

Estudio de una tiorredoxina atípica y de un factor de iniciación de la traducción en las respuestas frente a sequía en soja



Programa de Desarrollo de las Ciencias
Básicas (PEDECIBA)
Área: Biología
Subárea: Biología Celular y Molecular

Andrea Luciana Fleitas

Orientadores:
Dr. Omar Borsani
Dra. Sabina Vidal

Laboratorio de Bioquímica
(Facultad de Agronomía)
Laboratorio de Biología Molecular Vegetal
(Facultad de Ciencias)

AGRADECIMIENTOS	4
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 <i>Antecedentes para la selección de genes candidatos.....</i>	12
1.2 <i>Rol de los factores de iniciación de la traducción en las respuestas a estrés en plantas</i>	14
1.3 <i>Rol de las tiorredoxinas en plantas</i>	17
1.4 <i>Nucleorredoxinas</i>	20
1.5 <i>Hipótesis de investigación.....</i>	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 <i>Materiales</i>	26
3.2 <i>Material vegetal y condiciones de crecimiento</i>	26
3.3 <i>Extracción de RNA total</i>	27
3.4 <i>Extracción de DNA genómico.....</i>	27
3.5 <i>Ensayos de Northern Blot.....</i>	28
3.6 <i>Ensayo de Southern Blot</i>	29
3.7 <i>Generación de los vectores de entrada.....</i>	29
3.8 <i>Generación de las construcciones para ensayos funcionales</i>	30
3.9 <i>Generación de construcciones para la expresión de proteína recombinante en Escherichia coli.....</i>	31
3.10 <i>Generación de construcciones para la expresión de proteína recombinante en Nicotiana benthamiana.</i>	31
3.11 <i>Transformación de Escherichia coli para expresión de proteína recombinante.....</i>	32
3.12 <i>Transformación de Agrobacterium tumefaciens</i>	32
3.13 <i>Transformación de Arabidopsis thaliana</i>	33
3.14 <i>Agroinfiltración de hojas de tabaco y microscopía.....</i>	33
3.15 <i>Ensayo de Western Blot</i>	34
3.16 <i>Evaluación molecular de líneas de Arabidopsis transgénicas.....</i>	34
3.17 <i>Evaluación fenotípica de líneas de Arabidopsis transgénicas.....</i>	35
3.18 <i>Ensayos de inducción de la expresión de proteína recombinante en Escherichia coli</i>	35
3.19 <i>Extracción de proteínas totales por método de TCA-Acetona.....</i>	35
3.20 <i>Extracción de proteínas y eliminación de RubisCO</i>	36
3.21 <i>Electroforesis bidimensional</i>	36
3.22 <i>Escisión de los spots e identificación de las proteínas por espectrometría de masas.</i>	37

4.RESULTADOS	38
CARACTERIZACIÓN DEL ROL FUNCIONAL DE UNA NUCLEORREDOXINA DE TIPO II DE SOJA.	39
4.1 <i>Nucleorredoxinas de soja</i>	39
4.2 <i>Determinación de la localización subcelular de la GmNRX2.1</i>	40
4.3 <i>Generación y caracterización molecular de líneas transgénicas de A. thaliana que sobre-expresan el gen GmNRX2.1</i>	46
4.4 <i>Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas</i>	49
4.5 <i>Clonado de la GmNRX2.1 y sus variantes y expresión de proteína recombinante en Escherichia coli y en Nicotiana benthamiana</i>	50
Figura 17. <i>Ensayos de deshidratación. Las plantas se dejaron deshidratar durante 7 días, hasta la aparición de síntomas de marchitamiento. Las plantas fueron ordenadas para la fotografía.</i>	54
4.6 <i>Caracterización del perfil de expresión de los genes codificantes para NRXs en soja y en Arabidopsis</i>	56
ESTUDIO PROTEÓMICO DE LÍNEAS DE ARABIDOPSIS WT Y SOBRE-EXPRESANTES DEL GEN GMEIFISO4G	58
4.7 <i>Optimización de las condiciones para la extracción de proteínas totales por el método de TCA-Acetona</i>	59
4.8 <i>Separación de las proteínas por electroforesis bidimensional</i>	59
4.9 <i>Optimización de las condiciones para la extracción de proteínas y eliminación de la RubisCO utilizando columnas de afinidad anti-RubisCO Seppro RubisCO spin columns</i> ..	60
5.DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	63
5.1 <i>CARACTERIZACIÓN DEL ROL FUNCIONAL DE UNA NUCLEORREDOXINA DE TIPO II DE SOJA</i>	64
5.2 <i>ESTUDIO PROTEÓMICO DE LÍNEAS DE ARABIDOPSIS WT Y SOBRE-EXPRESANTES DEL GEN GMEIFISO4G</i> ..	71
CONCLUSIONES.....	74
REFERENCIAS	77

Agradecimientos

Para empezar, quisiera agradecer a Sabina y Omar por incluirme en el grupo y hacerme sentir parte enseguida. Todo este tiempo fue un gran desafío. Les agradezco mucho la confianza que depositaron en mi y por acompañarme en esta etapa, repleta de aprendizajes.

No creo poder escribir lo mucho que te agradezco, Sabi. Es emocionante encontrar gente que le pone tanto cariño al trabajo y generosidad a enseñar. Creo que todos los que trabajamos en el laboratorio apreciamos eso y la capacidad que tenés para nuclear, que es en buena parte lo que hace que el laboratorio sea tan lindo. Además de agradecerte tus enseñanzas adentro del laboratorio, también aprendí mucho afuera. En este tiempo fuiste un apoyo emocional enorme. Yo demuestro cada día que no soy fácil de tratar ni de estimular y tus respuestas siempre vienen con paciencia y cariño. Así que gracias por acompañarme en esta etapa de altibajos, por el apoyo y por las nuevas oportunidades.

Otro agradecimiento muy especial para todos los integrantes de BMV, que compartieron conmigo estos tres años: Sabi (otra vez), Juan, Ceci, Alex, Pedro y Marcel. En particular, te agradezco, Juan, por haberme regalado mi gen y por compartir otros. También por el trabajo que realizamos juntos y por alegrar el sojateam. Les quiero agradecer a todos por todo lo que aprendí y aprendo de cada uno. Gracias por enseñarme a trabajar con las plantitas y por todo lo que me enseñaron de Biología Molecular, fabulosa ciencia. Pero más importante que eso, les agradezco por el cariño y el buen humor de todos los días. Mi vínculo con la ciencia tiene matices continuamente, pero (aunque no lo crean) ha sido una etapa de reconciliación con este trabajo y creo que ustedes han sido fundamentales para que eso pudiera ocurrir. Sin dudas que rodearse de buena gente hace la diferencia. Ha sido un placer gigante compartir con ustedes este tiempo.

Les quiero agradecer a otras personas que permitieron que este trabajo fuera posible. A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía, por recibirnos con calidez cada vez que vamos por allá. En particular, agradezco a Esteban por los piques con la soja. Por otra parte, agradezco a los integrantes de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo, en especial a Bernardina, por la ayuda con los geles.

Finalmente, agradezco a todos mis amigos de la vida por el cariño y el apoyo de siempre y a mis padres por el apoyo, las oportunidades y por cultivar siempre las ganas de aprender.

Abreviaturas

½ MS	Medio Murashinge y Skoog a la mitad de concentración
2D-DIGE	<i>Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis</i>
4E-BP	Proteínas de unión a eIF4E
ABA	Ácido abscísico
Cap	Caperuza de 7-metilguanosina
CITE	<i>Cap-Independent Translational Enhancers</i>
DAG	Diacilgliceroloes
DGPP	Diacilglicerol pirofosfato
DH	Deshidratación
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
eIF	<i>Eukaryotic Initiation Factor</i>
Fd	Ferredoxina
FTR	Sistema Ferredoxina-Tiorredoxina Reductasa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación disulfuro
HA	Epítotope de Hemaglutinina
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Sites</i>
KO	<i>Knock out</i>
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MS	Espectrometría de Masa
NRX	Nucleorredoxina

NTR	Sistema NADPH-Tiorredoxina Reductasa
ON	Durante la noche
PA	Ácido fosfatídico
PABP	Proteína de unión a Poli(A)
PK	Proteína kinasa
Pq	Paraquat
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
SA	Ácido salicílico
SSH	<i>Suppression subtractive hybridization</i>
Trx	Tiorredoxina
TrxC	Dominio Tiorredoxina C-terminal de la GmNRX2.1
TrxN	Dominio Tiorredoxina N-terminal de la GmNRX2.1
UTR	Región no traducida
wt	Salvaje

Resumen

En Uruguay, la soja (*Glycine max*) es actualmente el cultivo más importante en términos de superficie cultivada. Debido a que este cultivo tiene su desarrollo durante el verano, por lo general está expuesto a períodos de sequía, lo que causa reducción en el rendimiento con grandes pérdidas económicas. La identificación de los componentes genéticos implicados en las respuestas al estrés facilitará la mejora de los cultivos a nuestras condiciones ambientales. En este sentido, hemos identificado dos genes que se inducen en respuesta a déficit hídrico en genotipos de soja tolerantes a la sequía. Uno de ellos codifica para una nucleorredoxina (NRX) de tipo 2 (GmNRX2.1) y otro codifica para un factor de iniciación de la traducción, GmElFiso4G.

Las NRXs son tiorredoxinas (Trx) atípicas de dominio múltiple, que están acopladas a un dominio C1, de unión a diacilglicerol (DAG), rico en cisteínas. Este trabajo aborda la caracterización funcional de la GmNRX2.1 mediante sobre-expresión del gen en plantas. La secuencia de cDNA fue aislada a partir de mRNA de una variedad de soja tolerante a la sequía (N7001) y clonada en vectores binarios para la expresión en plantas como fusiones al epítipo de hemaglutinina (HA) y a la proteína fluorescente verde (GFP). Se realizaron estudios de expresión transitoria en tabaco, hallando que la proteína tendría una localización citosólica y, posiblemente, nuclear. Se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-expresan la GmNRX2.1. Plantas de la generación T3 fueron caracterizadas genotípicamente y se realizaron ensayos fenotípicos *in vitro* en condiciones de estrés osmótico y salino. Asimismo, se realizaron ensayos de deshidratación en tierra. A pesar de que los fenotipos *in vitro* no fueron particularmente evidentes, las plantas transgénicas mostraron ventaja frente a las wt en los ensayos de deshidratación. Con el objetivo de realizar la caracterización bioquímica de la proteína GmNRX2.1 recombinante, se generaron construcciones de la proteína wt completa, así como para el mutante de sitio activo (C227S), el dominio Trx C-terminal aislado (TrxC) y el dominio C1 aislado. Estas construcciones serán utilizadas en el futuro para realizar la expresión heteróloga en *Escherichia coli* y en el sistema de expresión vegetal, *Nicotiana benthamiana*.

La participación del gen *GmElFiso4G* en la respuesta frente a sequía en soja fue establecido en un trabajo previo de nuestro grupo. Se determinó que las plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobre-expresan este gen presentaron tolerancia aumentada frente a estrés osmótico, salino y por baja temperatura. Tratándose de un factor de iniciación de la traducción y habiendo obtenido un fenotipo de tolerancia tan evidente, en el presente trabajo se abordó la caracterización funcional del gen a través de la evaluación del efecto de la sobre-expresión del GmElFiso4G sobre el perfil del proteoma de las plantas. Con dicho cometido, hemos optado por utilizar la técnica de 2D-DIGE (*two-dimensional Difference Gel Electrophoresis*). En este trabajo se optimizaron las condiciones de extracción de proteínas y la separación de las mismas mediante electroforesis bidimensional. Se pusieron a punto dos condiciones para realizar la extracción de proteínas y se determinaron las condiciones adecuadas para la eliminación de la proteína RubisCO utilizando columnas de afinidad anti-RubisCO.

1. Introducción

Entre los cultivos oleaginosos, la soja ocupa una posición de liderazgo a escala global. Actualmente, es el cuarto cultivo mundial cosechándose en promedio unas 220 millones de toneladas que son destinadas al consumo humano, la producción de biocombustibles y fundamentalmente a la alimentación de ganado (FAO, 2013). Entre los años 1995 y 2011 la producción de soja se incrementó en un 198 % en Brasil y en un 287 % en Argentina, y los productos de exportación derivados de dicho cultivo (granos, aceite y carne) aumentaron 329 y 980 %, respectivamente (FAO, 2014). En Uruguay, la soja es el principal cultivo de secano, ocupando más de 1 millón de hectáreas cultivadas y algo más de 3 millones 500 mil toneladas producidas según datos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) de la zafra 2013-2014 (Anuario Estadístico Agropecuario 2014, www.mgap.gub.uy), cuya exportación representó en dicho período una ganancia cercana a los US\$ 1900 millones. La actividad agrícola ha crecido enormemente en los últimos años en nuestro país y en particular en el año 2014 las ganancias debidas solamente a la exportación de soja superaron a las ganancias generadas por exportaciones de carne y ganado en pie (Anuario Estadístico Agropecuario 2014, MGAP).

La fuente principal de agua para estos cultivos radica en las precipitaciones; sus fluctuaciones, tanto en cantidad como distribución, originan períodos con deficiencias hídricas que pueden llevar a grandes pérdidas económicas anualmente. Sin ir más lejos, la sequía registrada este año 2015 ha implicado en el acumulado del año una caída en las exportaciones de un 18.4 %, sumando US\$ 675 millones según cifras del Instituto Uruguay XXI (<http://www.uruguayxxi.gub.uy/>). La agricultura de secano es el sistema de producción predominante a escala global y la sequía es de los factores ambientales que más restringe la productividad de los cultivos, así como la expansión de la agricultura hacia zonas marginales (FAO, 2011). La mejora de los cultivos frente al estrés abiótico, sea de la forma clásica o por ingeniería genética, es altamente dependiente de la identificación de componentes genéticos que determinen la tolerancia. La identificación, aislamiento y caracterización de genes involucrados en las respuestas a estrés abiótico permitirá en el mediano plazo utilizar esta información para generar herramientas que potencien la mejora de los cultivos a nuestras condiciones ambientales.

Estudios realizados en la región han demostrado que el rendimiento de los cultivos de secano se encuentra bastante por debajo de su potencial. En la región núcleo sojera Argentina las brechas de rendimiento para maíz y trigo rondan el 40 % y para soja el 30 %, aunque estas brechas se incrementan en regiones con menor historia agrícola (INTA INFORMA, mayo 2015). En los países de África subsahariana las brechas para los cultivos de secano alcanzan el 80 % según datos del Atlas Mundial de Brechas de Rendimiento (www.yeldgap.org). Sumado a esto, la tasa de aumento del rendimiento de los principales cultivos alimentarios no es lo suficientemente rápida como para satisfacer la demanda que impone una población mundial que se estima superará los 9 mil millones de personas para el año 2050 (Ray *et al.*, 2013). Asimismo, para asegurar un desarrollo sostenible sería deseable lograr los mayores rendimientos posibles en las tierras agrícolas ya existentes (Mueller *et al.*,

2012). Existen varios componentes que aportan a la superación en los rendimientos alcanzados por un cultivo, entre los que se encuentran la utilización de buenas prácticas agrícolas y la incorporación de innovaciones tecnológicas (FAO, 2011). En este sentido, la investigación e inversión que apunten a generar un sector agrícola más productivo y eficiente, con el fin de reducir los efectos de la variabilidad climática en la producción, resultan fundamentales.

En las plantas se identifican tres tipos de estrategias generales para enfrentar condiciones de sequía (Carrow, 1996). En los mecanismos de escape la planta acelera la culminación de su ciclo de vida antes de que las condiciones ambientales sean demasiado severas. Esto implica la puesta en marcha de rápidos cambios fisiológicos y en el desarrollo, que incluyen la maduración y floración prematura, así como la inducción de dormancia en la estación seca. Los mecanismos de evasión consisten en incrementar la capacidad de mantener en los tejidos un potencial de agua relativamente alto a pesar de la baja disponibilidad de agua en el suelo. Estos mecanismos involucran el aumento de la profundidad y de la eficiencia del sistema radicular, junto con estrategias para conservar el agua, como el cierre estomático, la reducción de la conductancia cuticular y del área foliar y la disminución de la absorción de luz. Finalmente, las estrategias que tienden a mantener la productividad de la planta en condiciones de restricción hídrica son considerados mecanismos de tolerancia. Éstos involucran cambios metabólicos para el mantenimiento de la turgencia celular a través de mecanismos de ajuste osmótico, del aumento en la plasticidad celular, de la acumulación de solutos y proteínas con funciones de protección celular, entre otros (Jones *et al.*, 1981; Jones, 2004). La resistencia a la sequía es entonces una característica compleja y multifactorial, que depende de la combinación de muchos genes y que deriva en la alteración de varios caracteres morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. A la fecha, son pocos los genes que han demostrado ser claves en la tolerancia a sequía en soja, en parte debido a que se trata de un cultivo con escasa variabilidad genética (Hyten *et al.*, 2006). Las primeras fuentes descritas de tolerancia a estrés hídrico fueron líneas que exhiben un fenotipo de marchitamiento lento ("*slow wilting genotypes*", Carter *et al.*, 2003). A pesar de que los mecanismos de señalización son complejos, la secuenciación de genomas vegetales y el uso de herramientas "ómicas" han permitido un avance importante en este área. En soja se ha identificado un cierto número de QTLs (*quantitative trait loci*) asociados a tolerancia (Pathan *et al.*, 2007; Abdel-Haleem *et al.*, 2011). Sin embargo, estas regiones genómicas explicarían menos del 10 % de la variación fenotípica observada entre los distintos genotipos (Manavalan *et al.*, 2009). En este sentido, esta propuesta pretende caracterizar nuevos componentes que participen en la tolerancia a sequía en plantas y dar una visión desde la bioquímica y la fisiología vegetal sobre los mecanismos involucrados en las respuestas a este tipo de estrés.

1.1 Antecedentes para la selección de genes candidatos

Los genes a abordar en este trabajo se desprenden del trabajo de doctorado del Dr. Juan Pablo Gallino. El trabajo del Dr. Gallino consistió en la identificación y caracterización de genes de respuesta a déficit hídrico en soja, procurando evidenciar diferencias entre genotipos susceptibles (TJ2049) y tolerantes (N7001 y Munasqa) a sequía. Para la identificación de dichos genes, se secuenció una biblioteca de cDNA generada mediante la técnica de sustracción por supresión e hibridación, SSH (*Suppression subtractive hybridization*; Diatchenko *et al.*, 1996). Esta técnica está basada en la amplificación selectiva de secuencias diferencialmente expresadas, suprimiendo simultáneamente la amplificación de secuencias comunes a ambas poblaciones, lo cual la hace adecuada para la identificación de transcritos poco abundantes, a menudo asociados con funciones de regulación. Los genes identificados fueron agrupados según se tratara de proteínas efectoras (dehidrasas, chaperonas, acuaporinas), de degradación (proteasas, proteínas relacionadas a procesos de ubiquitinación), de detoxificación (oxidorreductasas), de regulación (proteínas relacionadas a señalización, factores de transcripción) o de función desconocida. Análisis por macroarreglos demostraron que un conjunto de genes aumenta su expresión tanto en el genotipo tolerante (N7001) como en el susceptible (TJ2049), mientras que existen genes que específicamente se expresan en alguno de los dos genotipos. La proporción de genes expresados en común es mayor en la respuesta tardía que en etapas iniciales de exposición al estrés, en tanto que la proporción de genes activados específicamente en el cultivar N7001 es superior en etapas iniciales. Esto indicaría que el genotipo tolerante es capaz de percibir la falta de agua y responder más rápidamente que el susceptible. A su vez, de acuerdo a resultados de *Northern blot*, se seleccionaron genes que se expresaran exclusivamente en el genotipo N7001, o cuya expresión fuera significativamente superior en estrés temprano en ese cultivar y cuya función tentativa resultara interesante para profundizar en estudios funcionales, entre ellos los genes *GmNRX2.1* y *GmeIFiso4G*. Ambos genes fueron aislados del genotipo de soja tolerante a la sequía (N7001), que fue seleccionado por su fenotipo de marchitamiento lento en condiciones de estrés hídrico (Hufstetler *et al.*, 2007).

El gen *GmNRX2.1* se indujo en dos genotipos tolerantes (Munasqa, además del ya mencionado N7001) en estrés inicial con mayor intensidad que en el susceptible (Figura 1.A). El mismo codifica para una proteína de la familia de las tiorredoxinas (Trx), particularmente, una nucleorredoxina (NRX). Puesto que el trabajo experimental se enfoca fuertemente al trabajo con este gen, se retomará más adelante los antecedentes respecto a proteínas relacionadas.

Por otra parte, el gen *GmeIFiso4G* muestra un patrón de expresión claramente diferencial entre los dos genotipos de soja tolerantes y el genotipo susceptible, siendo su expresión prácticamente nula en el genotipo susceptible (Figura 1.A). Este último gen fue analizado por el Dr. Gallino durante su doctorado con resultados prometedores. Se trata de un factor de iniciación de la traducción de tipo 4G, que presenta dos dominios conservados MIF4G y MA3

pero que carece de la región N-terminal característica de los eIF4G. Se analizó la localización subcelular mediante la expresión transitoria de la fusión del *GmeIFiso4G* a GFP determinando una localización citosólica, posiblemente asociada al sistema de endomembranas.

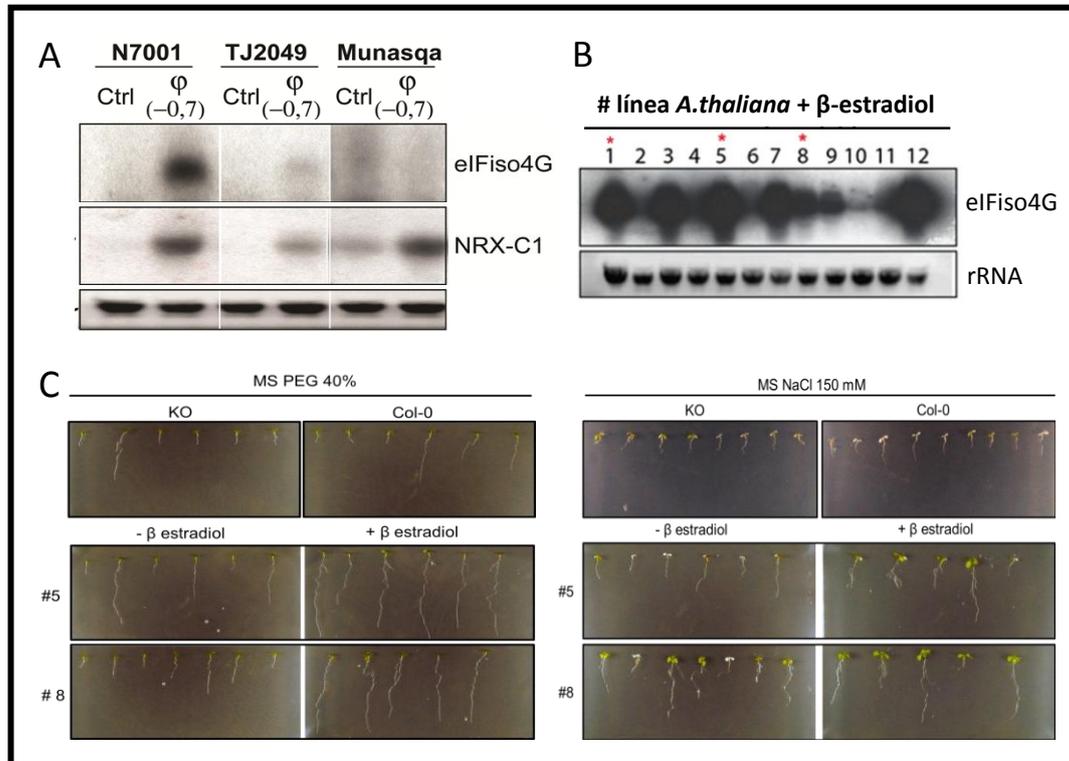


Figura 1. Genes candidatos seleccionados. A. Perfil de expresión analizado por Northern blot para los genes seleccionados (tomado de Gallino, 2013). El gen *GmeIFiso4G* aumenta su expresión en condiciones de deshidratación en los genotipos tolerantes N7001 y Munasqa. La acumulación del transcrito es prácticamente nula en el genotipo susceptible TJ2049. El gen *GmNRX2.1* aumenta su expresión en los genotipos tolerantes en mayor medida que en el susceptible. La variedad tolerante Munasqa presenta cierta acumulación basal del transcrito. Ctrl: control (planta regada), φ : deshidratación hasta alcanzar un potencial hídrico de -0.7 MPa. **B. Análisis de expresión por Northern blot de plantas de *A. thaliana* que sobre-expresan el gen *GmeIFiso4G*.** Se analizó ARN extraído a partir de plantas inducidas con β -estradiol 10 μ M durante 24 horas. Con asterisco se marcan las líneas seleccionadas para posteriores análisis fenotípicos. La línea número 5 fue la utilizada para los ensayos de proteómica. **C. Caracterización fenotípica de las plantas transgénicas.** Crecimiento luego de 6 días en medio MS equilibrado con PEG8000 40 % o con agregado de NaCl 150 mM. Plantas salvajes (Col-0), mutantes *knock out* (KO) y líneas transgénicas #5 y #8. Para estas últimas se muestra el crecimiento en presencia de β estradiol (+ β) y en ausencia del mismo (- β).

Asimismo, se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el gen *GmeIFiso4G* por un mecanismo que permite su inducción ante agregado de β -estradiol (Figura 1.B). Las líneas transgénicas seleccionadas presentaron diferencias importantes en condiciones de estrés osmótico frente al agregado de β -estradiol, particularmente marcadas a nivel radicular. Las plantas wt, el mutante *knock out* (KO) para el gen ortólogo de Arabidopsis (AT5G57870) y las líneas analizadas en estrés sin inducción del transgen, mostraron una reducción del crecimiento radicular de aproximadamente 70 % con respecto

a las plantas crecidas en la condición control. Sin embargo, se observó una reducción del crecimiento mucho menor en las líneas transgénicas sometidas a estrés e inducidas con β -estradiol (Figura 1.C). Las plantas transgénicas también mostraron ventaja frente a tratamientos de estrés salino (Figura 1.C) y de frío (resultados no mostrados). Estos resultados demuestran un rol evidente del gen *GmEIFiso4G* en la tolerancia frente a diversos factores de estrés abiótico (Gallino, 2013).

1.2 Rol de los factores de iniciación de la traducción en las respuestas a estrés en plantas

Las plantas, a diferencia de otros organismos que tienen la posibilidad de moverse, deben adaptar su metabolismo a diversas variables ambientales. Las respuestas al estrés ambiental muchas veces traen aparejado una rápida regulación de la expresión génica, de manera de adaptar la fisiología a dicho estrés y mejorar las posibilidades de subsistencia. La síntesis proteica es uno de los principales blancos de regulación en condiciones de estrés ya que contribuye a la rápida adaptación al limitar el gasto energético y dirigir la síntesis de proteínas específicas, necesarias para limitar el daño celular (Floris *et al.*, 2009).

El principal paso de regulación ocurre a nivel de la iniciación de la traducción. En los eucariotas, en condiciones fisiológicas, la mayoría de los mRNAs inician su traducción por un mecanismo dependiente de la caperuza de 7-metilguanosina (Cap) localizada en el extremo de su región 5' no traducida (5'-UTR) (Figura 2). La iniciación de la traducción es el proceso de ensamblaje de un ribosoma 80S competente para la elongación. Requiere por lo menos 9 factores de iniciación (eIFs) y se compone de dos pasos: primero, la formación de un complejo de pre-iniciación 48S con establecimiento del apareamiento codón-anticodón en el sitio P de la subunidad ribosómica 40S, y luego, la unión de la subunidad ribosómica 60S. El complejo de pre-iniciación 43S, compuesto por la subunidad ribosómica 40S, el eIF2-GTP y el Met-tRNA^{Met}, junto con el eIF3, eIF1, eIF1A y eIF5, se une a un mRNA con Cap 5' en un paso que involucra el despliegue de la estructura secundaria 5' del mRNA por eIF4A, eIF4B y eIF4F. El complejo 43S escanea la región 5'-UTR en el sentido 5'→3' en busca de un codón de inicio. Tras el reconocimiento del codón de inicio y la formación del complejo 48S, el eIF5 y el eIF5B promueven la hidrólisis del GTP unido al eIF2, el desplazamiento de los eIFs y la unión de la subunidad 60S. Generalmente, el 5'UTR de los mRNAs posee estructura secundaria. La carga del complejo 43S requiere la acción cooperativa del eIF4F y del eIF4B o eIF4H, que despliegan dicha estructura. El eIF4F se compone de la proteína de unión al Cap eIF4E, la RNA helicasa eIF4A y del eIF4G, que funciona como un *scaffold* que une al eIF4E, eIF4A, la proteína de unión a poli(A) (PABP) y al eIF3. Los eIF4B (o eIF4H) y el eIF4G potencian la actividad helicasa del eIF4A. Los eIF4A, eIF4G y eIF4E además de asistir la unión del complejo 43S, colaboran con el mismo durante el escaneo del 5'-UTR. El compromiso con un codón de inicio está mediado por el eIF5, una proteína de activación de GTPasa (GAP) específica para eIF2. La unión de la subunidad 60S y la disociación del eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF2-GDP residual están mediadas por el eIF5B, una GTPasa ribosoma dependiente. La PABP tiene un rol

importante en la estimulación de la traducción. Esta proteína puede interactuar con el componente eIF4G del eIF4F, que normalmente está unido al extremo 5' del mRNA. Esto resulta en la circularización del mRNA, conformación que facilita el reciclaje de los ribosomas (Jackson *et al.*, 2010).

