defensa de la planta relacionadas con el ácido jasmónico - (Huang et al., 2004); lleva a cabo 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; y está relacionado con la muerte celular programada - (Neill et al., 2003).

A su vez, este gas presenta naturaleza lipofílica, por lo que es una buena molécula para atravesar las membranas celulares y de esta manera reaccionar con otras macromoléculas como proteínas, lípidos o ácidos nucleicos, desempeñando distintas funciones – (Corpas et al., 2009c, 2011).

Organismos como las plantas se encuentran afectados por los cambios que se producen en el medio ambiente, y al carecer de aparatos locomotores para poder desplazarse y huir de

dichos cambios que le perjudican, pueden ver afectado su desarrollo y crecimiento considerado como normal u óptimo – (*Tesis doctoral Juan Carlos Begara, 2011*).

Por tanto, se conoce como estrés a un conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que están presentes en un organismo a diferentes niveles con respecto a los observados en condiciones óptimas. En plantas, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, hay menos información sobre cómo el óxido nítrico genera estrés nitrosativo. Dicho estrés va a generar en la planta alteraciones en el metabolismo celular y la expresión génica, hasta cambios en el crecimiento y rendimiento de los cultivos, y todas estas respuestas van a depender de la edad de la planta, la especie, el genotipo, además de la duración e incidencia del estrés – (*Bray et al., 2000*).

El NO es una RNS muy reactiva, por lo que puede dañar y matar a las células de las plantas por diversos mecanismos como son 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 el ADN - (*Bundy et al., 2000*).

### **2.2.2. Modificaciones post-traduccionales por RNS .**

El óxido nítrico lleva a cabo su acción mediante modificaciones post-traduccionales (PTMs), tales como la S-nitrosilación de cisteínas y la nitración de tirosinas, triptófano y fenilalanina que pueden modificar la función de las proteínas diana - (*Astier y Lindermayr, 2012*).

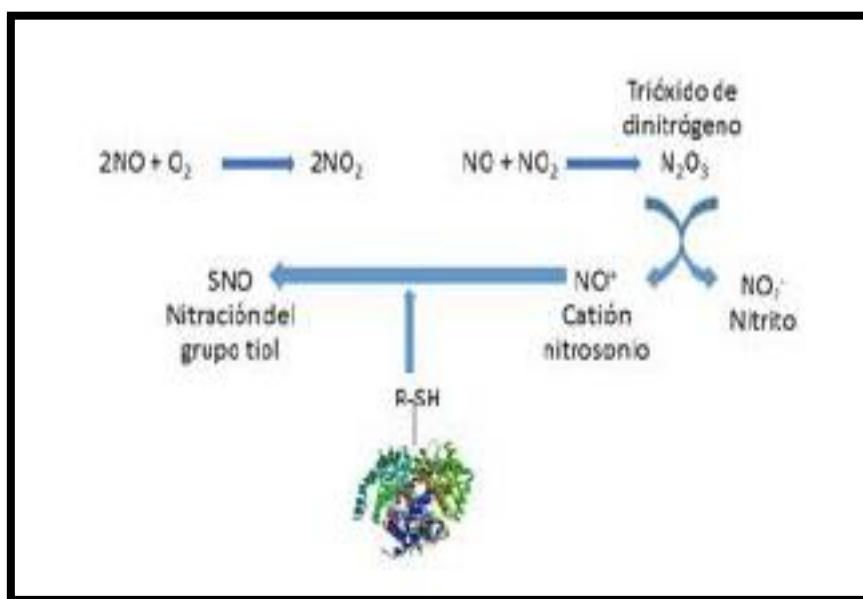
La S-nitrosilación de cisteínas es una PTMs que consiste en la adición de un grupo NO a un grupo tiol de un aminoácido de cisteína que llevará a la formación de un S-nitrosotiol (SNOs) distinto a la RNS de partida. Dicha modificación puede afectar a la función que la proteína tenía previamente, donde encontramos a quinasas, proteínas estructurales, proteasas, canales iónicos, factores de transcripción, entre otras - (*Hess et al., 2005; Astier et al., 2011*).

La S-nitrosilación de proteínas es una modificación post-traduccional reversible y específica que puede cambiar la función de las proteínas y, dependiendo de la orientación y distancia de los grupos tiol se pueden inducir o inhibir la formación de puentes disulfuro dentro o entre las proteínas. Todo este proceso es específico, ya que los residuos de cisteína que están implicados en la S-nitrosilación se sitúan entre aminoácidos básicos y ácidos - (*Lindermayr y Durner, 2009*).

En los sistemas animales, se ha demostrado que unos niveles de S-nitrosilación que no estén en un rango estimado como normal, pueden conducir a condiciones patofisiológicas,

padeciendo el individuo los efectos de un estrés nitrosativo – (Foster et al., 2003; Benhar et al., 2006), por tanto, se puede decir que la S-nitrosilación es un mecanismo regulador dominante de proteínas animales. En plantas hay pocos trabajos, pero sí que hay evidencias de que esta modificación post-traducciona juega un papel clave en dicha regulación.

El proceso de nitrosilación necesita 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 disociarán en cationes nitrosonios (NO<sup>+</sup>) que serán los artífices del ataque nucleofílico del grupo tiol de las proteínas - (Astier et al., 2011).



**Figura 5.** Mecanismo de S-nitrosilación de proteínas.

La regulación de la función de las proteínas mediante S-nitrosilación está inducida por aquellos mecanismos que controlan la adición como la eliminación en los grupos tiol de residuos de cisteína. Por tanto, la S-nitrosilación se induce por donadores exógenos de  $\cdot\text{NO}$  como por el  $\cdot\text{NO}$  endógeno, regulando la actividad de enzimas como las oxidoreductasas, proteasas, quinasas, fosfatasa, así como proteínas respiratorias y factores de transcripción – (Stamler et al., 2001).

Unos investigadores identificaron 63 proteínas S-nitrosiladas en un cultivo celular de *Arabidopsis* tratado con GSNO y 52 proteínas S-nitrosiladas en hojas de *Arabidopsis* tratadas con  $\cdot\text{NO}$ . Dentro de estas proteínas se encontraban aquellas que estaban relacionadas con el estrés, con el estado redox y aquellas que se encargaban del proceso de la señalización. Algunas enzimas encargadas de llevar a cabo la S-nitrosilación son la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y la metionina adenosil transferasa. Se estima que en torno al 60% de las

proteínas identificadas en plantas han sido registradas también en animales – (*Lindermayr et al., 2005*).

### **2.2.3. Papel del S-nitrosoglutation (GSNO).**

Los S-nitrosotioles (SNOs), y particularmente el S-nitrosoglutation (GSNO), tienen una gran relevancia en el metabolismo del  $\cdot\text{NO}$  porque pueden funcionar como un reservorio intracelular de  $\cdot\text{NO}$  y como un vehículo de  $\cdot\text{NO}$  a través de la célula y que ha sido recientemente identificado y cuantificado en plantas en condiciones fisiológicas y de estrés. Se conoce como el GSNO se moviliza, y lo hace a través del floema, por lo tanto, es considerado como un vehículo de  $\cdot\text{NO}$  a largas distancias, siendo muy importante en los mecanismos de señalización redox.- (*Leterrier et al., 2012*).

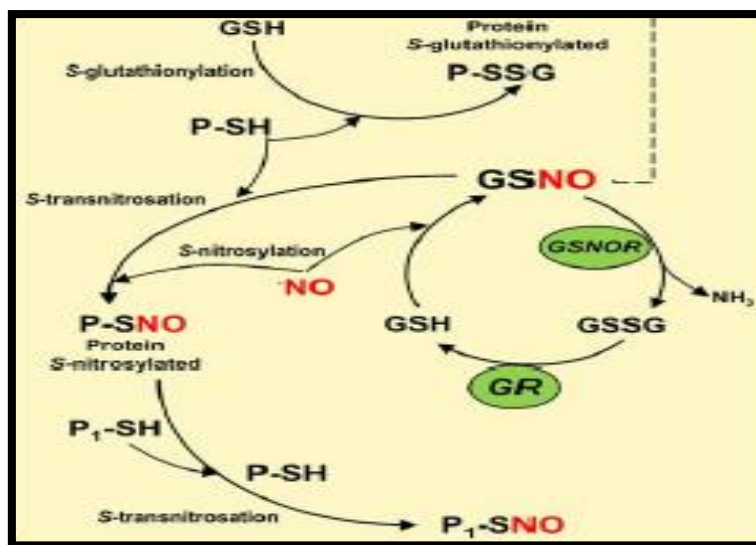
En este sentido, los SNOs pueden estar implicados en modificaciones post-traduccionales en la señalización celular bajo condiciones fisiológicas y de estrés, como salinidad, alta temperatura o daño mecánico. Además, se ha descubierto que el GSNO es una molécula que constituye una señal móvil indispensable para la bio-actividad del  $\cdot\text{NO}$  en las plantas - (*Valderrama et al., 2007; Chaki et al., 2011a; Chaki et al., 2011b; Begara-Morales et al., 2014*).

Los S-nitrosotioles (RSNOs) son metabolitos biológicos de  $\cdot\text{NO}$ , que se han formado por la reacción de  $\cdot\text{NO}$  con proteínas o componentes de carácter no proteico pero que presentan grupos sulfhidrilo. Estas RSNOs tienen la función de participar en reacciones biológicas de gran relevancia, entre las que se incluyen la liberación de  $\cdot\text{NO}$ , transnitrosación (transferencia de  $\cdot\text{NO}$  desde un nitrosotiol a un grupo tiol) y S-tiolación – (*Hogg, 2000; Stamler et al., 2003*).

Las condiciones ácidas como las presentes en los lisosomas y el espacio intermembranoso mitocondrial, incluso la acción de algunos metales de transición, pueden provocar la formación de RSNOs a partir de  $\cdot\text{NO}$  o nitritos – (*Zhang et al., 2005*).