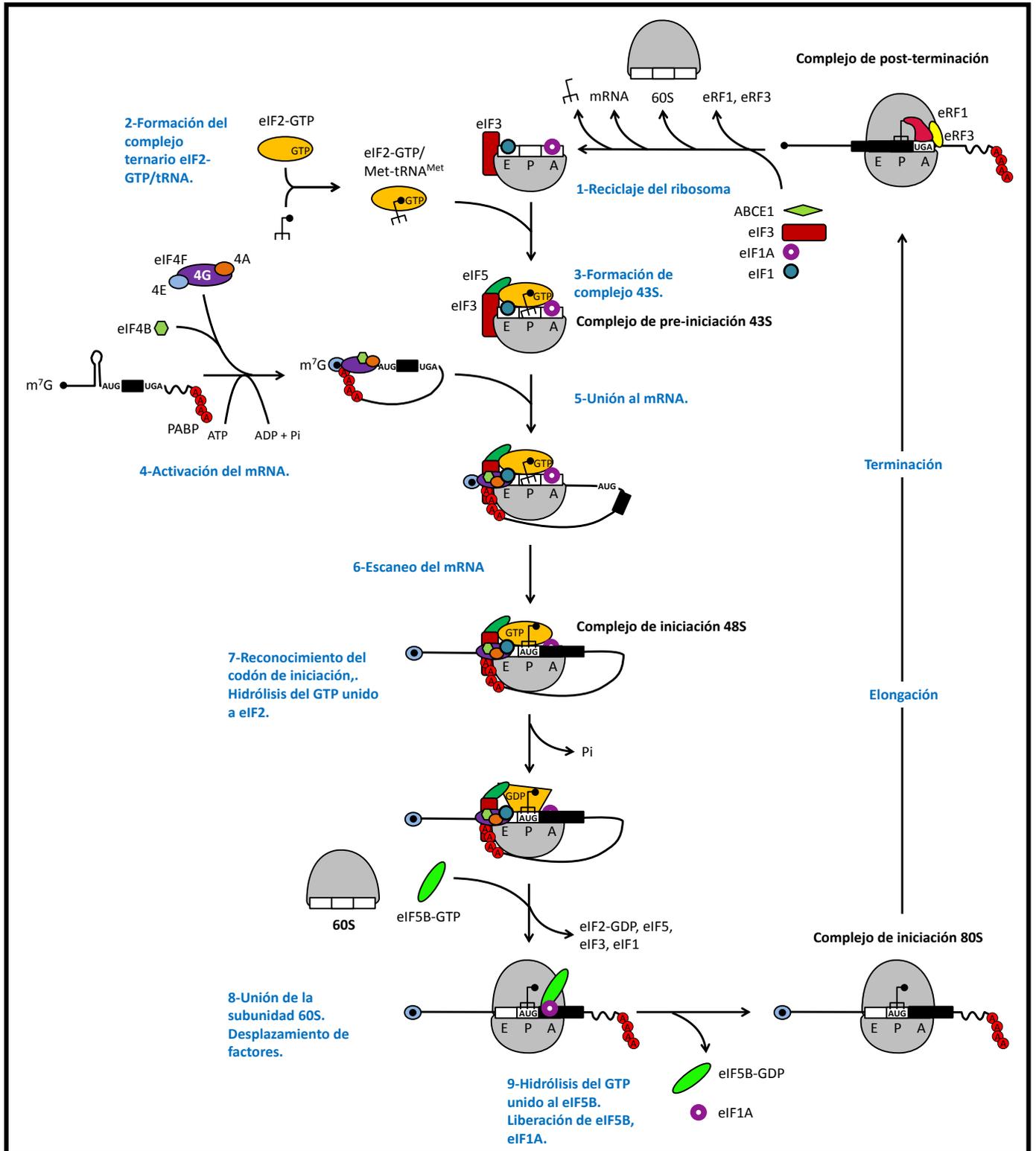


Figura 2. Modelo de iniciación de la traducción canónica (dependiente de 5'Cap) en organismos eucariotas. Adaptada de Jackson *et al.*, 2010. El proceso involucra ocho etapas (pasos 2 a 9), que resultan en la formación

de un complejo de iniciación 80S, competente para comenzar la etapa de elongación del proceso de traducción. La traducción es un proceso cíclico; estos pasos ocurren a continuación del reciclaje de los complejos de post-terminación, lo que regenera las subunidades ribosómicas 40S y 60S libres (1). La iniciación de la traducción implica: (2) la formación de un complejo ternario eIF2-GTP/Met-tRNA^{Met}; (3) la formación de un complejo de pre-iniciación 43S, el cual consta de la subunidad 40S, eIF1, eIF1A, eIF3, eIF2-GTP//Met-tRNA^{Met} y probablemente eIF5; (4) la activación del mRNA, durante la cual la región 5' del mRNA es desplegada por el eIF4B asociado al eIF4F por un mecanismo ATP dependiente; (5) la unión del complejo 43S a dicha región del mRNA; (6) el escaneo del 5'UTR en dirección 5'→3' por el complejo 43S; (7) el reconocimiento del codón de iniciación y la formación del complejo de iniciación 48S, lo que modifica el complejo hacia una conformación "cerrada" y lleva al desplazamiento del eIF1, permitiendo la hidrólisis del GTP unido a eIF2 por parte de eIF5; (8) la unión de la subunidad ribosómica 60S al complejo 48S junto con el desplazamiento del eIF2-GDP y otros factores (eIF1, eIF3, eIF4B, eIF4F y eIF5) mediada por eIF5B; y (9) la hidrólisis del GTP unido a eIF5B y la liberación de eIF1A y eIF5B-GDP desde los ribosomas 80S ensamblados y competentes para la elongación.

La iniciación de la traducción es un proceso altamente regulado. Los mecanismos de regulación pertenecen a una de dos categorías: los mecanismos que impactan sobre los factores de iniciación o los ribosomas, y que por lo tanto afectan todos los procesos de iniciación; y los mecanismos que afectan el mRNA, como los procesos regulados por microRNAs o el secuestro de los mRNAs en cuerpos de estrés y son, por ende, selectivos para algunos mRNAs. El caso más común de control sobre los factores de iniciación es la regulación de la disponibilidad de eIF2 y eIF4F activos por fosforilación, pero la actividad del eIF4F también está regulada por proteólisis de su componente eIF4G (Jackson *et al.*, 2010). La fosforilación del eIF2 está mediada por diferentes quinasas que se activan en respuesta a estrés causando la inhibición de la traducción al impedir la formación del complejo ternario eIF2/GTP/tRNA^{met}. Un mecanismo de regulación ampliamente estudiado en mamíferos es la regulación sobre el eIF4E. Este mecanismo involucra la interacción del eIF4E con proteínas de unión a eIF4E (4E-BPs). Las 4E-BPs presentan un dominio de unión a 4E similar al del eIF4G, por lo que actúan por competencia, impidiendo la interacción con el eIF4G y en consecuencia el reclutamiento de ribosoma al Cap. En condiciones normales, la quinasa TOR fosforila las 4E-BPs, lo que evita que éstas se unan al eIF4E, pero en respuesta a estrés, TOR es inhibida; la hipo-fosforilación de las 4E-BPs aumenta su afinidad por el eIF4E, inhibiéndose la traducción Cap-dependiente y pasando a un mecanismo Cap-independiente. Bajo condiciones de estrés, el mecanismo canónico de iniciación se altera. En plantas sometidas a estrés biótico y abiótico también se ha observado traducción Cap-independiente. Por ejemplo, en maíz, los mRNAs codificantes para la alcohol deshidrogenasa ADH1 y para la *heat shock protein* HSP101, se traducen de manera Cap-independiente en raíces privadas de oxígeno y durante estrés por calor, respectivamente. También los virus utilizan un mecanismo Cap-independiente para traducir sus mRNAs (Das Sharma *et al.*, 2015; Gallie, 2001). En casos de estrés, donde se compromete la iniciación Cap-dependiente, la presencia de IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*) dentro del 5'-UTR de los mRNAs y de CITES (*Cap-Independent Translational Enhancers*) permite la traducción eficiente de ciertos mRNAs, ya que admite que ocurra la iniciación en ausencia de reconocimiento del Cap por el eIF4E (Muñoz *et al.*, 2012).

Además de una serie de mecanismos de regulación conservados entre los eucariotas, las plantas también presentan elementos de regulación únicos. Aparte de los eIF4E y eIF4G canónicos, las plantas tienen las isoformas eIFiso4E y eIFiso4G. Estas isoformas interactúan específicamente entre sí para dar lugar al complejo eIFiso4F (Mayberry *et al.*, 2011). Estos complejos favorecen la iniciación de la traducción de mRNAs específicos, función que, como fue demostrado para *Arabidopsis* y maíz, no puede ser substituida por los eIF4F (Muñoz *et al.*, 2012). eIF4G y eIFiso4G comparten solamente un 30 % de similitud en un dominio central conservado. eIF4G tiene un extenso dominio N-terminal que está ausente en el eIFiso4G. Las subunidades de unión al Cap eIF4E y eIFiso4E comparten alrededor de un 50 % de similitud. El eIFiso4F de trigo tiene preferencia por mRNAs que presentan Cap y 5'-UTR desestructurados, mientras que el eIF4F promueve la traducción tanto de mensajeros con Cap y 5'-UTR estructurados como de mensajeros sin Cap (Gallie *et al.*, 2001b). También se ha visto que los complejos eIF4F, y en particular el componente eIF4G, son fundamentales para dirigir la iniciación interna en RNAs virales, los cuales no presentan Cap, y que los eIF4G son mucho más eficientes que los eIFiso4G en promover dicha iniciación (Gallie, 2001; Treder *et al.*, 2008). Asimismo, se ha determinado que la porción C-terminal del eIF4G presenta todos los dominios necesarios para promover la función de dicho factor, como ser los dominios de unión al RNA, a eIF4A y a eIF3, mientras que la porción N-terminal presenta los dominios de unión a la proteína de unión al Cap eIF4E y para la PABP (Treder *et al.*, 2008). La presencia de dos isoformas tan diferentes del eIF4G plantea la disyuntiva de si existe especialización funcional entre ellos. Hemos observado que el transcripto del gen *GmIFiso4G* aumenta considerablemente su expresión en condiciones de sequía en genotipos tolerantes a la misma, lo que indicaría que esta proteína podría cumplir un rol específico en la traducción de ciertas proteínas específicas en condiciones de estrés.

1.3 Rol de las tioredoxinas en plantas

Como se mencionó anteriormente, el gen *GmNRX2.1* codifica para una Trx. La superfamilia de Trx comprende proteínas con múltiples funciones que se caracterizan por poseer al menos un dominio Trx. En general, presentan actividad oxidorreductasa y son partícipes en reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Pedone *et al.*, 2010). Estas proteínas actúan como reductasas en el control redox, protegen a las proteínas frente a agregación e inactivación oxidativa, ayudan a las células a sobrellevar múltiples tipos de estrés como ser el causado por especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, regulan la muerte celular programada, actúan como chaperonas para el plegamiento de proteínas, entre otras funciones (Collet *et al.*, 2010). A pesar de que el volumen de información concerniendo el rol de las Trx en la regulación del estado redox y el metabolismo celular es enorme, poco se sabe sobre este tipo de Trxs atípicas.

Las plantas son sistemas sumamente complejos desde el punto de vista de su biología redox. Pueden producir una serie de antioxidantes de bajo peso molecular, como glutatión,

ascorbato y tocoferol. Las variaciones en la concentración de estos pares redox constituye una fuente muy rica en información. Estos antioxidantes de bajo peso molecular pueden interactuar con numerosos componentes celulares, influenciando procesos de crecimiento y desarrollo de la planta, modulando desde la mitosis y la elongación celular, hasta la senescencia y la muerte. El estado redox intracelular también regula la expresión de genes asociada a respuestas frente a diversos tipos de estrés biótico y abiótico (Foyer *et al.*, 2005). De esta manera, la interacción de estos antioxidantes de bajo peso molecular con especies oxidantes constituye una interfaz metabólica donde se definen procesos de aclimatación o de muerte. Los mecanismos utilizados para mantener el balance redox intracelular son especialmente delicados en organismos vegetales puesto que la generación de especies derivadas del oxígeno es intrínseca al proceso fotosintético. Sumado a los procesos comunes a otros organismos de producción de especies reactivas del oxígeno, como la cadena de transporte de electrones mitocondrial y varios sistemas enzimáticos celulares, la fotosíntesis es un proceso especialmente riesgoso desde el punto de vista de la fuga de electrones, tanto a nivel de la cadena de transporte de electrones fotosintética como a nivel de los sistemas de captura de luz (fotosistemas, Mittler *et al.*, 2004). Asimismo, en vistas de que las plantas son esencialmente inmóviles, tienen que lidiar con la adversidad ambiental y la escasez de recursos. La mayoría de estos estreses están acompañados por la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno que generan un estrés oxidativo que debe ser controlado (Rohuier *et al.*, 2008). La naturaleza reactiva de estos intermediarios tiene dos implicancias fundamentales: por un lado, la necesidad de que las células mantengan un estrecho control sobre su producción y propagación; y, por otro lado, que los mismos puedan actuar como moléculas señalizadoras. En estos mecanismos de señalización redox juega un rol esencial la oxidación de tioles (-SH). Las plantas, como otros organismos aeróbicos, mantienen los tioles en sus proteínas citoplasmáticas en su forma reducida debido a las concentraciones en el orden de milimolar de sus antioxidantes de bajo peso molecular. Sin embargo, los tioles pueden modificarse de diversas maneras, dando formas disulfuro (S-S), ácido sulfénico (-SOH), sulfínico (-SO₂H), sulfónico (-SO₃H), y también formas glutationiladas o nitrosiladas, entre otras modificaciones posibles (Paulsen *et al.*, 2013). Estas modificaciones en las proteínas pueden traer aparejado alteraciones en sus estructuras y propiedades bioquímicas. Además de los compuestos de bajo peso molecular, el estado redox intracelular está regulado principalmente por proteínas de la superfamilia de las tiorredoxinas (Trx). Los sistemas enzimáticos antioxidantes y de reparación están considerablemente incrementados y diversificados en las plantas en comparación con organismos bacterianos o animales.

El plegamiento de Trx fue identificado en 1975, cuando se dilucidó la estructura cristalográfica de la Trx1 de *Escherichia coli* en su forma disulfuro (Holmgren *et al.*, 1975). El plegamiento de las Trxs se caracteriza por un núcleo central de cinco hojas β antiparalelas rodeadas por cuatro hélices α (Collet *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2004; Lillig *et al.*, 2008). Muchas otras proteínas comparten esta clase de plegamiento (tiorredoxinas, glutarredoxinas, peroxidasas, isomerasas de disulfuro, glutatión-S-transferasas, oxidasas de

disulfuro, entre otras; Ren *et al.*, 2009; Qi *et al.*, 2005), de manera que pertenecen también a la familia de las Trxs a pesar de que su homología de secuencia sea baja (Atkinson *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2004). Todas las oxidoreductasas de la familia Trx presentan un sitio activo con los motivos CXXC o CXXS, posicionados en el *loop* que conecta una hoja β con una hélice α en la región N-terminal. La cisteína N-terminal del sitio activo es la que lleva a cabo el ataque nucleofílico. La misma se encuentra expuesta a la superficie y presenta un pKa bajo (Lillig *et al.*, 2008).

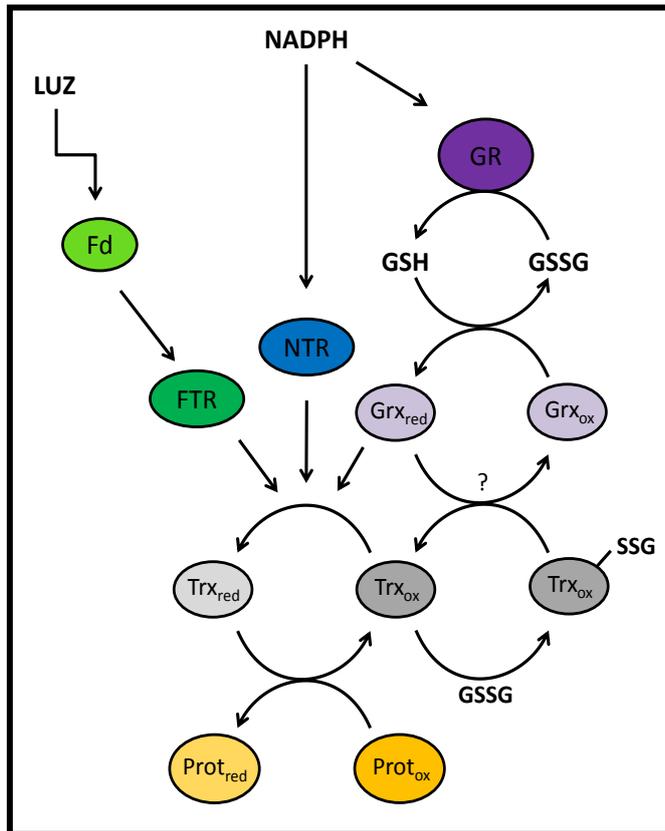


Figura 3. Vías para la reducción de las tiorredoxinas. Adaptado de Gelhaye *et al.*, 2004. La ruta cloroplástica involucra a la ferredoxina (Fd) y a la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR). En las mitocondrias y el citoplasma, las Trxs pueden ser reducidas por el sistema NADPH-NADPH tiorredoxina reductasa (NTR_A, NTR_B). En plantas, existe un sistema NTR adicional, NTR_C que opera en los cloroplastos. Trxs particulares pueden ser reducidas mediante el sistema glutatión reductasa (GR) / glutatión (GSH/GSSG) / glutarredoxina (Grx). También se ha observado la glutationilación de algunas Trxs.

Las Trxs son proteínas pequeñas (de unos 12 kDa), presentes en todos los organismos. Sumado a estas Trxs "clásicas", muchas proteínas también poseen dominios *Trx-like* o múltiples dominios Trx. Las Trxs son una familia ampliamente diversificada en plantas. Se han encontrado Trx en prácticamente todos los compartimentos celulares. Las Trxs clásicas se clasifican en cinco clases: Trxm (cloroplásticas), Trxx (cloroplásticas), Trxy (cloroplásticas), Trxf (cloroplásticas), Trxh (mitocondriales, citosólicas, nucleares, apoplásticas) y Trxo (mitocondriales). Las Trxs m, x e y son de origen procariótico, en tanto que las Trx f, h y o son de origen eucariótico. Sumado a estas Trxs típicas monodominio, las plantas también poseen numerosas Trxs monodominio atípicas (las cuales presentan sitios activos con secuencias no canónicas) y otras tantas Trxs atípicas de dominio múltiple, entre las que se encuentran las nucleorredoxinas (Gelhaye *et al.*, 2005). Las Trxs participan en infinidad de procesos metabólicos en las plantas. Participan en la transición del metabolismo entre luz y oscuridad,

regulando enzimas del metabolismo del carbono, de lípidos, de azufre, de nitrógeno, de la síntesis de hormonas y vitaminas (Gelhaye *et al.*, 2005), por mencionar sólo algunas. A su vez, proteínas de la familia, como ser glutarredoxinas, peroxirredoxinas, glutatión peroxidasa, metionina-sulfóxido reductasas, etc., también sumamente diversificadas, participan en funciones de detoxificación (Gelhaye *et al.*, 2005). Existen aproximadamente 40 genes potenciales codificantes para Trxs en *Arabidopsis thaliana* (Chibani *et al.*, 2009), otros 50 genes codifican glutarredoxinas (Meyer *et al.*, 2008), casi 50 más codifican glutatión transferasas (Dixon *et al.*, 2002) y 10 genes codifican peroxirredoxinas (Horling *et al.*, 2003), para dar una idea de las dimensiones de los sistemas antioxidantes. Una vez oxidadas, las Trxs pueden ser devueltas a su forma reducida a través del sistema ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) cloroplástico o a través del sistema NADPH-tiorredoxina reductasa (NTR) a nivel del cloroplasto (NTR_C), en el citosol y las mitocondrias (NTR_A, NTR_B). Algunas Trxs pueden ser reducidas mediante el sistema glutatión reductasa/glutatión/glutarredoxina, lo que suma un nivel de complejidad adicional (Figura 3) (Gelhaye *et al.*, 2005). Por otro lado, tal grado de diversificación despierta curiosidad en cuanto a la especificidad de estas enzimas: sus blancos, sus reductores intracelulares y sus mecanismos de acción.

1.4 Nucleorredoxinas

Las NRXs en conjunto con RdCVF (*Rod-derived-cone-visibility-factor*) y C9orf121 (*Chromosome-9-open-reading-frame*) conforman una sub-familia dentro de las Trxs puesto que comparten motivos particulares en su secuencia aminoacídica. Los dominios Trx en estas proteínas se asemejan más a la tryparredoxina presente en tripanosomátidos que a un dominio Trx típico. En mamíferos se ha determinado que estas proteínas actúan como reguladores en varias rutas de señalización fisiológicamente relevantes: regulan la ruta wnt (Funato *et al.*, 2008, 2010) y la del TLR4 (Hayashi *et al.*, 2010), regula factores de transcripción (AP1, NF- κ B y CREB, Hirota *et al.*, 2000), regulan la fosfofructoquinasa-1 (Funato *et al.*, 2013), interactúan con la fosfatasa-2-A (Lechward *et al.*, 2006), por mencionar algunos ejemplos. Las NRXs de plantas presentan escasa homología con las NRXs de mamíferos. Fueron descritas por primera vez en maíz (*Zea mays*) como proteínas nucleares conteniendo tres módulos tipo Trx y con actividad de reducción de disulfuros *in vitro* (Laughner *et al.*, 1998). La clase de las NRXs se presenta en plantas terrestres y en algunas algas pero está ausente en cianobacterias. Un análisis filogenético de secuencias permite distinguir tres subgrupos de NRXs, pero en todos los casos se trata de proteínas que comparten una organización común de dos (o en algunos casos, tres) dominios de Trx y presentan asimismo un dominio C1 (CX2CX10CX2CX6CX18-23CX4C) C-terminal (Chibani *et al.*, 2009). Las NRXs del subgrupo I presentan una región *linker* entre sus dos dominios Trx algo más larga que en los otros subgrupos, en tanto que el dominio C1 de las NRXs del subgrupo III está algo menos conservado. El rol de estas proteínas permanece ampliamente inexplorado en plantas. Se desconoce si los dominios Trx presentan una función redox conjunta, si el dominio C1 es esencial para las isoformas que lo contienen o cuáles son sus

funciones fisiológicas. Tampoco hay estudios que describan la relevancia del dominio C1, llamados de esa manera por ser identificados inicialmente en proteínas quinasa C (PKCs). Se trata de dominios pequeños (aproximadamente 50 aminoácidos), muy ricos en cisteínas y con capacidad de unión de zinc (Homel *et al.*, 1994). Este tipo de dominios participan en la unión a diacilgliceroles (DAG), regulando de esta manera la actividad de las proteínas que los contienen (proteínas quinasa, reguladores de proteínas-G pequeñas, etc., Colón-González *et al.*, 2006) y participando a su vez en la relocalización de las mismas hacia las membranas tras la unión del lípido (Geczy *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 2005; Kazanietz *et al.*, 1992; Leonard *et al.*, 2011; Mamidi *et al.*, 2012; Oancea *et al.*, 1998; Quest *et al.*, 1994). Los dominios C1 también pueden actuar como sitios de regulación redox de las proteínas (Korichneva *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2011), y como sitios de interacción proteína-proteína (Colón-González *et al.*, 2006).

Recientemente, las dos NRXs de *A. thaliana* (pertenecientes a los subgrupos I (NRX1) y III (NRX2) fueron preliminarmente caracterizadas (Marchal *et al.*, 2014). Ambas proteínas presentan cierta actividad de reducción de disulfuros *in vitro* y su localización es citosólica y nuclear. La NRX1 pudo ser reducida por NTR_A. Si bien las NRXs son dispensables para el desarrollo de la planta, las plantas KO para la NRX1 presentaron menor fertilidad del polen (Qin *et al.*, 2009; Marchal *et al.*, 2014).

La aparición del gen *GmNRX2.1* dentro de nuestra biblioteca de genes inducidos por sequía en soja, resulta interesante en vistas de que aún no se han vinculado NRXs a las respuestas frente a estrés hídrico, lo que sería un rol novedoso para estas proteínas. Cabe destacar que otro estudio transcriptómico de soja en condiciones de estrés hídrico también demostró una gran inducción del gen *GmNRX2.1* en estas condiciones (Le *et al.*, 2012).

1.5 Hipótesis de investigación

Trabajos previos de nuestro grupo sugieren que, en condiciones de sequía, los genotipos de soja tolerantes aquí estudiados expresarían genes específicos que en los genotipos susceptibles tendrían una menor o nula expresión. Otra posibilidad es que los genotipos tolerantes activen más rápidamente la expresión de genes comunes a ambos, lo que les brindaría la capacidad de adaptarse más tempranamente al estrés. En otras palabras, los genotipos tolerantes estudiados serían capaces de percibir la falta de agua y activar funciones de respuesta más rápidamente que los susceptibles. Los genes que presentamos en este trabajo, *GmNRX2.1* y *GmIFiso4G*, pertenecen a este grupo de genes y por lo tanto es esperable que la sobre-expresión de los mismos en plantas resulte en un aumento en la tolerancia al estrés hídrico. Se ha confirmado esta posibilidad para el gen *GmIFiso4G*. Teniendo en cuenta el conocimiento sobre la función de los factores de iniciación de la traducción en la regulación de la síntesis proteica, es posible que este gen participe en las respuestas frente a estrés abiótico facilitando la traducción de ciertos mRNAs, confiriendo a la planta una mayor tolerancia. Por otro lado, la NRX en estudio se trata de un tipo

particularmente atípico de NRX puesto que no presenta ningún sitio activo CxxC canónico y aún no se ha determinado si presenta actividad oxidorreductasa, cuáles son sus reductores o sus posibles blancos de acción. Es factible que cumpla acciones como oxidorreductasa, protegiendo a los tioles celulares ante condiciones de estrés. A su vez, también es posible que actúe regulando otras respuestas mediante una acción sobre factores de transcripción o activación/represión de otras proteínas a través de regulación redox de las mismas. En suma, esta proteína presentaría potencialmente funciones de regulación o efectoras.

2. Objetivos

Objetivos generales y específicos.

El objetivo general del trabajo es generar conocimiento acerca de dos genes de soja identificados previamente como genes que se sobre-expresan en genotipos tolerantes de soja en respuesta a sequía y que, por lo tanto, podrían presentar algún rol en las respuestas frente a este estrés.

En cuanto al gen *GmNRX2.1* se pretende en particular:

Objetivo específico 1: Estudiar la función de la *GmNRX2.1* en la tolerancia al estrés abiótico en plantas.

Objetivo específico 2: Generar herramientas para analizar *in vitro* las posibles actividades de una NRX con dominio C1.

Objetivo específico 3: Determinar el perfil de expresión de los genes codificantes para NRXs de soja ante estímulos y tratamientos de estrés.

Por otra parte, para el gen *GmeIFiso4G* se plantean los siguientes objetivos específicos con el fin de determinar el impacto de la sobre-expresión del gen *GmeIFiso4G* en el proteoma de plantas de *Arabidopsis* mediante estudios de proteómica comparativa utilizando la técnica de 2D-DIGE (*two-dimensional Difference Gel Electrophoresis*):

Objetivo específico 4: Poner a punto las condiciones de extracción de proteínas.

Objetivo específico 5: Optimizar las condiciones para la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

Todas las enzimas utilizadas para clonados y subclonados fueron adquiridas en Invitrogen o Thermo. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Macrogen, IDT o SBS. Los *kits* para extracción y purificación de DNA fueron adquiridos de Quiagen. La secuenciación de DNA fue realizada en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Los reactivos químicos fueron comprados en Sigma-Aldrich o Duchefa Biochemie.

3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron 3 genotipos contrastantes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill); el cultivar de alto rendimiento N7001, definido como tolerante a la sequía y que presenta el fenotipo de "marchitamiento lento" en condiciones de estrés hídrico (Carter *et al.*, 2003; Hufstetler *et al.*, 2007) y el cultivar TJ2049 definido como susceptible a la sequía según los datos obtenidos por estudios llevados a cabo en el marco del proyecto BiotecSur UE 127119. Para algunos análisis de expresión se usó además el cultivar Munasqa (primera variedad de soja resistente al glifosato liberada por una institución pública en la Argentina, la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes, EEAOC). Ésta es tolerante a la sequía según datos del equipo de investigación de la EEAOC, corroborados por el grupo del Dr. Omar Borsani (Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía).

Las plantas de soja se cultivaron en cámara de crecimiento bajo lámparas de halogenuro metálico y lámparas de vapor de sodio a alta presión con una intensidad lumínica de 800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ y un fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad, a 25 °C y una humedad relativa de 60-40%. Para su crecimiento se utilizaron macetas de 9 cm de diámetro por 8 cm de altura. Se utilizó una mezcla de partes iguales de arena y vermiculita como sustrato. Las plantas fueron regadas con medio RP (Rigaud y Puppo, 1975). Las plantas se regaron diariamente hasta capacidad de campo y una vez alcanzado el estado vegetativo V1, fueron sometidas a tratamientos de estrés. Se dejaron de regar los tratamientos de deshidratación (DH) hasta la aparición de síntomas de marchitamiento, continuando el riego diario de los tratamientos control. Asimismo, se realizaron tratamientos con ácido abscísico (ABA) 50 μM , ácido salicílico (SA) 5 mM o paraquat (Pq) 1 mM. Luego de los tratamientos, se separó el material en raíz y parte aérea, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C para su posterior procesamiento.

Para la obtención de líneas sobre-expresantes y para la comparación fenotípica bajo condiciones de estrés y control, se usó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Para realizar los análisis de localización subcelular mediante agroinfiltración se usó *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. Las plantas de *A. thaliana* y tabaco se cultivaron en cámara de crecimiento con 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ de intensidad lumínica y fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad a 25°C. Como solución de riego se utilizó agua destilada, suplementando con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con la mitad de concentración ($\frac{1}{2}$ MS) una vez a la semana.

Las plantas de *A. thaliana* crecidas *in vitro* se sembraron sobre medio ½MS, pH 5.7, 0.5 % agar, sin el agregado de sacarosa. Previamente, se esterilizaron las semillas sumergiéndolas en EtOH 70 % por un máximo de 5 minutos, seguido por una solución de hipoclorito de sodio 25 g/L y Tritón X-100 0.1 % durante 15 minutos con agitación. Se realizaron 4 lavados de 5 min con agua destilada estéril. Las semillas se estratificaron 5 a 7 días a 4 °C y se transfirieron a cámara de crecimiento bajo lámparas de LED con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{seg}^{-1}$, un fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad y 22 °C.

3.3 Extracción de RNA total

Se pulverizó 1 a 2 g de muestra vegetal en nitrógeno líquido y se transfirió el material a tubos para centrifuga conteniendo 5 mL de *buffer* NTES (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético [EDTA], 1 % dodecilsulfato de sodio [SDS]), 2.5 mL de fenol y 2.5 mL de cloroformo. Las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm durante 20 minutos y los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa fueron precipitados con 0.1 volúmenes de acetato de sodio (NaAc) 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol anhidro. Luego de 3 horas de incubación a -20 °C se centrifugó durante 30 minutos a 5.000 rpm y 4 °C. El *pellet* se resuspendió en agua miliQ tratada con 0.1 % dietilpirocarbonato (DEPC) y se transfirió a tubos de microcentrifuga. Se agregó un volumen igual de 4 M LiCl y el RNA se dejó precipitar durante la noche (ON) en hielo. Se centrifugó por 20 minutos a 14.000 rpm y a 4 °C. Los *pellets* se resuspendieron en agua-DEPC y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La concentración del RNA se midió en un nanodrop (Thermo). La calidad del RNA se evaluó resuspendiendo aproximadamente 1 μg de RNA total en una mezcla de formaldehído 2.2 M, formamida 50 % v/v, 1 X *buffer* MOPS (0.2 M ácido 3-(n-morfolino)-propanosulfónico [MOPS] pH 7, 0.05 M NaAc y 0.01 M EDTA) y bromuro de etidio (BET) 70 ng/ μL . Las muestras se desnaturalizaron a 55 °C durante 10 minutos y se separaron en geles de agarosa desnaturalizante con 2.2 M formaldehído, utilizando 1X MOPS como *buffer* para la electroforesis.

3.4 Extracción de DNA genómico

Se pulverizó 1 a 3 g de muestra vegetal en nitrógeno líquido y se transfirió el material a tubos SS-34 para centrifuga conteniendo 15 mL de *buffer* de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoetanol [β -ME], 1 % SDS). Se incubó durante 15 minutos a 65 °C y se agregaron 5 mL de acetato de potasio (KAc) 5 M a la solución caliente. Se incubó en hielo 30 minutos y se centrifugó 15 minutos a 35.000 x g. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo SS-34, se agregaron 10 mL de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó 15 minutos a 35.000 x g. El *pellet* se lavó con 1 mL de EtOH 70 %, se centrifugó 5 minutos a 35.000 x g y se dejó secar. El *pellet* se resuspendió en 450 μL de *buffer* TE (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 1 mM) con agregado de 50 μL de NaCl 3M y 2 μL de RNasa A (10 mg/mL) y se incubó 30 minutos a 37 °C. El DNA se

extrajo con 1 volumen de fenol y 2 volúmenes de cloroformo y se centrifugó 2 minutos a 14.500 x g. La fase acuosa se precipitó el DNA con 0.8 volumen de isopropanol. Se centrifugó 20 minutos a 12.500 x g, se lavó el *pellet* con 1 mL de EtOH 70 % y se resuspendió en 40 µL de agua MiliQ.