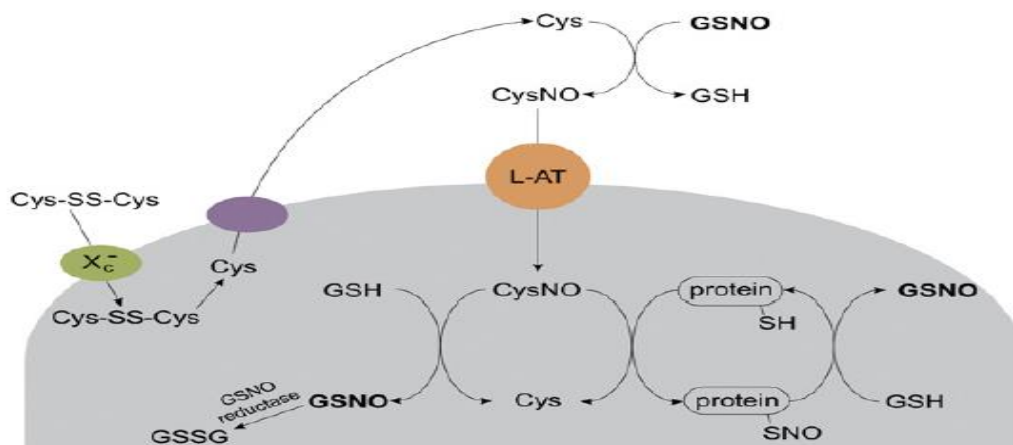
El  $\cdot\text{NO}$  in vivo tiene una vida media muy corta mientras que los S-nitrosotioles son más estables en disolución, de ahí que exista un gran interés en afrontar un estudio continuo sobre ellos. Los S-nitrosotioles tienen un papel intermediario en el metabolismo celular y en la actividad del  $\cdot\text{NO}$ , estando presentes en la regulación de la resistencia a la enfermedad cuando hay una interacción planta-patógeno. La mayoría de los S-nitrosotioles son inestables en soluciones acuosas, excepto el S-nitrosoglutation (GSNO), de ahí que se considere a este metabolito como el mejor medio de transporte y almacenamiento de  $\cdot\text{NO}$  en las células – (*Smith y Dasgupta, 2000*).

Un derivado del óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) como es el S-nitrosoglutation (GSNO), se ha formado tras el agrupamiento del  $\cdot\text{NO}$  con el glutathion reducido (GSH) en un proceso llamado como S-nitrosilacion. El GSNO es considerado como el S-nitrosotiol (SNO) más abundante con una baja masa molecular ( $336.32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Es además estable en oscuridad y en presencia de quelantes de iones metálicos en soluciones acuosas, pero factores como la luz, temperatura, pH, y algunos agentes reductores desencadenan su descomposición hacia  $\cdot\text{NO}$  y GSSG – (Corpas et al., 2013).



**Figura 6.** Modelo de metabolismo del GSNO con sus diferentes reacciones en la célula (Corpas et al., 2013).

El GSNO ha sido estudiado a nivel celular para ver qué efectos biológicos podía presentar. Se descubrió que el GSNO se descompone en el espacio extracelular, dejando al grupo  $\cdot\text{NO}$  separado del glutathion, que posteriormente será transportado dicho óxido nítrico mediante un transportador de aminoácidos L (L-AT), donde se producirá una transnitrosación con un S-nitrosotiol distinto de bajo peso molecular, denominado S-nitroso-L-cisteína (L-cysNO), siendo éste el sustrato ideal tras la ruptura previa del GSNO, para así poder adentrarse fácilmente por las membranas de las células donde se formará de nuevo GSNO o bien se generarán respuestas celulares – (Broniowska et al., 2013).



**Figura 7.** Transferencia del grupo ·NO en las células de plantas a partir de GSNO – (Broniowska et al., 2013).

Cuando se produce algún tipo de daño o toxicidad celular presente en la planta, se puede deducir que existe una mayor S-nitrosilación en comparación con los niveles estándar – (Valderrama et al., 2007).

### 2.3. Lipoxigenasas.

Las lipoxigenasas son una familia de enzimas que contienen hierro no hemínico (hierro de origen vegetal como son las legumbres, verduras de hoja verde, frutos secos, etcétera) que están distribuidas ampliamente en el reino vegetal y animal, encontrándose en más de 60 especies. Presenta diferencias en la relación de especificidad por el sustrato y producto, estando localizadas en las diferentes regiones intracelulares de las plantas, por lo que regulan sus funciones fisiológicas en casi todos los niveles – (Sanz et al., 1992).

En organismos tales como la patata, el tomate, la cebada, la espinaca o *Arabidopsis*, se ha encontrado una localización preferencial de la enzima dentro de los cloroplastos de la hoja o en el estroma – (Blée y Joyard, 1996).

El nombre original de las lipoxigenasa era conocido como caroteno oxidasa, y esto hacía referencia a su capacidad para oxidar carotenos u otros pigmentos. Lo mencionado se descubrió antes de saber las implicaciones que tenía con la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. Los productos intermedios que se forman en la reacción de hidroperoxidación de ácidos grasos, pueden ser a su vez capaces de oxidar otro tipo de compuestos de forma inespecífica, por lo que compuestos tales como la clorofila o los carotenoides pueden ser

afectados por ese potencial oxidante. Las lipoxigenasas por tanto pueden destruir esos compuestos y fomentar cambios de color en productos como el aceite – (Cohen et al., 1985).

La lipoxigenasa es un tipo de dioxigenasa que cataliza la incorporación de oxígeno molecular en moléculas que contengan un sistema Z,Z-1,4 pentadieno (sustrato específico de LOX). Se engloban en este sistema los ácidos grasos linoleico y linolénico. El oxígeno será incorporado en el ácido graso en la posición  $\omega$ -6 o  $\omega$ -10. El producto de la reacción es un hidroperóxido. Hay 3 métodos para medir la actividad de LOX – (Sanz et al., 1992):

- Medida del consumo de oxígeno mediante electrodo tipo Clark.
- Medida espectrofotométrica de la formación de dienos conjugados – (Axelrod et al., 1981).
- Cuantificación de los productos de reacción marcados que provienen de sustratos marcados radioactivamente con  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ , después de su separación mediante cromatografía en capa fina o líquida de alta presión.

Resulta complicado medir la actividad LOX debido a que los ácidos grasos presentan escasa solubilidad en agua. El pH óptimo es 5,5-7,0, a lo que suele añadirse sales amónicas, sódicas o potásicas, para que no se formen micelas. Además, existen inhibidores de LOX en extractos crudos tales como la clorofila – (Cohen et al., 1984) o  $\alpha$ -tocoferol – (Grossman y Waksman, 1984).

En el reino vegetal actúan 4 sistemas enzimáticos para la modificación oxidativa de los ácidos grasos:  $\alpha$ -oxidación,  $\beta$ -oxidación,  $\omega$ -oxidación y la ruta de la lipoxigenasa (LOX). El único de estos sistemas que presenta especificidad por el sustrato es el sistema LOX, siendo exclusivo para ácidos grasos poliinsaturados como son los ácidos grasos omega-3, donde se encuentra el ácido  $\alpha$ -linolénico (LnA), que alberga 18 átomos de carbono con 3 dobles enlaces carbono-carbono (es decir, sitios de insaturación) entre las posiciones 9, 12 y 15, si tomamos la posición 15 como el sitio de insaturación entre el carbono tercero y cuarto con respecto al extremo omega. Al tener tal cantidad de insaturaciones, podemos afirmar que es un ácido graso insaturado fácilmente oxidable, por lo que si se quiere comercializar un producto que lo lleve, necesita la adicción de antioxidantes (como la vitamina E), polifenoles, etc. Abajo podemos ver la fórmula química estructural del LnA - (Feussner y Wasternack, 2002):



Theorell en 1947 consiguió por primera vez purificar y cristalizar el enzima. Sin embargo, fue Chan en 1973 el investigador encargado de demostrar la presencia de un átomo de hierro por

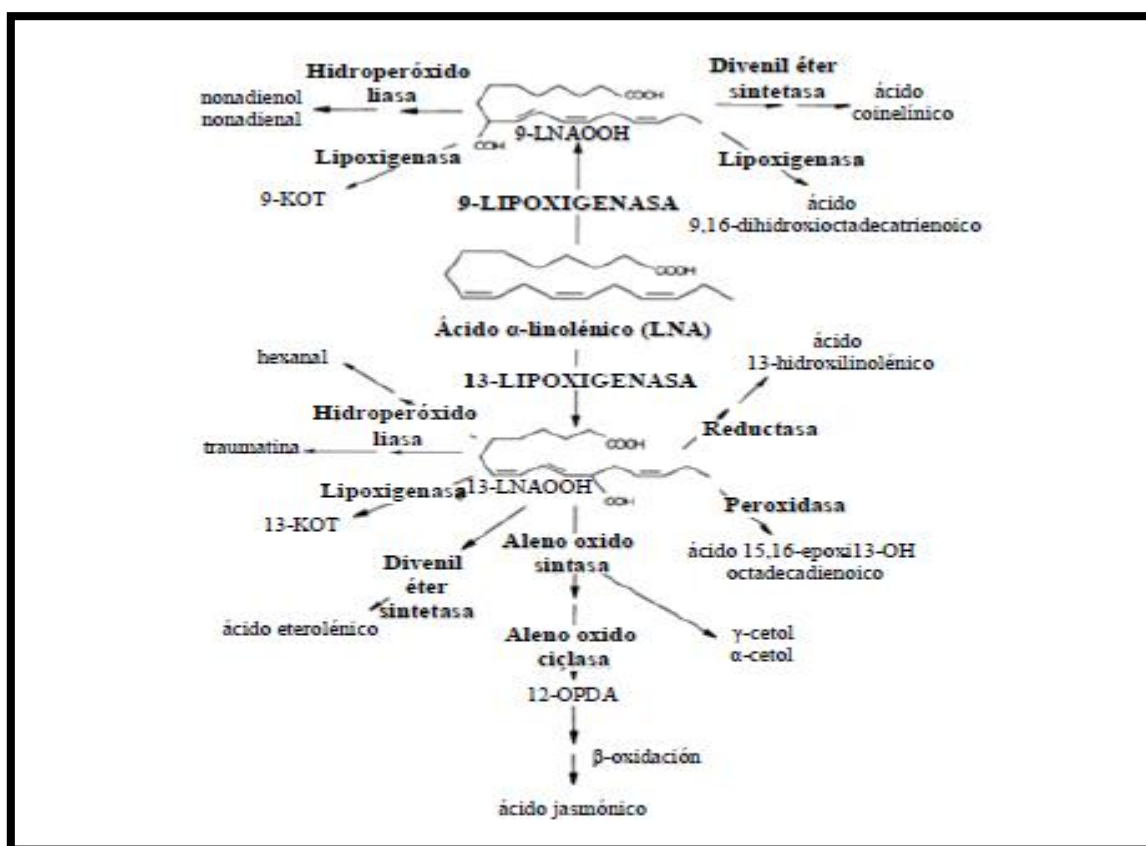
cada molécula de enzima (lipoxigenasa) – (Sanz *et al.*, 1992). Es ya en los años 90 cuando se lleva a cabo la determinación de las estructuras primarias de los isoenzimas LOX de soja (Shibata *et al.*, 1987, 1988).