3.5 Ensayos de Northern Blot

El RNA total (10 µg) fue separado en geles de agarosa desnaturalizantes con formaldehído 2.2 M, utilizando el *buffer* 1X MOPS para la corrida electroforética, como se describe en la sección 3.3. La transferencia del RNA a membranas de nylon (*Amaersham Hybond-N⁺*, GE Health Care) se realizó en solución 20X SSC (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7). Las muestras de RNA fueron fijadas a las membranas por exposición a luz ultravioleta (70000 µJ/cm², 5 seg) utilizando un *crosslinker* (Hoefer UVC 500 *Ultraviolet Crosslinker*).

Los fragmentos de DNA utilizados como sonda se obtuvieron por PCR a partir de DNA genómico de soja de la variedad N7001. Utilizando la polimerasa Taq (Thermo, EP0402) y los *primers* y programa de PCR indicados en la tabla 1 se generaron sondas adecuadas para la detección de los genes codificantes para las NRXs de soja (de tipo I: Glyma08g285900; de tipo II: Glyma06g021200, Glyma04g02100; y de tipo III: Glyma06g078100, Glyma04g76900) y de *A. thaliana* (de tipo I: At1g60420; y de tipo III: At4g31240). Las sondas se purificaron a partir de los geles utilizando el *Quiagen Gel extraction Kit* (Quiagen, Hilden, Germany).

Tabla 1. *Primers* y programas de PCR para generación de sondas para ensayo de Northern blot.

Nº primer	Nombre	Secuencia	Aplicación	Programa PCR
1	FoGmNRX1-Ex2	5'-TGGTTTGTATTTTCGGCATCCTG-3'	Para generación de sonda para detección de NRX de tipo I de soja: Glyma08g285900.	1- 95 °C, 3 m.
2	ReGmNRX1-Ex2	5'-TGATATTACGAAGTCCCGAGATGG-3'		2- 40 ciclos: 95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 40 s. 4- 72 °C, 5 m.
3	FoGmNRX2-Ex2	5'-CCTGTTGCTTGGCTAGTGGGTA-3'	Para generación de sonda para detección de NRXs de tipo II de soja: Glyma06g021200, Glyma04g02100.	1- 95 °C, 3 m.
4	ReGmNRX2-Ex2	5'-GGCCCTCCACCGTTTCCATC-3'		2- 40 ciclos: 95 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 40 s. 4- 72 °C, 5 m.
5	FoGmNRX3-3'UTR	5'-GAGTGTCCAACGCTCTTCTCATCA-3'	Para generación de sonda para detección de NRXs de tipo III de soja: Glyma06g078100, Glyma04g76900.	1- 95 °C, 3 m.
6	ReGmNRX3-3'UTR	5'-AGTGTGTTGGATTGGCGGTGAG-3'		2- 40 ciclos: 95 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; 72 °C, 40 s. 4- 72 °C, 5 m.
7	FoAtNRX1-Ex5_3'UTR	5'-GGACCAACTGGCAAACC-3'	Para generación de sonda para detección de AtNRX1 de <i>A. thaliana</i> : At1g60420.	1- 95 °C, 3 m.
8	ReAtNRX1-Ex5_3'UTR	5'-TTAGCAATTATACAAAGAAAGGAA-3'		2- 40 ciclos: 95 °C, 30 s; 47 °C, 30 s; 72 °C, 40 s. 4- 72 °C, 5 m.
9	FoAtNRX3-Ex5_3'UTR	5'-CCATGGCTTGAATACCTTA-3'	Para generación de sonda para detección de AtNRX3 de <i>A. thaliana</i> : At4g31240.	1- 95 °C, 3 m.
10	ReAtNRX3-Ex5_3'UTR	5'-ACATATCAGGATTCTTTGTCTACTAA-3'		2- 40 ciclos: 95 °C, 30 s; 47 °C, 30 s; 72 °C, 40 s. 4- 72 °C, 5 m.

3.6 Ensayo de *Southern Blot*

El DNA genómico (15 µg) fue digerido ON con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII separadamente, y fue separado en geles de agarosa utilizando *buffer* 1X TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8) para la corrida electroforética. El DNA fue desnaturalizado incubando el gel en solución de desnaturalización (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. El gel se neutralizó en solución de neutralización (Tris-HCl 1 M, NaCl 1.5 M, pH 8) durante 1 hora con agitación. La transferencia del DNA hacia la membrana de nylon (*Amaersham Hybond-N⁺*, GE Health Care) se realizó en solución 10X SSC. El DNA fue fijado a la membrana por exposición a luz ultravioleta como fue descrito en la sección 3.5.

Como sonda se utilizó un fragmento correspondiente a la secuencia de codificante para la GmNRX2.1 escindido de la construcción pGWB14:*GmNRX2.1* (sección 3.8) mediante digestión con las enzimas HindIII/SacI (Figura 11) el cual no presenta homología con secuencias de *A. thaliana*. El marcado de la sonda y la detección se realizó utilizando el *kit DIG High Prime DNA Labeling and detection starter kit* (Roche).

Construcciones para ensayos funcionales del gen GmNRX2.1 y para obtención de proteína recombinante

3.7 Generación de los vectores de entrada

Todas las construcciones fueron generadas mediante el uso de tecnología Gateway (Invitrogen). Se generaron vectores de entrada conteniendo la secuencia codificante para la GmNRX2.1 con tres propósitos: 1- realización de ensayos fenotípicos de plantas transgénicas sobre-expresantes; 2- estudios de localización subcelular; y 3- estudios bioquímicos de la proteína recombinante.

La secuencia codificante correspondiente a la GmNRX2.1 fue amplificada a partir de cDNA de soja de la variedad N7001 en condiciones de déficit hídrico. La síntesis del cDNA se llevó a cabo a partir de 5 µg de RNA total utilizando el *kit SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y 0.5 µL del cebador oligodT (100 µM) en un volumen final de 20 µL. Las etapas de PCR se realizaron en un termociclador Perking Elmer 2400 utilizando la polimerasa *Kapa HiFi Hotstart* (Kapa Biosystems). Los *primers* utilizados así como el programa de amplificación se detallan en la tabla 2.

Los *primers* 11 y 12 permitieron la amplificación de la secuencia codificante para la GmNRX2.1 carente de su codón de terminación y flanqueada por sitios de restricción para las enzimas Sall y EcoRI. Este amplicón fue ligado entre los sitios Sall/EcoRI en el vector pENTR2B (Invitrogen; pENTR2B:*GmNRX2.1-stop*). Se transformaron células TOP10 electrocompetentes y los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/mL. Se realizaron minipreparaciones de plásmidos utilizando el método de lisis alcalina y se analizaron mediante restricción y secuenciación. Por otra parte, los *primers* 13 y 14 permitieron la amplificación de la secuencia codificante para la

GmNRX2.1 con su codón de terminación y flanqueada por los sitios de recombinación attB1 y attB2. Los mismos hacen posible la inserción del producto de PCR en el vector pDONR-Zeo (Invitrogen) mediante recombinación utilizando el *mix* de reacción *Gateway BP clonase II enzyme mix* (Invitrogen; pDONR-Zeo:*GmNRX2.1+stop*).

Sumado a los dos vectores antedichos, se generaron vectores de entrada conteniendo las secuencias codificantes para: a- mutante puntual del sitio activo potencialmente activo presente en el segundo dominio Trx (WCVPC, mutante C227S); b- segundo dominio Trx aislado (mutante truncado R191-A326) carente de su codón de terminación; y c- dominio C1 aislado (mutante truncado G356-V411) con y sin su codón de terminación. Los *primers* utilizados y las condiciones de amplificación se resumen en la tabla 2. Estos amplicones fueron ligados entre los sitios de restricción BamHI/XhoI en el vector pENTR2B, seleccionados y analizados como se comentó anteriormente.

Tabla 2. Primers y programas de PCR para generación de construcciones génicas.

Nº primer	Nombre	Secuencia	Aplicación	Programa PCR
11	FoGmNRX2-Sall	5'-AAGTCGACAGAGAAAAGCGGAGATGA-3'	Para clonado de <i>GmNRX2.1</i> sin codón de terminación en pENTR2B.	1- 95 °C, 5 m. 2- 10 ciclos: 98 °C, 20 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 80 s.
12	ReGmNRX2-EcoRI -stop	5'-AAGAATTCACATTATTGTCATGACGTT-3'		3- 30 ciclos: 98 °C, 20 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 80 s. 4- 72 °C, 5 m.
13	FoGmNRX2-Dnr	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAG GCTTGATGAAGGATGGAGCCCAAGTT-3'	Para clonado de <i>GmNRX2.1</i> con codón de terminación en pDONRZeo.	1- 95 °C, 5 m. 2- 10 ciclos: 98 °C, 20 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 80 s.
14	ReGmNRX2-Dnr	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTCCTAGACATTATTGTCATGACG-3'		3- 30 ciclos: 98 °C, 20 s; 72 °C, 60 s; 72 °C, 80 s. 4- 72 °C, 5 m.
15	FoGmNRX2-C227S	5'-AATGGTGCCTCCCATCCGCCAAGTCACTCC-3'	Para generación de mutante C227S.	1- 95 °C, 5 m. 2- 40 ciclos: 98 °C, 20 s; 60 °C, 15 s; 72 °C, 4 min 30 s.
16	ReGmNRX2-C227S	5'-GGAGTGAACCTGGCGGATGGGACGCACCATT-3'		4- 72 °C, 5 m.
17	FoTrx2-BamHI -stop	5'-TAGCAGGATCCATGAGAGACTATGTTTTGAGTC-3'	Para clonado de dominio TrxC sin codón de terminación en pENTR2B.	1- 95 °C, 5 m. 2- 35 ciclos: 98 °C, 20 s; 60 °C, 15 s; 72 °C, 40 s.
18	ReTrx2-XhoI	5'-TGGTGCTCGAGGACGCATTTCTTGGTACAAG-3'		4- 72 °C, 5 m.
19	FoC1-BamHI	5'-TGGTGGGATCCATGGGGCACCGCCATGATCTG-3'	Para clonado de dominio C1 sin codón de terminación en pENTR2B.	1- 95 °C, 5 m. 2- 35 ciclos: 98 °C, 20 s; 60 °C, 15 s; 72 °C, 30 s.
20	ReC1-XhoI -stop	5'-GCGGCCTCGAGGAGACATTATTGTCATGACGTTTC-3'		4- 72 °C, 5 m.
21	ReC1-EcoRI	5'-AAGAATTCCTAGACATTATTGTCATGA-3'	Para clonado de dominio C1 con codón de terminación en pENTR2B.	1- 95 °C, 5 m. 2- 35 ciclos: 98 °C, 20 s; 60 °C, 15 s; 72 °C, 30 s. 4- 72 °C, 5 m.

3.8 Generación de las construcciones para ensayos funcionales

Los vectores de entrada fueron utilizados para generar construcciones para la sobre-expresión de la GmNRX2.1 en plantas como fusiones al epítotope de hemaglutinina (HA)

amino (N) y carboxilo (C)-terminales y como fusión a la proteína fluorescente verde (GFP) C-terminal. Las fusiones a HA fueron utilizadas para generar plantas transgénicas establemente transformadas para realizar estudios fenotípicos, mientras que la fusión a GFP fue utilizada para estudios de localización subcelular. Todos los vectores utilizados permiten la expresión del gen bajo control del promotor constitutivo CaMV35S (*Cauliflower Mosaic Virus*).

Para generar la fusión a HA amino-terminales, el vector de entrada pDONR-Zeo:*GmNRX2.1+stop* fue recombinado en el vectores pGWB15 (Nakagawa *et al.*, 2007), utilizando el *mix* de reacción *Gateway LR Clonase II Enzyme mix* (Invitrogen). De igual forma, se recombinó el vector de entrada pENTR2B:*GmNRX2.1-stop* en los vectores pGWB14 y pGWB5 (Nakagawa *et al.*, 2007) para generar las fusiones C-terminales a HA y GFP, respectivamente. Se transformaron células Top10 electrocompetentes y los transformantes se seleccionaron en medio LB con espectinomicina 100 µg/mL en todos casos. Las construcciones generadas fueron analizadas mediante restricción y secuenciación y fueron utilizadas para transformar *Agrobacterium tumefaciens*.

3.9 Generación de construcciones para la expresión de proteína recombinante en *Escherichia coli*.

La secuencia codificante para la GmNRX2.1 fue clonada en un vector para expresión de proteína recombinante en *E. coli*, pET301/CT-Dest (Invitrogen). El mismo permite la expresión de la proteína recombinante bajo control del promotor T7 y como fusión a una cola de 6 histidinas C-terminal (His-Tag), lo que facilita la purificación de la proteína de interés mediante cromatografía de afinidad por metales (IMAC). De igual manera que se procedió para la generación de las construcciones para realizar ensayos funcionales (sección 3.8), el vector de entrada pENTR2B:*GmNRX2.1-stop* se recombinó con el vector pET301/CT-Dest utilizando el *mix* de reacción *Gateway LR Clonase II Enzyme mix*. Se transformaron células Top10 electrocompetentes y los transformantes se seleccionaron en medio LB con ampicilina 100 µg/mL. Las construcciones generadas fueron analizadas mediante restricción y secuenciación y fueron utilizadas para transformar cepas de *E. coli* idóneas para la expresión de proteína (Sección 3.11).

3.10 Generación de construcciones para la expresión de proteína recombinante en *Nicotiana benthamiana*.

Las secuencias codificante para la GmNRX2.1 y sus variantes fueron clonadas en vectores virales para expresión de proteínas recombinantes en el sistema vegetal *Nicotiana benthamiana* (pEAQ-HT-Dest, Sainsbury *et al.*, 2008; 2009). En estos vectores, la expresión del gen de interés está dirigida por un promotor constitutivo CaMV35S, pero a diferencia de otros vectores binarios comúnmente utilizados en estrategias de transgénesis, los vectores de la serie pEAQ presentan secuencias virales que flanquean al gen de interés actuando como 5' y 3' UTRs. Estas secuencias derivan del RNA-2 del virus del mosaico del poroto

(*cowpea mosaic virus*) y han sido modificadas para eliminar los genes codificantes para la cubierta y las proteínas de movimiento del virus. A su vez, la secuencia 5'-UTR fue modificada eliminando codones AUG fuera de marco, lo que produce un gran aumento en la traducción del gen (Peyret *et al.*, 2013). Por otra parte, estos vectores permiten la expresión de la proteína de interés sin ningún epítotope (pEAQ-Dest1) o como fusión a una cola de histidinas N-terminal (pEAQ-Dest2) o C-terminal (pEAQ-Dest3) (Figura 19).

Se generaron construcciones para: a- proteína wt completa; b- mutante puntual del sitio activo potencialmente (mutante C227S); c- segundo dominio Trx aislado (TrxC, mutante R191-A326); dominio C1 aislado (mutante G356-V411). El mutante puntual C227S fue generado por mutagénesis sitio-dirigida a partir de las construcciones pENTR2B:*GmNRX2-stop* y pDONR-Zeo:*GmNRX2.1+stop* mediante el método QuickChange (Xia *et al.*, 2014). La proteína wt, C227S y el dominio C1 fueron recombinados en los vectores pEAQ-Dest1, pEAQ-Dest2 y pEAQ-Dest3 mediante sistema Gateway (Invitrogen). El mutante truncado R191-A326 fue clonado en el vector pEAQ-Dest3. Las construcciones generadas fueron analizadas mediante restricción y secuenciación y fueron utilizadas para transformar *A. tumefaciens*.

3.11 Transformación de *Escherichia coli* para expresión de proteína recombinante

Se transformaron varias cepas de expresión de *E.coli*: BL21, BL21 pLysS, Rosetta, Tuner, Origami, Shuffle y pGro7, todas ellas DE3. Las bacterias a transformar fueron crecidas en 5 mL de medio LB, a 37 °C y 220 rpm, ON en ausencia de antibiótico. En el caso de la cepa BL21 pLysS se agregó cloranfenicol 34 µg/mL al medio. Las bacterias crecidas ON fueron inoculadas a 50 mL del mismo medio en una relación 1:50 y este cultivo se incubó a 37 °C y 220 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0.4. A continuación las células se incubaron 20 min en hielo, se recuperaron por centrifugación a 3.000 x g y 4 °C por 10 minutos y se resuspendieron en 5 mL de CaCl₂ 0.1 M a 4 °C, estéril. Luego de incubar la suspensión celular por 30 minutos en hielo, se centrifugó a 1.000 x g y a 4 °C por otros 10 minutos y finalmente las células se resuspendieron en 1 mL CaCl₂ 0.1 M en baño de hielo. 250 µL de la suspensión celular fueron transferidos a un tubo de microcentrífuga e incubados 30 minutos en hielo con 1-5 µL del plásmido de interés. Pasado este tiempo, las células se transformaron por *shock* térmico a 42 °C por 2 minutos, seguido de 5 minutos de incubación en hielo. Luego se agregaron 500 µL de medio LB a temperatura ambiente y se incubó por un lapso de 1 h a 37 °C y 220 rpm. Finalmente el total de células transformadas se plaquearon en LB-agar con agregado de ampicilina 100 µg/mL. Las placas se incubaron ON a 37 °C.

3.12 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó en todos los casos la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* (Deblaere *et al.*, 1985). Para todas las transformaciones realizadas se utilizó el electroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation System* (BioRad, USA, CA). La selección en placa y medio líquido se llevó a

cabo usando medio LB o YEP con 100 µg/mL de rifamicina, 100 µg/mL carbenicilina y el espectinomicina 100 µg/mL.

3.13 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Para cada construcción se sembraron al menos 5 macetas con 4 plantas de *A. thaliana* en cada una. Se cortaron las inflorescencias primarias y cuando se llegó al estado en que las plantas presentaron una mayoría de botones florales, se procedió a la transformación por inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Para ello se inocularon 500 mL de medio YEP con 100 µg/mL de rifamicina, carbenicilina y espectinomicina, con cultivos frescos de *A. tumefaciens* conteniendo las diferentes construcciones. Se incubó ON a 28 °C con agitación a 200 rpm, o hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 2.0. Se centrifugó el cultivo durante 20 minutos a 2.000 x g y se resuspendió en buffer de infiltración (½ MS, 5 % sacarosa, 0.05 % Silwett L-77) obteniendo una DO₆₀₀ mayor a 2.0. Las plantas se sumergieron en esta mezcla durante algunos segundos y se envolvieron en bolsas de nylon para prevenir la evaporación del inóculo. Al día siguiente se transfirieron a condiciones normales de crecimiento. Posteriormente se realizaron inoculaciones sobre los nuevos botones florales que fueron surgiendo. Para estas inoculaciones se depositó la suspensión bacteriana detallada anteriormente sobre cada botón floral (Martinez *et al.*, 2004). Una vez cosechadas las semillas, se sembraron en medio ½ MS pH 5.7, 0.5 % agar, con 25 µg/mL higromicina. Las plantas que sobrevivieron a los 12 días fueron transferidas a maceta y se cosecharon semillas para la siguiente ronda de selección. El proceso anterior se repitió hasta obtener plantas de las generaciones T2 y T3 (se considera T0 a las plantas originadas por las semillas obtenidas luego de la inoculación).

3.14 Agroinfiltración de hojas de tabaco y microscopía

Para cada construcción se inocularon 5 mL de medio LB o YEP con 100 µg/mL de rifamicina, carbenicilina y espectinomicina, con cultivos frescos (1 o 2 días) de *A. tumefaciens*. El crecimiento se realizó en agitación a 200 rpm ON a 28°C. Antes de infiltrar, se pulverizaron las plantas con agua destilada y se las colocó bajo luces para que los estomas se abrieran. Se centrifugó 1 mL del cultivo a 2.200 x g 5 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió el *pellet* en 1 mL de *buffer* de infiltración (50 mM ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES) pH 5.6, 2 mM fosfato de sodio, 0.5 % glucosa y 100 µM acetosiringona), se centrifugó y resuspendió nuevamente en 1 mL de *buffer* de infiltración. Se diluyó la suspensión bacteriana con *buffer* de infiltración hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0.1. Las infiltraciones se realizaron con jeringas de 5 mL sin aguja, presionando sobre el envés de las hojas. Se realizaron 3 o 4 infiltraciones por construcción. Transcurridos 2 días, se cortaron los trozos de hoja infiltrados y se montaron para ser visualizados en microscopio confocal espectral (Leica TCS SP5 montado sobre un microscopio invertido Leica DM6000, software de imagen, LASAF v2.6.0).

3.15 Ensayo de *Western Blot*

La extracción de proteínas para el ensayo de *Western blot* se realizó colocando 100 a 200 mg de material vegetal en un tubo para microcentrifuga junto con 100 μ L de buffer de extracción de proteínas comercial (Tris-HCl pH 8.5, glicerol 40 %, dodecil sulfato de litio y EDTA [sin especificar]; Agrisera, AS08 300) frío con agregado de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y se homogeneizó utilizando un homogeneizador mini beadbeater (Biospec Products). Se centrifugó durante a 10.000 x g durante 10 minutos y a 4 °C para separar los detritos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y utilizando el reactivo de Bio-Rad (*dye reagent concentrate Coomasie brilliant blue G-250*). Se cargaron 20 μ g de proteína por carril y, una vez completa la electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) el gel fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa a 80 V durante 2 horas utilizando *buffer* Tris 50 mM, ácido bórico 50 mM, pH 8.3). Luego de la transferencia la membrana se incubó con un anticuerpo comercial generado en conejo que reconoce específicamente el epítotope HA (Invitrogen, 710236). Se realizó una dilución 1:250 (se utiliza a una concentración final de 2 μ g/mL) en *buffer* PBS (detallado como NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4) con 5 % p/v de leche en polvo descremada (Conaprole; PBS-L) y se incubó ON a 4 °C. La incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado al fluoróforo IRDye 800CW (λ_{ex} : 778 nm, λ_{em} : 795 nm; LI-COR) se realizó en PBS-L a una dilución 1:5000. Todos los lavados se realizaron con PBS. La detección de la señal fluorescente se realizó en un equipo G:BOX Chemi XT4 (Syngene)

3.16 Evaluación molecular de líneas de *Arabidopsis* transgénicas

Para analizar los niveles de expresión de las plantas transformadas con las construcciones pGWB14:*GmNRX2.1* y pGWB15:*GmNRX2.1* se realizaron extracciones de RNA como se describe en la sección 3.3, se realizó la transcripción reversa utilizando la transcriptasa reversa Superscript III (Invitrogen) y se realizó PCR semicuantitativo utilizando los *primers* y las condiciones de ciclado indicados en la tabla 3. Como control de carga, se realizó PCR semicuantitativo para el gen de actina de *A. thaliana* utilizando los *primers* y condiciones indicadas en el mismo cuadro. Para verificar la inserción del transgen en el genoma de las plantas se realizó ensayo de *Southern Blot* como se describe en la sección 3.6. El grado de expresión de proteína se analizó mediante ensayo de *Western Blot* como se detalla en la sección 3.15.

Tabla 3. Primers y programas de PCR utilizados para PCR semi-cuantitativo.

Nº primer	Nombre	Secuencia	Aplicación	Programa PCR
22	FoAtActina2	5'-GCAACTGGGATGATATGGAAAAGA-3'	Para RT-PCR	1- 95 °C, 3 m.
23	ReAtActina2	5'-AGCAGCTTCATTCCACAAA-3'	semicuantitativo del gen de actina2 de <i>A. thaliana</i> .	2- 18, 20, 22, 25 ciclos: 95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 50 s.
24	FoGmNRX int	5'-GAGTGTCACACGCTCTTCTCATCA-3'	Para RT-PCR	1- 95 °C, 3 m.
12	ReGmNRX2-EcoRI -stop	5'-AAGAATTCACATTATTGTCATGACGTT-3'	semicuantitativo del gen <i>GmNRX2.1</i> .	2- 18, 20, 22, 25 ciclos: 95 °C, 30 s; 58 °C, 30 s; 72 °C, 50 s.

3.17 Evaluación fenotípica de líneas de *Arabidopsis* transgénicas

La caracterización fenotípica se realizó adaptando los protocolos descritos por Versules *et al.*, 2006. Las semillas se sembraron en placas de Petri con medio ½ MS pH 5.7, 0.5 % agar y se estratificaron durante 5 a 7 días en heladera a 4 °C. A los 5 - 7 días, dependiendo del vigor, las plántulas que presentaban los dos cotiledones expandidos, se transfirieron a los correspondientes medios de estrés y control. Las plántulas se colocaron de manera vertical, recostadas en el mismo medio de cultivo pero con 1.5 % de agar para evaluar el crecimiento de la raíz. Se utilizaron tratamientos de manitol 250 mM, NaCl 150 mM y placas sumergidas en polietilenglicol (de peso molecular 8000 g/mol; PEG8000) 40 % (-0.7 MPa), de acuerdo a van der Weele *et al.* (2000). Transcurridos 7 a 14 días de establecidos los tratamientos de estrés y control, se realizaron medidas de peso fresco de raíz y parte aérea. Se analizaron un total de 16 plantas por tratamiento y por genotipo.

3.18 Ensayos de inducción de la expresión de proteína recombinante en *Escherichia coli*

Se realizaron pruebas de inducción para cepas BL21, BL21 pLysS, Rosetta, Tuner, Origami, Shuffle, DNA star, codon plus y pGro7 transformadas con la construcción pET301/CT-Dest:*GmNRX2.1*. Se utilizaron los medios TB (detallado como 24 g/L extracto de levadura, 12 g/L triptona, 4 mL/L glicerol, 17 mM KH₂PO₄ y K₂HPO₄, pH 7.4), 2XYT (detallado como 20 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptosa y 5 g/L de NaCl) con agregado de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1000 μM o en medio de autoinducción a 28 °C.

Estudio proteómico de líneas de *Arabidopsis* wt y sobre-expresantes del gen *GmE1Fiso4G*

3.19 Extracción de proteínas totales por método de TCA-Acetona

La extracción se realizó adaptando el protocolo descrito por Mechin *et al.*, 2007. Aproximadamente 200 mg de material vegetal perteneciente a la línea transgénica número 5 con y sin agregado de β-estradiol en condiciones de estrés osmótico (placas equilibradas con PEG8000 40 %) fue congelado en nitrógeno líquido en tubos para microcentrífuga conteniendo perlas de zirconio de 2 mm de diámetro (Biospec Products) y fue procesado en un *mini beadbeater* (Biospec Products) durante 1 minuto. Se agregó al tejido molido 1.5 mL

de una solución conteniendo 10 % p/v ácido tricloroacético (TCA), 0.07 % v/v β -ME en acetona fría y se incubó durante 1 hora a -20 °C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos a 4 °C y se resuspendió el *pellet* en una solución de lavado conteniendo 0.07 % v/v β -ME en acetona fría. El sedimento se incubó durante 1 hora a -20 °C, invirtiendo regularmente. El lavado se repitió 3 veces. El *pellet* resultante se dejó secar en cámara de flujo. Una vez seco, las proteínas se resuspendieron en una solución conteniendo 7 M urea, 2 M tiourea, 2 % 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanensulfonato (CHAPS) y 16 mM ditiotreitól (DTT). Tras la resuspensión, los detritos celulares fueron eliminados por centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos y a 25 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y la centrifugación se repitió una vez más. Las extracciones de proteína fueron visualizadas mediante SDS-PAGE y cuantificadas mediante densitometría utilizando el software *Imagequant* (Amersham).

3.20 Extracción de proteínas y eliminación de RubisCO

Aproximadamente 50 mg de material vegetal fue congelado en nitrógeno líquido en tubos para microcentrífuga conteniendo perlas de zirconio de 2 mm de diámetro (Biospec Products) y fue procesado en un *mini beadbeater* (Biospec Products) durante 1 min. Se agregó al tejido molido 500 μ L de buffer de extracción de proteínas (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, glicerol 20 %, pH 7 con agregado de PMSF 5 mM). La concentración de proteína se estimó midiendo la absorbancia a 280 nm y considerando que 1.3 unidades de absorbancia corresponden a aproximadamente 1 mg/mL de proteína (Grimsley *et al.*, 2004). Poco más de 0.8 mg de proteína fueron sembradas en columnas de afinidad anti-RubisCOs *Seppro RubisCO spin columns* (Sigma) para la eliminación de dicha proteína, para lo cual se siguieron las especificaciones del fabricante. Brevemente, las proteínas totales son incubadas con la resina de afinidad durante 15 minutos y se realizan lavados de manera de arrastrar las proteínas unidas inespecíficamente. La fracción no unida y las correspondientes a los lavados son las fracciones de interés. Finalmente, las proteínas unidas específicamente a la resina son eluidas con un *buffer* glicina 0.1 M, pH 2.5. Inmediatamente eluidas las fracciones conteniendo las proteínas no unidas (fracción no unida y primer lavado de la columna), las mismas se *poolearon* y se precipitaron con 9 volúmenes de TCA-Acetona y empleando la metodología antes descrita. Las extracciones de proteína fueron visualizadas mediante SDS-PAGE.

3.21 Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional se realizó en colaboración con la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo. Previo la electroforesis, todas las muestras fueron limpiadas utilizando el *2D clean-up kit* (GE) y resuspendidas en una solución de rehidratación conteniendo 7 M urea, 2 M tiourea, 2 % p/v CHAPS, 17 mM DTT, 0.002 % azul de bromfenol y 0.5 % v/v *buffer* IPG pH 3-11 NL (GE). El isoelectroenfoco se realizó

utilizando tiras de inmovilina de rango de pH 3-11 NL de 7 cm y de 13 cm (GE). La rehidratación pasiva de las tiras se realizó durante 18 horas. Pasado este tiempo las tiras se equilibraron en una solución de *buffer* Tris-HCl 75 mM pH 8.8, 6 M urea, 29.3 % v/v glicerol, 2 % SDS, 0.002 % azul de bromofenol, 17 mM DTT con agregado de 10 mg/mL DTT durante 15 minutos y luego en la misma solución conteniendo 25 mg/mL iodoacetamida (IAM) por 15 minutos más. En el caso de las tiras de 7 cm, se realizó una carga de 60 µg de proteína y se utilizó el siguiente programa de corrida: 1) *step and hold*: 300 V, 30 minutos; 2) gradiente: 1000 V, 30 minutos; 3) gradiente: 5000 V, 1 hora 20 minutos; 4) *step and hold*: 5000 V, 6-25 minutos. La segunda dimensión se llevó a cabo a 10 mA por 15 minutos y a 20 mA hasta el final de la corrida. Por otro lado, para las tiras de 13 cm se realizó una carga de 80 µg y el siguiente programa de corrida: 1) *step and hold*: 500 V, 1 hora; 2) gradiente: 1000 V, 1 hora; 3) gradiente: 8000 V, 2 horas 30 minutos; 4) *step and hold*: 8000 V, 10-30 minutos. La segunda dimensión se realizó a 10 mA durante 10 minutos y a 30 mA hasta el final de la corrida. Los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal (G250) ON y lavados con agua al día siguiente para evidenciar los *spots*.

3.22 Escisión de los spots e identificación de las proteínas por espectrometría de masas.

Se realizó un análisis comparativo de los geles correspondientes a línea transgénica número 5, con y sin agregado de β-estradiol, en condiciones de estrés osmótico, utilizando el *software* Melanie 6.0. Se determinaron 8 *spots* de interés, los cuales fueron recortados del gel y las proteínas fueron extraídas del mismo. Las proteínas fueron sometidas a digestión trípica y los péptidos se mezclaron con la matriz de MALDI. La masa molecular de los péptidos fue determinada por espectrometría de masas (MS) utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF. La identificación de las proteínas se realizó ingresando la huella peptídica en el motor de búsqueda con *Mascot*.