### **2.3.1. Papel fisiológico de las lipoxigenasas.**

Las lipoxigenasas están implicadas en procesos como el desarrollo de la planta y la movilización de lípidos de reserva durante la germinación. A su vez actúan como proteínas de reserva durante el crecimiento vegetativo. Responden frente a diversos tipos de estrés, heridas, patógenos, etc, por tanto, las lipoxigenasas tienen un papel funcional activo durante toda la vida de la planta – (Feussner *et al.*, 2001).

Se estudió con interés la ruta de la lipoxigenasa (LOX) debido a sus implicaciones tecnológicas. Dicha ruta (Figura 8.) genera productos de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados como son las oxilipinas, habiendo una alteración lipídica. También sintetizan hidroperóxidos por otras enzimas como son la aleno óxido sintasa (AOS), la peroxigenasa (POX), la divenil éter sintetasa (DES) o la hidroperóxido liasa (HPL) – (Feussner y Wasternack, 2002).

Los productos generados a través de la ruta de la lipoxigenasa (Figura 8.) tienen una función general en respuesta a los requerimientos de la planta. Son hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados, que actuarían como intermediarios llave para un número de rutas divergentes. Con ello el sistema LOX en plantas y animales pueden asemejarse al paso de hidroperóxido (formado por LOX) hacia leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, traumatina y ácido jasmónico, por lo que guardan relación con el desarrollo de la planta y la resistencia frente a los patógenos – (Feussner y Wasternack, 2002).



**Figura 8.** Ruta de la lipoxigenasa (LOX).

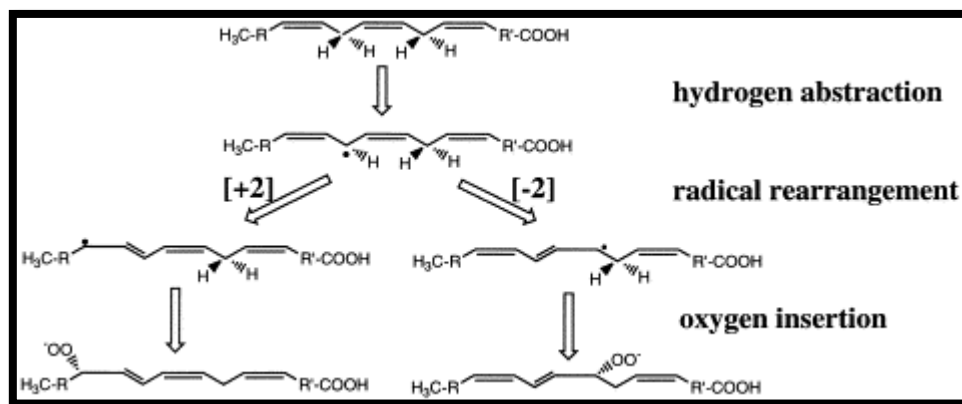
LOX en *Arabidopsis* está presente en raíces, cotiledones, hipocotilos, flores y hojas. Se conocen 6 isoenzimas de lipoxigenasas (At LOX1, At LOX2, At LOX3, At LOX4, At LOX5, At LOX6) que se van a clasificar en dos grupos (Figura 9.): 9-S-Lipoxigenasas (At LOX1 y At LOX 5) y 13-S-Lipoxigenasas (At LOX2, At LOX3, At LOX4, At LOX6), en función de si el ácido graso poliinsaturado se hidropoxida en el carbono 9 (formándose un 9S-hidroperóxido), o si se produce la reacción de hidropoxidación en el carbono 13 (formándose un 13S-hidroperóxido). Todo esto se ha demostrado mediante espectrometría y cromatografía de masas, además de que el grupo correspondiente a las 9-S-Lipoxigenasas muestra una oxigenación selectiva por el ácido linolénico.– (Bannenberg et al., 2008).

Se puede argumentar lo siguiente sobre los 2 grupos de lipoxigenasas:

1. Las enzimas 9-S lipoxigenasas (AtLOX 1 y 5), están envueltas en respuestas de defensas frente a bacterias, crecimiento, procesos de síntesis de ácido jasmónico (responde frente a un daño celular que se produzca en la planta), están implicadas en la formación de raíces laterales, en la oxidación lipídica, en la disociación de las membranas, en el proceso biosintético de oxilipinas (producen respuestas de estrés

tras estar en contacto con un agente patógeno o pesticida). Suelen localizarse en el citoplasma y los plastidios – (*The Arabidopsis Information Resource*).

2. Las enzimas 13-S lipoxigenasas (AtLOX 2,3,4 y 6) tienen como función la biosíntesis de compuestos volátiles de hojas verdes, a su vez también sintetizan el ácido jasmónico, está implicada en procesos redox, en la biosíntesis de oxilipinas, producen respuestas frente a organismos o condiciones meteorológicas que puedan conllevar un perjuicio para la salud de la planta (bacterias, hongos, herbívoros, sequía, heridas superficiales...). Se localizan en los cloroplastos (envoltura del cloroplasto, estroma, membrana tilacoidal...) y en el citoplasma – (*The Arabidopsis Information Resource*).



**Figura 9.** Reacción de la lipoxigenasa. A la derecha se ve un 9-S hidroperóxido y a la izquierda un 13-S hidroperóxido.

### 3. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo ha sido caracterizar la modulación funcional por nitrosilación de lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana* mediada por especies de nitrógeno reactivo como es el GSNO.

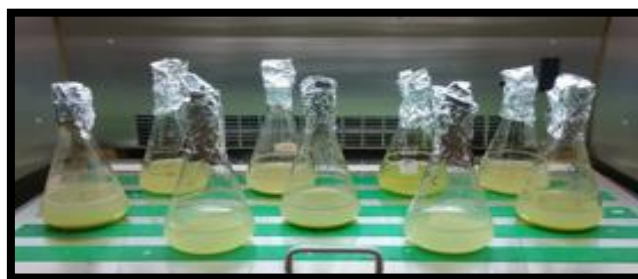
Para ello hemos establecido los siguientes objetivos parciales:

- Síntesis de sustrato de lipoxigenasa y GSNO.
- Estudio del efecto del GSNO sobre la actividad enzimática de la lipoxigenasa en *Arabidopsis thaliana*.
- Análisis de las secuencias de las isoenzimas de las lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana* mediante el programa Clustal Omega.
- Determinación de la nitrosilación en extractos de cultivo celular de *Arabidopsis thaliana* tratados con GSNO mediante el método del Biotin-Switch.

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

##### 4.1. Material vegetal: cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*.

Se utilizaron cultivos celulares en suspensión de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia, que se encontraban en una serie de matraces dispuestos por el grupo BIO-286 del área de bioquímica y biología molecular de la Universidad de Jaén.



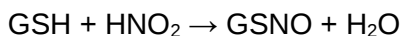
**Figura 10.** Matraces de cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* hallados en suspensión, dentro del incubador.

Las condiciones en las que estaban envueltos estos matraces fueron las siguientes: cada matraz llevaba 200 ml de un medio de cultivo JPL (JP y C, 1967), previamente autoclavado (121°C, 20 minutos), que es idóneo para el crecimiento celular con una serie de modificaciones (Axelos *et al.*, 1992), siendo la sacarosa la principal fuente de energía aprovechada por las células del cultivo. Los matraces estaban dispuestos en un incubador a una temperatura constante de 24 °C, en agitación continua a 120 rpm, y bajo iluminación blanca fotosintética (PAR, Photosynthetically Active Reaction) de  $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante las 24 horas del día.

Se procedió a subcultivar cada 7 días con una dilución del medio JPL de 1/20, y se pasaban a nuevos matraces que tenían 200ml de medio nuevo de cultivo en condiciones de máxima esterilidad en una campana de flujo laminar (Edificio A2 – Cultivos celulares vegetales - Universidad de Jaén), para así mantener al cultivo celular en unas condiciones óptimas. Este protocolo se repitió durante el tiempo que duró el proceso de elaboración práctica del trabajo, hasta obtener todos los resultados.

## 4.2. Síntesis de GSNO.

Al igual que ocurre con otros S-nitrosotioles, el GSNO puede sintetizarse a partir de la reacción entre GSH y ácido nitroso. Esta reacción es rápida, eficiente y tiene un alto rendimiento. Esta mezcla se coloreará enseguida hasta tomar una tonalidad rosada.



Hemos utilizado el siguiente método para formar GSNO 500 mM - (adapted from T.S. Hart, *Tetrahedron Letters* (1985) 26, 2013-2016).

### Reactivos

- Nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ , Sigma cat # S-3421)
- Glutation reducido (GSH, Sigma cat # G-6529)
- HCl concentrado
- NaOH 10N – 4 g. de NaOH en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$
- Probeta de 50 ml, agitador y una cubierta para mantenerlo alejado de la luz solar

### Protocolo

Va a generarse gas NO, por lo que todo el protocolo debe realizarse en una campana de extracción de gases. Tenemos los siguientes pasos:

- 1) Dentro de la probeta de 50 ml echamos 620  $\mu\text{l}$  de HCl, junto con 5,9 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Introducimos una mosca y agitamos la solución. Añadimos ahora 1,54 g de glutatión reducido (GSH).
- 2) Disolver en un tubo de microcentrífuga 0,346 g de  $\text{NaNO}_2$  en 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Agregamos esta solución al glutatión ácido que se ha formado en el paso 1 mientras se agita de manera continua. La solución tomará color rojizo y producirá burbujas. Dejamos incubando la solución resultante durante 5 minutos, procediendo a su cubrimiento para protegerla de la incidencia de la luz solar, debido a que el GSNO es muy sensible a la luz solar.
- 3) Intentar llevar el pH ácido hasta la neutralidad mediante la adición de NaOH 10N al 95%, por lo que se añadirán unos 710  $\mu\text{l}$  (no hay que generar un pH demasiado alcalino, porque de hacerlo de esta manera repercutiría en pérdidas de color en la

síntesis de GSNO, cosa que no nos interesa, porque habría que comenzar nuevamente con el protocolo).

- 4) La solución definitiva debemos llevarla a un volumen final de 10 ml de H<sub>2</sub>O. Tendríamos GSNO a una concentración estimada de 500 mM.
- 5) Repartiríamos dicho GSNO en alícuotas de 1 ml con la mayor celeridad posible para evitar el contacto directo con la luz solar. Después estas alícuotas podrían dividirse en otras de menor volumen como pueden ser de 150-200 µl, en eppendorfs opacos. Almacenamos todas las alícuotas a -80°C. Una vez que se descongela una alícuota de pequeño volumen, se recomienda no volver a introducirla en el congelador de 80°C, porque ha perdido propiedades.

La concentración de GSNO se determinó espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio UV-Visible (Varian) mediante el programa simple reads a una  $\lambda=335\text{nm}$ . El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de este compuesto es de  $0,92\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.3. Síntesis de ácido linolénico.**

Para la preparación del ácido linolénico (LnA) utilizado como sustrato se partió de 100 mg del ácido graso, que se emulsionaron con 3,57 ml de agua desoxigenada y 303 µl de Tween-20. Después se adicionan 200 µl de NaOH 2N y así se forman las sales sódicas, añadiendo agua desoxigenada hasta un volumen final de 35,71 ml para obtener una concentración final 10 mM en Tween-20 0,85% (v/v). Finalmente, se prepararon alícuotas de 1,5 ml bajo corriente de N<sub>2</sub> y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

#### **4.4. Obtención de extractos de cultivo celular.**

Cada 9 días se recogía una cantidad óptima de cultivo celular que solía ser de unos 150ml y se realizaban los siguientes pasos:

- 1) Pasamos los 150 ml de cultivo celular por un filtro de nailon, quedando totalmente escurrido, y posteriormente pesamos 10 g de extracto celular en seco. Se preparan una serie de morteros a los cuales se añade nitrógeno líquido para enfriarlos, evitando la desnaturalización de las enzimas y la reacción con cualquier agente contaminante.
- 2) Machacamos el extracto celular hasta dejar un polvo fino. Añadimos 2 ml de tampón de homogeneización (Tris-HCl 0,1M pH 7,5; Sacarosa 5%, PVPP 7%; TRITON x-100 0,05%; EDTA 0,1mM; PMSF 1mM; Inhibidor de proteasas 2%) por cada 1g de extracto celular (1g/2 ml tampón) y repartimos el contenido en distintos eppendorfs.
- 3) Centrifugamos a 13000 rpm, 10 minutos, 4°C. Recogemos el sobrenadante y volvemos a centrifugar en las mismas condiciones.

- 4) Cogemos el sobrenadante y procedemos a medir las proteínas mediante el método de Bradford (1976).

#### **4.5. Determinación de actividad enzimática.**

##### **4.5.1. Determinación de actividad lipoxigenasa.**

Medimos la actividad de las enzimas lipoxigenasas (formación de hidroperóxido) tras la obtención del extracto de cultivo celular de *Arabidopsis thaliana* tras 9 días del subcultivo (apartado 4.4).

Para ello se utilizó el espectrofotómetro Cary 50 Bio UV-Visible (Varian), mediante el programa kinetics, el cuál ajustamos a una longitud de onda óptima cuyo valor era  $\lambda=234\text{nm}$  según describe Axelrod *et al.* (1981), debido a la formación de dienos conjugados en la hidroxidación del ácido graso poliinsaturado, con un tiempo de medición que iba desde 0 hasta 1 minuto de duración para obtener el valor definitivo. Se utilizaba una cubeta de cuarzo de 2ml de capacidad, en cuyo interior se introdujeron los siguientes reactivos:

- 750  $\mu\text{l}$  de tampón de ensayo (Na-fosfato) 100mM pH 6.
- 15  $\mu\text{l}$  de ácido graso  $\alpha$ -linolénico (LnA) 10 mM 0,85% T.20
- 50  $\mu\text{l}$  de extracto de cultivo celular (*Arabidopsis thaliana*)

Una unidad de actividad LOX (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxido por min, siendo el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de este compuesto de  $25.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  - (Verhagen *et al.*, 1977).

##### **4.5.2. Determinación de actividad lipoxigenasa de extractos de cultivos celulares tratados con GSNO.**

Los extractos de cultivos celulares se incubaron a distintas concentraciones de GSNO (tabla 2 y 3) durante 30 minutos, RT (temperatura ambiente) y en oscuridad. Posteriormente se midió en cada una de las muestras la actividad lipoxigenasa espectrofotométricamente (apartado 4.5.1).

Dentro de esta sección, utilizamos dos controles negativos, uno llamado cPTIO 100mM (Carboxy-2-fenil-5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido), que es un secuestrador de NO, y otro llamado DTT 10mM (Ditiotreitol), encargado de revertir la nitrosilación. Se usaron a

distintas concentraciones (tabla 2 y 3) y se incubaron 30 minutos, RT (temperatura ambiente) y en oscuridad al igual que el GSNO.

#### **4.6. Determinación de proteínas.**

##### **4.6.1. Determinación de la concentración de proteínas del extracto mediante Bradford.**

Para determinar la concentración de proteínas totales presentes en el extracto de cultivo celular de *Arabidopsis thaliana*, vamos a realizar el método de Bradford (1976), para el cual hemos utilizado el espectrofotómetro Cary 50 Bio UV-Visible (Varian), con el programa simple reads, ajustándolo a una  $\lambda=595\text{nm}$  utilizando un blanco que llevaba 800  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  + 200  $\mu\text{l}$  de reactivo comercial de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Reagent).

Realizamos 3 diluciones de extracto de cultivo celular, cuya composición incluía 795  $\mu\text{l}$  de agua milli Q + 5  $\mu\text{l}$  de extracto. A todas las diluciones se les añadieron 200  $\mu\text{l}$  de reactivo comercial de Bradford y se procedió a incubarlas durante 10 minutos en el frigorífico para que se produjese la reacción.

Se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 0,6 mg/ml para elaborar la recta patrón.

##### **4.6.2. Determinación de cantidad de proteínas por BCA.**

Vamos a medir la cantidad de proteínas mediante la utilización del kit: Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Seguimos los siguientes pasos:

- 1) Preparar el reactivo BCA (ácido bicinconínico), donde en un tubo de 10 ml mezclaremos el Reagent A y el Reagent B que lleve el kit, en la siguiente proporción:

50  $\mu\text{l}$  Reagent A / 1  $\mu\text{l}$  Reagent B

Utilizamos una microplaca de 96 pocillos.

- 2) Preparar la recta patrón de BSA (Bovine Serum Albumin). El patrón de BSA que viene con el kit tiene una concentración de 2 mg/ml, por lo que ajustamos el volumen de BSA dependiendo de la concentración del stock.

| µg BSA | BSA µl | BCA (WR) µl |
|--------|--------|-------------|
| 0      | 0      | 200         |
| 1      | 0.5    | 200         |
| 2      | 1      | 200         |
| 5      | 2.5    | 200         |
| 10     | 5      | 200         |
| 15     | 7.5    | 200         |
| 20     | 10     | 200         |

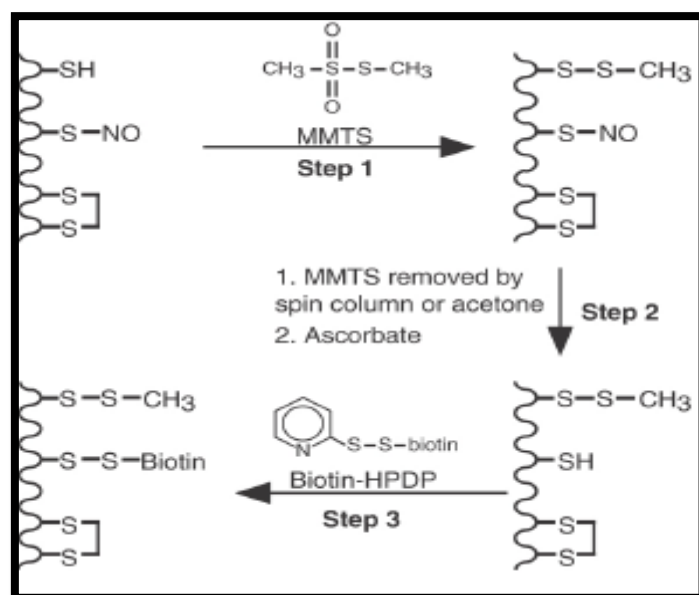
**Tabla 1.** Preparación de la recta patrón de BSA.

- 3) Preparar las muestras que se vayan a cuantificar. Si nuestra muestra está muy concentrada podemos realizar diluciones con buffer de lisis para no cambiar la composición que puede afectar a las medidas. Todas ellas van por duplicado en la placa, y cada una lleva 200 µl de WR (working reagent) + 8 µl de H<sub>2</sub>O + 2 µl de muestra.
- 4) Incubamos durante 30 minutos en una estufa a 37°C
- 5) Lectura de los valores de absorbancia en el lector de placas asociado al ordenador a una  $\lambda=562\text{nm}$ , mediante el programa XFluor4.
- 6) Interpolamos los valores obtenidos con los de la recta patrón.

#### **4.7. Detección de proteínas nitrosiladas mediante la técnica del biotin-switch.**

Con el objetivo de ver la nitrosilación de proteínas en los extractos de cultivo celular de *Arabidopsis thaliana* tras la incubación con GSNO, se llevó a cabo la técnica del biotin-switch.

Lo primero que va a ocurrir con gran importancia es el bloqueo de los tioles libres por el agente metiltiolador denominado como MMTS (metilmetanotiosulfonato). Después de bloquear los tioles libres, los enlaces de nitrosotiol se descomponen selectivamente mediante la adición de ascorbato sódico, que reducirá los nitrosotioles a tioles. Tras la formación de estos tioles, se harán reaccionar con biotina-HPDP, que es un reactivo de biotinilación específico de los grupos sulfhidrido. Finalmente, esas proteínas que han sido etiquetadas con biotina-HPDP pueden ser fácilmente detectadas por inmunoblotting con anticuerpos como la anti-biotina, seguido por una electroforesis bidimensional (SDS-PAGE) – (Jaffrey *et al.*, 2001).



**Figura 11.** Modelo esquemático de un ensayo Biotin-Switch.

#### 4.7.1. Tratamiento de los cultivos celulares.

Tras la obtención del extracto del cultivo celular (apartado 4.4.), hacemos el tratamiento con GSNO, donde también usamos 3 controles negativos que son: sin ascorbato, DTT y cPTIO, incubando las muestras durante 30 minutos, RT (temperatura ambiente). Los controles negativos se utilizaron en base a lo siguiente:

- El control sin ascorbato consistía en no adicionar ascorbato al tratamiento realizado en el ensayo de la técnica de biotin-switch, quedándose los nitrosotioles sin romper (paso 2 - figura 11), por lo que no estarían libres para unirse a la biotina (paso 3 – figura 11). El DTT es un agente reductor, por lo que los nitrosotioles que se formen van a desaparecer, y el cPTIO es un secuestrador de  $\cdot\text{NO}$ , por lo que impedirá la nitrosilación de cisteínas.

#### 4.7.2. Técnica biotin-switch

##### Reactivos biotin-switch

- 1) Neocuproína 0,1 mM (Neocuproína; etanol y  $\text{H}_2\text{O}$  en proporción 1:9).
- 2) HEN Buffer pH 7,7 (Hepes-NaOH 25mM; EDTA 1mM; Neocuproína 0,1 mM).
- 3) HENs Buffer pH 7,7 (Hepes-NaOH 25mM; EDTA 1mM; Neocuproína 0,1 mM; SDS 2,5%).