4.Resultados

Caracterización del rol funcional de una nucleorredoxina de tipo II de soja.

4.1 Nucleorredoxinas de soja

Para analizar la composición de la familia de las NRXs de soja, se realizaron búsquedas sobre el genoma publicado de soja en la base de datos Phytozome (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), utilizando la secuencia proteica de la GmNRX2.1 así como las secuencias proteicas de los miembros de la familia de las NRXs de *A. thaliana*. De esa forma, se determinó que el genoma de soja presenta cinco genes codificantes para NRXs: Glyma.04G021000.1, Glyma.04G076900.1, Glyma.06G021200.1, Glyma.06G078100.1, Glyma.08G285900.1. Uno de tipo I (Glyma.08G285900; de ahora en más, *GmNRX1*), dos de tipo II (Glyma.06G021200, Glyma.04G021000; *GmNRX2.1* y *GmNRX2.2*) y dos de tipo III (Glyma.06G078100 y Glyma.04G076900; *GmNRX3.1* y *GmNRX3.2*) (Figura 4). A su vez, los genes Glyma.04G076900 y Glyma.06G021200 originarían cada uno dos proteínas diferentes gracias a la posibilidad de variaciones en el *splicing*, por lo que existirían siete proteínas diferentes codificadas. *GmNRX1* codifica una proteína de 570 aa, la cual consta de una organización de tres dominios Trx asociados a un dominio C1 C-terminal. Esta proteína guarda un 64 % de identidad con su ortólogo en *A. thaliana* (At1g60420.1; *AtNRX1*). Los genes de tipo II y de tipo III presentan una organización de dominios similar, con dos dominios Trx y un dominio C1 C-terminal. Las NRXs de tipo III presentan 389 (*GmNRX3.1*), 389 y 291 aa (*GmNRX3.2*) y guardan un 60 % de identidad con su ortólogo en *A. thaliana* (At4g31240.1). Por su parte, las NRXs de tipo II presentan 434, 411 (*GmNRX2.1*) y 423 aa (*GmNRX2.2*) y no poseen genes ortólogos en *A. thaliana*. No obstante, *GmNRX2.1* guarda un 39 % de identidad con *AtNRX1* y un 37 % de identidad con *AtNRX3*, mientras que *GmNRX2.2* presenta un 42 % y 39 % de identidad con *AtNRX1* y *AtNRX2*, respectivamente. Si bien la identidad es algo mayor respecto a *AtNRX1*, la organización de dominios se asemeja más a *AtNRX3*.

Durante el trabajo de doctorado del Dr. Gallino, se determinó que uno de los genes correspondiente a una NRX de tipo II (Glyma.06G021200, *GmNRX2.1*) aumenta considerablemente su expresión en respuesta a sequía en genotipos de soja tolerantes a dicho estrés (N7001 y Munasqa), mientras que su expresión es menor en el genotipo susceptible (TJ2049). A su vez, se pudo apreciar que en el genotipo Munasqa existe cierta expresión basal del transcripto en condiciones control (Figura 1). Con el objetivo de obtener información sobre el perfil de expresión génica de los distintos miembros de la familia de las NRX de soja y de *A. thaliana*, se analizó el nivel de expresión de estos genes en bases de datos conteniendo información transcriptómica de estas especies vegetales. Un estudio transcriptómico realizado en soja cultivar Williams 82 en estadio V6 confirmó las observaciones de nuestro grupo, determinando que el gen *GmNRX2.1* aumenta su expresión en respuesta a sequía en una proporción de 13 veces, en tanto que los genes *GmNRX2.2* y

GmNRX3.2 lo hacen en 3.5 y 1.6 veces, respectivamente (Le *et al.*, 2012). En cambio el gen *GmNRX3.1* disminuye 2 veces su expresión en respuesta a sequía. Por otro lado, los genes de *A. thaliana*, también incrementan su expresión ante tratamientos de sequía, manitol (estrés osmótico) y NaCl (Genevestigator, <https://genevestigator.com/gv/>), y también lo hace el gen más cercano de *Medicago truncatula* (Medtr3g114530.1) en respuesta a NaCl (*Medicago truncatula Gene Expression Atlas, MtGEA*, <http://mtgea.noble.org/v3/>), lo que sugiere la participación de las NRXs en las respuestas frente a estrés abiótico.

En base al análisis de la relación filogenética que existe entre los genes codificantes para NRX en soja y las diferentes clases de NRX de plantas, el gen en estudio (Glyma.06G021200, *GmNRX2.1*) trata entonces de una NRX de tipo II. Ninguno de sus dominios Trx presenta sitios activos potenciales canónicos (WCGPC). El dominio Trx N-terminal (TrxN) presenta una secuencia WYPPC, lo que resulta curioso ya que no es común observar la sustitución de la Cys N-terminal (Figura 5). Si este dominio es en sí mismo catalíticamente activo es desconocido. El segundo dominio Trx (TrxC) presenta un sitio activo que sí es activo en potencia, con una secuencia WCVPC (Figura 6.A). El dominio C1, por su parte, presenta conservación a nivel de ciertos residuos clave (C375, C378, G382, W385, C391, C394, H399 y C402) que probablemente participen en la coordinación de átomos metálicos o presenten una función estructural fundamental.

4.2 Determinación de la localización subcelular de la GmNRX2.1

Con el propósito de determinar la localización subcelular de la *GmNRX2.1*, se observó mediante microscopía confocal la señal de la fusión *GmNRX2.1:GFP* en plantas de tabaco que expresan la *GmNRX2.1:GFP* transitoriamente. Para ello, la secuencia de cDNA codificante para la *GmNRX2.1* fue aislada a partir de mRNA de soja N7001 sometida a déficit hídrico y clonada mediante tecnología Gateway (Invitrogen) en un vector binario pGWB5 (Nakagawa *et al.*, 2007) para la expresión en planta como fusión a GFP C-terminal. Esta construcción permite la expresión del transgen bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (Odell *et al.*, 1985) (Figura 7). Se realizó la agroinfiltración de hojas de tabaco como se describe en la sección 3.14 y se visualizó la señal fluorescente mediante microscopía confocal 48 h post-infección. Se evidenció que la proteína presenta una localización principalmente citosólica y posiblemente nuclear (Figura 8).

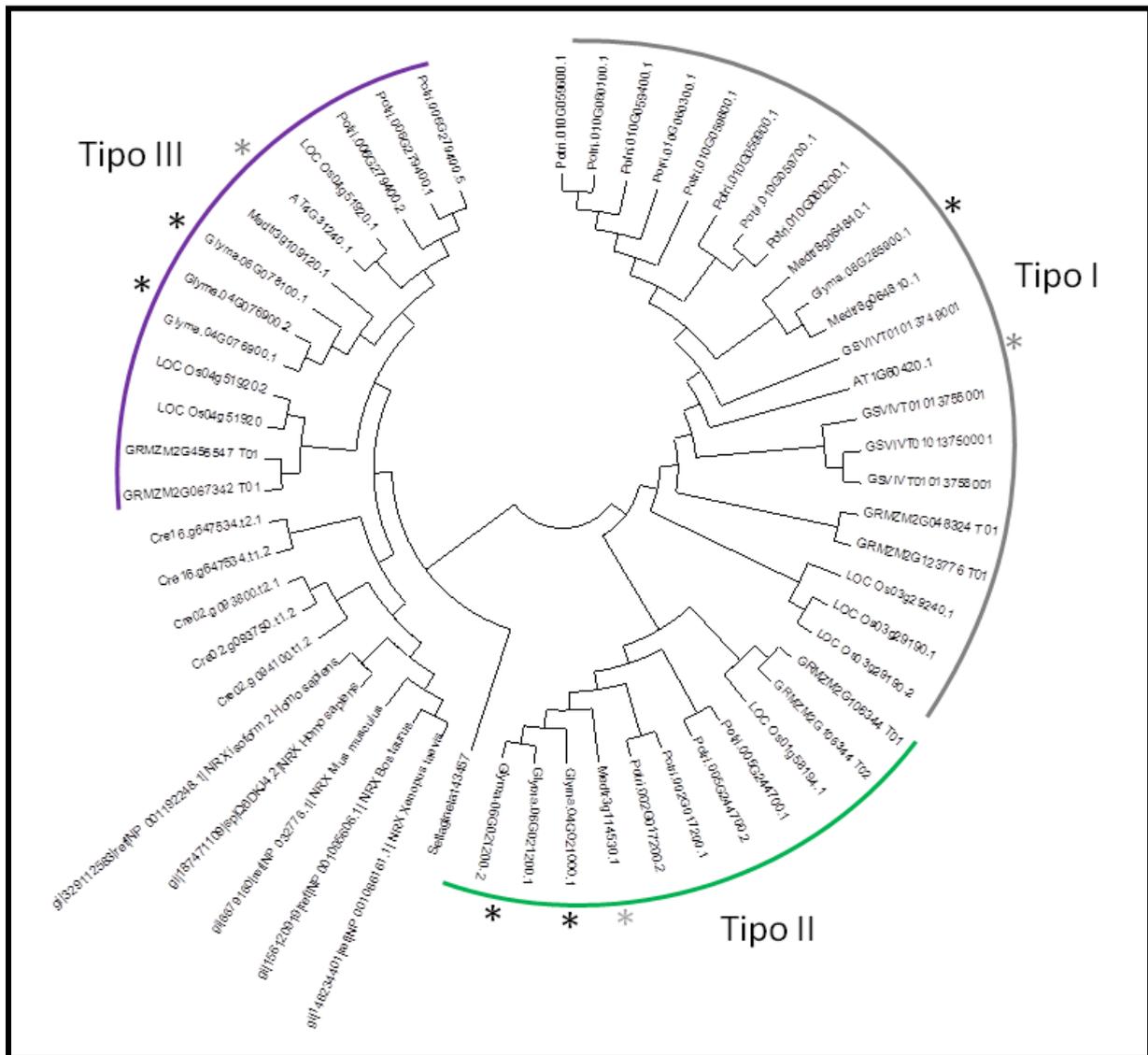


Figura 4. Árbol filogenético de la familia de las NRXs. El árbol fue generado utilizando 56 secuencias proteicas no redundantes. Se realizó un alineamiento utilizando el *software* Clustal W y las relaciones filogenéticas fueron trazadas utilizando el *software* Mega6 por el método de *Neighbour joining*. Sólo se muestra las relaciones topológicas. Las NRXs se agrupan en tres grupos: tipo I, tipo II y tipo III, cuyas características se describen en el texto principal. En asteriscos negros se indican las posiciones de las NRXs de soja. En gris oscuro se indican las NRXs de *A. thaliana* y en gris claro se indica el ortólogo más cercano de *M. truncatula*. Las secuencias incluidas fueron: AT1G60420.1, AT4G31240.1, Cre02.g093750.t1.2, Cre02.g093800.t2.1, Cre02.g094100.t1.2, Cre16.g647534.t1.2, Cre16.g647534.t2.1, NP_001086161.1| NRX Xenopus laevis, NP_001095606.1| NRX Bos taurus, Q6DKJ4.2|NRX Homo sapiens, NP_001192248.1| NRX isoform 2 Homo sapiens, NP_032776.1| NRX Mus musculus, Glyma.04G021000.1, Glyma.04G076900.1, Glyma.04G076900.2, Glyma.06G021200.1, Glyma.06G021200.2, Glyma.06G078100.1, Glyma.08G285900.1, GRMZM2G048324_T01, GRMZM2G067342_T01, GRMZM2G106344_T01, GRMZM2G106344_T02, GRMZM2G123776_T01, GRMZM2G456547_T01, GSVIVT01013749001, GSVIVT01013750001, GSVIVT01013755001, GSVIVT01013758001, LOC_Os01g58194.1, LOC_Os03g29190.1, LOC_Os03g29190.2, LOC_Os03g29240.1, LOC_Os04g51920.1, LOC_Os04g51920.2, Medtr3g109120.1, Medtr3g114530.1, Medtr8g064810.1, Medtr8g064840.1 Potri.002G017200.1, Potri.002G017200.2, Potri.005G244700.1, Potri.005G244700.2, Potri.006G279400.1, Potri.006G279400.2, Potri.006G279400.5, Potri.010G059400.1, Potri.010G059600.1, Potri.010G059700.1, Potri.010G059800.1, Potri.010G059900.1, Potri.010G060100.1, Potri.010G060200.1, Potri.010G060300.1, Sellaginela143457.

	10	20	30	40	50	60
Glyma.04G021000.1	M	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.04G076900.1	M	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.04G076900.2	M	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G021200.1	M	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G021200.2	M	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G078100.1	M	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.08G285900.1	M	-----ADSA	DVTHDVVSL	SSPQDFLLR	NNGDQVKIDS	LKGKKLGLYF
AT1G60420.1	M	-----MAETSKQVNG	DDAQDLHSL	SSPARDFLVR	NDGEQVKVDS	LLGKKIGLYF
AT4G31240.1	M	-----	-----	-----	-----	-----

	70	80	90	100	110	120
Glyma.04G021000.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.04G076900.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.04G076900.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G021200.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G021200.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G078100.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.08G285900.1	FTPTLV	DVYN	EVAKK	GDFQI	VFITADE	DEDE
AT1G60420.1	FTPQL	VEVYN	ELSSK	VGF EI	VFVSG	DEDEE
AT4G31240.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	130	140	150	160	170	180
Glyma.04G021000.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.04G076900.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.04G076900.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G021200.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G021200.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G078100.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.08G285900.1	VRGIPHL	LALL	DEAGNV	VVTE	GVDVIRE	YGV
AT1G60420.1	VRGIPNL	VMV	DDHGK	LVNEN	GVGVI	RSYGA
AT4G31240.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	190	200	210	220	230	240
Glyma.04G021000.1	ASQDF	DYLLS	PTGAQ	VKVS	LEGKV	VGLLF
Glyma.04G076900.1	AAEGV	EFLLS	CEG-	KVPV	CNGKI	ICLFF
Glyma.04G076900.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G021200.1	ASQDF	DYLLS	PTGAQ	VKVS	LEGRV	VGLLF
Glyma.06G021200.2	ASQDF	DYLLS	PTGAQ	VKVS	LEGRV	VGLLF
Glyma.06G078100.1	AAEGV	EFLLS	CEG-	KVPV	CNGKI	ICLFF
Glyma.08G285900.1	VSPSF	DFVIS	SDGK	KTIV	SE	LEGKT
AT1G60420.1	VTPSF	DFVIS	PDGN	KVPV	SE	LEGKT
AT4G31240.1	AAEGV	EFLLS	HSG-	EVPLEY	IHGKT	ICLFF

	250	260	270	280	290	300
Glyma.04G021000.1	IVYVSS	DEDL	NAFNS	FYGS	M	PWLAIP
Glyma.04G076900.1	IIFIS	FDRDE	DGFKE	HFKN	M	PWLAVP
Glyma.04G076900.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Glyma.06G021200.1	IVYVSS	DENL	DAFNS	FYGN	M	PWLAIP
Glyma.06G021200.2	IVYVSS	DENL	DAFNS	FYGN	M	PWLAIP
Glyma.06G078100.1	IIFIS	FDRDE	DGFKE	HFKN	M	PWLAVP
Glyma.08G285900.1	VVLIPL	DDDE	ESFK	ELLES	V	PWLSLP
AT1G60420.1	IVLIS	LEDE	ESFN	QDFK	T	PWLALP
AT4G31240.1	IIFV	SFDH	DM	TSFY	EHF	WCM

	310	320	330	340	350	360
Glyma.04G021000.1	TVRD	GVELIY	RYGI	QAYP	ES	KDRLE
Glyma.04G076900.1	IEED	LIGCIE	DYGAD	AFFP	ET	RKRHE
Glyma.04G076900.2	IEED	LIGCIE	DYGAD	AFFP	ET	RKRHE
Glyma.06G021200.1	TVRD	GVELIY	RYGI	QAYP	ES	NERLE
Glyma.06G021200.2	TVRD	GVELIY	RYGI	QAYP	ES	NERLE
Glyma.06G078100.1	IEED	LIGCIE	DYGAD	AFFP	ET	RKRHE
Glyma.08G285900.1	LHSN	VAAE	AIE	DHGVA	AYP	PEKFA
AT1G60420.1	RHSN	VAAE	AID	DYGVL	AYP	PEKFO
AT4G31240.1	VAED	VIGLIE	DYGSE	AFFP	ET	KKRKE

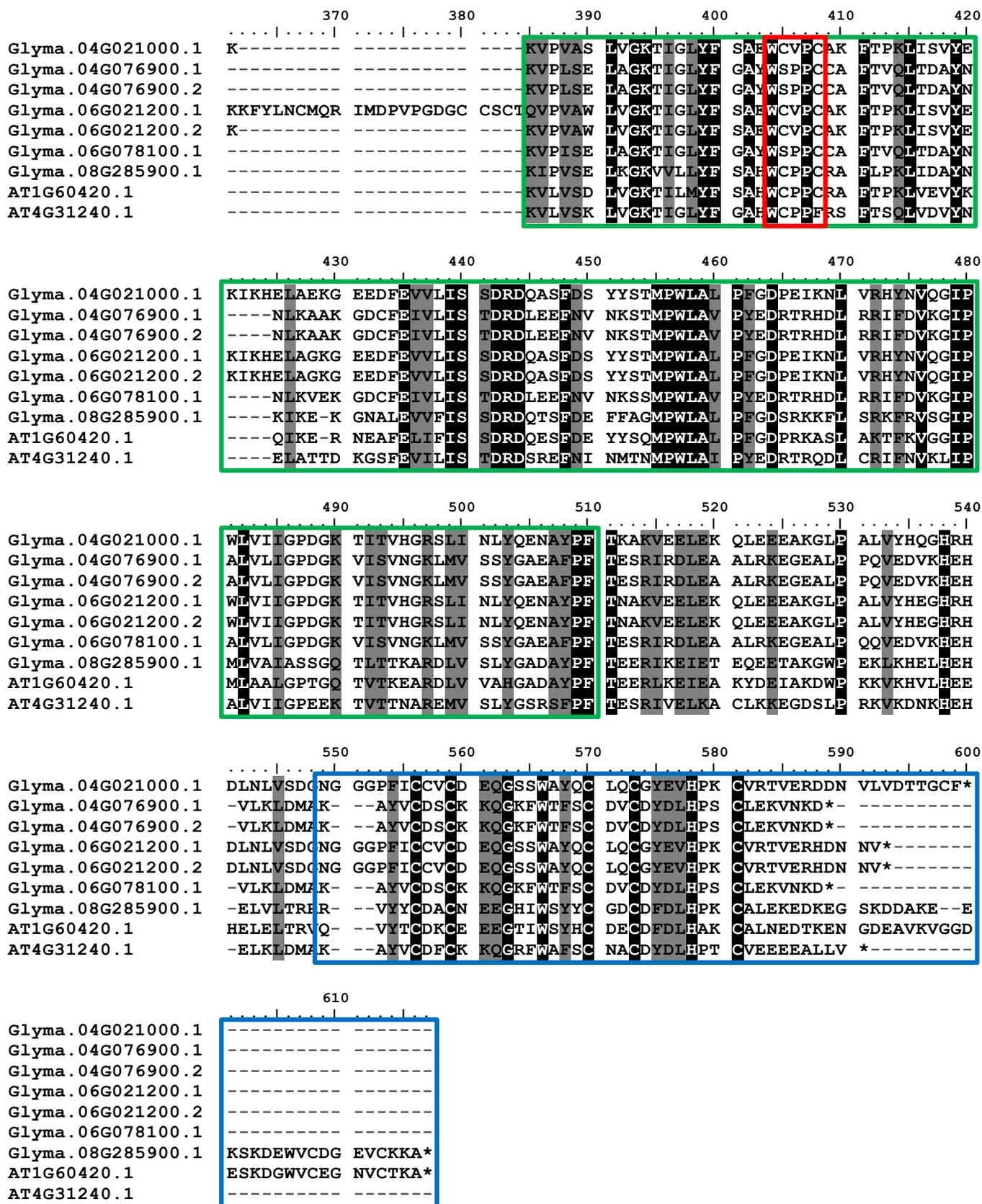


Figura 5. Alineamiento de las NRXs de soja y *A. thaliana*. El alineamiento se realizó utilizando el software ClustalW. Los residuos conservados en el 100 % de los casos se indican en negro y los conservados en el 90 % de los casos, en gris. En verde se indican los dominios Trx. En azul se indica el dominio C1. Los sitios activos tentativos se remarcan en rojo.

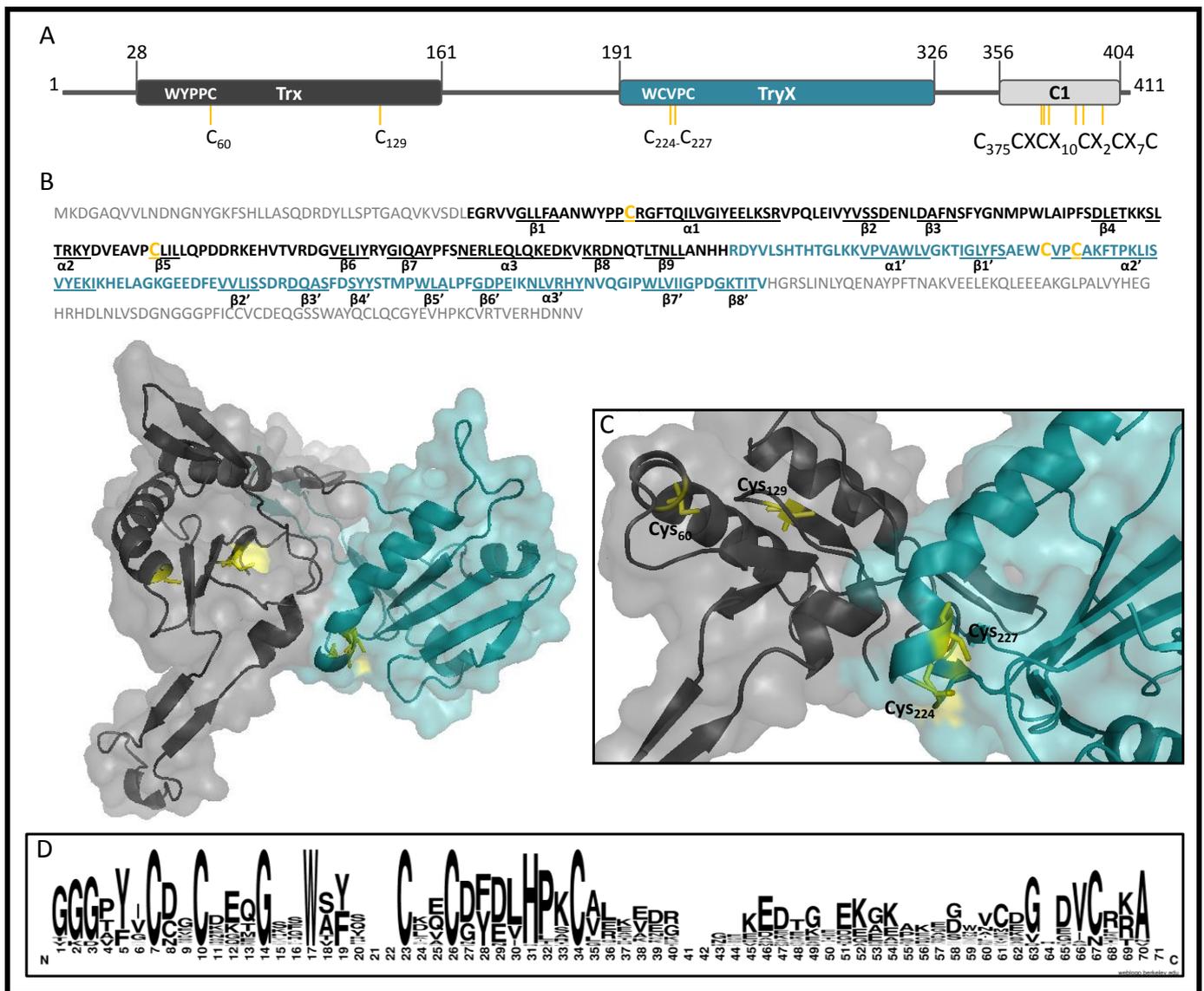


Figura 6. A. Organización modular de la GmNRX2.1. La GmNRX2.1 presenta dos dominios Trx atípicos, los cuales presentan sitios activos tentativos no canónicos, WYPPC y WCVPC. El segundo dominio Trx se identifica como un dominio *tryparedoxin-like* (TryX), cuya presencia resulta característica de las NRxs y proteínas familiarizadas. Asimismo, se muestra la presencia de un dominio rico en cisteínas C1, C-terminal. **B. Modelo *in silico* de los dominios Trx de la GmNRX2.1.** El modelo fue generado utilizando el recurso *Swiss model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) y solamente se incluyeron los aa correspondientes a los dominios Trx. El dominio Trx N-terminal (TrxN) se muestra en gris, en verde el dominio Trx C-terminal (TrxC) y en amarillo las cys. **C.** De acuerdo a este modelo, las cys en el dominio TrxC exhibirían una disposición habitual, donde la cys catalítica se posiciona en un *loop* previo a una hélice α . Si bien el dominio TrxN no presenta un sitio activo aparentemente activo, en el modelo pareciera haber cercanía espacial con otra cisteína alejada del sitio activo (C129). **D. Frecuencia de residuos dentro del dominio C1.** Se incluyeron 40 secuencias correspondientes a dominios C1 de NRxs de plantas, se realizó un alineamiento utilizando el *software* Mega6 y se generó el logo utilizando el recurso *web logo* (<http://weblogo.berkeley.edu/>). Se observa la presencia de residuos muy conservados. En particular los residuos C7, C10, G14, W17, C23, C26, H31 y C34 se conservan en el 100 % de los casos. Las secuencias incluidas fueron: AT1G60420.1, Glyma.04G021000.1, Glyma.04G076900.1, Glyma.04G076900.2, Glyma.06G021200.1, Glyma.06G021200.2, Glyma.06G078100.1, Glyma.08G285900.1, GRMZM2G048324_T01, GRMZM2G106344_T01, GRMZM2G106344_T02, GRMZM2G123776_T01, GRMZM2G456547_T01, GSVIVT01013750001, GSVIVT01013758001, LOC_Os01g58194.1, LOC_Os03g29190.1, LOC_Os03g29190.2, LOC_Os03g29240.1, LOC_Os04g51920.1, LOC_Os04g51920.2, Medtr3g109120.1, Medtr3g114530.1, Medtr8g064810.1, Potri.002G017200.1, Potri.002G017200.2, Potri.005G244700.1, Potri.005G244700.2, Potri.006G279400.1, Potri.006G279400.2, Potri.006G279400.5, Potri.010G059400.1, Potri.010G059600.1, Potri.010G059700.1, Potri.010G059900.1, Potri.010G060100.1, Potri.010G060200.1, Potri.010G060300.1, Sellaginela143457.

A su vez, se generaron plantas de *A. thaliana* transgénicas que expresan constitutivamente la fusión GmNRX2.1:GFP con el fin de poder monitorear *in vivo* la distribución intracelular de GmNRX2.1 frente a distintos estímulos o tratamientos. Esto se realizó ya que los dominios C1 han sido descritos como dominios que participan en la relocalización de las proteínas hacia membranas tras la unión de DAG (Geczy *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 1994; Hall *et al.*, 2005; Kazanietz *et al.*, 1992; Leonard *et al.*, 2011; Mamidi *et al.*, 2012; Oancea *et al.*, 1998; Quest *et al.*, 1994) o debido a cambios redox (Korichneva *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2011). Las plantas transgénicas fueron tratadas con ABA o H₂O₂ durante 2 h o incubadas en placas con PEG o NaCl durante 16 h y la señal de GFP fue analizada por microscopía confocal. Los resultados no evidenciaron que la proteína se relocalizara ante estos tratamientos, ya que la señal fue similar en las plantas no tratadas que en las tratadas, tanto en la parte aérea (Figura 9) como en la raíz (Figura 10).

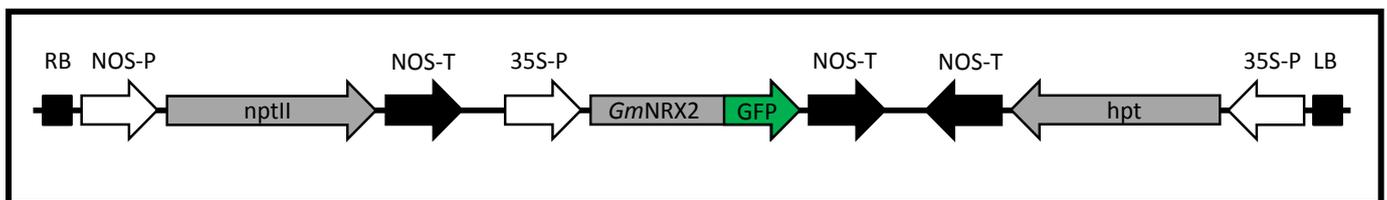


Figura 7. Esquema de las construcciones generadas para determinación de la localización subcelular de la GmNRX2.1. Sólo se indican los elementos dentro del T-DNA. **A. Diagrama de la construcción pGWB5:GmNRX2.1.** El vector pGWB5 permite la expresión de la proteína bajo control del promotor constitutivo CaMV35S (35S-P) y como fusión C-terminal a GFP. El codón de terminación de la *GmNRX2.1* fue eliminado. Se indican: RB: borde derecho (*right border*); LB: borde izquierdo (*left border*); NOS-P: *nopaline synthase promoter*; NOS-T: *nopaline synthase terminator*; nptII: *neomycin phosphotransferase* (confiere resistencia a kanamicina); hpt: *hygromycin phosphotranferase* (confiere resistencia a higromicina).

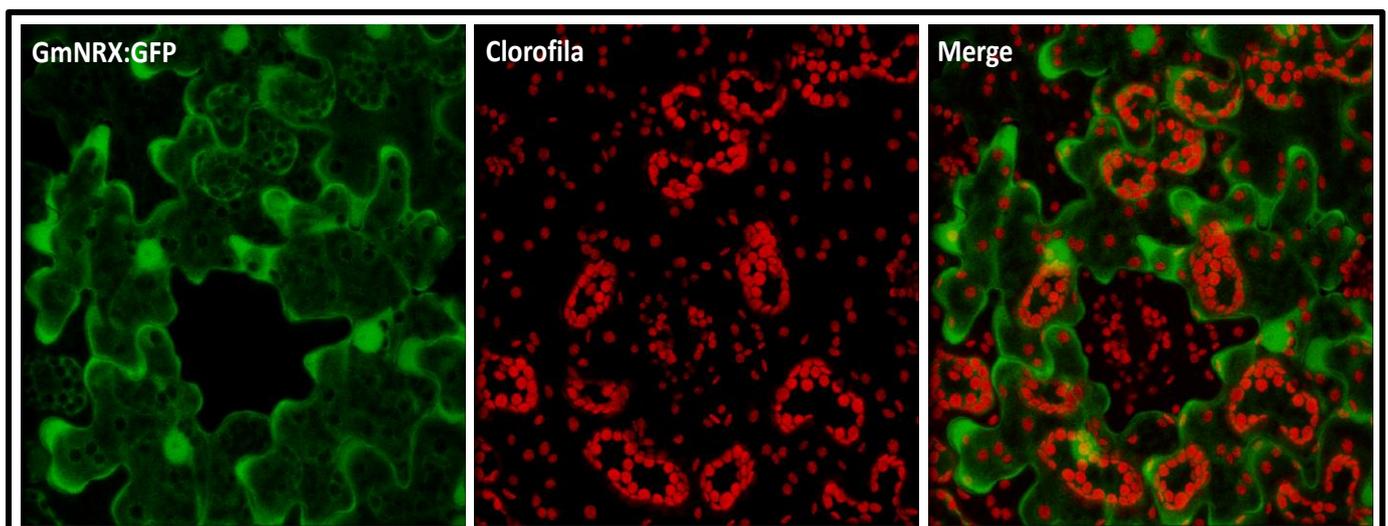


Figura 8. Localización subcelular por expresión transitoria en hojas de tabaco. Se realizó agroinfiltración de hojas de tabaco y pasadas 48 h se observó la emisión de GFP por microscopía óptica confocal. La proteína exhibe una localización principalmente citosólica.