- 4) SDS 25%.
- 5) MMTS 6M (MMTS 2M 98%; DMF).
- 6) Ascorbato sódico 20mM.
- 7) Biotina- HPDP 4mM (Biotina; DMF)
- 8) GSNO 100mM

### **Protocolo Biotin-switch**

Trabajamos siempre en condiciones de oscuridad. Realizamos los siguientes pasos:

- 1) Tomamos 1mg/ml (X  $\mu$ l de muestra + tampón HEN hasta llegar a 900  $\mu$ l). Realizamos un triplicado de cada muestra.
- 2) Añadimos SDS 2,5%.
- 3) Añadimos MMTS 20mM.
- 4) Incubamos 20 minutos a 50°C, vorteadando de manera continua en un termoagitador.
- 5) Añadimos 2 volúmenes (2ml) de acetona fría en tubos de propileno e incubamos a -80°C o -20°C, durante 2 horas, para que precipiten las proteínas.
- 6) Centrifugamos a 10000g, durante 10 minutos a 4°C.
- 7) Lavamos el pellet con acetona fría para retirar el MMTS.
- 8) Secamos el pellet con corriente de N<sub>2</sub>.
- 9) Resuspendemos el pellet en 100  $\mu$ l tampón HENs/mg proteína.
- 10) Añadimos Ascorbato 1mM.
- 11) Añadimos 2mM Biotin.
- 12) Incubamos 1hora, RT (20°C), en oscuridad.
- 13) Añadimos 2 volúmenes (2ml) de acetona.
- 14) Incubar a -80°C.
- 15) Centrifugamos a 10000g, durante 10 minutos a 4°C.
- 16) Secamos el pellet con corriente de N<sub>2</sub>.
- 17) Resuspendemos el pellet en 100  $\mu$ l tampón HEN/mg proteína.

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

Vamos a realizar una técnica que consiste en someter el extracto de cultivo celular que contiene las proteínas a una electroforesis, para conseguir separarlas. Dicha electroforesis consta de 2 geles discontinuos de poliacrilamida que están formados por dos zonas bien diferenciadas: el gel concentrador y el gel separador.

Los geles de poliacrilamida se han formado por la polimerización de la acrilamida comercial, con ayuda de la adición del persulfato amónico (PSAM) y el TEMED. Y es usando este tipo de geles, cuando al aplicar un campo eléctrico, observamos como el complejo SDS-proteína migra hacia el ánodo (parte baja del gel) debido a su carga negativa.

Mediante las condiciones desnaturalizantes que posee este tipo de electroforesis, nos aseguramos de que las proteínas estén completamente dissociadas en sus correspondientes subunidades, sin formar agregaciones moleculares, y a su vez, nos permite separar dichas proteínas en base a su masa molecular debido a la selección de tamaños impuestos por los poros del gel.

Sabemos la masa molecular de nuestra proteína de interés al someterla a una electroforesis conjunta con proteínas de masas moleculares ya conocidas, siguiendo su patrón.

#### **Reactivos**

- Tampón gel concentrador (superior): Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.
- Tampón gel separador (inferior): Tris-HCl 1,5M, pH 8,8.
- Persulfato amónico (PSAM) 10%.
- TEMED 15 µl para 2 geles.
- Tampón de electroforesis: Tris-HCl 0,25M, pH 8,3; glicina 1,92M y SDS 1%.
- Acrilamida 30%; glicerol 50%; SDS 10%.

### **Preparación de los geles**

Se han utilizado geles con unas dimensiones de 6,5 x 8 cm, con 1 cm de grosor. El gel separador (inferior) se preparó al 10%.

Para poder realizar la electroforesis, se normalizó la cantidad de proteínas de cada muestra.

Posteriormente, 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.

Utilizamos el tampón de electroforesis anteriormente descrito en los reactivos, aplicando un voltaje de inicio de unos 100V, pasando a doblarse hasta los 200V cuando la muestra se encuentra por completo en el interior del gel separador.

Tras terminar la electroforesis se procedió a hacer un western-blot.

## **4.9. Western-blot.**

### **4.9.1. Transferencia semiseca de proteínas tras electroforesis.**

Después de realizar la SDS-PAGE, procedimos a transferir las proteínas que se encontraban en el gel hacia una membrana de PVDF, que tenía un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Immobilon-P, Millipore) y la recortamos con la dimensión de 6,5 x 8 cm, utilizando posteriormente un sistema de transferencia semiseco Trans-Blot SD (Bio-Rad).

### **Reactivos**

- Tampón de transferencia: CAPS 10 mM, pH 11 y metanol 10% (v/v).
- Solución de tinción de membranas: rojo Ponceau 0,1%

### **Técnica**

Primero se activaron las membranas durante 15 segundos con metanol 100% (v/v), después se llevaron a un cristizador donde había agua milli Q durante 2 minutos, para posteriormente equilibrarlas con tampón de transferencia (CAPS + metanol) en otro cristizador.

Se prepararon papeles Whatman nº3, que fueron cortados con las mismas dimensiones que tenía el gel, con un total de 6 papeles Whatman por cada gel (se ponen 3 papeles por debajo del gel y 3 por encima), y estos papeles resultantes, además del gel, se equilibraron con el mismo tampón de transferencia.

La transferencia se llevó a cabo en unas condiciones de intensidad de 1,5 mA/cm<sup>2</sup> de membrana (como las dimensiones eran 6,5 x 8 cm, aplicamos una intensidad de 0,078 A, para un gel).

Para dejar constancia de la eficacia del proceso de transferencia del gel a la membrana, éstas se tiñeron con rojo Ponceau de manera reversible, poniéndolas 10 minutos en un cristalizador con el colorante en continua agitación, procediendo a realizar múltiples lavados con agua milli Q para eliminar el fondo y contrastar así el correcto funcionamiento del Trans-Blot SD (Bio-Rad).

#### **4.9.2. Bloqueo e inmunodetección por quimioluminiscencia.**

La primera etapa de la inmunodetección trataba de bloquear la membrana para así evitar que los anticuerpos se unieran de manera inespecífica a la membrana.

##### **Reactivos**

- TBS 10x: Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y NaCl 100mM
- Tampón de bloqueo: BSA 1%, TBS 10x (1x), Tween 20 0,1%.
- Tampón de lavado: TBS 10x (1x), Tween 20 0,1%, agua milli Q.
- Tampón de revelado: Tris-HCl 50mM pH 8,6, NaCl 150mM.
- Solución 4-iodofenol: 100mg 4-iodofenol en 10 mL DMSO.
- Solución de revelado por quimioluminiscencia: se disolvieron 8 mg de luminol en 20 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,6. Justo antes de usarlo, se añadieron 3,2 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (v/v) y 200 µl de 4-iodofenol.

##### **Técnica**

Después del proceso de la transferencia, se lavaron las membranas con agua milli Q, y se sumergieron en un cristalizador, donde estaba el tampón de bloqueo, durante 3 horas en agitación vertical, a temperatura ambiente.

Después se procedió a dar el primer lavado a las membranas, con el tampón de lavado, durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se desechó el tampón de lavado antiguo por otro nuevo, y se dejó en agitación durante otros 30 minutos.

A continuación, las membranas se incubaron junto con el anticuerpo antineutrovidina (que reconocerá a la biotina que tiene cada proteína en la membrana, y se unirá a ella), durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo presentaba una dilución de 1/20000 en el tampón de lavado.

Posteriormente, las membranas se lavaron con tampón de lavado durante 1 hora (cada 30 minutos cambiamos el tampón de lavado antiguo por el nuevo), para eliminar ese exceso de anticuerpo que, finalmente, no se ha unido de manera específica a la proteína de interés.

Por último, se procede al revelado, donde las membranas se incuban durante 1 a 5 minutos junto a la solución de revelado por quimioluminiscencia, en la cámara oscura (por tanto, en condiciones de oscuridad). La reacción de quimioluminiscencia se genera cuando una reacción química produce energía, y ésta a su vez, emite luz. Se usa la peroxidasa de rábano (HRP) para catalizar la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, formando un compuesto intermediario activado, capacitado para emitir luz. Ahora, esa luz emitida puede incrementarse mediante la adición de 4-iodofenol, que actúa como transmisor de radicales de oxígeno al luminol. Por último, la emisión de luz producida por esta reacción se imprimirá en una película de autorradiografía tipo "Hiperfilm" (Amersham), que se pondrá en contacto directo con la membrana mediante un cassette de exposición (Kodak). Los tiempos de exposición variaron entre unos segundos hacia unos 20 minutos, dependiendo de la intensidad luminosa que finalmente se obtiene.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Alineamiento de lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana*.**

Realizamos el alineamiento de las 6 lipoxigenasas existentes en *Arabidopsis thaliana* con la finalidad de saber dónde se encontraban los residuos de cisteínas objeto de nuestro interés, y que posteriormente se iban a nitrosilar mediante la adición de GSNO.



```

AtLOX-1 TREELVESCTIIIWVASALHAAVNFGQYPVAGYLPNRPTISRQYMPKE--NTPEFEELEKNPDKVFLKTITAQLQTLLGISLIEILSTHS
AtLOX-5 TRDDLIETCTIIWIASALHAAVNFGQYPYAGFLPNRPTVSRFMEPE--GTDEYAELEEDADVAFLKTITPQLQTLLGISIIEILSMHS
AtLOX-2 TQDDLIGVVTIIAWVTSGHHAAVNFGQYGYGGYFPNRPTTIRIMPTEDPTDEALKEFYESPEKVLKTYPSQKQATLVMVTLDLLSTHS
AtLOX-6 TTQDLSQILTNIWIASGQHAAINFGQYPFGGYVPNRPTLLRKLIPE--TDPDYEMFMRNPQYSFLGSLPTQLQATKVMVQETLSTHS
AtLOX-3 TVDDLVSILTTLIWLASQAHAALNFGQYPYGGYVPNRPPLMRRLIPDE--SDPEYASFISHPEKYFSSMPSLAQTSKFMAVVDTLSTHS
AtLOX-4 TVEDLVSVITTTIWLASQAHAALNFGQYPYGGYVPNRPPLMRRLIPDE--SDPEFTSFIEDPQKYFFSSMPSLLQTTFMAVVDTLSTHS
      *      *
AtLOX-1 SDEVYLGQ--RDSKEWAAEKEALEAFEKFGKEVKIEKNIDERNDDETLNRTGLVKMPYTLLFPS-----SEGGVTGRGIPNSVSI
AtLOX-5 TDEIYLGQ--RDSPNWTADDEPLEAFKRFGKELELIENNIIRRNDKRFKNRTGPNIPYTLLYPNTTDYTREGGITGKGIPNSVSI
AtLOX-2 PDEEYIGE--QQEASWANEPVINAAFERFKGKLQYLEGVIDERNVNITLKNRAGAGVVKYELLKPT-----SEHGVTGMGVPYSISI
AtLOX-6 PDEEYLIELREVQRHWFQDEQVVKYFNKFSEELVKIEKTINERNKDKKLKNRTGAGMPPYELLPT-----SPHGVTGRGIPNSISI
AtLOX-3 PDEEYIGE-RQQPSIWTGDAEIVEAFYGFAAEIGRIEKEIEKRNADPDRNRCGAGVLPYELLVPS-----SEPGVTCRGVPNSVSI
AtLOX-4 PDEEYIGE-RQQPSIWTGDAEIVDAFYGFSAEIGRIEKEIDKRNDRPSRRNRCGAGVLPYELMAPS-----SEPGVTCRGVPNSVSI
      *

```

**Figura 12.** Alineamiento de las 6 lipoxigenasas existentes en *Arabidopsis thaliana*.

En amarillo se han marcado los residuos de cisteína que están presentes en un determinado nivel de la secuencia de las lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana*, que pueden ser susceptibles de llevar a cabo el proceso de nitrosilación.