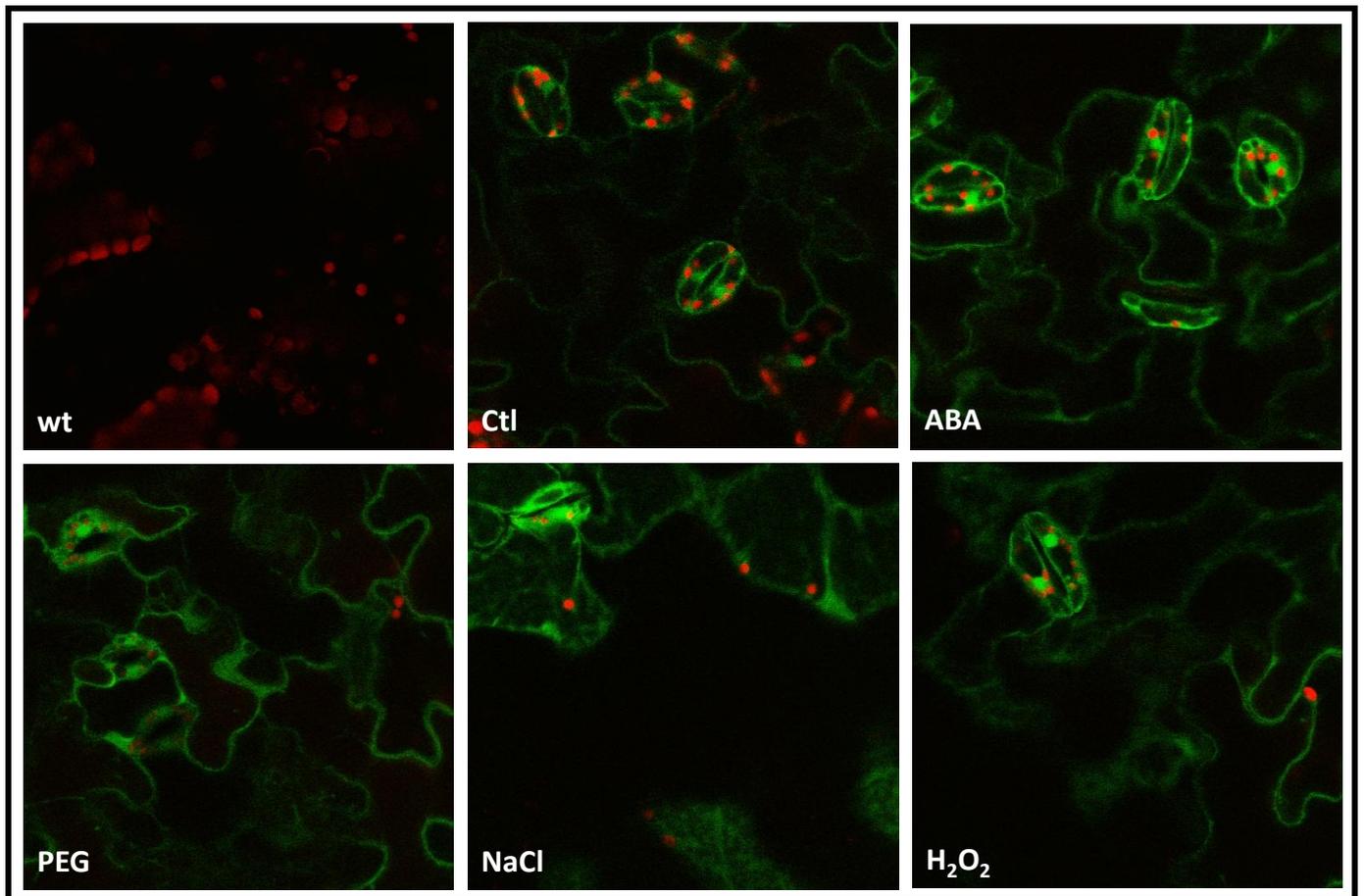


Figura 9. Localización subcelular en la parte aérea de plantas de *A. thaliana* establemente transformadas. Se observó la localización de la señal de la GFP ante tratamientos de ABA 50 μ M o H_2O_2 1mM durante 2 h o incubadas en placas equilibradas con PEG8000 40% o NaCl 150 mM durante 16 h. La proteína de fusión no muestra relocalización evidente ante los estímulos evaluados.

4.3 Generación y caracterización molecular de líneas transgénicas de *A. thaliana* que sobre-expresan el gen *GmNRX2.1*

Procurando evaluar la participación de *GmNRX2.1* en la tolerancia al estrés hídrico u otras condiciones de estrés, se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobre-expresan este gen. Para ello, la secuencia de cDNA codificante para la *GmNRX2.1* fue clonada en vectores binarios para la expresión en planta como fusiones al epítipo de hemaglutinina (HA). Para ello se emplearon los vectores pGWB14 y pGWB15 (Nakagawa *et al.*, 2007) para realizar fusiones N y C-terminal, respectivamente. Estas construcciones también permiten la expresión del transgen bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (Figura 11). Se generaron plantas transgénicas de *A. thaliana* con estas construcciones y las semillas obtenidas (T0) fueron sometidas a dos rondas de selección en un medio con higromicina hasta la obtención de la generación T3.

Se obtuvieron varias líneas resistentes a higromicina para ambas construcciones (pGWB14:*GmNRX2.1* y pGWB15:*GmNRX2.1*). Para seleccionar las líneas a utilizar en los ensayos fenotípicos, se procedió a determinar el grado de acumulación del transcrito

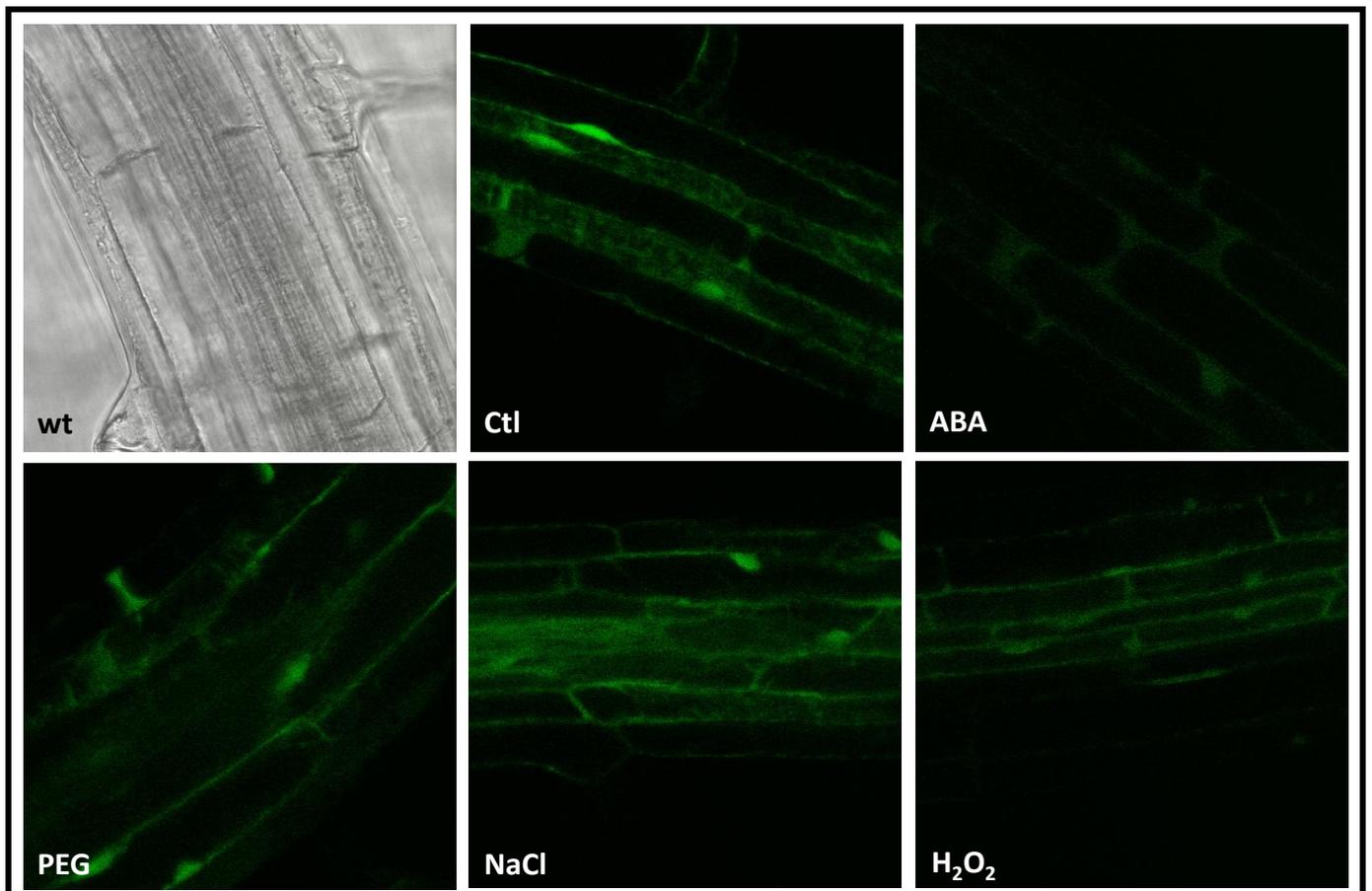


Figura 10. Localización subcelular en la raíz de plantas de *A. thaliana* establemente transformadas. Se observó la localización de la señal de la GFP ante tratamientos de ABA 50 μ M o H_2O_2 1mM durante 2 h o incubadas en placas equilibradas con PEG8000 40% o NaCl 150 mM durante 16 h. La proteína de fusión no muestra relocalización evidente ante los estímulos evaluados.

mediante RT-PCR semicuantitativo a partir de RNA de plantas crecidas en medio suplementado con higromicina. Se determinó la cantidad adecuada de cDNA para realizar el PCR semicuantitativo para el gen *GmNRX2.1*, realizando previamente PCR con *primers* específicos para el gen de actina de *A. thaliana*. Para las plantas transformadas con la fusión a HA C-terminal (pGWB14:*GmNRX2.1*), se observó acumulación abundante del transcripto para las líneas C7 y C10, intermedia para la línea C18 y baja para la línea C13, mientras que la línea C24 prácticamente no mostró acumulación del transcripto (Figura 12). En el caso de las plantas transformadas con la fusión a HA N-terminal (pGWB15:*GmNRX2.1*) se observó acumulación intermedia del transcripto para las líneas N5, N6 y N10 y una acumulación algo menor para las líneas N2 y N3 (Figura 12). En base a estos resultados, se eligieron las líneas C10 y C13 y N3 y N6 para continuar con los ensayos fenotípicos, por presentar diferentes niveles de expresión del transgen. La elección de líneas con alto y bajo nivel de expresión tiene el cometido de evaluar si existe un efecto concentración-dependiente sobre el fenotipo observado.

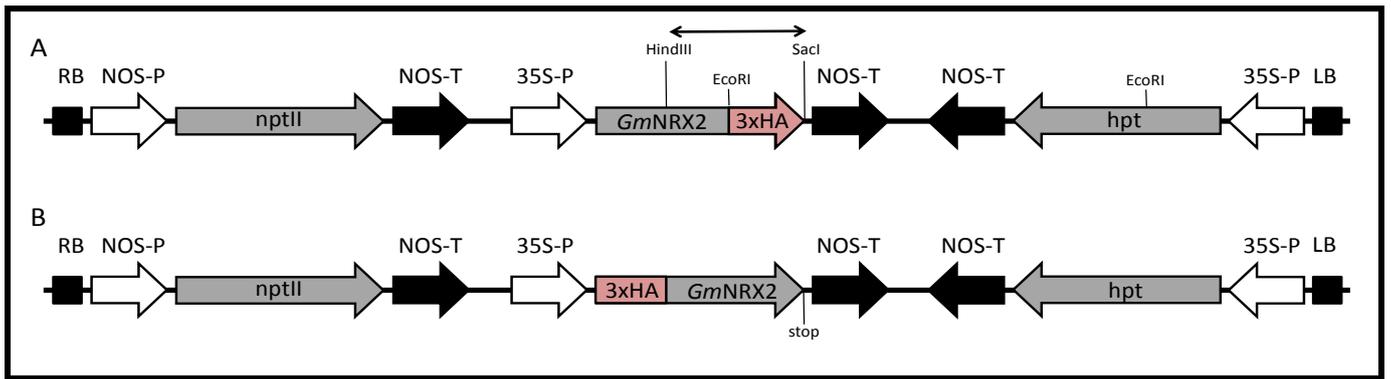


Figura 11. Esquema de las construcciones generadas para la generación de plantas de *A.thaliana* que sobre-expresan el gen *GmNRX2.1* constitutivamente. Sólo se indican los elementos dentro del T-DNA. **A. Diagrama de la construcción pGWB14:*GmNRX2.1*.** El vector pGWB14 permite la expresión de la proteína bajo control del promotor constitutivo CaMV35S (35S-P) y como fusión C-terminal al epítipo de hemaglutinina (HA). El codón de terminación de la *GmNRX2.1* fue eliminado. La flecha comprendida entre los sitios de restricción HindIII/SacI indica el fragmento que fue utilizado como sonda para el ensayo de *Southern blot*. **B. Diagrama de la construcción pGWB15:*GmNRX2.1*.** El vector pGWB15 permite la expresión de la proteína bajo control del promotor CaMV35S y como fusión a HA N-terminal. Se conservó el codón de terminación (stop) de la *GmNRX2.1*. Se indican: RB: borde derecho (*right border*); LB: borde izquierdo (*left border*); NOS-P: *nopaline synthase promoter*; NOS-T: *nopaline synthase terminator*; *nptII*: *neomycin phosphotransferase* (confiere resistencia a kanamicina); *hpt*: *hygromycin phosphotranferase* (confiere resistencia a higromicina).

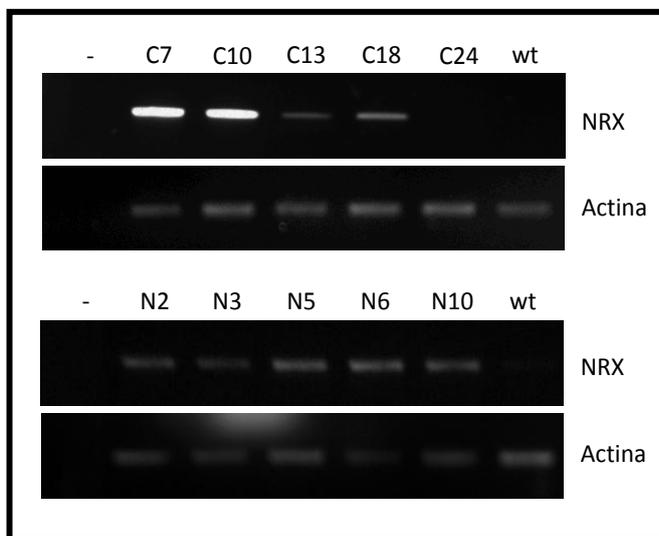


Figura 12. Determinación de la acumulación de transcritos para la *GmNRX2.1* mediante RT-PCR semicuantitativo. Como control de carga se realizó PCR utilizando *primers* específicos para el gen de actina de *A. thaliana*. Para las líneas transformadas con la construcción pGWB14:*GmNRX2.1*, se eligieron las líneas C10 y C13 y para las líneas transformadas con la construcción pGWB15:*GmNRX2.1* se eligieron las líneas N3 y N6 para continuar con ensayos fenotípicos.

A su vez, para las líneas transformadas con la construcción pGWB14:*GmNRX2.1*, se determinó la acumulación de la proteína mediante ensayo de *Western blot*, utilizando anticuerpos comerciales que reconocen específicamente el epítipo de HA (Invitrogen). Todas las líneas analizadas presentaron acumulación de proteína mientras que no se observó acumulación en plantas no transformadas (Figura 13.B). Para determinar el número de inserciones de la construcción en las líneas transgénicas C10 y C13, se realizaron ensayos de *Southern blot* utilizando como sonda un fragmento HindIII-SacI escindido de la construcción pGWB14:*GmNRX2.1*. El DNA genómico de ambas líneas así como de plantas wt,

fue digerido con EcoRI o con HindIII. En el caso de la digestión con EcoRI, si las líneas transgénicas hubieran presentado una única inserción de la construcción, se habrían visualizado dos bandas: una banda de aproximadamente 2300 bp, correspondiente al fragmento EcoRI-EcoRI presente en la propia construcción (Figura 11) y una segunda banda de tamaño desconocido. Por otra parte, una única banda se habría observado en el caso de la digestión con HindIII. De acuerdo a esta suposición, la línea C10 presenta dos inserciones del transgen: se observaron cuatro bandas cuando el gDNA fue digerido con EcoRI y dos bandas específicas cuando el gDNA fue digerido con HindIII. La situación con la línea C13 es menos clara. Se observó una banda cuando el gDNA fue digerido con EcoRI, mientras que tres bandas se observaron al digerir con HindIII. Con estos resultados no es posible asegurar el número de inserciones, pero podría estimarse que la línea C13 presenta al menos dos inserciones del transgen (Figura 13.A).

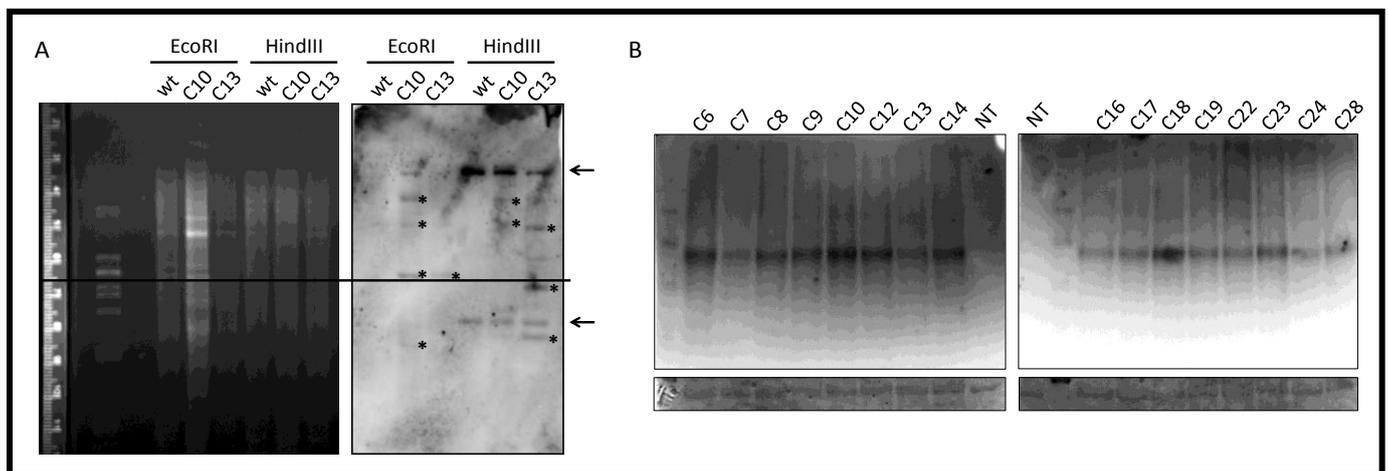


Figura 13. Caracterización molecular de las líneas transgénicas transformadas con la construcción pGWB14:GmNRX2.1. A. Ensayo de Southern blot. Se determinó mediante ensayo de Southern blot el número de inserciones del transgen en el genoma de *A. thaliana*. El DNA genómico de las líneas C10 y C13 fue digerido con las enzimas EcoRI o HindIII y transferido a membranas de nylon. El marcado de la sonda y la detección se realizó utilizando el kit DIG High Prime DNA Labeling and detection starter kit (Roche). Con asteriscos se indican las bandas detectadas. La línea negra a la mitad de los geles indica la altura a la que debería aparecer el fragmento EcoRI-EcoRI presente en el T-DNA (ver figura 11) en el caso del DNA genómico digerido con EcoRI. Las flechas indican bandas que se presentan tanto en el DNA genómico de las líneas C10 y C13 digeridas con HindIII como en el DNA genómico de plantas wt, que corresponden a bandas inespecíficas. **B. Ensayo de Western blot.** Se determinó mediante ensayo de Western blot el grado de acumulación de la proteína GmNRX2.1:HA. Se utilizaron anticuerpos comerciales anti-HA (Invitrogen). Todas las líneas analizadas, salvo las no transformadas (NT), mostraron acumulación de proteína. Como control de carga, se visualizó la presencia de la subunidad mayor de la Rubisco mediante tinción de la membrana con ponceau.

4.4 Caracterización fenotípica de las líneas transgénicas

Para determinar el efecto de la sobre-expresión del gen *GmNRX2.1* en la tolerancia al estrés abiótico, se realizaron ensayos fenotípicos para las líneas transgénicas en diversas condiciones. Se evaluó el porcentaje de germinación en NaCl (75 mM), ABA (1 y 2 μ M), y Pq (0.5 y 1 μ M). En estas condiciones no se observaron diferencias en el porcentaje de

germinación entre las líneas transgénicas y la wt (Figura 14). Se evaluó también el crecimiento de plántulas en condiciones de estrés osmótico (manitol 250 mM) y salino (NaCl 150 mM). Transcurridos 7 a 14 días, se realizaron medidas de peso fresco de las plantas completas o de la raíz y la parte aérea. Las líneas transgénicas no mostraron diferencias aparentes con las plantas wt en las condiciones ensayadas (Figura 15 y Figura 16).

Asimismo, se realizaron ensayos de deshidratación con plantas cultivadas *ex vitro*. Plantas de 5-7 días de crecimiento *in vitro* fueron transferidas a tubos tipo falcon de 50 mL conteniendo una mezcla de arena:turba 4:1 y crecidas durante dos semanas adicionales. Al comenzar el ensayo, las plantas fueron regadas al 100 % de la capacidad de sustrato y a partir de ese momento el riego fue suspendido durante 7 días. En estas condiciones, las líneas transgénicas sí parecieron tener cierta ventaja respecto a las wt, al mostrar menor daño aparente (Figura 17). Sumado a esto, se evaluó la capacidad de recuperación del estrés retomando el riego. Los resultados mostraron que las plantas transgénicas se recuperaron del estrés, mientras que las plantas wt alcanzaron el estado de marchitez permanente (Figura 18).

4.5 Clonado de la *GmNRX2.1* y sus variantes y expresión de proteína recombinante en *Escherichia coli* y en *Nicotiana benthamiana*

Con el propósito de llevar adelante la caracterización bioquímica de la *GmNRX2.1*, se generaron construcciones génicas para producir la proteína recombinante, tanto en *E. coli* como en plantas. Para ello, la secuencia de cDNA de *GmNRX2.1* fue clonada en vector pET301 (Invitrogen) para expresión en *E. coli* como fusión a una cola de histidinas C-terminal. Se transformaron varias cepas de *E. coli* (BL21 pLysS, codon plus, DNA star, Origami, Shuffle, Rosetta, Tuner, pGro7) y se realizaron pruebas de inducción en los medios TB y 2XYT con agregado de IPTG 1 mM o en medio de autoinducción a 28 °C. En todas las condiciones ensayadas se observó que la proteína se expresó de manera insoluble y en bajas cantidades. Una cantidad muy pequeña de proteína soluble se obtuvo al trabajar en medio de autoinducción con agregado de Zn²⁺, aunque la expresión aún resultó escasa.

Con el fin de resolver este inconveniente, decidimos cambiar a un sistema de expresión vegetal (*Nicotiana benthamiana*). Los sistemas de expresión vegetales presentan varias ventajas desde el punto de vista de las modificaciones postraduccionales y en cuanto al rendimiento (en muchos casos superando 500 mg de proteína recombinante por kilo de peso fresco [Shah *et al.*, 2013]). Por otro lado, una serie de características útiles han posicionado a *N. benthamiana* como un modelo vegetal interesante. *N. benthamiana* presenta alta susceptibilidad a infección por virus, lo que ha permitido la expresión de genes exógenos a partir de vectores virales. Otra ventaja que ha popularizado a este modelo es la posibilidad de ser agroinfiltrada con facilidad, lo que ha sido de utilidad para llevar adelante estudios de localización subcelular y de interacción proteína-proteína (Goodin *et al.*, 2008).

Por otro lado, procurando generar información sobre las NRXs manteniendo un abordaje desde bioquímica de proteínas, se procedió a generar construcciones para la expresión de variantes de la proteína (wt, mutante C227S, dominio TrxC y dominio C1) en vectores de la serie pEAQ-HT Dest (Figura 19), de manera de hilar más fino en el mecanismo de acción de estas proteínas. Para definir de la mejor manera posible qué tramos de la proteína clonar con el fin de realizar ensayos bioquímicos con la GmNRX2.1 recombinante, los diferentes dominios de la proteína fueron predichos utilizando el recurso *Conserved Domains* de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Asimismo, se realizó un modelado por homología utilizando el recurso *Swiss model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) (Figura 6). Cabe destacar que visto que el plegamiento de Trx es un plegamiento muy conservado, este tipo de modelado suele arrojar modelos bastante confiables.

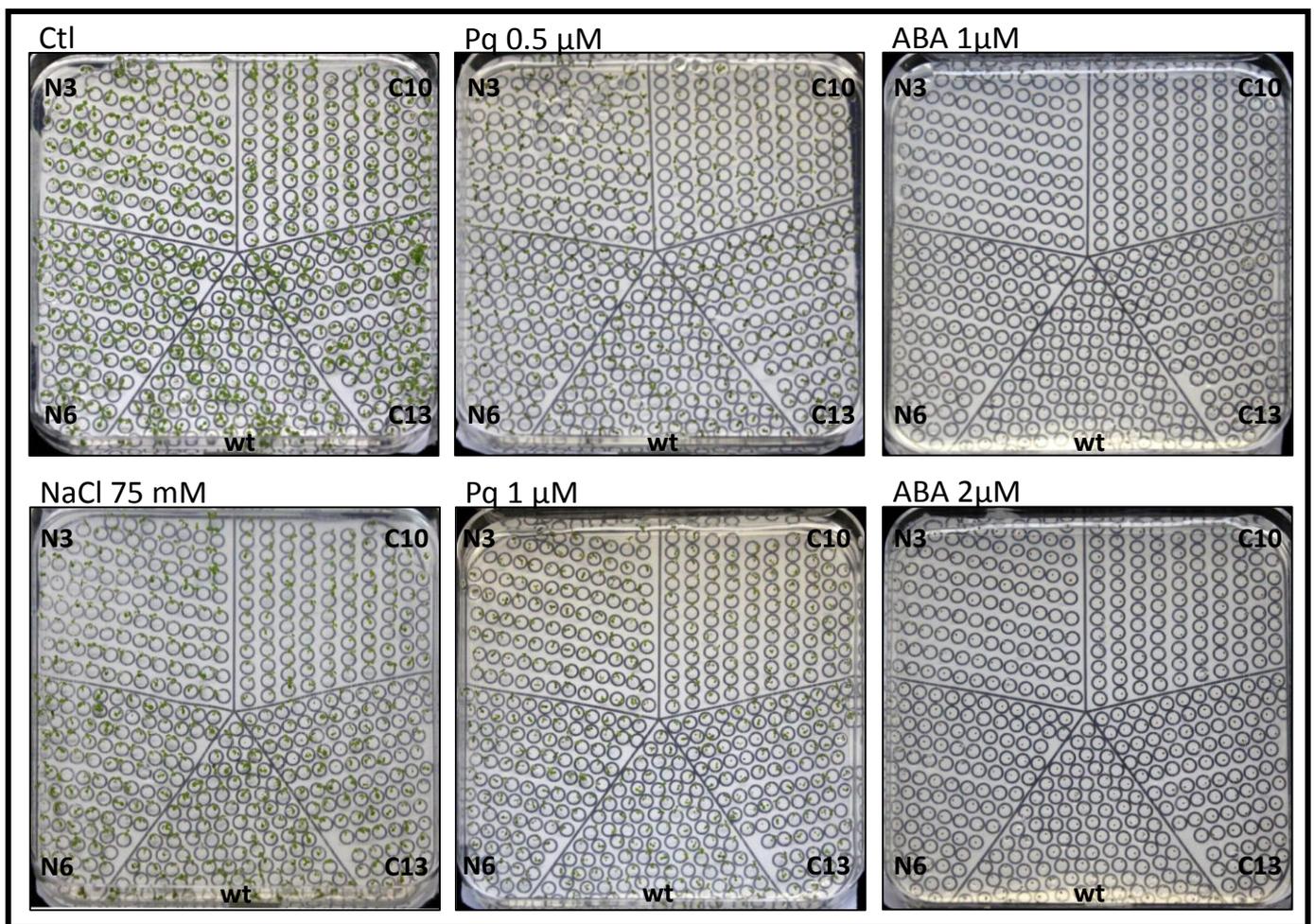


Figura 14. Ensayos de germinación. Las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas y estratificadas en agua a 4 °C durante 5 a 7 días. Pasado este tiempo, las semillas fueron sembradas en placas de MS-MES pH 5.7 con agregado de NaCl 75 mM, paraquat (Pq) 0.5 y 1 μM y ABA 1 y 2 μM. Se sembró 100 semillas de cada línea por placa y se contó el porcentaje de germinación en cada caso. La imagen fue tomada a los 5 días de crecimiento. El 100 % de las semillas germinaron en condiciones control, NaCl 75 mM y Pq 0.5 y 1 μM, mientras que ninguna de las semillas germinó en las placas con ABA.