Los aminoácidos señalados en rojo indican los dominios existentes en las diferentes lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana*, que están implicados en la afinidad por el sustrato y en la unión al oxígeno.

Se han marcado con un asterisco los 5 residuos esenciales que están conservados y cuya función está implicada en la unión al átomo del hierro por parte del centro activo de la enzima.

Mediante una flecha, se indica el residuo de Phe que desencadena la actividad de las enzimas 13-S lipoxigenasas, y mediante un rombo el residuo de Ala que determina la estereoespecificidad de las lipoxigenasas por el sustrato.

Se aprecia en color azul el péptido nitrosilado descubierto en la lipoxigenasa 2 - (Hu et al., 2015).

Por último, se ha enmarcado el dominio C-terminal, que está conservado en todas las lipoxigenasas.

## 5.2. Determinación de actividad lipoxigenasa en extractos de cultivos celulares tratados con GSNO.

Los extractos de cultivos celulares se incubaron a distintas concentraciones de GSNO y cPTIO (tabla 2 y 3) durante 30 minutos, y posteriormente se midió en cada una de las muestras la actividad lipoxigenasa espectrofotométricamente (apartado 4.5).

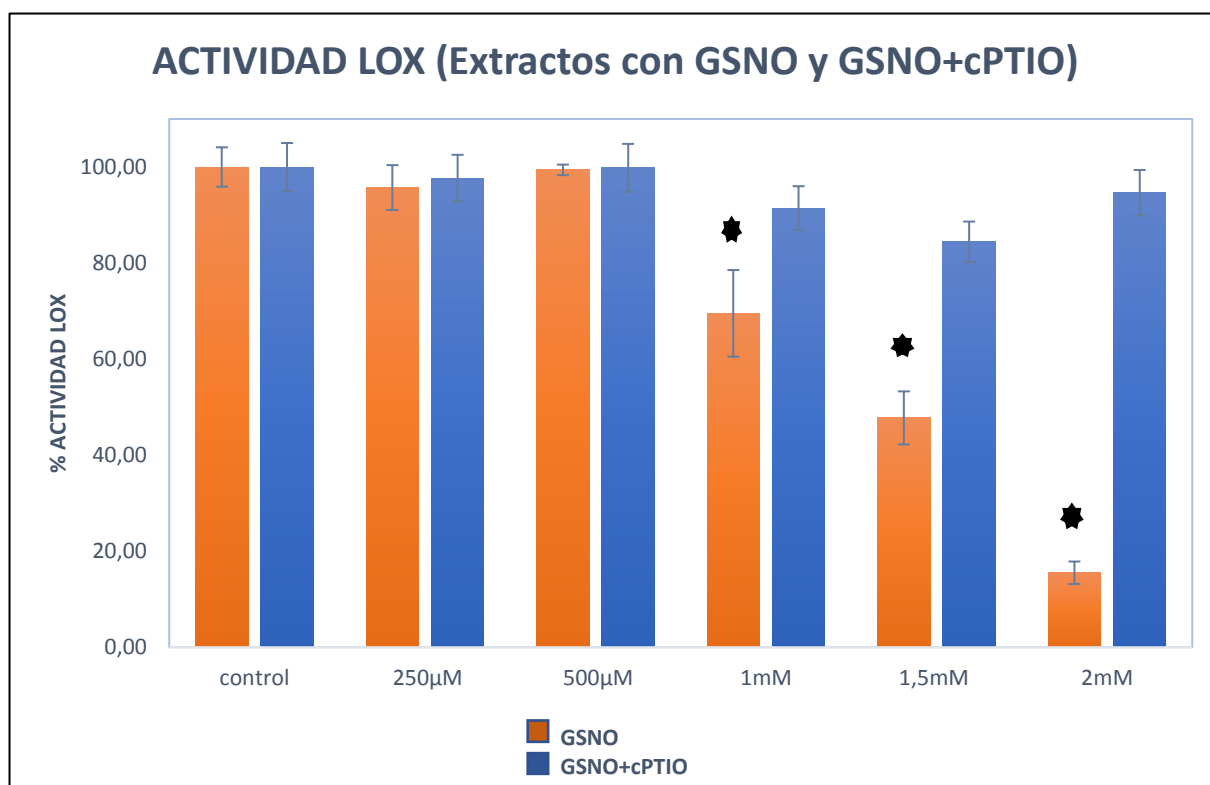
| Muestra 1 | Muestra 2     | Muestra 3     | Muestra 4      | Muestra 5      | Muestra 6      |
|-----------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Control   | 250µM<br>GSNO | 500µM<br>GSNO | 1000µM<br>GSNO | 1500µM<br>GSNO | 2000µM<br>GSNO |

**Tabla 2.** Diseño experimental para la determinación de actividad lipoxigenasa mediante la adicción de GSNO.

| Muestra 1 | Muestra 2                | Muestra 3                | Muestra 4                 | Muestra 5                 | Muestra 6                 | Muestra 7               |
|-----------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Control   | 250µM<br>GSNO +<br>cPTIO | 500µM<br>GSNO +<br>cPTIO | 1000µM<br>GSNO +<br>cPTIO | 1500µM<br>GSNO +<br>cPTIO | 2000µM<br>GSNO +<br>cPTIO | 2000µM<br>GSNO +<br>DTT |

**Tabla 3.** Diseño experimental para la determinación de actividad lipoxigenasa mediante la adicción de GSNO, cPTIO y DTT.

En la figura 13 observamos como a partir de un grupo control, donde hay un 100% de actividad lipoxigenasa equivalente a 80 mU/mg proteína, podíamos añadir especies reactivas de nitrógeno (como es el GSNO en este caso), para ver si ejercían algún efecto sobre la actividad de las enzimas.



**Figura 13.** Análisis del porcentaje de actividad de las lipoxigenasas de extractos de cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* tratadas con GSNO (color naranja) y GSNO + cPTIO(azul).

Cuando incrementábamos las concentraciones de GSNO en el extracto del cultivo celular se observaba una disminución de actividad lipoxigenasa, más concretamente, un 30,48% cuando se añadía GSNO 1mM, un 52,25% cuando se añadía GSNO 1,5mM y un 84,51% cuando añadimos GSNO 2mM, siendo estos resultados significativos (t de Student,  $p < 0,01$ ).

Procedimos a intentar revertir la actividad lipoxigenasa incluso en aquellos grupos donde el GSNO la disminuía notoriamente. Para ello, formamos los mismos grupos de GSNO con las mismas concentraciones, pero ahora añadimos a cada grupo cPTIO (tabla 3), que es un secuestrador de NO, y por tanto, impide la nitrosilación evitando la pérdida de actividad lipoxigenasa. Tal es así, que el grupo de GSNO 1mM mediante la adición de cPTIO ahora tiene un 91,43% de actividad. Caso parecido ocurre con el GSNO 1,5mM + cPTIO, que tiene una actividad de un 84,42%, acercándose notablemente a los controles. Lo mismo sucedió con la actividad del GSNO 2mM + cPTIO donde existía una actividad del 94,65%.

También se hizo una incubación simultánea con DTT 10mM, el cual es un reductor que impide la nitrosilación en la muestra de GSNO 2mM (la cual presentaba una pérdida de actividad del

84,51%), rompiendo los enlaces nitrosotiol y revirtiendo prácticamente al 100% la actividad lipoxigenasa.

### 5.3. Determinación de la nitrosilación de proteínas en extractos de cultivos celulares tratados con GSNO.

Los extractos de cultivos celulares que se obtuvieron (apartado 4.4), se trataron con distintas concentraciones de GSNO, y se introdujeron 3 controles negativos que fueron: sin ascorbato, DTT y cPTIO (tabla 4). Se incubaron durante 30 minutos, RT (temperatura ambiente).

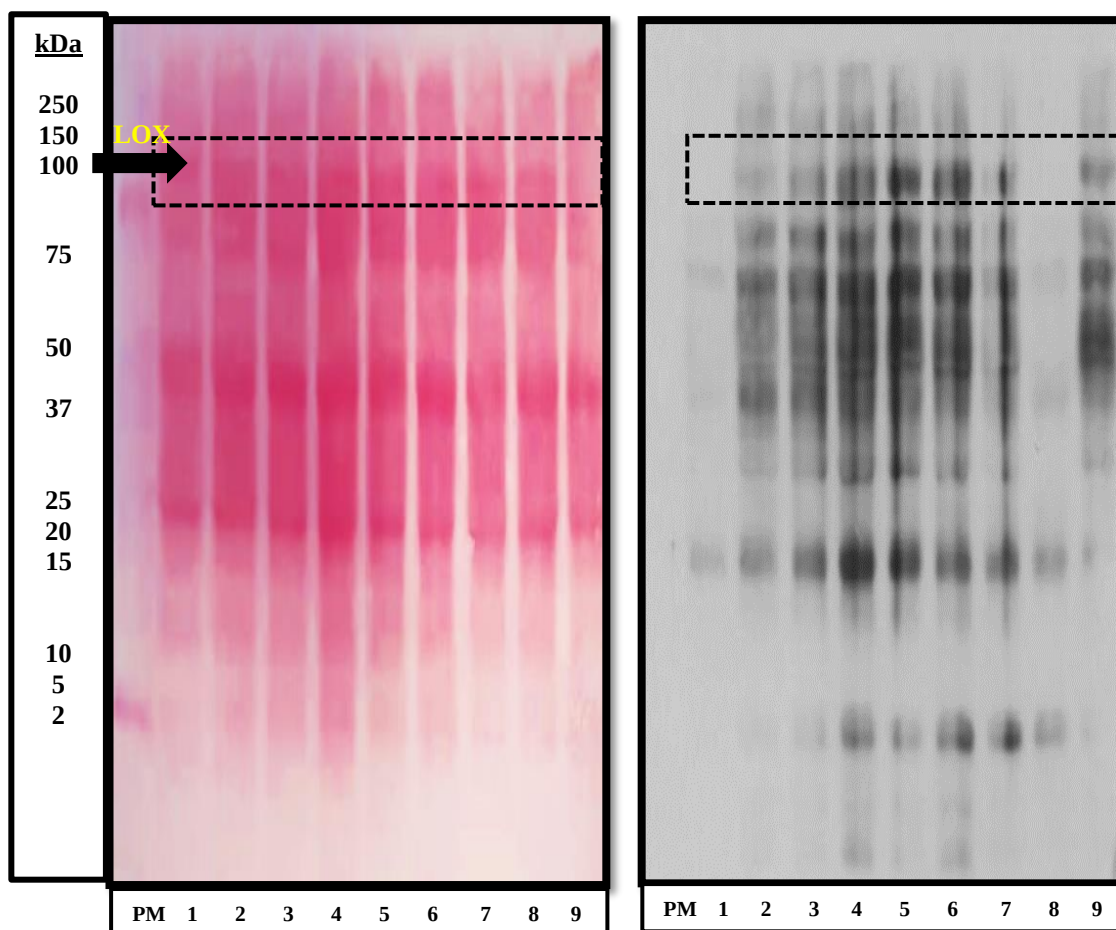
| Pocillo 1 | Pocillo 2  | Pocillo 3  | Pocillo 4   | Pocillo 5   | Pocillo 6   | Pocillo 7                   | Pocillo 8         | Pocillo 9           |
|-----------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------------|-------------------|---------------------|
| Control   | 250µM GSNO | 500µM GSNO | 1000µM GSNO | 1500µM GSNO | 2000µM GSNO | 2000µM GSNO (Sin ascorbato) | 2000µM GSNO (DTT) | 2000µM GSNO (Cptio) |