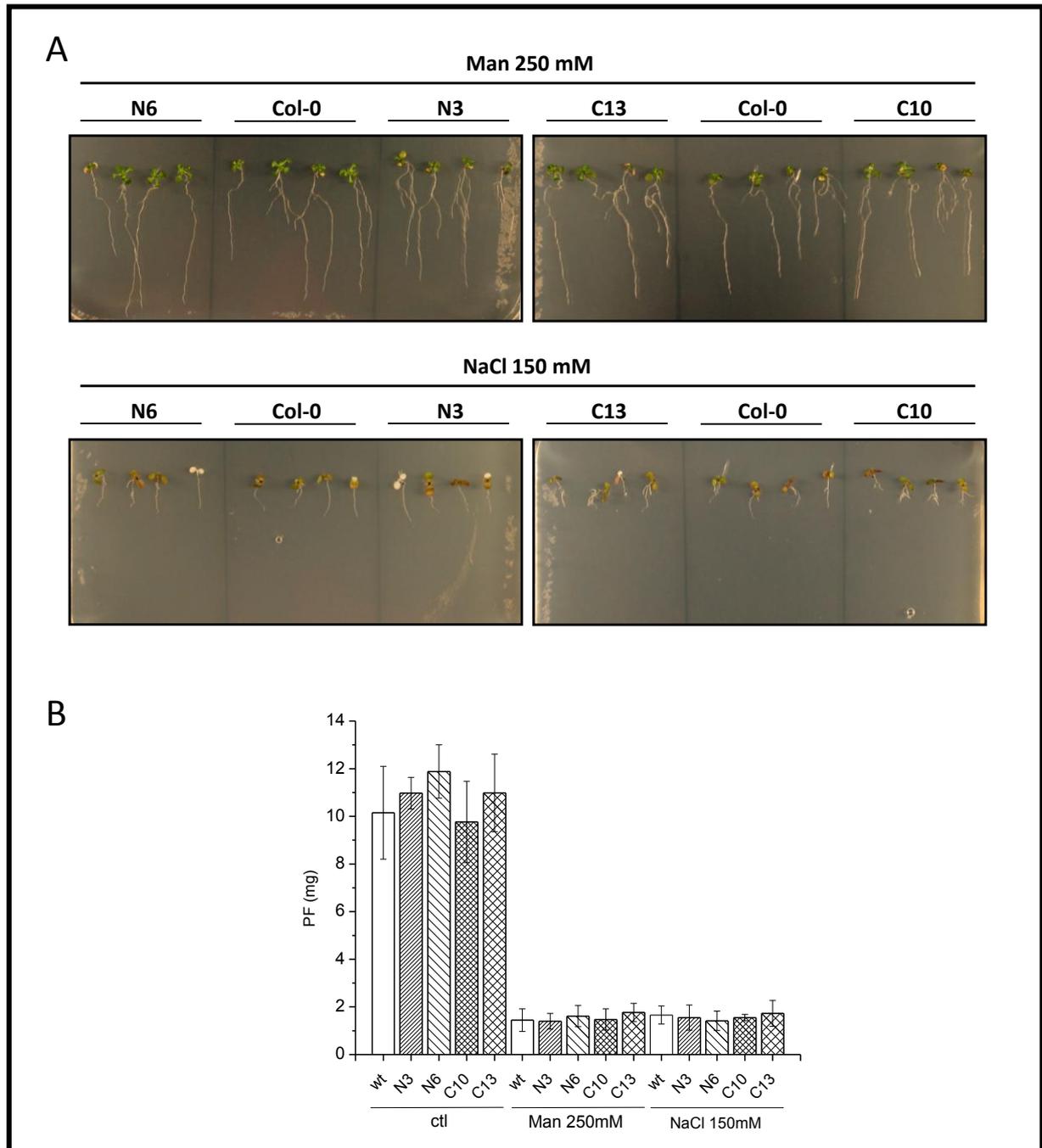


Figura 15. Crecimiento en condiciones de estrés osmótico (manitol 250 mM) y salino (NaCl 150 mM) durante 7 días. A. Plantas de 5 días de crecimiento fueron transferidas a medio MS-MES pH 5.7 con agregado de manitol 250 mM o NaCl 150 mM. **B.** Se mantuvo las plantas en los tratamientos de estrés durante 7 días y se registró el peso fresco de las plántulas enteras.

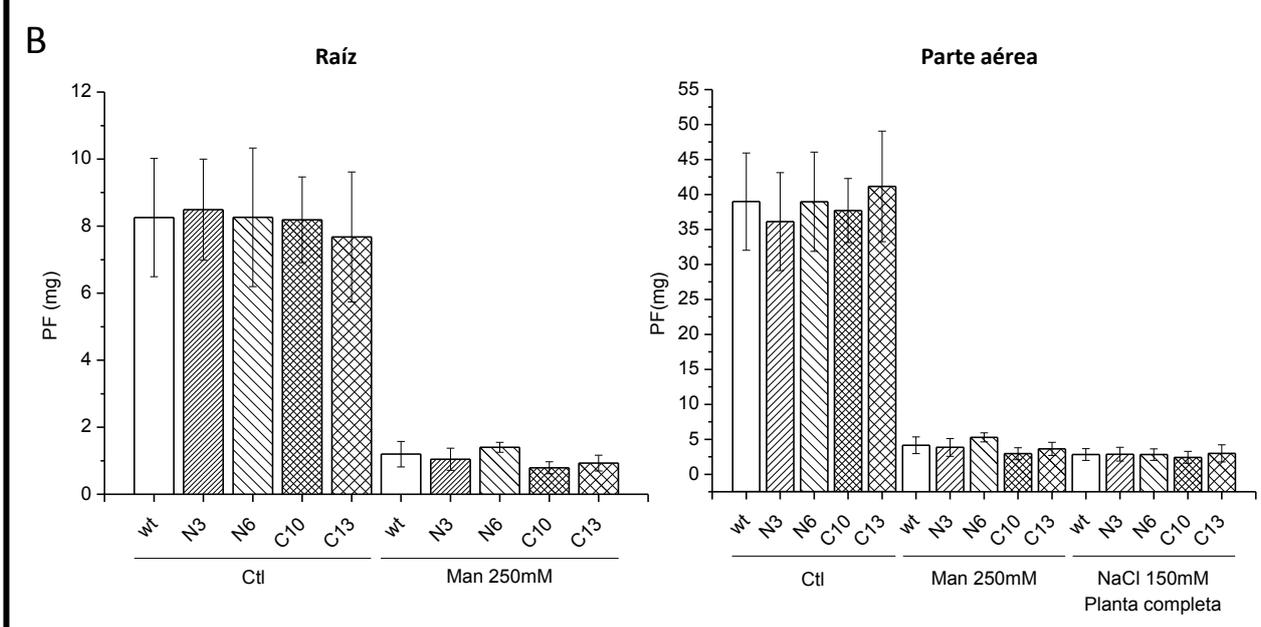
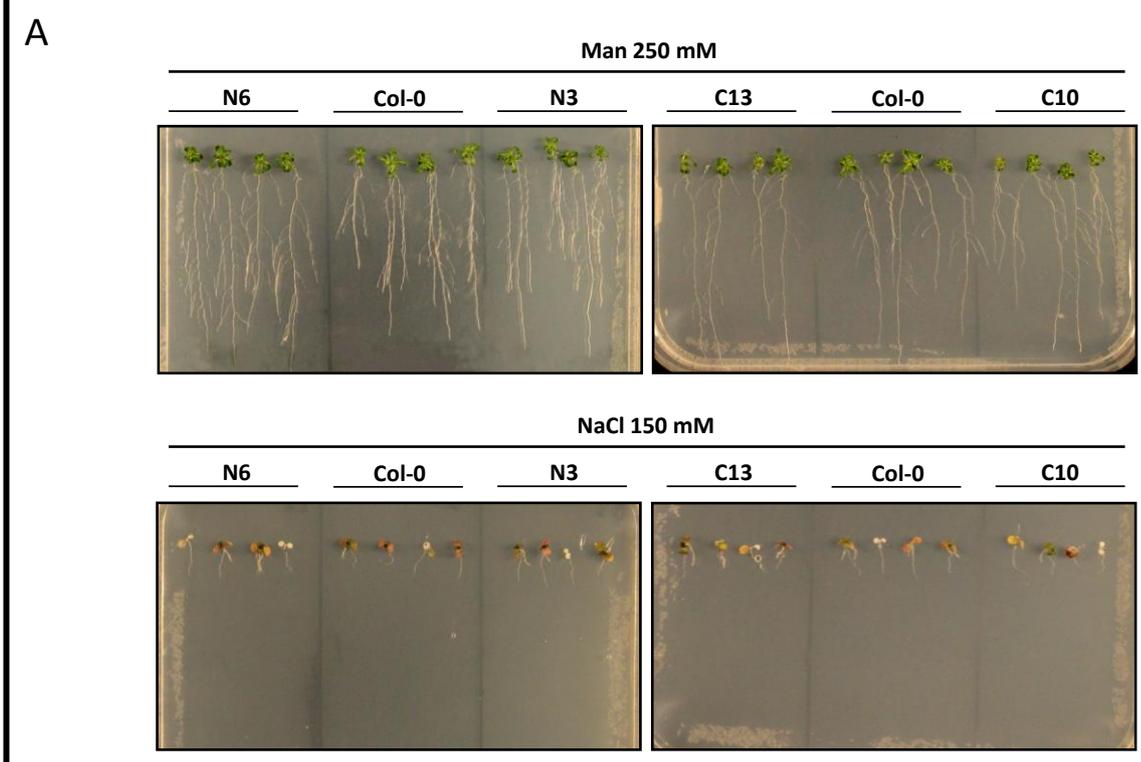


Figura 16. Crecimiento en condiciones de estrés osmótico (manitol 250 mM) y salino (NaCl 150 mM) durante 14 días. A. Plantas de 5 días de crecimiento fueron transferidas a medio MS-MES pH 5.7 con agregado de manitol 250 mM o NaCl 150 mM. **B.** Se mantuvo las plantas en los tratamientos de estrés durante 14 días y se registró el peso fresco de las plántulas enteras.



Figura 17. Ensayos de deshidratación. Las plantas se dejaron deshidratar durante 7 días, hasta la aparición de síntomas de marchitamiento. Las plantas fueron ordenadas para la fotografía.

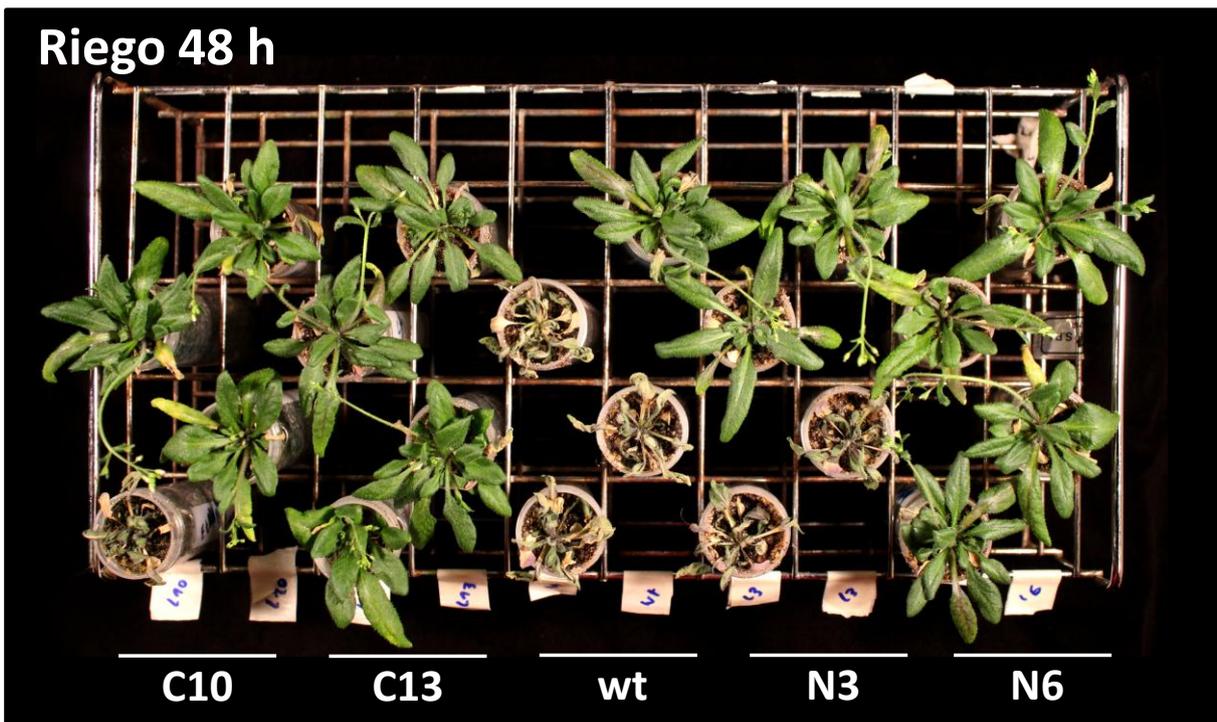


Figura 18. Recuperación de la deshidratación. Las plantas se rehidrataron por 48 h mediante la reposición del régimen de riego a las plantas deshidratadas. Las plantas fueron ordenadas para la fotografía.

Como se comentó anteriormente, la GmNRX2.1 es una Trx atípica puesto que la composición de aminoácidos de sus sitios activos potenciales no es canónica. Por lo tanto, sería interesante evaluar la actividad redox de esta proteína con el fin de determinar si su acción a nivel molecular radica en la actividad oxidorreductasa de sus dominios Trx. Se decidió trabajar con la proteína completa wt con la variante C227S y con el dominio TrxC (R191-A326). El trabajo con la proteína completa permitirá responder a preguntas como ser cuál es la actividad de esta proteína, si puede ser reducida por el sistema NADPH-Tiorredoxina Reductasa (NTR), si es capaz de reducir algunas peroxirredoxinas de plantas o si puede ser glutationilada. También se podrá responder cuál es el estado oligomérico de esta proteína (la NRX1 de *A. thaliana* se comporta como un dímero en solución [Marchal *et al.*, 2014]). La proteína C227S permitirá evidenciar si existe actividad residual una vez que el sitio activo potencial ha sido anulado, lo que implicaría un mecanismo de acción diferente a una Trx convencional. El mutante truncado TrxC dará información sobre el segundo dominio Trx aislado; su actividad en comparación con la forma wt evidenciará si algún otro dominio está regulando su actividad o participa en el mecanismo de acción redox. Por otro lado, también es de interés conocer las propiedades del dominio C1, como la posibilidad de que el mismo una moléculas lipídicas, metales o se oxide, por lo que también se procedió al clonado de la región C-terminal G356-V411.

Las regiones R191-A326 y G356-V411, fueron amplificadas por PCR a partir de la construcción pENTR2.B:*GmNRX2.1*. Por otra parte, el mutante C227S fue generado a partir

del vector pENTR2.B:*GmNRX2.1*, utilizando *primers* perfectamente complementarios entre sí y que se posicionan sobre la secuencia que codifica para el sitio activo. Los *primers* están diseñados de manera de generar una sustitución de un codón TGC por uno AGC, lo que resulta en un cambio de cisteína por serina (Figura 20).

El procedimiento para la sobre-expresión de proteína con fines de purificación es esencialmente igual al realizado para la expresión transitoria para determinar la localización subcelular; la diferencia fundamental está en las construcciones utilizadas (que como se expresa en la Sección 3.10, están diseñadas para favorecer la hiper-traducción del gen) y en el tiempo transcurrido entre la infiltración y la cosecha del material vegetal. Habitualmente se mantiene las plantas creciendo 5 a 9 días para que la proteína se acumule. Las construcciones aquí generadas serán utilizadas para optimizar las condiciones de infiltración, el tiempo de inducción, las condiciones de extracción y purificación de proteínas.

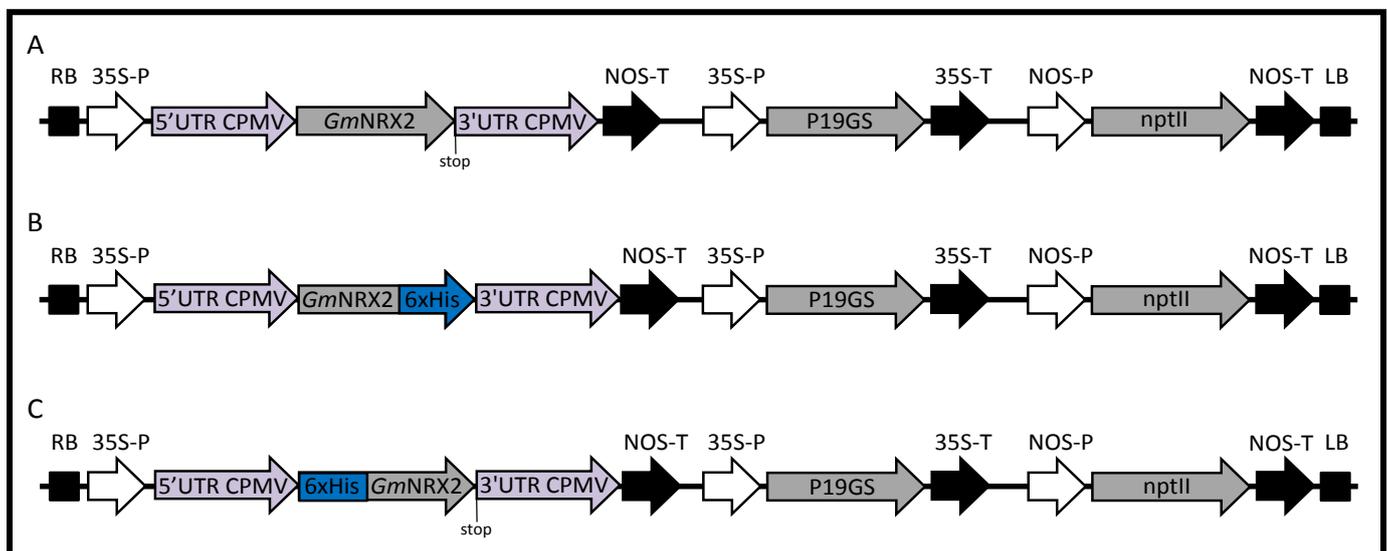


Figura 19. Esquema de las construcciones generadas para la expresión de la *GmNRX2.1* y sus variantes en *N. benthamiana*. Sólo se indican los elementos dentro del T-DNA. **A. Diagrama de la construcción pEAQHT-Dest1:*GmNRX2.1*.** Permite la expresión de la proteína sin cola de histidinas. **B. Diagrama de la construcción pEAQHT-Dest2:*GmNRX2.1*.** Permite la expresión de la proteína como fusión a una cola de 6 histidinas C-terminal. **C. Diagrama de la construcción pEAQHT-Dest3:*GmNRX2.1*.** Permite la expresión de la proteína como fusión a una cola de 6 histidinas N-terminal. La serie de vectores pEAQHT-Dest permite la expresión de la proteína bajo control del promotor CaMV35S y flanqueada por las secuencias virales derivadas del RNA-2 del virus del mosaico del poroto (*cowpea mosaic virus*; 5'UTR CPMV y 3'UTR CPMV). Se indican: RB: borde derecho (*right border*); LB: borde izquierdo (*left border*); NOS-P: *nopaline synthase promoter*; NOS-T: *nopaline synthase terminator*; nptII: *neomycin phosphotransferase* (confiere resistencia a kanamicina); hpt: *hygromycin phosphotransferase* (confiere resistencia a higromicina).

4.6 Caracterización del perfil de expresión de los genes codificantes para NRXs en soja y en *Arabidopsis*

Con el objetivo de evaluar la relevancia de los distintos miembros de la familia de las NRXs en el desarrollo de las plantas de soja, se planificaron ensayos para determinar cómo es el perfil de expresión de estos genes en diferentes etapas de la germinación así como en

estadios vegetativos, a nivel de diferentes órganos de la planta (cotiledones, embrión, raíz y parte aérea). También se intentará revelar cómo responden estos genes en estado vegetativo, ante diferentes estímulos (deshidratación, ABA, SA, Pq), en diferentes genotipos de soja (tolerantes [N7001, Munasqa] y susceptibles [TJ2049] a la sequía). Para ello, se extrajo RNA total a partir de las muestras vegetales y se generaron membranas que serán utilizadas para realizar ensayos de *Northern blot* utilizando sondas específicas para los distintos genes NRX de soja. A su vez, para analizar el perfil de expresión de los genes NRX de *A. thaliana*, se extrajo RNA a partir de muestras de semillas en germinación (48 y 72 h de crecimiento en cámara) o de plantas sometidas a tratamientos de deshidratación, ABA, SA y Pq durante 24 h, discriminando en raíz y parte aérea. Estos ensayos se completarán a la brevedad.

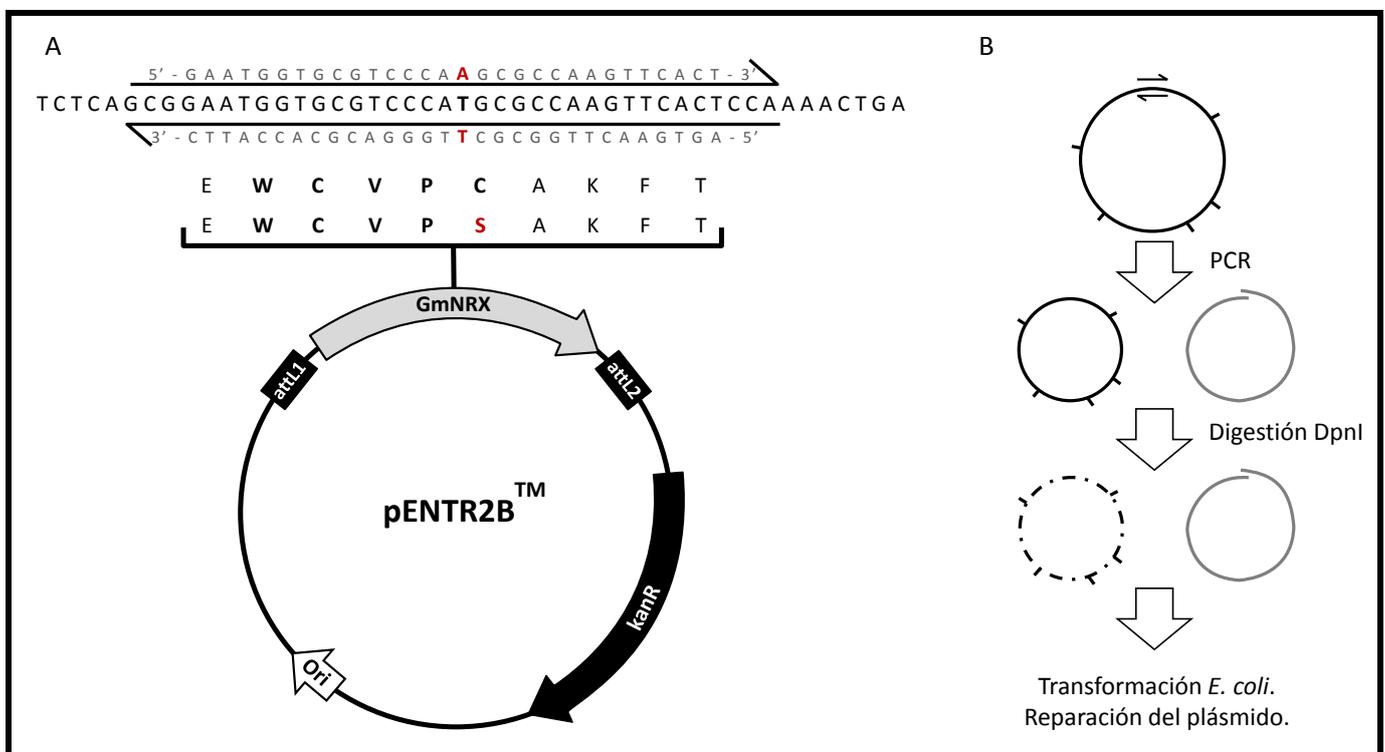


Figura 20. Generación de mutante C227S. **A** El mutante C227S fue generado a partir del vector pENTR2.B:*GmNRX2.1*. Los *primers* fueron diseñados para ser perfectamente complementarios entre sí, posicionarse sobre la secuencia que codifica para el sitio activo y generar una sustitución de un codón TGC por uno AGC, lo que resulta en un cambio de cisteína por serina. **B. Esquema de trabajo para la generación del mutante puntual C227S.** Se realizó la amplificación por PCR utilizando como molde la construcción pENTR2.B:*GmNRX2.1* Como este plásmido proviene de una minipreparación de DNA, se encuentra metilado. Visto que ambos *primers* se posicionan sobre la NRX en la misma posición, la amplificación por PCR genera un producto que contiene todos los elementos del plásmido. Si bien este producto se trata de un DNA lineal, el mismo consta de una pequeña región solapante, que corresponde a la región donde hibridaron los *primers*. Esta región complementaria, permite que producto se circularice y pueda ser adquirido por la bacteria (como si fuera un DNA circular) y reparado por la misma. Previamente a realizar la transformación de *E. coli*, la mezcla resultante luego de la amplificación por PCR debe ser tratada con la enzima DpnI, que digiere el DNA metilado. Esto elimina el plásmido original, que podría ser tomado con mayor eficiencia por la bacteria, de la mezcla.

Estudio proteómico de líneas de Arabidopsis wt y sobre-expresantes del gen Gmelfiso4G

Como se comentó en la introducción, en las plantas existen mecanismos de regulación de la traducción particulares, que implican la presencia de dos isoformas de los factores eIF4G y eIF4E. La evidencia experimental generada al momento sugiere que estas isoformas, ampliamente divergentes entre sí, presentan especialización funcional, regulando la traducción de mRNAs específicos ante diferentes situaciones. Hemos observado que el transcripto del gen *Gmelfiso4G* aumenta considerablemente en condiciones de sequía en genotipos tolerantes a la misma y hemos determinado que la sobre-expresión del gen confiere tolerancia aumentada a estrés osmótico, salino y por bajas temperaturas. La hipótesis más directa es que la presencia de este factor podría estimular la traducción de ciertas proteínas específicas en condiciones de estrés y es este supuesto lo que buscamos evaluar. El objetivo último es realizar estudios de proteómica comparativa entre las plantas transgénicas inducidas y no inducidas con β -estradiol, en condiciones control y condiciones de estrés, utilizando la técnica de 2D-DIGE (*two-dimensional difference gel electrophoresis*).

Esta técnica presenta varias ventajas respecto a los abordajes de proteómica convencionales. Brevemente, en este tipo de ensayos, dos extractos proteicos son marcados, cada uno separadamente, con derivados N-hidroxi succinimida, popil-Cy3 y metil-Cy5. Estos reactivos reaccionan con el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina y están diseñados para compensar por la pérdida de carga de dicho residuo, introduciendo sólo un pequeño aumento de la masa molecular cuando se realiza un marcado sub-estequiométrico (Viswanathan *et al.*, 2006). Ambas muestras marcadas son mezcladas en igual proporción y sembradas en una misma corrida de electroforesis bidimensional. Los *spots* de proteína son visualizados iluminando el gel con luz a la longitud de onda de excitación de cada fluoróforo. Las proteínas diferencialmente expresadas son entonces recortadas del gel e identificadas por espectrometría de masa. Este abordaje elimina la variabilidad gel a gel, que enmascara muchas veces las diferencias biológicas y compromete cualquier comparación cuantitativa que se quiera realizar (Van der Bergh *et al.*, 2004). Asimismo, se incluye en cada corrida un estándar interno, compuesto por una mezcla de partes iguales de ambas muestras marcada con un tercer fluoróforo (Cy2). Cada muestra en el gel puede ser normalizada respecto al estándar interno, lo que permite una cuantificación precisa de cada *spot* y habilita la comparación entre geles (Marouga *et al.*, 2005).

Es importante remarcar, que para poder realizar dichos ensayos es fundamental optimizar las condiciones de extracción, de manera de obtener extractos proteicos de buena calidad, y la separación en geles bidimensionales tal que permita la resolución de la mayor cantidad de proteínas posible o de regiones que resulten de interés.

4.7 Optimización de las condiciones para la extracción de proteínas totales por el método de TCA-Acetona

Para profundizar en el mecanismo mediante el cual el gen *GmeIFiso4G* opera para conferir tolerancia al estrés, se puso a punto las condiciones de extracción de proteínas adecuadas para realizar estudios proteómicos. Como primer abordaje, se comenzó a trabajar con muestras correspondientes a la línea 5, la cual presenta gran acumulación del transcrito de *GmeIFiso4G* y un claro fenotipo de mayor tolerancia al estrés, en condiciones de estrés osmótico (placas equilibradas con PEG8000 40 %), con y sin agregado de β -estradiol. Se pusieron a punto las extracciones de proteína mediante dos procedimientos. Por un lado, se utilizó un *buffer* de extracción comercial (*Protein Extraction Buffer* [PEB]; Agrisera, AS08 300). El mismo consiste en un *buffer* Tris-HCl pH 8.5, con agregado de LDS (*Lithium dodecyl sulfate*) como detergente, EDTA y 10 % v/v de glicerol. Por otro lado, se utilizó un protocolo de extracción de proteínas totales por precipitación con TCA-acetona (Mechin *et al.*, 2007). Las extracciones en PEB mostraron bandas peor definidas, posiblemente indicando cierta proteólisis (Figura 21), por lo que se optó por continuar realizando las extracciones con el método TCA-acetona.

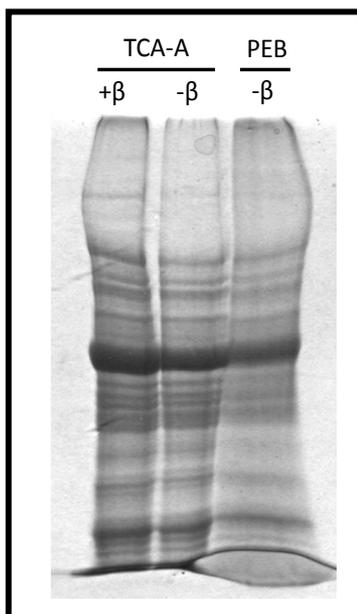


Figura 21. Optimización de las condiciones de extracción de proteína. Las extracciones de proteína se realizaron mediante un método de extracción de proteínas totales por precipitación con TCA-Acetona (TCA-A) o utilizando un *buffer* de extracción de proteínas de Agrisera (PEB). Las extracciones en PEB mostraron bandas peor definidas, posiblemente indicando proteólisis.

4.8 Separación de las proteínas por electroforesis bidimensional

Optimizadas las condiciones de extracción, se procedió a resolver las proteínas en geles de 7 cm. Para ello, se emplearon tiras de inmovilina de rango de pH 3-11 NL. Este rango de pH amplio permite obtener un paneo general de la muestra que se está analizando, de manera de determinar en qué regiones se concentra la mayor cantidad de proteínas o alguna proteína de interés, y qué rango de pH utilizar posteriormente para definir las mejor. En estos ensayos preliminares, la resolución de las proteínas fue muy buena, observando *spots* bien definidos y sin señales de aberraciones técnicas (Figura 22), de modo que se

continuó con este rango de pH (3-11 NL), escalando para geles de 13 cm. En este caso, también se obtuvo un resultado técnico muy satisfactorio (Figura 23), por lo cual se procedió a la selección de 8 *spots* que resultaron de interés por presentar intensidad notoriamente contrastante entre ambas muestras, y se procuró identificar las proteínas mediante MALDI-TOF MS/MS. Sin embargo, a pesar de que la buena resolución de los *spots*, no fue posible identificar otras proteínas que no fueran la subunidad grande de la RubisCO de *A. thaliana*. Es probable que al tratarse de una proteína tan abundante en la muestra se produzca contaminación de otros *spots* y que sus péptidos vuelen mejor en el espectrómetro de masa, ocultando la señal de las proteínas de interés.

4.9 Optimización de las condiciones para la extracción de proteínas y eliminación de la RubisCO utilizando columnas de afinidad anti-RubisCO *Seppro RubisCO spin columns*

Con el objetivo de eliminar la proteína RubisCO de los extractos proteicos a analizar por 2D-DIGE, se adquirieron columnas de afinidad anti-RubisCO *Seppro RubisCO spin columns* (Sigma). Reducir el contenido de RubisCO en la muestra tiene la ventaja adicional de que aumenta la proporción de otras proteínas sembradas en el gel, es decir que se aumenta la probabilidad de observar diferencias entre proteínas menos abundantes. Sin embargo, el método de extracción de proteínas por precipitación con TCA-acetona no es compatible con estas columnas, por lo que fue necesario poner a punto nuevas condiciones para la extracción de proteínas que no implicaran condiciones desnaturalizantes. Un *buffer* de extracción con agregado de PMSF 5 mM dio buenos resultados. Las proteínas totales fueron incubadas con la resina de afinidad y se realizaron lavados con el fin de remover las proteínas unidas inespecíficamente. La fracción no unida y las fracciones correspondientes a los lavados constituyen las fracciones de interés. La RubisCO unida a la resina fue removida con un *buffer* de *stripping*. Una vez optimizada la cantidad de proteína a sembrar en la columna (poco más de 0.8 mg), se observó la remoción casi completa de la RubisCO (Figura 24).

En resumen, se logró poner a punto las condiciones de extracción y tratamiento de las muestras proteicas, lo que permitirá realizar los ensayos de 2D-DIGE a la brevedad.

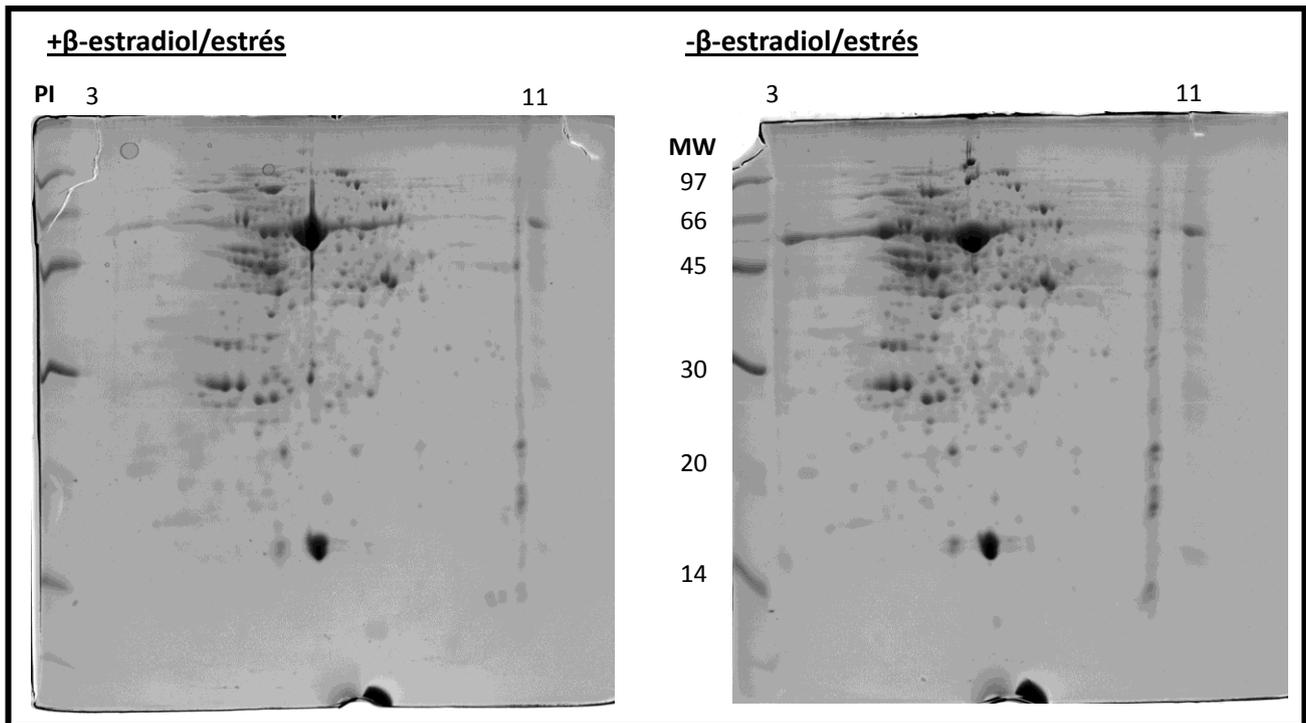


Figura 22. Electroforesis bidimensional en geles de 7 cm. Las muestras fueron limpiadas utilizando el *2D clean-up kit* (GE) y resuspendidas en una solución de rehidratación conteniendo urea, tiourea, CHAPS, DTT, azul de bromfenol y *buffer* IPG pH 3-11 NL (GE). Se realizó una carga de 60 μ g de proteína por tira. El isoelectroenfoco se realizó utilizando tiras de inmovilina de rango de pH 3-11 NL de 7 cm (GE). La rehidratación pasiva de las tiras se realizó durante 18 horas. Pasado este tiempo las tiras se equilibraron en una solución conteniendo 10 mg/mL DTT durante 15 minutos y luego en la misma solución conteniendo 25 mg/mL iodoacetamida por 15 minutos más. Se utilizó el siguiente programa de corrida: 1) *step and hold*: 300 V, 30 minutos; 2) *gradiente*: 1000 V, 30 minutos; 3) *gradiente*: 5000 V, 1 hora 20 minutos; 4) *step and hold*: 5000 V, 6-25 minutos. La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de poliacrilamida de 12.5 % de entrecruzamiento, a 10 mA por 15 minutos y a 20 mA hasta el final de la corrida.

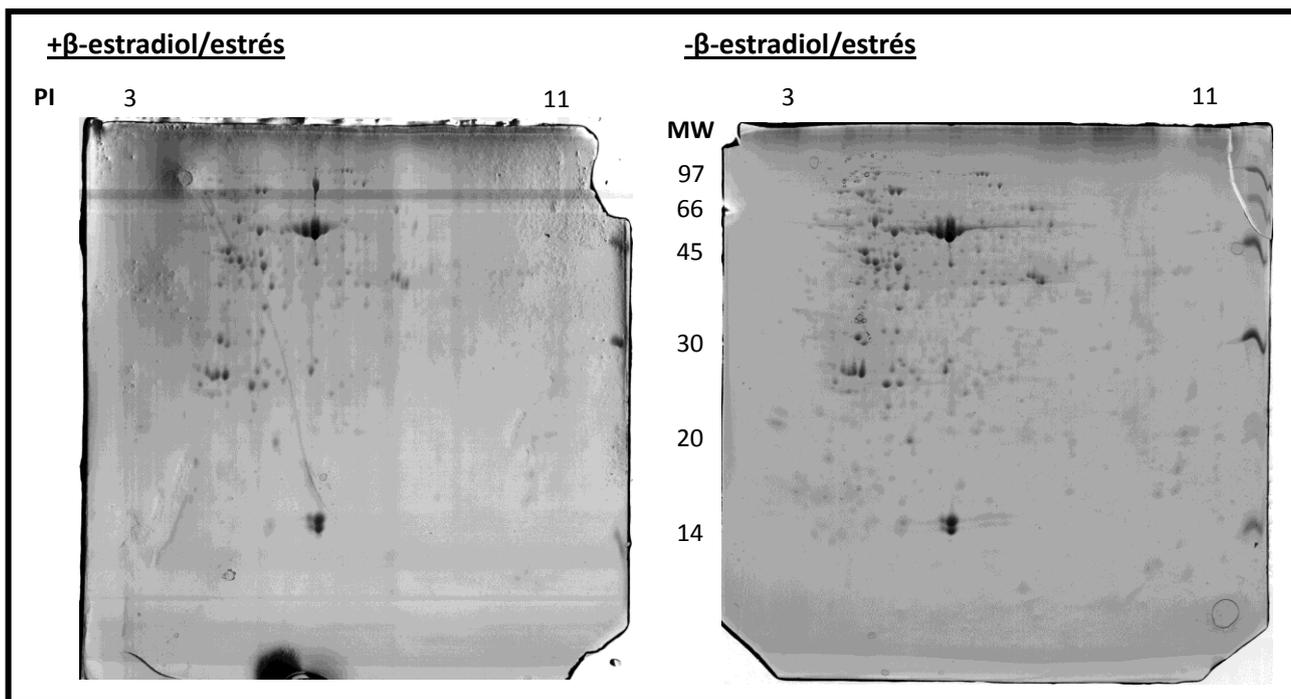


Figura 23. Electroforesis bidimensional en geles de 13 cm. Las muestras fueron limpiadas utilizando el *2D clean-up kit* (GE) y resuspendidas en una solución de rehidratación conteniendo urea, tiourea, CHAPS, DTT, azul de bromfenol y *buffer* IPG pH 3-11 NL (GE). Se realizó una carga de 80 μ g de proteína por tira. El isoelectroenfoco se realizó utilizando tiras de inmovilina de rango de pH 3-11 NL de 13 cm (GE). La rehidratación pasiva de las tiras se realizó durante 18 horas. Pasado este tiempo las tiras se equilibraron en una solución conteniendo 10 mg/mL DTT durante 15 minutos y luego en la misma solución conteniendo 25 mg/mL iodoacetamida por 15 minutos más. Se utilizó el siguiente programa de corrida: 1) *step and hold*: 500 V, 1 hora; 2) *gradiente*: 1000 V, 1 hora; 3) *gradiente*: 8000 V, 2 horas 30 minutos; 4) *step and hold*: 8000 V, 10-30 minutos. La segunda dimensión se realizó a 10 mA durante 15 minutos y a 30 mA hasta el final de la corrida.

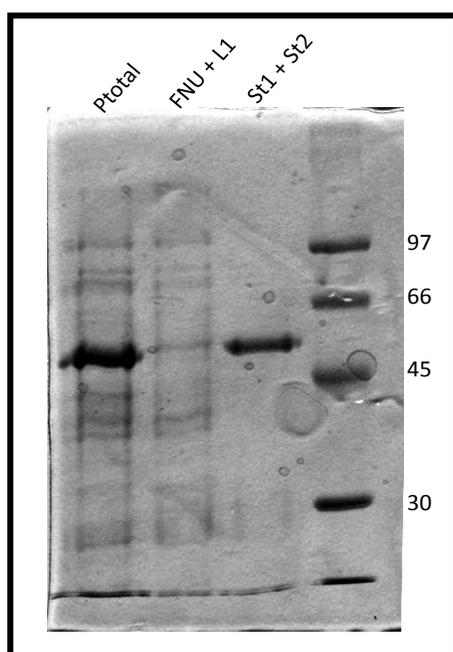


Figura 24. SDS-PAGE de fracciones procesadas con *Seppro RubisCO spin columns*. Ptotal: Proteína total, correspondiente a la muestra previo al tratamiento con las columnas de afinidad. FNU + L1: corresponde a la fracción de proteínas no unidas y primer lavado de la columna. St1 + St2: corresponde a las proteínas unidas a la columna específicamente.

5. Discusión y perspectivas

5.1 Caracterización del rol funcional de una nucleorreductasa de tipo II de soja.

Las NRXs pueden clasificarse en tres clases de proteínas, las cuales mantienen una organización de dos o tres dominios Trx asociados a un dominio C1, de unión a diacilgliceroles, C-terminal. El contenido de genes que codifican NRXs en plantas es variable, abarcando entre dos genes en *A. thaliana* a trece en la especie leñosa *Populus trichocarpa* (Figura 4). Las NRXs de plantas se distinguen de las NRXs de otros organismos del reino animal en que en las plantas estas proteínas presentan un dominio C1. Al igual que en los animales, las NRXs de *Chlamidomonas reinhardtii* no contienen un dominio C1, lo que indicaría que la ganancia de dicho dominio ocurrió luego de que las plantas terrestres divergieran de las algas. La presencia de estos dominios en proteínas vegetales despierta curiosidad ya que se conoce muy poco sobre el rol del DAG como molécula señalizadora en plantas. El DAG es un precursor de glicolípidos, lípidos de almacenamiento y fosfolípidos estructurales (Gaude *et al.*, 2008). En las células vegetales, el contenido de DAG es bajo debido a que el mismo es rápidamente fosforilado a ácido fosfatídico (PA) y a diacilglicerol pirofosfato (DGPP) (Pierrugues *et al.*, 2001). El PA ha sido implicado como el principal lípido con funciones de mensajero secundario en plantas. No obstante, se ha determinado que el DAG podría cumplir un rol señalizador en determinadas condiciones de estrés abiótico y del desarrollo (Helling *et al.*, 2006; Jouhet *et al.*, 2003; Kocourková *et al.*, 2011; Pejchar *et al.*, 2010; Soo *et al.*, 1991; Wimalasekera *et al.*, 2010). En los animales, el DAG ejerce sus efectos al unirse a los dominios C1 presentes en proteínas quinasa C (PKC), lo que induce su fosforilación. La PKC fosforilada puede a su vez activar a la proteína quinasa D (PKD), la cual desencadena rutas de respuesta. Sin embargo, no existen genes que codifiquen PKCs en los genomas vegetales (Dong *et al.*, 2012), por lo cual es posible que funciones de señalización que en otros organismos son llevadas a cabo por PKC puedan ser cumplidas por otras proteínas con dominios C1 (incluso carentes de actividad quinasa) en plantas.

En los dominios C1 presentes en las NRXs, se destaca la ocurrencia de ciertos residuos conservados indicados como C7, C10, G14, W17, C23, C26, H31 y C34 (Figura 6.D), que se presentan en todos los dominios C1 analizados. Los dominios pequeños, ricos en cisteínas, generalmente tienen la capacidad de unir átomos de zinc. Se trata de dominios que pueden presentarse en arreglos estructurales diversos. Son también llamados "dedos de zinc", aunque es importante no confundirlos con los dedos de zinc que participan en la unión al DNA. Éstos últimos forman parte de una familia particular de dedo de zinc denominada C2H2, compuesta por una horquilla β y una hélice α con un átomo de zinc apilado entre ellas (Krishna *et al.*, 2002). A diferencia de la mayoría de las proteínas globulares, los dominios de dedo de zinc no presentan un *core* hidrofóbico pronunciado y están estabilizados por la presencia del ion zinc. Los dominios C1 pertenecen a otra familia de dedos de zinc llamados "dominios de clave de sol" (*treble clef domains*), los cuales presentan un arreglo de elementos: nudo de zinc, lazo, horquilla β , hélice α , que se pliegan alrededor del átomo de zinc (de manera que recuerda a una clave de sol). Asimismo, pueden presentarse de a

dobletes, permitiendo la unión de dos iones zinc (Grishin, 2001). Los residuos conservados en el caso de las NRXs, presentan un ordenamiento de a pares de los posibles residuos quelantes cisteína e histidina (Figura 6.D). Un ordenamiento de este tipo permitiría la unión de uno o dos iones metálicos y esto es lo que ocurre en la mayoría de los dominios C1 presentes en PKCs. No obstante, otros tipos de motivos de clave de sol pueden acomodar en su estructura tridimensional hasta ocho sitios de unión a metal, utilizando también estructuras por fuera del motivo (Grishin, 2001). Por lo tanto, la estequiometría de unión de metales no podría predecirse con certeza solamente conociendo la secuencia aminoacídica.

Otra razón estructural por la cual las NRXs resultan de interés recae en los dominios Trx. Como se comentó anteriormente, la familia de las Trx está muy diversificada en plantas, lo que genera curiosidad a cerca de la especificidad que pueden tener las proteínas de esta familia. A su vez, el plegamiento de Trx incluye miembros con niveles de variación estructural y funcional enormes. Los aportes al conocimiento sobre el vínculo entre variaciones en la estructura proteica y la función pueden promover nuevos empujes a la comprensión sobre las funciones moleculares y biológicas de proteínas con funciones desconocidas.

La GmNRX2.1 presenta dos sitios activos potenciales. El dominio TrxC exhibe un motivo WYPPC mientras que el dominio TrxN tiene una secuencia WCVPC. Ninguno de estos motivos coincide con un motivo Trx clásico (WCGPC). La familia de las Trx se caracteriza por mantener variabilidad a nivel del sitio activo. En algunas proteínas de la familia se puede observar un mecanismo de reacción en el cual sólo una de las cisteínas está implicada, y en algunos casos, ninguna de las cisteínas está conservada. Algunas de estas proteínas carentes de cisteínas presentan actividad catalítica, en tanto que otras, no. Esto despierta curiosidad en cuanto a cómo el plegamiento de Trx facilita por si mismo reacciones de oxidorreducción en ausencia de un equipamiento catalítico típico. La sustitución más habitual del motivo CxxC es el cambio de cisteína por serina y, menos frecuentemente, por treonina. El motivo Cxxc está generalmente asociado a las glutarredoxinas monotiólicas (sustitución cisteína por serina, típicamente). Otras proteínas que presentan motivos Cxxc son las glutatión peroxidasas (usualmente, sustitución cisteína por treonina) (Fomenko *et al.*, 2003; Holly *et al.*, 2009). Es mucho menos habitual observar la sustitución del tiolato nucleofílico presente en la cisteína N-terminal, como por ejemplo en el motivo WYPPC presente en la GmNRX2.1. El ejemplo más común de motivo cxxC ocurre en algunas proteínas peroxirredoxina-like, donde la cisteína C-terminal provee el tiolato nucleofílico. En estos casos, una treonina o, menos frecuentemente, una serina, estabiliza el nucleófilo (Fomenko *et al.*, 2003; Holly *et al.*, 2009). La sustitución cisteína por tirosina presente en la GmNRX2.1 es muy inusual. Determinar si el sitio activo WYPPC en el dominio TrxN es activo verdaderamente, es una pregunta que queda por responder. Es interesante notar que existe cercanía estructural entre una segunda cisteína presente en el dominio TrxN (Figura 6.C). De presentar este dominio una actividad redox dependiente de tioles, es posible que dicha cisteína participe en el mecanismo catalítico. Otra posibilidad sería que la GmNRX2.1 formara un dímero consigo

misma, de igual manera que lo hace la proteína de *A. thaliana* (Marchal *et al.*, 2014), lo que abriría la posibilidad a que exista complementación entre los dominios TrxN-TrxN o TrxN-TrxC para cerrar un ciclo catalítico. El motivo WCVPC tampoco es habitual, aunque es probable que sea activo.

Las tiorredoxinas de dominio múltiple contienen entre 2 y 4 dominios Trx acoplados. En algunas tiorredoxinas de dominio múltiple se observa que no todos los dominios Trx son redox activos. Las proteína disulfuro isomerasas (PDI) son el ejemplo más representativo, donde ciertos dominios Trx participan confiriendo especificidad de unión por el sustrato. Es posible que el dominio TrxC en la GmNRX2.1 no sea activo, sino que participe como un sitio de interacción proteína-proteína o como un sitio receptor de modificaciones postraduccionales (como ser glutationilación).

Con el fin de determinar el o los compartimentos subcelulares en los cuales GmNRX2.1 ejerce un posible rol, se estudió el perfil de localización de esta proteína dentro de las células. Los estudios que abarcan la localización subcelular de proteínas de la subfamilia de las NRX son escasos. La GmNRX2.1 no presenta señales de localización subcelular, como fuera predicho por los recursos wolf P-sort (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) y Target P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), por lo que se esperaba que la proteína presentara una localización citosólica. Se observó mediante microscopía confocal la señal de la fusión GmNRX2.1:GFP en las plantas de tabaco que expresan la GmNRX2.1:GFP transitoriamente, determinando que la proteína presenta una localización citosólica y, posiblemente, nuclear (Figura 8). Es importante destacar que el hecho de observar señal de fluorescencia a nivel nuclear no implica necesariamente la presencia de la fusión GmNRX2.1:GFP en dicho compartimento. En proteínas que se localizan en el citosol es común observar señal de fluorescencia en el núcleo debido a que la fusión tiende a clivarse y la GFP a dirigirse hacia dicho compartimento. Por otro lado, también existen ejemplos de proteínas de la familia de las Trx que se localizan en el núcleo a pesar de carecer de señal de localización nuclear (Marchal *et al.*, 2013). Si bien es importante confirmar la posible localización nuclear para la GmNRX2.1, dicha localización ha sido observada para las NRXs de organismos del reino animal (Kurooka *et al.*, 1997) y para una NRX de maíz (Loughner *et al.*, 1998) y una de *A. thaliana* (Marchal *et al.*, 2013). Esta última puede utilizar el sistema NADPH-tiorredoxina reductasa (NTR) como reductor en el ensayo de reducción de insulina (Marchal *et al.*, 2013). Esto resulta interesante ya que, al igual que las NRX, la NTR puede localizarse también a nivel nuclear en condiciones de estrés oxidativo actuando como reductor de otras Trxs (Pulido *et al.*, 2009). Es posible que la NRX constituya un sistema de regulación redox a nivel nuclear junto con la NTR o junto con otros reductores celulares.

Por otra parte, se evaluó la posibilidad de que la proteína se relocalizara ante diversos tratamientos en plantas de *A. thaliana* establemente transformadas con la construcción pGWB5:GmNRX2.1. No fue evidente que la proteína se relocalizara ante los estímulos

empleados. Sin embargo, es posible que una señal de fluorescencia tan intensa enmascare cambios pequeños en la señal entre núcleo y citosol. Para determinar cambios más sutiles se ha planificado poner a punto la purificación de núcleos, de manera de determinar la presencia de la proteína en extractos proteicos enriquecidos en fracción nuclear utilizando anticuerpos comerciales anti-HA.

Para analizar el rol de GmNRX2.1 en la tolerancia al estrés abiótico, se generaron y caracterizaron fenotípicamente plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobre-expresan el gen *GmNRX2.1*. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre las plantas transgénicas y las wt en cuanto a crecimiento y capacidad de germinación en condiciones de estrés osmótico, salino y oxidativo. En las únicas condiciones en que las plantas transgénicas mostraron cierta ventaja sobre las wt fue en estrés hídrico *ex vitro*. Como se mencionó en la introducción, las Trx constituyen un grupo de proteínas sumamente diversificado en plantas. Es evidente que el estudio de este tipo de genes es muy complejo en estos organismos debido a que existe un alto nivel de redundancia funcional, así como mecanismos de compensación mediante rutas no vinculadas. Un caso paradigmático es el ejemplo de las plantas de tabaco silenciadas para la ascorbato peroxidasa y la catalasa, las cuales son menos sensibles al estrés oxidativo que las plantas que carecen de cada uno de esas proteínas individualmente. Esto se debe a una supresión de la actividad fotosintética y a un incremento de la expresión de la oxidasa alternativa mitocondrial y la monodehidroascorbato reductasa (Rizhisky *et al.*, 2002). Asimismo, dada la redundancia génica, es común que plantas KO para genes de la familia de las Trx no presenten trastornos de su desarrollo ni sensibilidad incrementada a situaciones que induzcan estrés oxidativo. Incluso plantas KO para múltiples genes de la familia no presentan un fenotipo claro (Meyer *et al.*, 2005). Por lo tanto, es difícil obtener información funcional sobre genes de este tipo únicamente utilizando abordajes de genética reversa, a través del silenciamiento o la sobre-expresión de un gen en particular. Estos estudios deben ser complementados con técnicas que permitan hilar fino en la trama de las interacciones a nivel molecular.

En este sentido, se procedió a la generación de construcciones para la expresión de proteína recombinante, de manera de poder mantener un abordaje desde la bioquímica de proteínas para extraer información funcional sobre la GmNRX2.1. Como se expuso con anterioridad, al tratarse de Trxs atípicas de dominio múltiple existe una serie de preguntas básicas que despiertan interés acerca de la función de las NRXs, y que esperamos poder responder en el trabajo futuro. Surgen preguntas referidas a aspectos funcionales (cuál es el reductor, cuáles son los blancos) y de regulación (posibles modificaciones, cuál es la función del dominio C1) sobre la GmNRX2.1.

Por lo tanto, es de interés determinar qué tipo de actividad presentan estas proteínas. Los estudios realizados de actividad oxidorreductasa tanto para NRXs de plantas (Laughner *et al.*, 1998; Marchal *et al.*, 2014), como de mamíferos (Kurooka *et al.*, 1997) se basan en ensayo de reducción de insulina. Si bien las NRXs no son tan eficientes en este ensayo como

otras Trxs convencionales, no se ha evaluado si estas proteínas pueden tener otro tipo de actividad. A su vez, la proteína presenta cisteínas adicionales a las de sus sitios activos tentativos, por lo que sería interesante analizar si las mismas pueden modificarse.

También se espera determinar cuál es el posible reductor de esta proteína. Al presentar una localización citosólica y posiblemente nuclear sería interesante investigar si puede ser reducida por el sistema NTR. Alternativamente, sería posible examinar si el sistema glutatión reductasa/glutatión/glutarredoxina puede reducir a la GmNRX2.1. Por otra parte, también se podría analizar si las GmNRX2.1 es capaz de reducir alguna peroxirredoxina citosólica o si puede actuar como reductor para peroxirredoxinas nucleares (1-cys-Prx). La 1-cys-Prx es una peroxirredoxina nuclear específica de semilla, para la cual aún no es conocido su reductor, por lo que es un punto particularmente interesante.

Asimismo, quisiéramos evaluar si ambos dominios Trx son activos y/o necesarios para la actividad. Una vez determinada qué tipo de actividad presenta esta proteína, se evaluará la funcionalidad del segundo dominio Trx aislado con el fin de analizar si este dominio, que es el potencialmente activo gracias a la presencia de un sitio activo de tipo CxxC, presenta actividad redox, o si los dos dominios Trx presentan actividad redox conjunta.

A su vez, queda por determinar las características del dominio C1. Se ha planteado que estos dominios coordinan átomos de zinc, que tienen la capacidad de unir lípidos y de oxidarse. No obstante, estas capacidades no han sido verificadas.

Finalmente, sería interesante determinar cuáles son los posibles interactores de la GmNRX2.1. Este punto se realizará con el mutante C227S y con la proteína WT. Se determinará de esta manera qué interacciones son redox-dependientes. Estos ensayos se realizarán con extractos de soja. Esta metodología permitirá mantener un abordaje más amplio y libre de preconcepciones sobre la funcionalidad de las NRXs.

Para la expresión de proteína recombinante se evaluaron dos sistemas diferentes. Por un lado, se clonó la secuencia codificante para la GmNRX2.1 en un vector pET301 para expresión en *E. coli* como fusión a una His-tag C-terminal. Por otro lado, se clonó la secuencia codificante para la GmNRX2.1 y de sus variantes C227S, dominio TrxC (R191-A326) y dominio C1 (G326-C411) en vectores de la serie pEAQHT-Dest para expresión en el sistema vegetal *N. benthamiana*. En el caso de la expresión de proteína en bacteria, no fue posible obtener una cantidad suficiente de proteína soluble. Esto coincide con lo descrito para ambas proteínas de *Arabidopsis* (Marchal *et al.*, 2014) y la NRX de maíz (Laughner *et al.*, 1998). La GmNRX2.1 es una proteína relativamente grande (de 50 kDa aproximadamente) y sumado a que es una proteína muy rica en cisteínas (posee 10 cisteínas, 6 de ellas en el dominio C1) podía esperarse que su expresión heteróloga presentara complicaciones. Por lo tanto, el trabajo futuro se enfocará a optimizar las condiciones de expresión de la GmNRX2.1 y de sus variantes en *N. benthamiana* puesto que estamos convencidos que un abordaje desde la bioquímica de proteínas permitirá obtener mucha información funcional sobre el mecanismo molecular mediante el cual operan estas proteínas.

Es importante mencionar que en vistas de que no existen trabajos que evalúen con profundidad a las NRX desde el punto de vista bioquímico, el rumbo que puede tomar este

trabajo es incierto, si bien tenemos algunas ideas hacia dónde enfocarnos. Existen entonces algunas preguntas que serán nuestro punto de partida, mientras que otras serán abordadas en función de la evidencia que se vaya desprendiendo. Las preguntas bioquímicas fundamentales que este trabajo pretenderá responder son: 1- si esta proteína presenta actividad redox; 2- si puede ser reducida por el sistema NTR; 3- si la NRX puede reducir alguna Prx o peróxido (H_2O_2); y 4- cuáles son las propiedades del dominio C1.

Como punto inicial se procederá a optimizar herramientas que permitan seguir reacciones de oxidación-reducción en la GmNRX2.1. Se caracterizarán la fluorescencia intrínseca de las variantes WT, dominio Trx R191-A326 y dominio C1. Se realizarán espectros de emisión de las formas oxidada y reducida y en un rango de pH fisiológico (pH 5 a pH 7). La GmNRX2.1 presenta 7 residuos de triptófano: 2 de ellos en el primer dominio Trx, 4 en el segundo dominio Trx (uno de los cuales compone el sitio activo potencial, WCVPC) y 1 en el dominio C1. A pesar de que el número de triptófanos es elevado, si la fluorescencia de alguno de los residuos cambia con las condiciones ensayadas es esperable visualizar algún cambio en la fluorescencia, lo que puede ser de utilidad aunque el cambio no sea extremadamente pronunciado. Las posibilidades aumentan con los dominios TrxC y C1. Visualizar cambios en la fluorescencia de la proteína sería una herramienta ideal para los ensayos de actividad, puesto que permitiría seguir cambios rápidos que ocurran sobre la NRX, sin intermediarios. Alternativamente, se podrán utilizar ensayos acoplados ampliamente utilizados con proteínas de la familia como ser el sistema NADPH-NTR-Trx y medir el consumo de NADPH (Holmgren, 1979, 1995; Rouhier *et al.*, 2001). También se evaluará la posibilidad de utilizar el sustrato artificial ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzónico) (DTNB) el cual reacciona con tioles dando un producto coloreado. Asimismo se determinará si la Prx5 humana (hPrx5) puede ser reducida por la NRX. La hPrx5 presenta cambios en su fluorescencia intrínseca marcados y bien caracterizados (Portillo *et al.*, 2014) que podrían utilizarse para seguir indirectamente las reacciones sobre la NRX.

Utilizando estas herramientas se podrá evaluar la posibilidad de que el sistema NTR reduzca a la GmNRX2.1. Contamos actualmente con las construcciones para expresar la NTR de trigo y la NTRc de arroz. También contamos con tiorredoxina reductasas bacterianas y de mamífero que podrán ser evaluadas como reductores de la GmNRX2.1. Eventualmente se podrá analizar la posibilidad de que el sistema glutatión reductasa (GR)-glutarredoxina (Grx) sirva como reductor de la GmNRX2.1.

El trabajo con el dominio C1 aislado permitirá confirmar si el dominio une lípidos o metales o si tiene la capacidad de oxidarse. El dominio presenta un único residuo de triptófano que será de utilidad para visualizar cambios en el entorno del mismo ante unión/pérdida de ligandos o cambios conformacionales. Alternativamente se podrán emplear lípidos fluorescentes o ensayos de desplazamiento de sondas fluorescentes, como se suele proceder con proteínas que unen ácidos grasos (Wilton, 1990). Se determinará si el dominio C1 presenta capacidad para unir Zn^{2+} y , si lo hace, se determinará la constante de afinidad y estequiometría de la unión.

Con el fin de aclarar el rol fisiológico de la GmNRX2.1, también estamos interesados en determinar con qué proteínas interactúa. Tras optimizar la expresión y purificación de la GmNRX2.1, se realizarán ensayos de *pull down* y se determinarán posibles interactores. Estos ensayos se llevarán adelante utilizando la variante C227S. La eliminación de la cisteína resolutive es una estrategia comúnmente utilizada para estabilizar los complejos proteicos que interactúan normalmente de manera transitoria redox-dependiente. La unión covalente Trx-blanco puede ser disuelta mediante el agregado de un agente reductor de tioles (Balmer *et al.*, 2003; Motohashi *et al.*, 2001). Para ello, la proteína pura será inmovilizada a una resina de IMAC, se hará fluir extractos vegetales de soja a través de esta columna, se disolverán los complejos proteicos formados y se identificarán aquellas proteínas unidas a la GmNRX2.1 mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Otro elemento que será de relevancia para redondear este trabajo es evaluar en qué condiciones se expresan las NRXs. Un trabajo previo de nuestro grupo determinó que el gen codificante para la GmNRX2.1 incrementa su expresión en respuesta a sequía en plantas de soja tolerantes a dicho estrés en mayor medida que en plantas susceptibles. Al momento, el único estudio funcional de NRXs de planta demostró que una NRX de *A. thaliana* tiene una función en el desarrollo del polen (Marchal *et al.*, 2014). Sin embargo, no se ha vinculado la participación de este tipo de proteínas en las respuestas frente a estrés abiótico o biótico, por lo tanto se decidió evaluar el perfil de expresión de los genes codificantes para NRXs en soja y en *A. thaliana* frente a diferentes estímulos hormonales (ABA, SA) y de estrés (deshidratación, Pq). Con el objetivo de determinar si estas proteínas presentan un rol en algún momento del desarrollo, también es de interés determinar si las mismas varían su expresión durante la germinación y en estado vegetativo. Para ello, se han realizado extracciones de RNA tanto de soja como de *A. thaliana* en las condiciones mencionadas y se han generado membranas que serán hibridadas con sondas de DNA que reconocen cada tipo de NRX (tipo I, tipo II y tipo III de soja, y tipo I y tipo III de *A. thaliana*). La detección de estos transcriptos será realizada a la brevedad.