**Tabla 4.** Composición de cada pocillo del gel.

En la figura 14 observamos el patrón de proteínas totales (izquierda) y la nitrosilación (derecha) en el tratamiento de extractos de cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* de 9 días (tabla 4), donde cargamos 5µg de proteínas de cada una de las muestras en cada pocillo de unos geles que tenían un gradiente del 10% de acrilamida.

En las muestras 1, 2 y 3, donde tenemos respectivamente el control, 250 y 500µM de GSNO, se observa como presentan una baja nitrosilación.

En las muestras 4, 5 y 6, donde tenemos respectivamente 1000, 1500 y 2000 µM de GSNO, hay mayor intensidad en las bandas debido a una mayor concentración incidente de GSNO, que ha nitrosilado más cantidad de proteínas. En las calles 7, 8 y 9, donde se encontraban los 3 controles negativos con 2000 µM de GSNO, puede vislumbrarse un menor contraste en las bandas, por lo que han reducido de forma considerable la nitrosilación con respecto a la muestra 6.



**Figura 14.** Membrana teñida con rojo Ponceau (izquierda) y película de autorradiografía tipo “Hiperfilm” (Amersham) obtenida tras la inmunodetección (derecha).

En nuestro caso, el interés más inmediato se encontraba en localizar en el gel aquellas proteínas que tengan un peso molecular en torno a 100 kDa, ya que las lipoxigenasas se encuentran a ese nivel (90-110 kDa).

Como puede observarse, hay una correlación entre la pérdida de actividad observada a medida que se aumenta la concentración de GSNO y la cantidad de proteínas nitrosiladas en el rango de tamaño de las lipoxigenasas (Figura 13 y 14).

## 6. DISCUSIÓN

La modificación post-traducciona (PTM) denominada como S-nitrosilación tiene actualmente gran relevancia en los procesos de señalización celular y regulación funcional de proteínas.

La nitrosilación de cisteínas es una PTMs que consiste en la adición de un grupo  $\cdot\text{NO}$  a un grupo tiol de un aminoácido de cisteína que llevará a la formación de un S-nitrosotiol (SNOs). Dicha modificación puede afectar a la función que la proteína tenía previamente, donde encontramos a quinasas, proteínas estructurales, proteasas, canales iónicos, factores de transcripción, entre otras - (Hess *et al.*, 2005; Astier *et al.*, 2011).

Es una PTM reversible y específica que puede cambiar la función de las proteínas y, dependiendo de la orientación y distancia de los grupos tiol se pueden inducir o inhibir la formación de puentes disulfuro dentro o entre las proteínas - (Lindermayr y Durner, 2009).

Con el objetivo de profundizar en esta modificación post-traducciona, elegimos un sistema que estuviese implicado en el crecimiento de la planta y en el mantenimiento de su homeostasis frente a cualquier situación de estrés, por lo que las enzimas lipoxigenasas cumplieran estas características, estando presentes en las células de una planta modelo como es *Arabidopsis thaliana*.

La lipoxigenasa es un tipo de dioxigenasa que cataliza la incorporación de oxígeno molecular en moléculas que contengan un sistema Z,Z-1,4 pentadieno como es el ácido linolénico. Los productos generados son hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados, que actuarían como intermediarios llave para un número de rutas divergentes.

Como agente nitrosilante utilizamos una especie de nitrógeno reactivo como es el S-nitrosoglutation (GSNO), que es considerado como un reservorio de  $\cdot\text{NO}$  intracelular en la planta, además de ser el S-nitrosotiol (SNO) más abundante con una baja masa molecular. Es estable en oscuridad y en presencia de quelantes de iones metálicos en soluciones acuosas, pero factores como la luz, temperatura, pH, y algunos agentes reductores desencadenan su descomposición hacia  $\cdot\text{NO}$  y GSSG – (Corpas *et al.*, 2013).

Se detectó un péptido nitrosilado en la lipoxigenasa 2 de *Arabidopsis thaliana* (señalado en azul en la figura 12.), por lo que esta premisa justifica el papel desencadenante de la acción de las RNS como el GSNO en las modificaciones post-traduccionales que se producen en las lipoxigenasas – (Hu et al., 2015).

En este trabajo, postulamos que los residuos de cisteína, identificados como diana de nitrosilación, presentan una funcionalidad que afecta a la actividad enzimática de las lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana*. La disminución en la actividad enzimática observada tras el tratamiento con GSNO en las lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana* puede justificarse debido al estrés nitrosativo a la están siendo sometidas, existiendo mayor nitrosilación con respecto a valores estándar.

El análisis de estos resultados indica que la nitrosilación de lipoxigenasas por GSNO puede constituir un mecanismo de control de la actividad de esta enzima, implicando modificaciones en el crecimiento de la planta.

## 7. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden deducir tras este estudio son las siguientes:

- La nitrosilación en lipoxigenasas de *Arabidopsis thaliana* provoca una disminución gradual de su actividad, dependiente de la concentración de GSNO.
- Hay una correlación entre la pérdida de actividad observada a medida que se aumenta la concentración de GSNO y la cantidad de proteínas nitrosiladas en el rango de tamaño de las lipoxigenasas.
- El patrón de nitrosilación de proteínas detectado nos indica que la incidencia más pronunciada del GSNO sobre las proteínas se produce cuando está a concentraciones comprendidas entre 1mM y 2mM, donde a partir de esta última concentración las proteínas se encuentran ya en su punto máximo de estrés nitrosativo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA.

- Astier J., Lindermayr C. (2012). Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *Institute of Biochemical Plant Patology* 13: 15193-208.
- 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.
- Axelrod, B.C., Cheesbrough, T.M., Laasko, S.L.(1981). Lipoxygenase from soybean. *Methods in Enzymology* 71: 441- 451.
- Bannenberg G., Martínez M., Hamberg M., Castresana C. (2008). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids* 44: 85-95.
- 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 RNAseq 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.
- Benhar M., Forrester M.T., Stamler J.S. (2006). Nitrosative stress in the ER: a new role of S-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *ACS Chemical Biology* 1: 355-358.
- 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.
- Blée E., Joyard J. (1996). Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant physiology* 110: 445-454.
- 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.
- Broniowska K.A., Diers A.R., Hogg N. (2013). S-nitrosoglutathione. *Biochimica et biophysica acta* 1830: 3173-3181.
- 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.
- Centelles J.J., Esteban C., Imperial S. (2004). Óxido nítrico. *Offarm* 23: 96-102.
- 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.
- Chaki M. (2007). Función de las especies de nitrógeno reactivo en la modulación de la respuesta de plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) frente a procesos de estrés biótico y abiótico. Tesis, Uni. Jaén. España.
- 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.
- Cohen J.D., Goldenthal M.J., Buchferer B., Marmur J. (1984). Mutational analysis of the MAL 1 locus of *Saccharomyces*: identification and functional characterization of three genes. *Molecular & General Genetics* 196: 208-16.
- Corpas F. J., Barroso J. B. y del Río 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., Leterrier M., Barroso J.B. (2009c). Protein tyrosine nitration. A new challenge in plants. *Plant Signal. Behav.* 4:10,1-4.
- 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.
- Corpas F.J., Alché J.D., Barroso J.B. (2013). Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in plant science*.
- Del Río 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: 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.

- Feussner I., Wasternack C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual review of plant biology* 53: 275-97.
- Feussner I., Kühn H., Wasternack C. (2001). Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends in plant science* 6: 268-73.
- Foster M.W., McMahon T.J., Stamler J.S. (2003). S-nitrosylation in health and disease. *Trends in molecular medicine* 9: 160-168.
- 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.
- Grossman S., Waksman E.G. (1984). New aspects of the inhibition of soybean lipoxygenase by  $\alpha$ -tocopherol. Evidence for the existence of a specific complex. *Int. J. Biochem.* 16: 281-289.
- Hess D.T., Matsumoto A., Kim S.O., Marshall H.E., Stamler J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6: 150-66.
- Hogg N. (2000). Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free radical biology & medicine* 28: 1478-86.
- 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.
- Hu J., Huang X., Chen L., Sun X., Lu C., Zhang L., Wang Y., Zuo J. (2015). Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 167: 1731-46.
- Hughes, M.N. (1999). Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1411: 263-272.
- Jaffrey S.R., Snyder S.H. (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* 2001: pl1.

- Jp J., C, P. (1967). Growth and synthesis of proteins in cell suspensions of a kinetin dependent tobacco. *Physiologia Plantarum* 20, 834-&.
- 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.
- 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.
- Lindermayr C., Durner J. (2009). S-Nitrosylation in plant: pattern and function. *J Proteomics*. 73, 1-9.
- Mata-Pérez C., Sánchez Calvo B., Padilla M.N., Begara-Morales J.C., Valderrama R., Corpas F.J., Barroso J.B. (2017). Nitro-fatty acids in plant signaling: new key mediators of nitric oxide metabolism. *Redox biology* 11: 554-561.
- Meyerowitz, E.M. (1989). Arabidopsis, a useful weed. *Cell* 56, 263-269.
- Neill, S.J., Desikan R., Hancock J.T. (2003). Nitric signalling in plants. *New Phytol* 159: 11-35.
- Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.
- Prescott S.M. (1999). A tematic series on oxidation of lipids as a source of messengers. *Journal of Biological Chemistry* 274: 22901.
- Sanz L.C., Pérez A.G., Olías J.M. (1992). La lipoxigenasa en el reino vegetal. I. Propiedades. *CSIC. Vol.43 Fasc.4*.
- Shibata D., Steczko J., Dixon J.E., Hermodson M., Yazdanparast R., Axelrod B. (1987). Primare structure of soybean lipoxygenase-1. *The journal biological chemistry* 262: 10080-5.
- Shibata D., Steczko J., Dixon J.E., Andrews P.C., Hermodson M., Axelrod B. (1988). Primare structure of soybean lipoxygenase-2. *The journal biological chemistry* 263: 6816-21.

- Smith J.N., Dasgupta T.P. (2000). Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by l-ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric oxide* 4: 57-66.
- Stamler J.S., Taber R.L., Califf R.M. (2003). Translation of academic discovery into societal benefit: proposal for a balanced approach-part 1. *Am. J. Med.* 115:596-599.
- Stamler J.S., Singel, D.J., and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902.
- Stamler J. S., Lamas S. y Fang F. C. (2001). Nitrosylation the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106(6): 675.
- 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.
- Wojtaszek, P. (2000). Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry* 54, 1-4.
- Zhang Y., Keszler A., Broniowska K.A., Hogg N. (2005). Characterization and application of the biotin-switch assay for the identification of S-nitrosated proteins. *Free radical biology & medicine*. 38: 874-81.

## **9. RESUMEN DE ASIGNATURAS DEL MÁSTER.**

### **Seguridad en el Laboratorio y bioética.**

Este curso nos ha mostrado la continua exposición a una gran variedad de riesgos a los que estamos sometidos cuando trabajamos en un laboratorio. Se ha llevado a cabo una visión de la legislación y prevención de riesgos laborales de forma general. Y se han estudiado los diferentes tipos de riesgo, entre los que podemos encontrar: biológicos, químicos, electromagnéticos, físicos y eléctricos. A su vez, se ha estudiado la normativa sobre experimentación humana y animal y el comité de bioética al que están sometidos, donde hemos procedido a redactar una solicitud para el comité de bioética, para trabajar con un determinado organismo que lo requiera. Los contenidos abordados en este curso se han visto reforzados por la impartición de una serie de charlas llevadas a cabo por profesionales de diferentes entidades, mostrándonos la importancia de adquirir las competencias anteriormente mencionadas y su aplicación desde los conceptos teóricos aprendidos durante el curso.

### **Proteómica, genómica, bioinformática y biología de sistemas.**

En este curso se han estudiado diferentes aplicaciones informáticas que son muy útiles para cualquier estudio biológico. Se han estudiado varias bases de datos donde podíamos encontrar artículos publicados, información de un gen específico de interés, proteínas, etc. (ensembl, NCBI, genamics, genome, genecard, etc). También hemos analizado secuencias mediante los programas (Bioedit, FASTA, BLAST, CLUSTAL, etc). Finalmente, se visualizaron análisis de microarrays para comprender el estudio genómico desde el punto de vista de la biología de sistemas.

### **Regulación génica e ingeniería genética avanzada.**

En este curso profundizamos en la metodología que permite modificar células genéticamente, organismos diversos o plantas y mediante el cual se adquirirán las competencias de realizar en el laboratorio clonación de genes en vectores de expresión, saber aplicar la ingeniería genética a la mejora animal y vegetal, conocer los últimos avances en la tecnología de genotipación y secuenciación, y el desarrollo para manejar bibliografía y documentación científica en inglés así como desarrollar una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados. Para ello, se trató la base conceptual del conjunto de técnicas,

se abordó su aplicación a la clonación y la obtención de organismos modificados genéticamente y se dio a conocer sus aplicaciones en biotecnología y biomedicina.

### **Técnicas avanzadas en biología celular.**

En este curso conocimos de primera mano el fundamento y manejo de los distintos tipos de microscopios y su aplicación en los diferentes campos de la investigación, así como los métodos más usados para capturar y tratar las imágenes salientes de él, mediante el programa ImageJ. Vimos las diferentes técnicas y aplicaciones biomédicas que pueden darse en cultivos de células animales, sus ventajas y sus desventajas, así como los procesos de diferenciación in vitro de células madre embrionarias.

### **Técnicas de purificación y análisis de proteínas y metabolitos.**

En este curso tuvimos una visión amplia de la metodología de producción, purificación, análisis y caracterización de proteínas nativas y recombinantes, y de metabolitos, con sus correspondientes aplicaciones.

Se vio también como se producían proteínas de manera masiva mediante ADN recombinante. A su vez, se estudiaron las diferentes técnicas de identificación y cuantificación de proteínas en muestras complejas.

Por último, se determinaron parámetros físico-químicos y se realizó una caracterización cinética de enzimas. Se usaron técnicas de determinación de metabolitos.

### **Citogenética molecular y clínica.**

Este curso a nivel teórico nos ayudó a realizar estudios avanzados sobre como se organizan los cromosomas, a cómo usar las técnicas adecuadas para estudiar los cromosomas cuando están en metafase, y a ver mutaciones cromosómicas numéricas y estructurales. Se analizó la citogenética humana.

A nivel práctico se obtuvieron preparaciones cromosómicas a partir de cultivos celulares. Se realizaron bandeos cromosómicos, microdisecciones cromosómicas e hibridaciones in situ.

### **Patología molecular y celular.**

Este curso estaba enfocado a iniciarnos en el conocimiento de la etiología molecular de las enfermedades y en la aplicación de dicho conocimiento al diagnóstico y tratamiento de las mismas para alcanzar competencias tales como conocer en profundidad las bases moleculares de la enfermedad y la aplicación de la biología molecular en el diagnóstico y tratamiento, para conocer los principios de la terapia génica. Además, para la completa asimilación de tales competencias y, para desarrollar una capacidad crítica y argumentativa así como saber utilizar bibliografía y documentación y diferentes bases de datos, se llevó a cabo análisis de trabajos de investigación y la defensa de sus resultados. Para la completa comprensión y el enfoque clínico de este curso se impartieron charlas donde se nos dio un enfoque clínico de la terapia del cáncer.

### **Biología molecular de enfermedades infecciosas.**

En este curso comprendimos a nivel microbiológico cómo estamos expuestos a una amplia gama de enfermedades provocadas por microorganismos que son perjudiciales a la hora de interactuar con nuestro organismo. Estos podían estar presentes en los alimentos, en el suelo, en el aire, o bien, estar presentes en otros organismos pero que su transmisión al humano era una realidad, por lo que se llevó a cabo un estudio exhaustivo a nivel parasitológico de diferentes especies involucradas en enfermedades humanas principalmente.

### **Estrés celular.**

En este curso se impartieron nociones sobre las funciones biológicas de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) y del oxígeno (ROS), su reactividad bioquímica y enzimología, la producción de radicales de nitrógeno y oxígeno en situaciones de estrés, la metodología para la detección de estos radicales libres y la realización de diseños experimentales que permitan evidenciar diferentes comportamientos moleculares asociados a fenómenos de estrés celular. Se realizaron sesiones prácticas en las que se interpretó la determinación de la respuesta de la actividad de sistemas antioxidantes frente a situaciones de estrés en tejidos animales y la determinación de la actividad óxido nítrico sintasa con la consecuente realización de un dossier recogiendo los resultados y discusión de los resultados.

## **Biología molecular y celular del envejecimiento.**

Este curso estaba enfocado para proporcionarnos una formación avanzada y una experiencia práctica de los procesos y mecanismos moleculares del envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas así como potenciales terapias celulares y farmacológicas para su tratamientos, trabajando aspectos en los que las competencias finales se tradujeron en: aprender a manejar bases de datos de biología molecular y darle un uso en tareas de investigación, conocer en profundidad las bases moleculares de la enfermedad y la aplicación de la biología molecular en el diagnóstico y tratamiento, conocer los principios de la terapia génica. Los contenidos impartidos nos proporcionaron una formación avanzada y una experiencia práctica de los procesos y mecanismos moleculares del envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas, así como permitirnos abordar las terapias celulares y farmacológicas para su tratamiento, viéndose cumplimentada esta formación con una serie de charlas.

## **Neuroendocrinología clínica.**

En este curso se nos brindó el concepto e introducción en el ámbito de la neuroendocrinología. Se vio la interacción existente entre el sistema nervioso central y el sistema endocrino. La relación existente entre el hipotálamo y la hipófisis. Se analizaron las enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer, Parkinson, enfermedades metabólicas, etc. Se vio la aplicación clínica de la neuroendocrinología.



**MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN**

**DIRECCIÓN GENERAL  
DE UNIVERSIDADES**

# **Currículum vitae**

## **Impreso normalizado**

**Nombre: Iván Pacheco Carrillo**  
**Fecha: 12/07/2018**

---

APELLIDOS: *Pacheco Carrillo*

NOMBRE: *Iván*

SEXO: *Hombre*

DNI: *71355626N*

FECHA DE NACIMIENTO: *31/01/1993*

DIRECCION PARTICULAR: *C/San Agustín Nº17*

CIUDAD: *Membrilla (Ciudad Real)*

CÓDIGO POSTAL: *13230*

TELÉFONO: *+34 644214521*

---

### FORMACIÓN ACADÉMICA

Titulación: *Grado en Biología.*

CENTRO: *Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada*

FECHA: *Julio de 2016*

---

### SITUACIÓN PROFESIONAL ACTUAL

ORGANISMO: *Universidad de Jaén*

FACULTAD, ESCUELA o INSTITUTO DEL C.S.I.C.: *Facultad de Ciencias experimentales*

DEPT./SECC./ UNIDAD ESTR.: *Departamento de Biología Experimental (Área de Bioquímica)*

CATEGORIA PROFESIONAL Y FECHA DE INICIO: *Estudiante – Octubre 2017*

DIRECCION POSTAL: *Ed. B3, Campus las Lagunillas, S/N; 23071 Jaén*

TELEFONO (indicar prefijo, número y extensión): *+34 953211874*

---

### IDIOMAS DE INTERES CIENTIFICO (R=regular, B=bien, C=correctamente)

IDIOMA: *Inglés (B1-PET Cambridge)*

HABLA *C*

LEE *C*

ESCRIBE *C*

IDIOMA: *Francés*

HABLA *R*

LEE *B*

ESCRIBE *R*

---