En suma, este trabajo ha aportado datos de localización subcelular, perfil de expresión y función de la GmNRX2.1 *in vivo* y ha generado herramientas para estudiar en profundidad las características bioquímicas de la proteína *in vitro*.

5.2 Estudio proteómico de líneas de *Arabidopsis wt* y sobre-expresantes del gen *GmElFiso4G*

Esta parte del trabajo se enmarca dentro de otro proyecto del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal en el cual se pretende dar respuesta al rol de un factor de iniciación de la traducción de soja (*GmElFiso4G*) en las respuestas frente a estrés. Como se mencionó anteriormente, el control de la traducción es un punto de regulación génica fundamental. La presencia de dos tipos de proteínas notoriamente divergentes, *eIF4G* y *eIFiso4G*, así como el rol esencial que cumplen dichos factores en la iniciación de la traducción, plantea la posibilidad de que exista una especialización funcional entre ellos. El dominio N-terminal del *eIF4G* contiene los sitios de unión para el *eIF4E* y para la PABP; el dominio intermedio une el *eIF3* y el *eIF4A*; y, en el *eIF4G* de mamífero, el dominio C-terminal une una segunda molécula de *eIF4A* y una quinasa *Mnk1*, responsable de la fosforilación del *eIF4E*. Por tanto, el *eIF4G* funciona como una proteína de *scaffold*, que recluta varios factores involucrados en estimular la unión de la subunidad ribosómica 40S (Gallie, 2001). Se ha demostrado para las proteínas de trigo que las mayores diferencias entre el *eIF4G* y el *eIFiso4G* están en su afinidad por mRNAs con Cap y una estructura 5' estructurada: el *eIF4F* promueve la traducción de este tipo de mRNAs en mayor medida que el *eIFiso4G* (Gallie *et al.*, 2001b). Una estructura secundaria estable en el 5' de los mRNAs puede servir para impedir el escaneo de la subunidad ribosómica 40S en busca del codón de inicio (Kozak, 2005), de manera que es posible regular la traducción en respuesta a alteraciones en la cantidad o la actividad de componentes de la maquinaria de traducción (Gallie *et al.*, 2001b). Por ejemplo, en embriones de trigo, el *eIFiso4G* se expresa 9 veces más que el *eIF4G* (Browning *et al.*, 1990). Este aumento en la expresión puede ser necesario para compensar su más baja actividad o para promover la traducción de mRNAs específicos. Algo similar podría estar ocurriendo en el caso de la soja sometida a condiciones de estrés, cuando la síntesis proteica global disminuye significativamente, mientras que algunos transcriptos (aquellos que codifican proteínas relacionadas con la respuesta al estrés), son traducidos activamente y en niveles elevados.

Por otra parte, el elevado número de genes hace pensar que existe cierto nivel de solapamiento funcional entre las isoformas. *A. thaliana* posee tres genes codificantes para la subunidad mayor del complejo *eIF4F/eIFiso4F*: *eIF4G* (At3g60240), *eIFiso4G1* (At5g57870) y *eIFiso4G2* (At2g24050). La pérdida de cada uno de los genes *eIFiso4G* individualmente prácticamente no tuvo impacto sobre el fenotipo de las plantas. Sin embargo, la pérdida de ambos genes produjo una alteración severa del crecimiento, disminución de la clorofila a y b, disminución de la fertilidad y la estabilidad en las semillas, y una mayor susceptibilidad a la deshidratación y al estrés salino, lo que indica que al menos uno de los parálogos *eIFiso4G* es necesario para sustentar la expresión de algunos genes que participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta (Lellis *et al.*, 2010). Las plantas KO también mostraron una capacidad fotosintética reducida debido a un aumento en el quenching no fotoquímico

(NPQ) gracias a un aumento de la expresión de la enzima violaxantina de-epoxidasa (Chen *et al.*, 2014)

La soja presenta 4 genes codificantes para *GmeIF4G* y 3 genes codificantes para *GmeIFiso4G*. Teniendo en cuenta esta diversificación de los genes de la familia, sería prudente pensar que existe especialización para dirigir la síntesis de determinados transcriptos. Además, considerando que las isoformas eIFiso4G se hallan exclusivamente en las plantas, es esperable que sean requeridos para la traducción de mRNAs importantes en funciones específicas de las plantas, como ser la fotosíntesis, la síntesis de celulosa, la floración y la producción de semillas, así como las respuestas frente a estrés ambiental (Lellis *et al.*, 2010). Otro punto que es importante destacar es que los eIF4G y eIFiso4G se encuentran formando complejos con los eIF4E y eIFiso4E, que presentan a su vez varias isoformas con diferentes afinidades por los mRNAs con Cap (Kropiwnicka *et al.*, 2015), lo que aporta diversidad adicional. Es posible que el gen en estudio aumente su expresión para promover la síntesis de ciertas proteínas que limiten el daño en condiciones de estrés. En el caso de la soja y de las plantas de *A. thaliana* que sobre-expresan el gen *GmeIFiso4G*, sometidas a condiciones de estrés osmótico y frío, hemos observado mediante ensayos de *Western blot* que existe una acumulación considerable de dehidrinas (Gallino *et al.*, no publicado). En esta parte del trabajo buscamos mantener un abordaje más amplio para determinar qué proteínas se encuentran aumentadas y que favorecen el fenotipo de tolerancia observado.

Los estudios proteómicos convencionales que implican electroforesis bidimensional no suelen ser técnicas cuantitativas ya que pueden traer aparejado variaciones gel a gel. Estas variaciones pueden deberse a problemas de absorción de la proteína por la tiras de isoelectroenfoque, transferencia incompleta de las proteínas desde la primera dimensión a la segunda, falta de homogeneidad en el gel, diferencias en la potencia del campo eléctrico o en los gradientes de pH (Van den Bergh, 2004). En la técnica de 2D-DIGE estos problemas son eliminados. La precisión en la cuantificación de proteínas, acompañado de la robustez estadística (siempre se realizan varias réplicas biológicas), hacen que esta técnica sea cuantitativa, adecuada para nuestro sistema en estudio.

No obstante, para poder llevar adelante dicha técnica es importante optimizar las condiciones de extracción de proteínas y separación de las mismas mediante electroforesis bidimensional, puntos sobre los que se avanzó en este trabajo, quedando todavía mucho por realizar. Como se mencionó en la sección de resultados, al momento hemos obtenido resultados técnicos positivos. Se logró optimizar la extracción de proteínas de manera de evitar la proteólisis y la separación mediante electroforesis bidimensional fue muy buena en las condiciones ensayadas. Al intentar identificar proteínas mediante espectrometría de masas, tuvimos el inconveniente de solamente identificar la subunidad mayor de la RubisCO. Para resolver este problema, hemos adquirido columnas de afinidad anti-RubisCO (Sigma), y nuevamente, logramos optimizar la extracción de proteínas y la eliminación de la RubisCO mediante esta metodología. La realización de este paso tiene la ventaja adicional de que

permitirá sembrar mayor cantidad de otras proteínas en cada gel, permitiendo evidenciar cambios en proteínas menos abundantes. El trabajo futuro estará dirigido a optimizar nuevamente la separación mediante electroforesis bidimensional y, en última instancia, realizar la comparación entre tratamientos por la técnica de 2D-DIGE.

Conclusiones

Durante este trabajo se abordó la caracterización de dos genes de soja, *GmNRX2.1* y *GmeIFiso4G*, que fueron seleccionados a partir de un trabajo previo de nuestro grupo como posibles candidatos en la participación en las respuestas frente a estrés hídrico. Para el gen *GmNRX2.1* se determinó que se trata de una proteína cuya localización es citosólica y, posiblemente, nuclear. No fue posible determinar condiciones en las que se observe un fenotipo claro *in vitro*. Sin embargo, las plantas transgénicas que sobre-expresan la *GmNRX2.1* mostraron ventaja frente a las wt en los ensayos de deshidratación en tierra. Las mismas mostraron menos daño luego de 7 días sin riego y se recuperaron de la deshidratación, mientras que las plantas wt alcanzaron el estado de marchitez permanente. Actualmente, se han generado construcciones para la sobre-expresión de proteína recombinante en bacteria y en planta y el trabajo futuro se enfocará hacia la optimización de las condiciones de expresión y purificación y hacia la caracterización bioquímica de la proteína en profundidad.

Otro punto que es importante remarcar es la complejidad que puede presentar el estudio de las rutas de respuesta frente a estrés abiótico en plantas. Los principales estreses que pueden afectar a las plantas en el campo (como la sequía, la salinidad, el calor, el frío y el congelamiento, la restricción de nutrientes, la alta intensidad de luz, el ozono y la anaerobiosis) pueden ser abordados sólo parcialmente en el laboratorio. Existen múltiples variables, como las fluctuaciones en el estrés, las combinaciones de diversos estreses, la heterogeneidad en el impacto y las respuestas entre diferentes plantas, o el estado del desarrollo en el que se produce el estrés, que pueden también tener una gran influencia sobre la fisiología. Asimismo, los eventos de estrés son seguidos de periodos de recuperación. Sin embargo, muy pocos estudios se han centrado en los cambios metabólicos que acompañan a la recuperación del estrés. En el campo, las plantas pueden estar sometidas a múltiples etapas de estrés-recuperación, lo que generalmente no es reproducido en el laboratorio. Otra diferencia fundamental entre el campo y el laboratorio es la intensidad y la duración del estrés. Muchas veces, los sustratos y recintos utilizados para los ensayos de estrés, o el estado nutricional en el que se encuentran las plantas, no simulan adecuadamente lo que ocurre en el campo (Mittler *et al.*, 2010). En pocas palabras, encontrar genes aislados cuya expresión genere un fenotipo de tolerancia marcado es, en buena medida, una especie de lotería.

Por otra parte, el Dr. Gallino ha comprobado que la sobre-expresión del gen *GmeIFiso4G* confiere tolerancia al estrés osmótico, salino y frente a bajas temperaturas en plantas transgénicas de *A. thaliana*. El objetivo último de esta parte del trabajo es determinar el impacto de la sobre-expresión del gen *GmeIFiso4G* en el proteoma de plantas en condiciones control y condiciones de estrés mediante estudios de proteómica comparativa utilizando la técnica de 2D-DIGE. Al momento, el trabajo ha apuntado a la resolución de situaciones técnicas previas a la realización de dicho abordaje. Se ha optado realizar un paso previo para la eliminación de la RubisCO, lo que facilitará la determinación de las proteínas presentes en el gel por espectrometría de masas y permitirá sembrar en cada gel una mayor proporción de proteínas menos abundantes. Para ello, se han puesto a punto las condiciones

para la extracción de proteínas y la eliminación de la RubisCO utilizando las columnas de afinidad *anti-RubisCO Seppro RubisCO spin columns* (Sigma). En breve, se procederá a determinación de las mejores condiciones para la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional. Este trabajo permitirá finalmente realizar la técnica de 2D-DIGE para comparar el perfil de expresión proteica entre los tratamientos.

Referencias

1. Abdel-Haleem H, Lee GJ, Boerma RH. Identification of QTL for increased fibrous roots in soybean. *Theor Appl Genet* (2011), 122(5):935-946.
2. Atkinson HJ, Babbitt PC. An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. *PLoS Comp Biol* (2009), 5(10), e1000541.
3. Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schürmann P, Buchanan BB. Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003), 100(1), 370-375.
4. Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal Biochem* (1976), 72:248-254.
5. Browning KS, Humphreys J, Hobbs W, Smith GB, Ravel JM. Determination of the amounts of the protein synthesis initiation and elongation factors in wheat germ. *J Biol Chem* (1990), 265(29):17967-17973.
6. Carter TE, Burton JW, Bowman DT, Cui Z, Zhou X, Villagarcia MR, Niewoehner AS, Fountain MO. Registration of 'N7001' Soybean. *Crop Sci* (2003), 43:1126-1127.
7. Carrow, R. N. Drought avoidance characteristics of diverse tall freescure cultivars. *Crop Sci* (1996), 36:371-377.
8. Chalmel F, Léveillard T, Jaillard C, Lardenois A, Berdugo N, Morel E, Koehl P, Lambrou G, Holmgren A, Sahel JA, Poch O. Rod-derived cone viability factor-2 is a novel bifunctional-thioredoxin-like protein with therapeutic potential. *BMC Mol Biol* (2007), 8:74.
9. Chen Z, Jolley B, Caldwell C, Gallie DR. Eukaryotic translation initiation factor eIF5A is required to regulate violaxanthin de-epoxidase expression in Arabidopsis. *J Biol Chem* (2014), 289 (20):13926-13936.
10. Chibani K, Wingsle G, Jacquot JP, Gelhaye E, Rouhier N. Comparative genomic study of the thioredoxin family in photosynthetic organisms with emphasis on *Populus trichocarpa*. *Mol Plant* (2009), 2(2):208-322.
11. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* (1998), 16(6):735-743.
12. Collet JF, Messens J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antiox Red Signal* (2010), 13(8):1205-1215.
13. Colón-González F, Kazanietz MG. C1 domains exposed: From diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochem Biophys Acta* (2006), 1761:827-837.
14. Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl Acids Res* (1985), 13(13):4777-4788.
15. Diatchenko L, Laut YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. *Proc Natl Acad Sci* (1996), 93:6025-6030.

16. Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. Plant glutathione transferases. *Genome Biol* (2002), 3(3):REVIEWS3004.
17. Dong W, Lv H, Xia G, Wang M. Does diacylglycerol serve as a signaling molecule in plants? *Plant signal behav* (2012), 7(4):472-475.
18. FAO (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London.
19. FAO (2013). FAO statistical yearbook. World food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
20. FAO (2014). FAO statistical yearbook. Latin America and the Caribbean food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Regional Office for the Latin America and the Caribbean, Santiago.
21. Fernandes, A. P., Holmgren, A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* (2004), 6(1):63-74.
22. Floris M, Mahgoub H, Lanet E, Robaglia C, Menand B. Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *Int J Mol Sci* (2009), 10:3168-3128.
23. Fomenko DE, Gladyshev VN. Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochem* (2003), 42:11214-11225.
24. Foyer CH, Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* (2005), 17(7):1866-1875.
25. Funato Y, Miki H. Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin. *Free Rad Res* (2010a), 44(4):397-388.
26. Funato Y, Terabayashi T, Sakamoto R, Okuzaki D, Ichise H, Nojima H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by retaining a pool of inactive dishevelled protein. *Curr Biol* (2010b), 20:1945-1952.
27. Funato Y, Hayashi T, Irino Y, Takenawa T, Miki H. Nucleoredoxin regulates glucose metabolism via phosphofructokinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* (2013), 440(4):737-742.
28. Gallie RD. Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukariotic initiation factor 4G dependent. *J Virol* (2001), 75(24):12141-12152.
29. Gallie RD, Browning KS. eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* (2001), 276(40):36951-36960.
30. Gallino JP. Identificación y caracterización funcional de genes de tolerancia a la sequía en soja. Tesis de doctorado (2013).
31. Gaude N, Scheible WR, Ohta H, Dörmann P. Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of Arabidopsis. *Plant J* (2008), 56:28-39.

32. Geczy T, Peach ML, Kazzouli SE, Sigano DM, Kang JH, Valle CJ, Selezneva J, Woo W, Kedei N, Lewin NE, Garfield SH, Lim L, Mannan P, Marquez VE, Blumberg PM. Molecular basis for failure of “atypical” C1 domain of Vav1 to bind diacylglycerol/phorbol ester. *J Biol Chem* (2012), 287(16):13137-13158.
33. Gelhaye E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP. The plant thioredoxin system. *Cell Mol Life Sci* (2005), 62:24-35
34. Ghosh S, Xie WQ, Quest AFG, MabroukS GM, Strum JC, Bell RM. Cysteine-rich region of Raf-1 Kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-Ras. *J Biol Chem* (1994), 269(13):10000-10007.
35. Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol Plant Microbe Interact* (2008), 21(8):1015-1026.
36. Graf PCF, Martinez-Yamout M, VanHaerents S, Lilie H, Dyson HJ, Jakob U. Activation of the redox-regulated chaperone Hsp33 by domain unfolding. *J Biol Chem* (2004), 279(19):20529-20538.
37. Grimsley GR, Pace CN. (2004) Spectrophotometric determination of protein concentration, *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 3, Unit 3 1.
38. Grishin N. Treble clef finger-a functionally diverse zinc-binding structural motif. *Nucl Acid Res* (2001), 28(8):1708-1714.
39. Hall C, Lim L, Leung T. C1, see them all. *TRENDS Biochem Sci* (2005), 30(4):169-171.
40. Hayashi T, Funato Y, Terabayashi T, Morinaka A, Sakamoto R, Ichise H, Fukuda H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88). *J Biol Chem* (2010), 285(24):18586-18593.
41. Helling D, Possart A, Cottier S, Klahre U, Kost B. Pollen tube tip growth depends on plasma membrane polarization mediated by Tobacco PLC3 activity and endocytic membrane recycling. *Plant Cell* (2006), 18:3519-3534.
42. Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res* (1999), 27:297-300.
43. Hirota K, Matsui M, Murata M, Takashima Y, Cheng FS, Itoh T, Fukuda K, Yodoi J. Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kappaB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2000), 274:177-182.
44. Holmgren A, Söderberg BO, Eklund H, Brändén CI. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1975), 72(6):2305-2309.
45. Holmgren A. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* (1979), 254(19):9627-9632.
46. Holmgren A. Glutaredoxin. *Methods Enzymol* (1995), 252:283-292.
47. Hommel U1, Zurini M, Luyten M. Solution structure of cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Nat Struct Biol* (1994), 1(6):383-387.

48. Horling F, Lamkemeyer P, König J, Finkemeier I, Kandlbinder A, Baier M, Dietz KJ. Divergent light, ascorbate, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol* (2003), 131(1), 317-325.
49. Horsch RB, Klee HJ, Stachelt S, Winanst SC, Nestert EW, Rogers SG, Fraley RT. Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs. *Proc Natl Acad Sci* (1986), 83:2571-2575.
50. Hufstetler EV, Boerma HR, Carter TE y Earl HG. Genotypic variation for three physiological traits affecting drought tolerance in soybean. *Crop Sci* (2007), 47:25-35.
51. Hyten DL, Song Q, Zhu Y, Choi IY, Nelson RL, Costa JM, Specht JE. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. *Proc Natl Acad Sci* (2006), 103(45):16666-16671.
52. Jackson R, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukariotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2010), 11(2):113-127.
53. Jefferson RA, Kavanagh RA, Bevan MW. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* (1987), 6(13):3901-3907.
54. Jefferson. The GUS reporter gene system. *Nature* (1989), 342:837-838.
55. Jones MM, Turner NC y Osmond CB. (1981) Mechanisms of drought resistance, p.15–37. En: Paleg LG and Aspinall D (eds.) *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic, New York.
56. Jones H. (2004) What is water use efficiency? En: Bacon MA (ed). *Water use efficiency in plant biology*. Oxford: Blackwell p. 27-41.
57. Jouhet J, Maréchal E, Bligny R, Joyard J, Block MA. Transient increase of phosphatidylcholine in plant cells in response to phosphate deprivation. *FEBS Lett.* (2003), 544:63-68.
58. Kazanietz MG, Krausz KW, Blumberg PM. Differential irreversible insertion of Protein Kinase C into phospholipid vesicles by phorbol esters and related activators. *J Biol Chem* (1992), 267(29):20878-20886.
59. Kocourková D, Krcková Z, Pejchar P, Veselková S, Valentová O, Wimalasekera R, Scherer GFE, Martinec J. The phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C NPC4 plays a role in response of Arabidopsis roots to salt stress. *J Exp Bot* (2011), 62(11):3753-3763.
60. Korichneva I, Hoyos B, Chua R, Levi E, Hammerling U. Zinc release from Protein Kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J Biol Chem* (2002), 277(46):44327-44331.
61. Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* (2005), 361:13-37.
62. Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers. *Nucl Acid Res* (2003), 21(2):532-550.
63. Kropiwnicka A, Kuchta K, Lukasewicz M, Kowalska J, Jemielity J, Ginalski K, Darzynkiewicz E, Zuberek J. Five eIF4E isoforms from Arabidopsis thaliana are

- characterized by distinct features of cap analogs binding. *Biochem Biophys Res Commun* (2015), 456:47-52.
64. Kurooka H, Kato K, Minoguchi S, Takahashi Y, Ikeda J, Habu S, Osawa N, Buchberg AM, Moriwaki K, Shisa H, Honjo T. Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics* (1997), 39(3):331-339.
 65. Laughner BJ, Sehnke PC, Ferl RJ. A novel nuclear member of the thioredoxin superfamily. *Plant Physiol* (1998), 118:987-996.
 66. Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Ham le H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS. Differential gene expression in soybean leaf tissues at late developmental stages under drought stress revealed by genome-wide transcriptome analysis. *PLoS One* (2012), 7(11):e49522.
 67. Lechward K, Sugajska E, de Baere I, Goris J, Hemmings BA, Zolnierowicz S. Interaction of nucleoredoxin with protein phosphatase 2A. *FEBS Lett* (2006), 580:3631–3637.
 68. Lellis AD, Allen ML, Aertker AW, Tran JK, Hillis DM, Harbin CR, Caldwell C, Gallie DR, Browning KS. Deletion of the eIFiso4G subunit of the Arabidopsis eIFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Mol Biol* (2010), 74:249-263.
 69. Leonard TA, Hurley JH. Regulation of protein kinases by lipids. *Curr Op Struc Biol* (2011), 21:785-791.
 70. Lillig, C. H., Berndt, C., Holmgren, A. Glutaredoxin systems. *Biochim Biophys Acta* (2008), 1780:1304-1317.
 71. Majhi A, Rahman GM, Panchal S, Das J. Binding of curcumin and its long chain derivatives to the activator binding domain of novel Protein Kinase C. *Bioorg Med Chem* (2010), 18(4):1591-1598.
 72. Mamidi N, Borah R, Sinha N, Jana C, Manna D. Effects of ortho substituent groups of protocatechualdehyde derivatives on binding to the C1 domain of novel Protein Kinase C. *J Phys Chem* (2012), 116:10684-10692.
 73. Manavalan LP, Guttikonda SK, Plan Tran L-S y Nguyen T. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiol* (2009), 50:1260-1276.
 74. Marchal C, Delorme-Hinoux V, Bariat L, Siala W, Belin C, Saez-Vasquez J, Ridonet C, Reichheld JP. NTR/NRX define a new thioredoxin system in the nucleus of Arabidopsis thaliana cells. *Mol Plant* (2014), 7(1):30-44.
 75. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem* (2005), 382:669-678.
 76. Martinez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L. Improving transformation efficiency of Arabidopsis thaliana by modifying the floral dip method. *Plant Mol Biol Rep* (2004), 22:63-70.

77. Mayberry LK, Allen ML, Nitka KR, Campbell L, Murphy PA, Browning KS. Plant cap-binding complexes eukaryotic initiation factors eIF4F and eIF5A. Molecular specificity of subunit binding. *J Biol Chem* (2011), 286(49):42566-42574.
78. Méchin V, Damerval C, Zivy M. (2007) Total Protein Extraction with TCA-Acetone. *Methods in molecular biology: Plant Proteomics Chapter 1*.
79. Meyer AJ. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol* (2008), 165:1390-1403.
80. Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F. Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynth Res* (2005), 86(3):419-433.
81. Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F, Reichheld JP. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim Biophys Acta* (2008), 1783(4):589-600.
82. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *TRENDS in Plant Sci* (2004), 9(10):490-498.
83. Mittler R, Blumwald E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu Rev Plant Biol* (2010), 61:443-462.
84. Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001), 98(20):11224-11229.
85. Mueller ND, Gerber JS, Johnstone M, Ray DK, Ramankutty N, Foley JA. Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nat Lett* (2012), 490:254-257.
86. Muñoz A, Castellano MM. Regulation of translation initiation under abiotic stress conditions in plants: Is it a conserved or not so conserved process among eukaryotes? *Comp Func Gen* (2012), doi:10.1155/2012/406357.
87. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* (1962), 15:473-497.
88. Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T. Development of a series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosc Bioeng* (2007), 104(1):34-41.
89. Nakamura Y, Awai K, Masuda T, Yoshioka Y, Takamiya K, Ohta H. A Novel Phosphatidylcholine-hydrolyzing Phospholipase C Induced by Phosphate Starvation in Arabidopsis. *J Biol Chem* (2005), 280(9):7469-7476.
90. Oancea E, Teruel MN, Quest AFG, Meyer T. Green Fluorescent Protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from Protein Kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* (1998), 140(3):485-498.
91. Odell JT, Knowlton S, Lin W, Mauvais CJ. Properties of an isolated transcription stimulating sequence derived from the cauliflower mosaic virus 35S promoter.
92. Pathan MS, Lee JD, Shannon JG y Nguyen HT (2007). Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean. En: *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds.):265-302 Springer New York.

93. Paulsen CE, Carroll KS. Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem Rev* (2013), 113(7):4633-4679.
94. Peyret H, Lomonossoff GP. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Mol Biol* (2013), 83:51-58.
95. Portillo-Ledesma S, Sardi F, Manta B, Tourn MV, Clippe A, Knoops B, Alvarez B, Coitiño EL, Ferrer-Sueta G. Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochem* (2014), 53(38):6113-6125.
96. Pedone E, Limauro D, D'Ambrosio K, De Simone G, Bartolucci S. Multiple catalytically active thioredoxin folds: a winning strategy for many functions. *Cell Mol Life Sci* (2010), 67:3797-814.
97. Pejchar P, Potocký M, Novotná Z, Veselková Š, Kocourková D, Valentová O, Schwarzerová K, Martinec J. Aluminium ions inhibit the formation of diacylglycerol generated by phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C in tobacco cells. *New Phytol* (2010), 188:150-160.
98. Pierrugues O, Brutesco C, Oshiro J, Gouy M, Deveaux Y, Carman GM, Thuriaux P, Kazmaier M. Lipid phosphate phosphatase in Arabidopsis. *J Biol Chem* (2001), 276(23):20300-20308.
99. Pulido P, Cazalis R, Cejudo FJ. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. *Plant J* (2009), 57:132-145.
100. Qi Y, Grishin NV. Structural classification of thioredoxin-like fold proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* (2005), 58(2):376-388.
101. Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, Palanivelu R. Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genet* (2009), 5(8):e1000621.
102. Quest AFG, Bell RM. The regulatory region of Protein Kinase Cy. Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione s-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations. *J Biol Chem* (1994), 269, 31:20000-20012.
103. Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLOS one* (2013), 8(6):e66428.
104. Ren G, Stephan D, Xu Z, Zheng Y, Tang D, Harrison RS, Kurz M, Jarrott R, Shouldice SR, Hiniker A, Martin JL, Heras B, Bardwell JCA. Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J Biol Chem* (2009), 284(15):10150-10159.
105. Rigaud J, Puppò A. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* (1975), 88: 223-228.
106. Rizhsky L, Hallak-Her E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Bar JE, Rodermeil S, Inzé D, Mittler R. Double antisense plants lacking peroxidase and catalase are less

- sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J* (2002), 32:329-342.
107. Rouhier N, Gelhaye E, Sautiere PE, Brun A, Laurent P, Tagu D, Gerard J, de Faÿ E, Meyer Y, Jacquot JP. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol* (2001), 127(3):1299-1309.
 108. Rouhier N, Koh CS, Gelhaye E, Corbier C, Favier F, Didierjean C, Jacquot JP. Redox based anti-oxidant systems in plants: biochemical and structural analyses. *Biochim Biophys Acta* (2008), 1780(11):1249-1260.
 109. Roberts CS, Rajagopal S, Smith LA, Nguyen TA, Yang W, Nugroho S, Ravi KS, Vijayachandra K, Harcourt KL, Dransfield L, Desamero N, Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P, Mayer JE, Keese P, Kilian K, Jefferson RA. pCAMBIA binary vectors: A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants by both *Agrobacterium* and direct DNA uptake methods. (2002) En: www.pCAMBIA.org
 110. Sainsbury F, Lomonossoff GP. Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol* (2008), 148:1212-1218.
 111. Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonossoff GP. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J* (2009), 7(7), 682-693.
 112. Scherer GFE, Paul RU, Holk A. Phospholipase A2 in auxin and elicitor signal transduction in cultured parsley cells (*Petroselinum crispum* L.). *Plant Growth Develop* (2000), 32(2-3):123-128.
 113. Scherer GFE, Paul RU, Holk A, Martinec J. Down-regulation by elicitors of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C and up-regulation of phospholipase A in plant cells. *Biochem Biophys Res Comm* (2002), 293(2):766-770.
 114. Shah KH, Almaghrabi B, Bohlmann H. Comparison of expression vectors for transient expression of recombinant proteins in plants. *Plant Mol Biol Rep* (2013), 31:1529-1538.
 115. Sharma SD, Kraft JJ, Miller WA, Goss DJ. Recruitment of the 40S ribosomal subunit to the 3'-untranslated region (UTR) of a viral mRNA via the eIF4 complex facilitates cap-independent translation. *J Biol Chem* (2015), 290(18):11268-11281.
 116. Soo K, Thompson Jr AT. Diacylglycerol metabolism in the green alga *Dunaliella salina* under osmotic stress. Possible role of diacylglycerols in Phospholipase C-mediated signal transduction. *Plant Phys* (1991), 97:921-927.
 117. Treder K, Pettit Kneller EL, Allen EM, Wang Z, Browning KS, Allen Miller W. The 3' cap-independent translation element of Barley yellow dwarf virus binds eIF4F via the eIF4G subunit to initiate translation. *RNA* (2008), 14:134-147

118. Van den Bergh G, Arckens L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Op Biotechnol* (2004), 15:38-43.
119. Van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE y Baskin TI. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J Exp Bot* (2000), 51: 1555-1562.
120. Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* (2006), 45(4):523-539.
121. Viswanathan S, Unlü M, Minden JS. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc* (2006), 1(3):1351-1358.
122. Voráčková I, Suchanová S, Ulbrich P, Diehl WE, Ruml T. Purification of proteins containing zinc finger domains using immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif* (2011), 79(1):88-95.
123. Wilton DC. A continuous fluorescence displacement assay for the measurement of phospholipase A2 and other lipases that release long-chain fatty acids. *Biochem J* (1990), 266(2):435-439.
124. Wimalasekera R, Pejchar P, Holk A, Martinec J, Scherer GFE. Plant Phosphatidylcholine-Hydrolyzing Phospholipases C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* (2010), 3(3):610-625.
125. Xia Y, Chu W, Qi Q, Xun L. New insights into the QuikChange™ process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res* (2015), 43(2): e12 doi: 10.1093/nar/gku1189.
126. Zhao F, Ilbert M, Varadan R, Cremers CM, Hoyos B, Acin-Perez R, Vinogradov V, Cowburn D, Jakob U, Hammerling U. Are zinc-finger domains of Protein Kinase C dynamic structures that unfold by lipid or redox activation? *Antiox Red Signal* (2011), 14(5):757-766.



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN

