



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL



**ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE
SEÑALIZACIÓN POR LÍPIDOS NITRADOS DURANTE
EL DESARROLLO Y EL ESTRÉS ABIÓTICO EN
PLANTAS**

PRESENTADA POR:

LORENA ARANDA CAÑO

DIRIGIDA POR:

DR. D. JUAN BAUTISTA BARROSO ALBARRACÍN

DRA. DÑA. RAQUEL VALDERRAMA RODRÍGUEZ

JAÉN, 1 DE MARZO DE 2022

ISBN

·O₂⁻: radical superóxido

·OH: radical hidroxilo

¹O₂: oxígeno singlete

6PGDH: 6-fosfogluconato deshidrogenasa

ABA: ácido abscísico

ABI5: ABA INSENSITIVE 5

AHP1: transductor de señal de citoquinina

ANN1: anexina 1

ANT1: translocasa 1 de nucleótido de adenina

AOVE: aceite de oliva virgen extra

AOX: oxidasa alternativa

APX: ascorbato peroxidasa

ARC: componente reductor de amidoxima

Arg: arginina

As: arsénico

AsA: ascorbato

AT1R: receptor de angiotensina II

BH₄: tetrahidrobiopterina

BR: brasinoesteroides

Ca²⁺: iones calcio

CAM1: calmodulina 1

CAM4: calmodulina 4

CaMBP: proteínas de unión a calmodulina

cAPX: ascorbato peroxidasa citosólica

Cat: catalasa

CAT2: catalasa 2

CAT3: catalasa 3

CBF: factores de unión de repetición C

Cd: cadmio

CdCl₂: cloruro de cadmio

chlAPX: ascorbato peroxidasa cloroplastídica

Cl⁻: iones cloro

cLA: ácido linoleico conjugado

CMC: concentraciones micelares críticas

CML: proteínas similares a la calmodulina

CO₂: dióxido de carbono

CO₃⁻: anión de trióxido de carbono

COR: genes sensibles al frío

cPTIO: 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido-3-óxido

CRY: criptogenina

Cu: cobre

Cys: cisteína

Asp: aspartato

DHA: deshidroascorbato

DHAR: deshidroascorbato reductasa

Glu: glutamato

EDRF: factor de relajación derivado del endotelio

ELC: extracto libre de células

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

EPR: espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica

ET: etileno

FA: ácido graso

FAD: dinucleótido de flavina y adenina

FAS: sintasa de ácidos grasos

FBA2: fructosa bisfosfato aldolasa-2

FDA: fluoresceína

FDR: tasa de falsos descubrimientos

FFA: ácidos grasos libres

FMN: flavin mononucleótido

G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GC: guanilato ciclasa

GMPc: GMP cíclico

GO: Gene Ontology

GOX: glicoxilato oxidasa
GPX: glutatión peroxidasa
GR: glutatión reductasa
GS: radical glutationilo
GSH: glutatión
GSNO: S-nitrosoglutatión
GSNOR: S-nitrosoglutatión reductasa
GSSG: glutatión oxidado
GST: glutatión S-transferasa
H: hojas
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
H₂S: sulfuro de hidrógeno
HCl: ácido clorhídrico
HDA6: histona desacetilasa
His: histidina
HNO₂: ácido nítrico
HNO₂: ácido nitroso
HR: respuesta hipersensible
HS: estrés por calor
HSA: albúmina de suero humano
HSF1: factor de choque térmico 1
HSR: genes relacionados con el estrés por calor
ICDH: isocitrato deshidrogenasa
IMAC: cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
INF: infectina
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
JA: ácido jasmónico
Keap 1: proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch
LA: ácido linoleico
Ln: ácido linolénico
L-NAME: L-N ω -nitroarginina metilo de éster
Lys: lisina

M⁺: iones de metales pesados

MAG-DAG: mono y diacilglicéridos

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

mAPX: ascorbato peroxidasa peroxisomal

MCP: muerte celular programada

MDA: malodialdehído

MDH1: malato deshidrogenasa-1

MDHA: monodeshidroascorbato

MDHAR: monodeshidroascorbato reductasa

MRM: monitorización de reacciones múltiples

MSR: metionina sulfoxido reductasa

mtAPX: ascorbato peroxidasa mitocondrial

N₂: nitrógeno atmosférico

N₂O: óxido nitroso

N₂O₃: óxido de nitrógeno (III)

N₂O₃: trióxido de dinitrógeno

N₂O₄: tetróxido de dinitrógeno

Na⁺: iones sodio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADP-ME: enzima málico dependiente de NADP

ND: no detectado

NF-B p65: subunidad p65 del factor nuclear B

NH₃: amoníaco

NH₄⁺: amonio

NiR: nitrito reductasa plastidial

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NO⁻: anión nitroxilo

NO: óxido nítrico

NO⁺: catión de nitrosonio

NO₂: dióxido de nitrógeno

NO₂⁻: nitritos

NO₂-cLA: ácido nitro-linoleico conjugado

NO₂-FAs: ácidos grasos nitrados
NO₂-LA: ácido nitro-linoleico.
NO₂-Ln: ácido nitro-linolénico
NO₂-OA: ácido nitro-oleico
NO₃⁻: nitratos
NOS: óxido nítrico sintasa
NOX2: NADPH oxidasa 2
NPR1: gen 1 no expresor relacionado con la patogénesis
NR: nitrato reductasa
NtOSAK: proteína quinasa activada por estrés osmótico
O₂: oxígeno
OA: ácido oleico
ONOO⁻: peroxinitrito
ONOOCO₂: nitrosoperoxicarbonato
ONOOH: ácido peroxinitroso
P: proteínas
P5CS1: Δ1-pirrolina-5-carboxilato sintasa 1
PA: ácido fosfatídico
Pb: plomo
PC: fosfatidilcolina
PDI: proteína disulfuro isomerasa
PE: fosfatidiletanolamina
PEPCase-k: fosfoenolpiruvato carboxil quinasa
PF: peso fresco
PGHS: prostaglandina endoperóxido H sintasa
PGK: fosfoglicerato quinasa
PhO: radicales fenoxilo
PhOH: compuestos fenólicos
PI: fosfatidilinositol
PIN: transportador polar de la auxina
PKC: proteína quinasa C
PknG: proteína quinasa G

PL: fosfolípidos

PLD: fosfolipasa D

PM-NiNOR: nicotiana-óxido nítrico reductasa unida a la membrana plasmática

PM-NR: nitrato reductasa unida a la membrana plasmática

POD: peroxidasa

POX: hemoperoxidasa

PPAR- γ : receptor activado de la proliferación de peroxisomas

PR: proteínas relacionadas con la patogenia

PR-2: β -1,3-glucanasa

PR-3: quitinasa nitrada

Pro-MMP: pro-metaloproteinasas de matriz

Prot: proteínas

PRTM5: proteína metiltransferasa 5

Prx: peroxirredoxina

PrxII E: peroxiredoxina II E

PS: fosfatidilserina

P-S: grupo tiolato de la proteína

P-SH: grupo tiol de la proteína

PSII: fotosistema II

PSM: número de coincidencias del espectro de péptidos

P-SON: S-nitrosotioles de proteínas

PSS1: fosfatidilserina sintasa 1

PTFE: politetrafluoroetileno

PTM: modificaciones post-traduccionales

Q_A: quinonas

R: raíz

RBOHD: NADPH oxidasa

RLS: especies reactivas de lípidos

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROOH: hidroperóxidos

ROS: especies reactivas de oxígeno

RT: tiempo de retención

SA: ácido salicílico

SABP3: proteína de unión al ácido salicílico

SAR: resistencia sistemática adquirida

SDS: dodecilsulfato sódico

SE: fitoesteroles

SH: sulfidrilo

SKP1: quinasa relacionada con la fase S

SNO: nitrosotioles

SNP: nitroprusiato sódico

SnRK2: quinasas serina/treonina

SOD: superóxido dismutasa

-SOH: ácido sulfénico

SOS1: anti-portador de los protones de sodio de la membrana plasmática

SOS2: sensor de calcio

SOS3: proteína quinasa

TAG: triacilglicéridos

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TCEP: tris(2-carboxietil)fosfina

TEV: virus del tabaco

THF: tetrahidrofolato

TIR1: receptor de auxina

TPI: triosa fosfato isomerasa

TRPV1, TRPA1: potencial de receptor transitorio

Trx/TrxR: sistema de la tiorredoxina/tiorredoxina reductasa

TRX: tiorredoxinas

TRXh5: tiorredoxina h5

UL: unidades de luminiscencia.

XOR: xantina óxido-reductasa

Y-NO₂: 3-nitrotirosina

ZmCIPK1: proteína quinasa inducida por patógenos

ZmCIPK16: proteína quinasa que interactuante con el CBL

ZmSIMK: proteína quinasa inducida por cloruro sódico

I. Resumen/Summary	1
II. Introducción.....	8
1. Óxido nítrico	10
2. Metabolismo del óxido nítrico en plantas.....	10
2.1. La fuente de NO en plantas	10
2.1.1. Mecanismos enzimáticos.....	12
2.1.2. Mecanismos no enzimáticos	16
2.1.3. Otros mecanismos	16
2.2. Bioactividad y señalización mediada por el óxido nítrico en plantas	16
2.2.1. Nitración de lípidos.....	19
2.2.2. Modificaciones post-traduccionales de proteínas por RNS.....	24
3. Funciones fisiológicas del óxido nítrico durante el desarrollo de la planta	35
3.1. Papel de los ácidos grasos nitrados durante el desarrollo de la planta	39
4. Implicación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en las situaciones de estrés	40
4.1. Estrés biótico	41
4.2. Estrés abiótico y condiciones ambientales adversas.....	44
4.3. Papel de los ácidos grasos nitrados en las situaciones de estrés en plantas	54
5. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo	55
5.1. Antioxidantes no enzimáticos	56
5.2. Antioxidantes enzimáticos.....	57
III. Objetivos	60
IV. Material y métodos	64
6. Material de experimentación	66
6.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
6.1.1. Cultivos celulares	66
6.1.2. Semillas.....	66
6.1.3. Desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
6.1.4. Situaciones de estrés abiótico en plántulas de <i>Arabidopsis</i>	71
6.2. <i>Nicotiana tabacum</i>	74
6.2.1. Cultivos celulares	74
6.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
6.3.1. Cultivos de levaduras.....	74
6.3.2. Estrés por choque térmico.....	74
7. Obtención del extracto proteico vegetal por precipitación con acetona.....	75

8.	Obtención del extracto libre de células (ELC) de levaduras	75
9.	Determinación de la concentración de proteínas totales (Bradford)	75
10.	Detección de marcadores de la homeostasis redox.....	75
10.1.	Detección y cuantificación de los niveles de malondialdehído.....	75
10.2.	Detección y cuantificación de los niveles de H ₂ O ₂ en <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
10.3.	Detección y cuantificación de los niveles de H ₂ O ₂ en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	76
10.4.	Detección y cuantificación de los niveles de ROS extracelulares en los cultivos celulares de <i>Nicotiana tabacum</i>	76
11.	Síntesis del ácido nitro-oleico (NO ₂ -OA), del ácido nitro-oleico marcado con carbono 13 (¹³ C ₁₈ -NO ₂ -OA), del ácido nitro-linoleico (NO ₂ -LA) y del ácido nitro-linolénico (NO ₂ -Ln)	77
12.	Detección de los ácidos grasos nitrados	77
12.1.	Detección de los NO ₂ -FAs de los depósitos lipídicos.....	77
12.1.1.	Extracción lipídica.....	77
12.1.2.	Extracción en fase sólida	78
12.1.3.	Hidrólisis ácida.....	79
12.2.	Detección de los NO ₂ -FAs de los depósitos proteicos.....	80
12.3.	Detección e identificación de los NO ₂ -FAs por LC-MS/MS.....	80
13.	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	81
13.1.	Fosfoglicerato quinasa (PGK) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
13.2.	Triosa fosfato isomerasa (TPI) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
13.3.	Enzima málico dependiente de NADP de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
13.4.	Isocitrato deshidrogenasa citosólica de <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
13.5.	Glutación S-transferasa (GST) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
13.6.	Catalasa (Cat) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
13.7.	Ascorbato peroxidasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
13.8.	Peroxirredoxina Tsa1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
14.	Tratamiento con los diferentes NO ₂ -FAs.....	87
14.1.	Tratamiento de las proteínas recombinantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> con los diferentes NO ₂ -FAs.....	87
14.2.	Tratamiento de la peroxirredoxina Tsa1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con NO ₂ -OA	87
14.3.	Tratamiento de los extractos proteicos de los cultivos celulares de <i>Arabidopsis</i> con NO ₂ -Ln.....	87
14.4.	Tratamiento de los cultivos celulares de <i>Nicotiana tabacum</i> con los diferentes NO ₂ -FAs ...	88
15.	Detección e identificación de las proteínas nitroalquiladas	88
15.1.	Digestión proteolítica de las proteínas.....	88
15.2.	Enriquecimiento y desalado de los péptidos nitroalquilados de las proteínas.....	88

15.3.	Desalado de los péptidos de las proteínas recombinantes tratadas con NO ₂ -Ln.....	89
15.4.	Detección de la nitroalquilación de proteínas por nanoLC-MS/MS	90
15.5.	Procesamiento de los datos de MS/MS e identificación de proteínas nitroalquiladas	90
15.6.	Cuantificación relativa de los niveles de nitroalquilación en las proteínas recombinantes por nanoLC-MS/MS	91
15.7.	Detección de péptidos nitroalquilados endógenos por búsqueda bioinformática en el MS1.....	94
16.	Análisis bioinformático de las proteínas nitroalquiladas.....	95
17.	Determinación de las actividades enzimáticas de las proteínas recombinantes	95
17.1.	Fosfoglicerato quinasa.....	95
17.2.	Triosa fosfato isomerasa.....	96
17.3.	Enzima málico dependiente de NADP	96
17.4.	Isocitrato deshidrogenasa	96
17.5.	Glutación S-transferasa.....	97
17.6.	Catalasa (Cat).....	97
17.7.	Ascorbato peroxidasa	97
17.8.	Peroxirredoxina Tsa1	98
18.	Modelización molecular <i>in silico</i> de la ICDH, Cat y APX.....	98
19.	Tratamiento de los cultivos celulares de <i>Nicotiana tabacum</i> con elicinas.....	98
20.	Viabilidad celular de los cultivos de <i>Nicotiana tabacum</i>	99
21.	Inmunodetección de la peroxirredoxina Tsa1	99
21.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	99
21.2.	Transferencia semiseca de proteínas	100
21.3.	Detección inmunológica (Western Blot).....	100
V. Resultados		102
22.	Identificación de los principales NO ₂ -FAs endógenos en <i>Arabidopsis thaliana</i>	104
22.1.	Caracterización de los principales almacenes de NO ₂ -FAs en <i>Arabidopsis</i>	106
23.	Biodistribución de los almacenes de NO ₂ -FAs en el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	111
24.	Identificación y caracterización de las proteínas nitroalquiladas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	122
24.1.	Detección e identificación de las proteínas nitroalquiladas endógenas en los cultivos celulares de <i>Arabidopsis</i>	124
24.2.	Caracterización funcional de las proteínas nitroalquiladas.....	126
25.	Caracterización del perfil de proteínas nitroalquiladas durante el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	134
26.	Modulación de los almacenes de NO ₂ -FAs en el estrés abiótico.....	145

27.	Caracterización del perfil de proteínas nitroalquiladas durante las situaciones de estrés abiótico.....	151
27.1.	Salinidad	151
27.2.	Cadmio	153
27.3.	Baja temperatura	153
27.4.	Luz Continua	153
27.5.	Oscuridad	157
28.	Papel de los NO ₂ -FAs durante el estrés biótico	159
29.	Papel señalizador de la nitroalquilación por NO ₂ -OA de la proteína antioxidante Tsa1 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	165
29.1.	Caracterización de la actividad enzimática de Tsa1 en el estrés por choque térmico	166
29.2.	Detección y cuantificación de los niveles de NO ₂ -OA endógeno y en la situación de estrés.....	166
29.3.	Efecto del NO ₂ -OA sobre la actividad enzimática de la Tsa1.....	168
29.4.	Caracterización de la nitroalquilación de la Tsa 1 recombinante de levadura.....	169
29.5.	Cuantificación relativa de las dianas de nitroalquilación de la Tsa1 recombinante.....	170
29.6.	Detección de la nitroalquilación <i>in vivo</i> de la Tsa1	171
VI.	Discusión.....	173
30.	Caracterización e identificación de los NO ₂ -FAs endógenos en <i>Arabidopsis thaliana</i>	175
31.	Principales depósitos celulares de los NO ₂ -FAs.....	175
32.	Biodistribución de los almacenes lipídicos y proteicos de los NO ₂ -FAs durante el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	177
33.	Identificación y caracterización de proteínas nitroalquiladas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	181
34.	Perfil de proteínas nitroalquiladas durante el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	183
35.	Modulación de los depósitos de NO ₂ -FAs en el estrés abiótico	185
36.	Perfil de proteínas nitroalquiladas durante las situaciones de estrés abiótico	189
37.	Efecto protector de los NO ₂ -FAs en el estrés biótico	189
38.	Papel señalizador del NO ₂ -OA por nitroalquilación de la proteína antioxidante Tsa1 en <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	191
VII.	Conclusiones/Conclusions.....	195
VIII.	Bibliografía.....	200
IX.	Anexo I.....	237
X.	Anexo II.....	260
XI.	Anexo III.....	(Excel)
XII.	Currículum vitae	264

XIII. Publicaciones273

Figura 1. Fuentes de síntesis de NO en células vegetales	11
Figura 2. Reactividad del peroxinitrito.....	18
Figura 3. Mecanismo de formación de los nitrolípidos.....	20
Figura 4. Mecanismo de liberación de NO a través de la reacción de Nef modificada.....	21
Figura 5. Liberación del NO a través de la transposición de nitroalquenos.....	22
Figura 6. Representación esquemática del autoensamblaje de los ácidos grasos con respecto a la concentración micelar crítica y el pH	23
Figura 7. Biodistribución de los NO ₂ -FAs.....	24
Figura 8. Modulación de los niveles de S-nitrosotioles.....	25
Figura 9. Modificaciones post-traduccionales de proteínas por RNS.	32
Figura 10. Funciones fisiológicas del NO.....	36
Figura 11. Representación esquemática de las interacciones del óxido nítrico (NO) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el estrés biótico de las plantas.....	42
Figura 12. El efecto del óxido nítrico sobre el estrés por metales pesados en las plantas.....	47
Figura 13. Efecto del óxido nítrico en el estrés por frío en plantas.	51
Figura 14. Descripción general de los mecanismos de actuación de los sistemas antioxidantes de las plantas.....	58
Figura 15. Cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
Figura 16. Semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
Figura 17. Plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de 5 días (apertura de los cotiledones).....	68
Figura 18. Plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de 14 días (inicio de la roseta).	68
Figura 19. Plántulas de 24 días de <i>A. thaliana</i> (roseta).....	69
Figura 20. Plántulas de 34 días de <i>A. thaliana</i> (floración).	70
Figura 21. Plántulas de 36 días de <i>A. thaliana</i> (producción de semillas).	70
Figura 22. Plántulas de 53 días de <i>A. thaliana</i> (senescencia).....	71
Figura 23. Plántulas de <i>Arabidopsis</i> tras 14 días de estrés por salinidad	72
Figura 24. Plántulas de <i>Arabidopsis</i> tras 14 días de estrés por metales pesados (cadmio).....	72
Figura 25. Efecto del estrés por baja temperatura (4°C) durante 24 horas.....	73
Figura 26. Efecto del estrés por luz continua (190 μE m ⁻² s ⁻¹) durante 48 horas.	73
Figura 27. Efecto del estrés por oscuridad durante 48 horas.	74
Figura 28. PGK recombinante de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
Figura 29. TPI recombinante de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
Figura 30. NADP-ME recombinante de <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
Figura 31. ICDH recombinante de <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
Figura 32. GST recombinante de <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
Figura 33. Catalasa recombinante de <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
Figura 34. APX recombinante de <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
Figura 35. Tsa1 recombinante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
Figura 36. Detección de los principales ácidos grasos nitrados presentes en <i>Arabidopsis thaliana</i>	105
Figura 37. Niveles endógenos de NO ₂ -FAs en <i>Arabidopsis</i>	106
Figura 38. Distribución y cuantificación de los niveles endógenos de NO ₂ -FAs en las diferentes fracciones lipídicas	108
Figura 39. Niveles endógenos de NO ₂ -FAs aductados con proteínas en plántulas de 14 días.	110

Figura 40. Principales almacenes de NO ₂ -FAs en Arabidopsis.	111
Figura 41. Distribución relativa de NO ₂ -FAs en los diferentes almacenes lipídicos y en el reservorio proteico durante las etapas de crecimiento de Arabidopsis seleccionadas.....	115
Figura 42. Composición relativa de NO ₂ -FAs en los diferentes almacenes lipídicos y proteicos de raíces de plantas de Arabidopsis en diferentes etapas de crecimiento	116
Figura 43. Modulación de la composición nitro-lipídica presente en los depósitos de la planta durante el desarrollo de Arabidopsis.	119
Figura 44. Niveles endógenos de NO ₂ -FAs durante el desarrollo de Arabidopsis.....	121
Figura 45. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en los cultivos celulares de Arabidopsis de 9 días tratados con NO ₂ -Ln (100 μM y 10 mM).	123
Figura 46. Clasificación funcional de las proteínas endógenas nitroalquiladas por NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln identificadas en cultivos celulares de Arabidopsis de 9 días.....	125
Figura 47. Actividad enzimática de la fosfoglicerato quinasa recombinante tras el tratamiento con los diferentes NO ₂ -FAs.	126
Figura 48. Actividad enzimática de la triosa fosfato isomerasa recombinante tras el tratamiento con los diferentes NO ₂ -FAs.....	127
Figura 49. Actividad del enzima málico dependiente de NADP recombinante tras el tratamiento con los diferentes NO ₂ -FAs.....	128
Figura 50. Análisis de la modulación por nitroalquilación de la isocitrato deshidrogenasa citosólica recombinante de Arabidopsis.	129
Figura 51. Actividad enzimática de la glutatión S-transferasa recombinante tras el tratamiento con los diferentes NO ₂ -FAs.	130
Figura 52. Efecto de la nitroalquilación sobre la catalasa 2 recombinante de Arabidopsis.....	132
Figura 53. Modulación por nitroalquilación de la ascorbato peroxidasa recombinante de Arabidopsis.	133
Figura 54. Cuantificación del número de proteínas nitroalquiladas por los diferentes NO ₂ -FAs durante el desarrollo de Arabidopsis mediante espectrometría de masas.	135
Figura 55. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln en semillas	136
Figura 56. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln en plántulas que presentan los cotiledones totalmente abiertos, las cuales se corresponden con plántulas de 5 días.....	137
Figura 57. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln en plántulas que han desarrollado sus primeras hojas en la disposición de roseta, las cuales se corresponden con plántulas de 14 días.....	138
Figura 58. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln en las hojas de los hidropónicos que presentan una roseta totalmente desarrollada, y estos acontecimientos tienen lugar cuando los hidropónicos tienen 24 días.....	140
Figura 59. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln en las hojas de los hidropónicos que se encuentran en floración, en concreto, cuando la planta tiene 34 días	141
Figura 60. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln en las hojas de los hidropónicos que se encuentran produciendo semillas, etapa que se corresponde con hidropónicos de 36 días.....	142
Figura 61. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln en las hojas de los hidropónicos senescentes, que se corresponde con plantas de 53 días.....	143

Figura 62. Detección de marcadores de la homeostasis redox en las diferentes situaciones de estrés abiótico.....	146
Figura 63. Niveles totales de NO ₂ -FAs en las diferentes situaciones de estrés abiótico.....	146
Figura 64. Modulación de los niveles endógenos de NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln aductados con proteínas en las diferentes situaciones de estrés abiótico	147
Figura 65. Modulación de los niveles endógenos de NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln esterificados en los almacenes lipídicos en las diferentes situaciones de estrés abiótico	148
Figura 66. Biodistribución de los NO ₂ -FAs esterificados con lípidos complejos en las diferentes situaciones de estrés abiótico	150
Figura 67. Cuantificación de proteínas nitroalquiladas por los diferentes NO ₂ -FAs en el control y en las diferentes situaciones de estrés tras el análisis por nanoLC-MS/MS.	151
Figura 68. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por salinidad	152
Figura 69. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por cadmio.....	154
Figura 70. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por baja temperatura	155
Figura 71. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por luz continua	156
Figura 72. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por oscuridad.....	158
Figura 73. Viabilidad de los cultivos celulares de tabaco tras el tratamiento con 50 nM de CRY e INF durante 2 horas.....	159
Figura 74. Niveles de especies reactivas de oxígeno tras la incubación de las células de tabaco con 50 nM CRY y INF durante 2 horas	160
Figura 75. Caracterización de la respuesta de los cultivos celulares de tabaco al tratamiento con NO ₂ -FAs.....	161
Figura 76. Viabilidad de los cultivos celulares de tabaco pretratados con 100 µM de NO ₂ -FAs e incubados posteriormente con infectina	162
Figura 77. Niveles de especies reactivas de oxígeno de los cultivos celulares de tabaco pretratados con 100 µM de NO ₂ -FAs e incubados posteriormente con infectina.....	163
Figura 78. Viabilidad de los cultivos celulares de tabaco pretratados con 100 µM de NO ₂ -FAs e incubados posteriormente con criptogenina.....	164
Figura 79. Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los cultivos celulares de tabaco pretratados con 100 µM de NO ₂ -FAs e incubados posteriormente con criptogenina.....	165
Figura 80. Caracterización del estrés por choque térmico a 37°C durante 1 hora en cultivos de levadura en fase exponencial de crecimiento (DO=0,6).	166
Figura 81. Picos cromatográficos correspondientes al patrón de NO ₂ -OA y su detección endógena en las muestras control y de estrés por choque térmico de levadura.....	167
Figura 82. Niveles endógenos de NO ₂ -OA detectados por LC-MS/MS en muestras control y de estrés por choque térmico de levaduras.	168
Figura 83. Efecto del tratamiento con NO ₂ -OA sobre la actividad enzimática de la peroxirredoxina Tsa 1.....	169
Figura 84. Cuantificación relativa de los residuos nitroalquilados de la Tsa1 tras el tratamiento con NO ₂ -OA.....	170

Tabla 1. Generación de NO a partir de L-arginina en algunas especies de plantas	12
Tabla 2. Principales RNS	17
Tabla 3. Principales nitrolípidos detectados en sistemas vegetales.	20
Tabla 4. Caracterización funcional de proteínas S-nitrosiladas en plantas.....	26
Tabla 5. Dianas proteicas de los NO ₂ -FAs en sistemas animales y sus efectos sobre la función proteica	33
Tabla 6. Niveles endógenos de NO ₂ -FAs durante el desarrollo de diferentes especies vegetales.....	40
Tabla 7. Niveles de NO ₂ -Ln en diferentes situaciones de estrés abiótico en Arabidopsis.....	55
Tabla 8. Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos y enzimáticos frente al estrés oxidativo ..	56
Tabla 9. Iones moleculares, iones generados tras la fragmentación y parámetros para el análisis de TAG, DAG y fosfolípidos mediante Q-TOF MS/MS.	79
Tabla 10. Caracterización cromatográfica y espectrométrica (péptidos experimentales, carga, peso molecular y RT) de los iones precursores que contienen las dianas susceptibles de nitroalquilación en la catalasa recombinante tratada con NO ₂ -Ln.....	91
Tabla 11. Caracterización cromatográfica y espectrométrica (péptidos experimentales, carga, peso molecular y RT) de los iones precursores que contienen las dianas susceptibles de nitroalquilación en la ascorbato peroxidasa recombinante tratada con NO ₂ -Ln	92
Tabla 12. Caracterización cromatográfica y espectrométrica (péptidos experimentales, carga, peso molecular y RT) de los iones precursores que contienen las dianas susceptibles de nitroalquilación en la peroxirredoxina Tsa1 recombinante tratada con NO ₂ -Ln.....	93
Tabla 13. Relación m/z y tiempo de retención cromatográfico característicos de los péptidos que contienen las dianas de nitroalquilación de la Tsa1.....	95
Tabla 14. Niveles endógenos de NO ₂ -OA, NO ₂ -LA y NO ₂ -Ln en los diferentes almacenes lipídicos y en el reservorio proteico durante las etapas de desarrollo seleccionadas de Arabidopsis thaliana.	112
Tabla 15. Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) de las proteínas nitroalquiladas identificadas en raíces de hidropónicos de 24, 34, 36 y 53 días.....	144
Tabla 16. Detección por nanoLC-MS/MS de los péptidos nitroalquilados de la Tsa1 recombinante tratada con NO ₂ -OA e identificación de los residuos diana de la aducción con NO ₂ -OA.	170
Tabla 17. Identificación in vivo de las dianas de nitroalquilación de la Tsa1	171

Resumen
Summary

La interacción no enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados con el NO y especies derivadas da lugar a la formación de los ácidos grasos nitrados (NO₂-FAs). Estas moléculas señalizadoras tienen la capacidad de liberar óxido nítrico (NO), ya que son almacenes estables de NO. Además, recientemente, se ha caracterizado la esterificación reversible *in vitro* de los NO₂-FAs con lípidos complejos, lo que aumenta su estabilidad y, por tanto, su vida útil. Principalmente, los NO₂-FAs ejercen su función biológica modulando la función de las proteínas como consecuencia de su aducción con residuos nucleofílicos (aducto de Michael), lo que da lugar a la modificación postraduccional reversible conocida como nitroalquilación. En sistemas animales, los NO₂-FAs son considerados moléculas señalizadoras pleiotrópicas con poder antiinflamatorio y citoprotector, ya que son capaces de modular la actividad de las proteínas PPAR- γ , NF κ B y Nrf2/Keap1 por nitroalquilación. El principal almacén lipídico de los NO₂-FAs en animales son los triacilglicéridos. Sin embargo, en sistemas vegetales el conocimiento de estas moléculas está menos avanzado. Hasta la fecha, se ha identificado la presencia de ácido nitro oleico (NO₂-OA) en *Brassica napus* y de ácido nitro linoléico (NO₂-Ln) en *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* y *Oryza sativa*. Los NO₂-FAs actúan como moléculas señalizadoras durante el desarrollo de las semillas y las plantas, y están involucrados en las respuestas de defensa frente a condiciones de estrés abiótico a través de la inducción de factores de transcripción de choque térmico que regulan la expresión de sistemas antioxidantes o que desencadenan la producción de ROS. Además, la capacidad de liberación de NO del NO₂-Ln es responsable de la producción *in vivo* de S-nitrosoglutatión (GSNO), lo que contribuye a mantener la homeostasis de los S-nitrosotioles (SNO) en las células vegetales. En esta Tesis Doctoral se ha detectado por primera vez la presencia de NO₂-OA y ácido nitro-linoleico (NO₂-LA) en *Arabidopsis* y, además, se ha corroborado la presencia de NO₂-Ln. La identificación de los almacenes lipídicos y proteicos de los NO₂-FAs evidenció que la fosfatidilserina actuaba como principal reservorio de NO₂-Ln, mientras que el NO₂-LA y NO₂-OA se almacenaban mayoritariamente en las proteínas. Sin embargo, el estudio de la biodistribución de los NO₂-FAs en diferentes etapas de desarrollo comprendidas desde la semilla hasta la senescencia, puso de manifiesto que la acumulación de estas moléculas en los almacenes lipídicos y proteicos estaba influenciada por los acontecimientos característicos que tenían lugar en cada etapa. En este trabajo también se han identificado y clasificado, por primera vez, diferentes proteínas nitroalquiladas asociadas a cada etapa de desarrollo, destacando su implicación en procesos de respuesta al estrés y biosintéticos durante el crecimiento vegetativo de la planta. En estos casos, la nitroalquilación ejercía un efecto negativo sobre la actividad enzimática de las proteínas. También es importante mencionar la participación mayoritaria de proteínas nitroalquiladas relacionadas con la reproducción cuando la planta se encontraba en estado de floración. Adicionalmente, se ha estudiado la biodistribución de los NO₂-FAs en almacenes lipídicos y proteicos durante diferentes situaciones de estrés abiótico como salinidad, cadmio, baja temperatura, luz continua y oscuridad. En este caso, se detectó un comportamiento diferente según se tratará de almacenes lipídicos o proteicos. Con respecto a los primeros, se observó un incremento generalizado en los niveles de NO₂-FAs esterificados en lípidos más complejos. Concretamente, destacó la acumulación de NO₂-FAs en lípidos de membrana, lo que relacionaba a estas moléculas con la modulación de las estructuras membranosas con la finalidad de paliar los daños causados por el estrés. Sin embargo, la abundancia de proteínas nitroalquiladas en los reservorios proteicos disminuyó en las situaciones de estrés. El incremento en los niveles de ROS y RNS, que habitualmente acompaña a las situaciones desfavorables en plantas, justificaría la oxidación del aducto de Michael y, por tanto, la liberación del NO₂-FA y la restauración de la actividad de la proteína previamente nitroalquilada. Curiosamente, aunque en las plántulas control las proteínas nitroalquiladas implicadas en los procesos de respuesta al estrés fueron muy abundantes, en las situaciones de estrés la nitroalquilación de estas proteínas disminuyó, lo que permitió su activación. Estos comportamientos evidenciaban el papel señalizador de los NO₂-FAs en la respuesta al estrés,

modulando tanto la respuesta antioxidante como la estructura de la membrana plasmática. Los NO₂-FAs también parecen tener un efecto señalizador y/o protector en la respuesta al estrés biótico inducido por elicitinas, ya que el pretratamiento de células de tabaco con nitrolípidos disminuyó los niveles de ROS. Finalmente, el papel señalizador de los NO₂-FAs, en concreto del NO₂-OA, en el control de la respuesta antioxidante ha sido evidenciado utilizando la peroxirredoxina Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae* en el estrés por choque térmico. En este organismo, se ha identificado por primera vez la presencia de NO₂-OA, el cual puede aductarse al residuo catalítico de la proteína antioxidante Tsa1, limitando su actividad enzimática. En el estrés por choque térmico, los elevados niveles de ROS producidos, oxidaban el aducto de Michael establecido entre la Tsa1 y el NO₂-OA y restauraba la actividad detoxificante de la proteína relacionada con la reducción de los niveles de H₂O₂. En definitiva, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral evidencian la amplia biodistribución de los NO₂-FAs en diferentes almacenes lipídicos y en proteínas lo que incrementa las posibilidades señalizadoras de estas moléculas y justifica su implicación en las respuestas a estreses de tipo biótico y abiótico en sistemas vegetales.

The non-enzymatic interaction of polyunsaturated fatty acids with NO and derived species give rise to the formation of nitrated fatty acids (NO₂-FAs). These signaling molecules have the ability to release nitric oxide (NO), since they are stable stores of NO. In addition, the *in vitro* reversible esterification of NO₂-FAs with complex lipids has recently been characterized, which increases their stability and, therefore, their useful life. Mainly, NO₂-FAs exert their biological function by modulating protein function as a consequence of their adduction with nucleophilic residues (Michael adduct), which gives rise to the reversible post-translational modification known as nitroalkylation. In animal systems, NO₂-FAs are considered pleiotropic signaling molecules with anti-inflammatory and cytoprotective functions, since NO₂-FAs are capable of modulating the activity of PPAR- γ , NF κ B and Nrf2/Keap1 proteins by nitroalkylation. The main lipid storage of NO₂-FAs in animals are triacylglycerides. However, in plant systems, the knowledge of these molecules is less advanced. To date, the presence of nitro-oleic acid (NO₂-OA) has been identified in *Brassica napus*, and nitro-linolenic acid (NO₂-Ln) in *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* and *Oryza sativa*. NO₂-FAs act as signaling molecules during seed and plant development. Furthermore, they are involved in defense responses against abiotic stress conditions through the induction of heat shock transcription factors that regulate the expression of antioxidant systems or trigger ROS production. In addition, the NO release capacity of NO₂-Ln is responsible of the *in vivo* production of S-nitrosoglutathione (GSNO), which contributes to maintaining the homeostasis of S-nitrosothiols (SNO) in plant cells. In this Doctoral Thesis, the presence of NO₂-OA and NO₂-LA in *Arabidopsis* has been detected for the first time, in addition the presence of NO₂-Ln has been confirmed. The identification of the lipid and protein stores of NO₂-FAs showed that phosphatidylserine acted as the main reservoir of NO₂-Ln, while NO₂-LA and NO₂-OA were mainly stored in proteins. However, the study of the biodistribution of NO₂-FAs in different stages of development, from seed to senescence, revealed that the accumulation of these molecules in lipid and protein storages was influenced by the characteristic events of each development stage. In this work, different nitroalkylated proteins associated with each stage have also been identified and classified for the first time, highlighting their involvement in stress response and biosynthetic processes during the vegetative plant. In these cases, the nitroalkylation exerted a negative effect on the enzymatic activity of the proteins. It is also important to mention the majority participation of nitroalkylated proteins related to reproduction when the plant was in the flowering stage. Additionally, the biodistribution of NO₂-FAs in lipid and protein stores has been studied during different abiotic stress situations such as salinity, cadmium, low temperature, continuous light and darkness. In this case, a different behavior was detected depending on whether it was lipid or protein stores. Regarding the former, a general increase in the levels of NO₂-FAs that were esterified in more complex lipids was observed. Specifically, a marked accumulation of NO₂-FAs in membrane lipids was noted, which related these molecules to the modulation of membrane structure in order to alleviate the damage caused by stress. However, the abundance of nitroalkylated proteins in protein reservoirs decreased in stress situations. The increase in the levels of both ROS and RNS, which usually accompanies unfavourable situations in plants, would justify the oxidation of the Michael adduct and, thus, the release of NO₂-FA and the restoration of the activity of the previously nitroalkylated protein. Interestingly, although in the control seedlings the nitroalkylated proteins involved in the stress response processes were very abundant, in stress situations the nitroalkylation of these proteins decreased, which allowed their activation. These behaviors evidenced the signaling role of NO₂-FA in the stress response, modulating both the antioxidant response and the structure of the plasma membrane. NO₂-FAs also seem to have a signaling and/or protective effect on the response to biotic stress induced by elicitors, since pretreatment of tobacco cells with nitrolipids decreased ROS levels. Finally, the signaling role of NO₂-FAs, specifically NO₂-OA, in the control of the antioxidant response has been evidenced using the peroxyredoxin Tsa1 from *Saccharomyces cerevisiae* in heat shock stress.

In this organism, the presence of NO₂-OA has been identified for the first time, which can be adducted to the catalytic residue of the antioxidant protein Tsa1, limiting its enzymatic activity. In heat shock stress, the high levels of ROS, oxidized the Michael adduct between Tsa1 and NO₂-OA and restored the antioxidant activity of the protein related to the reduction of H₂O₂. In short, the results obtained in this Doctoral Thesis show the wide biodistribution of NO₂-FA in different lipids and protein stores, which increases the signaling possibilities of these molecules and justifies their involvement in responses to biotic and abiotic stresses in plant systems.

Introducción

1. Óxido nítrico

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO) es un gas inorgánico incoloro y de pequeño tamaño que se caracteriza principalmente por ser un radical libre porque presenta un electrón desapareado en su orbital externo lo que justifica su elevada reactividad con otras moléculas y su vida media relativamente corta *in vivo* (menos de 10 segundos). Además, debido a su naturaleza lipofílica, el NO es capaz de atravesar las membranas celulares para reaccionar con distintas macromoléculas como lípidos, ácidos nucleicos o proteínas, entre otras (Stamler et al. 1992; Hughes 1999; Wojtaszek 2000).

La historia del óxido nítrico en sistemas biológicos comenzó en torno a 1980 cuando se demostró que la relajación del músculo liso inducida por la acetilcolina dependía de la liberación de una señal química muy lábil llamada factor de relajación derivado del endotelio (EDRF), que procedía de las células endoteliales. Estudios posteriores demostraron que el EDRF era el óxido nítrico (Furchgott 1980; Furchgott 1993; Palmer et al. 1987). Este notable hallazgo impulsó la investigación de la síntesis, el papel y la señalización del NO especialmente en el ámbito del sistema cardiovascular. Todos estos avances motivaron que la revista Science otorgara al NO la mención de “Molécula del año” en 1992, además de conducir a la otorgación del Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1998 a Robert Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad, por sus descubrimientos en relación con el NO como una molécula mensajera en el aparato cardiovascular (Elizabeth and Koshland 1992; Howlett 1998).

Paralelamente, se iniciaron estudios relacionados con la implicación del NO en sistemas vegetales. Los primeros estudios consideraron el NO como un contaminante del aire que entraba en contacto con las partes aéreas de las plantas e influía en sus procesos fisiológicos (Wellburn et al. 1972; Bennett and Hill 1973; Taylor 1974; Zeevaart 1976; Anderson and Mansfield 1979; Caporn et al. 1991; Morgan et al. 1992). En este sentido, cabe destacar el gran impacto que tuvieron los trabajos que Klepper al demostrar, por primera vez, que las plantas eran capaces de eliminar el óxido nítrico procedente de la atmósfera y que, además, podían emitir y generar NO cuando el equilibrio metabólico de las mismas se alteraba (Klepper 1979). En esta publicación pionera, también se proporcionaron indicios sobre el origen del NO de las plantas, los cuáles se confirmaron en trabajos posteriores que revelaron que el NO presente en plantas podría ser el resultado de una reacción enzimática catalizada por la nitrato reductasa (NR) (Harper 1981; Dean and Harper 1986; Yamasaki 2000). A partir de este momento, las investigaciones sobre el NO en la biología vegetal se reorientaron, centrándose en el estudio de esta molécula como un producto endógeno de las plantas.

2. Metabolismo del óxido nítrico en plantas

2.1. La fuente de NO en plantas

En organismos animales, la principal fuente de NO es la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), la cual es una hemo-proteína que en estado homo-dimérico cataliza la oxidación, dependiente de oxígeno (O_2) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), de L-arginina a NO y L-citrulina mediante una reacción compleja que requiere del dinucleótido de flavina y adenina (FAD), flavin mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (BH_4), calmodulina e iones calcio (Ca^{2+}). Los sistemas animales poseen tres isoformas de la NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS). Todas ellas están codificadas por genes diferentes. Tanto la nNOS como la eNOS son constitutivas y están involucradas en procesos de señalización. En cambio, la iNOS está

controlada transcripcionalmente y se ha relacionado clásicamente con la respuesta inmune e inflamatoria (Moncada 1991; Alderton et al. 2001; Santolini 2019).

Sin embargo, la generación de NO en plantas está íntimamente relacionada con su metabolismo y, de hecho, es uno de los elementos integrantes del ciclo del nitrógeno de la Tierra, concretamente participa en los ciclos de nitrificación y desnitrificación. En el ciclo de nitrificación, el amoníaco (NH_3) del suelo, proveniente de la orina de los animales o de la acción de las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (N_2), sirve de sustento a otro tipo de microorganismos de acción nitrificante, es decir, que descomponen el NH_3 a amonio (NH_4^+) y lo oxidan en nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Estos últimos compuestos sirven, a su vez, de nutriente a otro tipo de microorganismos de metabolismo desnitrificante, que descomponen las moléculas de nitrito y nitrato, obteniendo energía y liberando el nitrógeno en estado gaseoso de vuelta a la atmósfera. Aunque el N_2 atmosférico es el producto final del ciclo de desnitrificación, cabe destacar otras formas intermedias de nitrógeno gaseoso como son el óxido nitroso (N_2O) y el NO (Bernhard 2010).

Como se apuntó anteriormente, las plantas no solo reaccionan al NO procedente de la atmósfera o del suelo, sino que también son capaces de sintetizar cantidades substanciales de NO (Durner et al. 1998). La síntesis del NO en plantas puede ser llevada a cabo por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (**Fig. 1**). El papel fisiológico de cada mecanismo dependerá de la especie, del tipo de tejido o células, de las condiciones externas y de la posible activación de una vía de señalización en la planta (Neill et al. 2002; Gupta et al. 2022).

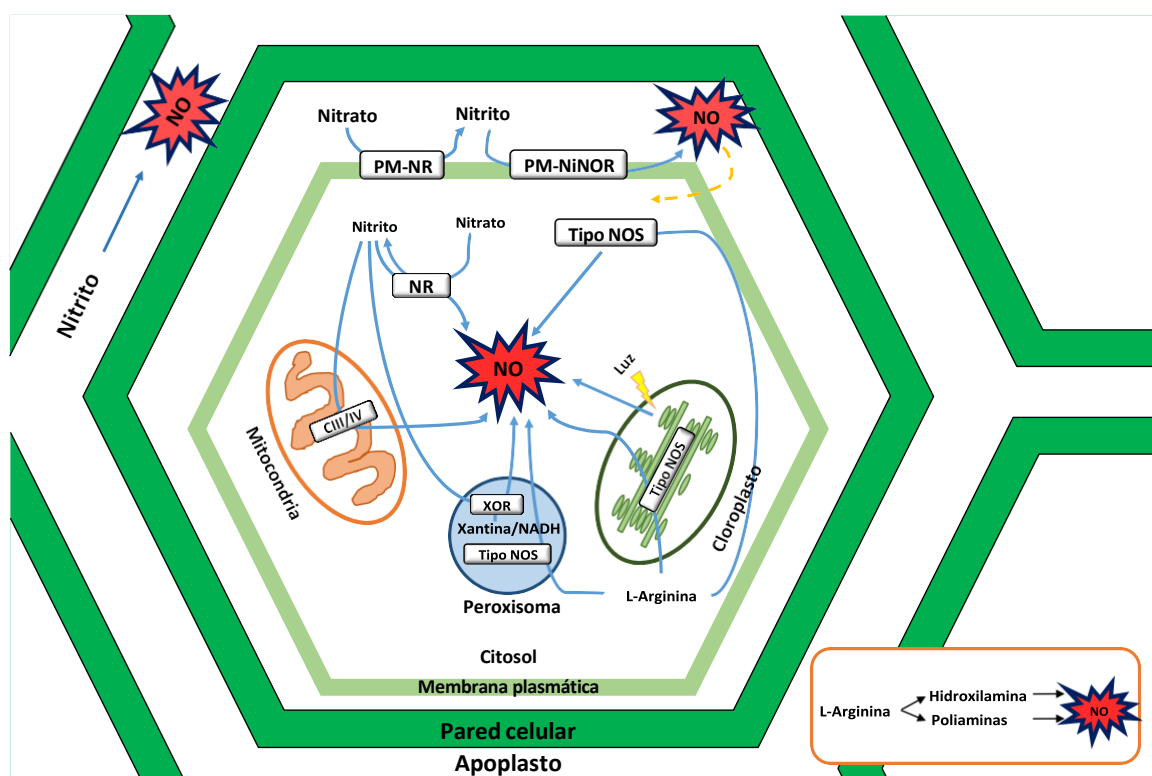


Figura 1. Fuentes de síntesis de NO en células vegetales. En el apoplasto tiene lugar la síntesis de NO a partir de reacciones no-enzimáticas en condiciones de pH bajo o en ambiente reductor. PM-NR: la nitrato reductasa unida a la membrana plasmática transforma el nitrato a nitrito, y este nitrito es transformado en NO por acción de la PM-NiNOR: nicotiana-óxido nítrico reductasa unida a la membrana plasmática. En el citoplasma se localiza una NR que principalmente transforma el nitrato en nitrito, pero también tiene la capacidad de generar NO, además,

en este compartimento también se localiza una actividad tipo NOS similar a la de animales. En la mitocondria, la cadena transportadora de electrones (CIII/IV) desencadena la producción de NO. En peroxisomas, la producción de NO es debida a una actividad tipo NOS y a la enzima xantina óxido-reductasa (XOR). En el cloroplasto existe una vía no enzimática de síntesis de NO a partir de la luz y los carotenoides y otra enzimática mediante una actividad tipo NOS. Otras fuentes generadoras de NO implican a las hidroxilaminas y a las poliaminas.

2.1.1. Mecanismos enzimáticos

Los mecanismos enzimáticos son probablemente la principal fuente de NO en plantas (Yamasaki et al. 1999). Dentro de este grupo cabe destacar diferentes la actividad tipo NOS dependiente de L-arginina, la actividad tipo NR y otros sistemas enzimáticos generadores de NO.

Actividad tipo óxido nítrico sintasa dependiente de L-arginina

En 1999, nuestro Grupo de Investigación detectó, por primera vez, la generación enzimática de NO en peroxisomas de guisante a partir de L-arginina y todos los cofactores utilizados por la NOS animal (Barroso et al. 1999). Adicionalmente, esta actividad tipo NOS dependiente de L-arginina también fue identificada en otras especies y tejidos vegetales (**Tabla 1**) (**Fig. 1**).

Tabla 1. Generación de NO a partir de L-arginina en algunas especies de plantas (modificada de (Corpas et al. 2009)).

Especie vegetal	Órgano/ Tejido/ Compartimento celular	Referencia
<i>Pisum sativum</i>	Peroxisomas de hojas	(Barroso et al. 1999; Corpas et al. 2004)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hojas	(Zhao et al. 2007)
<i>Hibiscus moscheutos</i>	Raíces	(Tian et al. 2007)
<i>Zea mays</i>	Raíces y hojas jóvenes	(Ribeiro Jr et al. 1999)
<i>Zea mays</i>	Plántulas	(Hao et al. 2008)
<i>Olea europea</i>	Hojas	(Valderrama et al. 2007)
<i>Pisum sativum</i>	Raíz, tallo y hoja	(Corpas et al. 2006)
<i>Sorghum bicolor</i>	Eje embrionario de semilla	(Simontacchi et al. 2004)
<i>Glycine max</i>	Cotiledones	(Modolo et al. 2002)
<i>Glycine max</i>	Cloroplastos de hojas	(Jasid et al. 2006)
<i>Helianthus annuus</i>	Hipocótilos	(Chaki et al. 2009)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Hojas	(Durner et al. 1998)
<i>Lupinus albus</i>	Raíces y nódulos	(Cueto et al. 1996)
<i>Capsicum annum</i>	Hojas	(Airaki et al. 2011)
<i>Hordeum vulgare</i>	Mitocondria	(Gupta and Kaiser 2010)

En este contexto, (Corpas and Barroso 2017) han postulado que la actividad similar a la NOS dependiente de L-Arg detectada en plantas superiores podría ser el resultado de la cooperación entre proteínas discretas que juntas pueden generar NO; esto explicaría la ausencia de hallazgos a nivel molecular sobre la presencia de un complejo proteico similar al de la NOS animal. Estos "complejos de proteínas" tienen los mismos requisitos que los NOS de mamíferos en los que cada subunidad de los NOS homodiméricos contiene un dominio de oxigenasa N-terminal (dependiendo de la categoría de proteínas hemetiolato) y un dominio de reductasa C-terminal que es homólogo al citocromo NADPH P450 reductasa y otras flavoproteínas. Esta hipótesis se basa en los siguientes ejemplos que se encuentran en diferentes tipos de células eucariotas. Por ejemplo, aunque el mecanismo de biosíntesis de

ácidos grasos mediado por la actividad de la sintasa de ácidos grasos (FAS) es universal en todos los organismos, la organización de esta FAS es muy distinta. Si bien el complejo FAS cataliza la misma reacción para sintetizar ácidos grasos, existe una notable variedad de formas estructurales en animales, plantas y bacterias. En plantas superiores, FAS es un complejo multiproteína disociable tipo II similar al sistema de *Escherichia coli*, con reacciones parciales individuales catalizadas por proteínas separadas, que trabajan juntas como una FAS, pueden aislarse y cuya función puede demostrarse por separado (Beld et al. 2015). Sin embargo, la FAS animal (tipo I) está formado por proteínas grandes y multidominio que forman un único complejo que cataliza reacciones universales similares al tipo II-FAS, lo que demuestra cómo pueden surgir nuevas proteínas a partir de la fusión de genes que codifican proteínas más pequeñas existentes. Otro ejemplo es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que no tiene ortólogos de NOS de mamíferos o bacterias, y el NO se genera mediante una actividad similar a la NOS dependiente de L-Arg. Esta actividad está mediada por la participación de varias proteínas discretas, incluida la flavoproteína Tah18, que transfiere electrones a la proteína del grupo hierro-azufre Dre2 (Sasano et al. 2012; Nishimura et al. 2013; Yoshikawa et al. 2016). Por otro lado, en el alga *Chlamydomonas*, se ha descrito recientemente un sistema dual que implica interacciones entre los dominios oxidasa y reductasa de NR y ARC (componente reductor de amidoxima), en el que el NO se genera de forma eficaz mediante una vía reductora (Chamizo-Ampudia et al. 2016). Estos ejemplos muestran que los organismos de diferentes categorías biológicas pueden utilizar estrategias particulares para lograr un objetivo metabólico específico. Por lo tanto, en plantas superiores, la actividad similar a la NOS dependiente de L-Arg detectada podría ser un nuevo ejemplo de proteínas con dominios oxigenasa y reductasa que trabajan juntas para generar NO en células vegetales superiores, ya sea en el citosol o en otros compartimentos subcelulares como peroxisomas y cloroplastos.

La identificación del gen o genes que codifican la proteína o proteínas que constituyen la NOS es aún un tema controvertido en el campo científico. Recientemente, se han llevado a cabo diversos estudios ómicos en los que se han realizado comparativas a nivel de genoma y de transcriptoma en busca de una o varias NOS homólogas a las de animales. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha identificado ninguna NOS similar, lo que sugiere que las plantas terrestres no poseen las NOS típicas presentes en mamíferos. No obstante, este enfoque bioinformático permitió la identificación de 15 posibles NOS en algas (Jeandroz et al. 2016; Hancock and Neill 2019; Kolbert et al. 2019). Esta última identificación de 15 posibles NOS en algas, confirmó el trabajo pionero del grupo de L. Lamatina, el cual caracterizó una NOS funcional en el alga verde *Ostreococcus tauri* (Foresi et al. 2010).

En términos estructurales, estas NOS de algas conservan los dominios oxigenasa y reductasa de las NOS de animales, incluidos los motivos de unión para el grupo hemo, BH₄, NADPH, FMN y FAD. También se localizó en ellas un posible dominio de unión a calmodulina, dominio que es controlado por los iones Ca⁺² (Foresi et al. 2010; Foresi et al. 2015; Santolini et al. 2017).

Por el contrario, diferentes análisis estructurales *in silico* revelaron singularidades de las NOS de algas en comparación con sus homólogas de mamíferos, como la ausencia del extremo N-terminal y el motivo del grupo Zn/S involucrado en la interfaz del homo-dímero, y la presencia de inserciones o sustituciones de residuos involucrados en la liberación del NO al

final del proceso catalítico. Además, se ha observado que las NOS de algas pueden utilizar de manera eficiente el pterin tetrahidrofolato (THF) en lugar del BH_4 , ya que la biosíntesis de BH_4 en organismos fotosintéticos aún no ha sido probada y los genes que codifican las proteínas clave involucradas en la producción de BH_4 también se desconocen. Estas diferencias entre las NOS de algas y de mamíferos sugieren la existencia de nuevas propiedades bioquímicas y funcionalidades y podrían justificar la gran velocidad de síntesis de NO que presenta la proteína NOS recombinante de *O. tauri* en comparación con las NOS de mamíferos (Crane et al. 2010; Santolini et al. 2017; Jeandroz et al. 2016; Foresi et al. 2015; Weisslocker-Schaetzel et al. 2017; Kolbert et al. 2019).

En conclusión, los estudios mencionados anteriormente indican que las plantas terrestres no poseen una NOS típica, lo que cuestiona los procesos enzimáticos de síntesis de NO dependientes de L-arginina observados en estos organismos (Kolbert et al. 2019).

Actividad tipo nitrato reductasa

La síntesis de NO en plantas también es llevada a cabo por la NR, siendo esta vía de síntesis de NO una de las más caracterizadas dentro del metabolismo del nitrógeno vegetal. En plantas de *Arabidopsis thaliana*, la NR está codificada por dos genes homólogos (Nia1 y Nia2). Esta enzima se localiza en el citosol y cataliza principalmente la reducción del nitrato a nitrito utilizando el NAD(P)H como principal donador de electrones, y como cofactores un grupo hemo, FAD y molibdopterina (**Fig. 1**). El nitrito generado se reduce aún más a amonio en los plastidios por la nitrito reductasa plastidial (NiR) (Hageman 1990; Wilkinson and Crawford 1993; Yamasaki 2000).

Existen algunas evidencias científicas que también implican a la NR en la catálisis de la reducción del nitrito a NO, no obstante, en condiciones estándar, el porcentaje de actividad de la NR *in vivo* involucrada en la reducción del nitrito solo constituye el 1% (**Fig. 1**) (Planchet et al. 2005; Gupta and Igamberdiev 2011; Rockel et al. 2002). A pesar de esto, la NR es una fuente importante de producción enzimática de NO en plantas, ya que las plantas mutantes deficientes en NR presentan niveles bajos tanto de nitrito como de NO (Morot-Gaudry-Talarmain et al. 2002; Planchet et al. 2005).

La NR se activa a pH bajo y, además, para llevar a cabo la catálisis de NO, requiere bajas concentraciones de nitrato y altas concentraciones de nitrito, por tanto, la producción de NO depende de la acumulación de nitrito. Esto ocurre cuando hay un nivel bajo de pH que desencadena la inhibición de la NiR plastidial (Rockel et al. 2002; Kaiser and Brendle-Behnisch 1995).

La NR está regulada post-traduccionalmente a través de la fosforilación de un residuo conservado de serina, lo que provoca la inactivación de la NR y su consiguiente degradación proteolítica (Lillo et al. 2004; Kaiser and Huber 2001). En cambio, la mutación en el residuo susceptible a fosforilación da lugar a un incremento en la acumulación de nitrito y en la emisión del NO (Lea et al. 2004).

La síntesis de NO mediada por la NR es inducida por varios factores abióticos y bióticos tales como: 1) inductores químicos de fitopatógenos fúngicos y bacterianos, donde el NO actúa

como señal para inducir los mecanismos de defensa (Shi and Li 2008; Srivastava et al. 2009; Yamamoto-Katou et al. 2006; Vitor et al. 2013); 2) en situaciones de estrés osmótico (Kolbert et al. 2010; Xie et al. 2013); 3) en condiciones de estrés hídrico, donde el NO induce el metabolismo del ácido crasuláceo y la respuesta antioxidante (Sang et al. 2008; Freschi et al. 2010); 4) en la transición floral (Seligman et al. 2008); 5) en la formación de la raíz lateral inducida por auxinas (Kolbert et al. 2008); 6) en condiciones de hipoxia (Benamar et al. 2008; Blokhina and Fagerstedt 2010a); 7) durante el cierre de los estomas inducido por el ácido abscísico (ABA) (Neill et al. 2008; Desikan et al. 2002); 8) en el desarrollo del vello radicular (Lombardo and Lamattina 2012) y 9) en la homeostasis de células madre (Wany et al. 2018).

Todos los avances científicos que se han hecho hasta la fecha, sugieren que la participación de la NR en la síntesis de NO es indirecta y que el NO que origina interviene en el desarrollo de las plantas y en su respuesta al estrés (Kolbert et al. 2019).

Otros sistemas enzimáticos generadores de NO

Mitocondrias

En 2004, se descubrió por primera vez la producción de NO en las mitocondrias de las plantas, concretamente en un alga verde unicelular llamada *Chlorella sorokiniana* (Tischner et al. 2004). Más tarde, en mitocondrias de cultivos celulares de tabaco y en raíces de guisante, cebada y tabaco se observó que la reducción de nitritos por acción de la cadena transportadora de electrones generaba NO y que esta vía de síntesis de NO se inhibía en presencia de oxígeno (**Fig. 1**) (Planchet et al. 2005; Gupta et al. 2005). Esta inhibición se corroboró en raíces de arroz y en nódulos de leguminosas, donde en condiciones anaerobias, las mitocondrias tenían la capacidad de usar el nitrito como un aceptor de electrones para oxidar el NAD(P)H citosólico y generar NO (Stoimenova et al. 2007; Horchani et al. 2011).

Esta vía de síntesis de NO ayuda a proteger la estructura y función de las mitocondrias, ya que, las mitocondrias anóxicas incrementan la síntesis de NO y ATP y reducen los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación lipídica, además, el NO sintetizado participa en la formación de súper complejos de las mitocondrias, siendo estos la asociación de los complejos respiratorios mitocondriales, con excepción del complejo II (Gupta et al. 2017; Lapuente-Brun et al. 2013).

Peroxisomas

En los peroxisomas se encuentra la enzima XOR que en condiciones anaeróbicas es capaz de reducir el nitrito a NO. Para ello utiliza el NADH o la xantina como sustrato reductor (**Fig. 1**) (Godber et al. 2000; del Rio et al. 2004; Wang et al. 2010).

Membrana plasmática

La producción de NO en la membrana plasmática se observó, por primera vez, en fracciones de membrana aisladas de raíces de tabaco en las que se detectó la síntesis de NO a partir de nitrito. Más tarde, se consiguió identificar que el nitrito utilizado como sustrato por la PM-NiNOR es probablemente proporcionado por una NR que está unida a

la membrana plasmática en una reacción acoplada (**Fig. 1**) (Stöhr et al. 2001; Gupta et al. 2011).

De esta manera, el NO producido podría entrar fácilmente en la célula y desencadenar diferentes procesos que permitirían a la planta reaccionar a las señales del exterior. Además, el sistema NR-NiNOR de la membrana participa en la detección de la disponibilidad de nitrato en el suelo y regula la respuesta a la infección de la raíz por hongos micorrícicos (Meyer and Stöhr 2002; Moche et al. 2010).

2.1.2. Mecanismos no enzimáticos

En los sistemas vegetales, la producción de NO también puede ser debida a mecanismos no enzimáticos.

Uno de estos mecanismos sucede en los cloroplastos, donde en 1994 se evidenció la producción no enzimática de NO dependiente de la luz y con la participación de los carotenoides (**Fig. 1**) (Cooney et al. 1994).

Otra forma de obtener NO a través de vías no enzimáticas consiste en la reducción de nitritos a NO. Esto ocurre en condiciones particulares de pH bajo o en ambientes altamente reductores como los que ocasionalmente pueden acontecer, por ejemplo, en el apoplasto de las células de cebada (**Fig. 1**) (Bethke et al. 2004b).

2.1.3. Otros mecanismos

Además de todos los mecanismos anteriormente mencionados, existen otros mecanismos de producción de NO aún poco estudiados.

Entre ellos, cabe mencionar la producción de NO a partir de la oxidación de hidroxilaminas (R-NHOH) por sistemas generadores de superóxido y peróxido de hidrógeno (**Fig. 1**). Sin embargo, la ruta bioquímica de conversión de la hidroxilamina a NO y su importancia en los sistemas vegetales sigue sin estar totalmente definida, principalmente porque la presencia de hidroxilamina en plantas todavía no ha sido probada con total certeza (Rümer et al. 2009).

Otra vía de síntesis de NO implica a las poliaminas, tales como la espermina y la espermidina (**Fig. 1**). Estas poliaminas proceden de la vía biosintética de la arginina. Sin embargo, el mecanismo bioquímico por el cual NO es liberado a partir de de las poliaminas aún no se ha revelado (Tun et al. 2006; Flores et al. 2008; Yamasaki and Cohen 2006).

2.2. Bioactividad y señalización mediada por el óxido nítrico en plantas

El óxido nítrico es considerado una molécula señal tanto en sistemas animales como en vegetales. En un primer momento, se pensó que el mecanismo de señalización del NO en plantas era similar al ejercido en animales, el cual se basa en la activación de un mensajero intracelular denominado guanósín monofosfato cíclico (GMPc) por acción del NO que desencadena una cascada de transducción de señales que regulan la relajación del músculo liso (Waldman 1987; Moncada 1991; Wedel et al. 1994; Stone and Marletta 1994; Russwurm and Koesling 2004). Sin embargo, estudios científicos acompañados de búsquedas bioinformáticas de los principales componentes de la cascada desencadenada por NO/GMPc en mamíferos apoyan la posibilidad de

que los sistemas vegetales no compartan el mismo proceso de señalización del NO (Durner et al. 1998; Pagnussat et al. 2003; Ludidi and Gehring 2003; Szmidt-Jaworska et al. 2004; Hussain et al. 2016; Astier et al. 2019).

El NO, tanto en su estado gaseoso como en solución acuosa puede reaccionar con el O₂ para dar lugar a N₂O₃ y NO₂. En solución acuosa, el N₂O₃ y el NO₂ producen cantidades estequiométricas de NO₂⁻ y NO₃⁻. El NO₂ es 1,5 veces más soluble en una membrana lipídica que e

En el caso de las plantas, para una mejor comprensión del proceso de señalización mediado por el NO se deben tener en cuenta previamente las especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las RNS son un conjunto de moléculas derivadas del óxido nítrico que generan modificaciones post-traduccionales (PTM) como la S-nitrosilación y la nitración de proteínas, además de modificar otras moléculas como los lípidos o ácidos nucleicos por nitración.

En la **tabla 2** se muestran las RNS más representativas clasificándolas en función de su naturaleza radicalaria y no radicalaria (Corpas 2016; Gupta et al. 2020).

Tabla 2. Principales RNS. Modificada de (Corpas 2016).

	NO RADICALES	RADICALES
RNS	Anión nitroxilo (NO ⁻)	NO [·]
	Catión de nitrosonio (NO ⁺)	Dióxido de nitrógeno (NO ₂)
	Ácido nitroso (HNO ₂)	
	Trióxido de dinitrógeno (N ₂ O ₃)	
	Tetróxido de dinitrógeno (N ₂ O ₄)	
	Peroxinitrito (ONOO ⁻)	
	Ácido peroxinitroso (ONOOH)	

El NO, tanto en su estado gaseoso como en solución acuosa puede reaccionar con el O₂ para dar lugar a N₂O₃ y NO₂. En solución acuosa, el N₂O₃ y el NO₂ producen cantidades estequiométricas de NO₂⁻ y NO₃⁻. El NO₂ es 1,5 veces más soluble en una membrana lipídica que en agua (Signorelli et al. 2011).

El NO también puede reaccionar con el radical superóxido (·O₂⁻) para producir ONOO⁻. Esta reacción no enzimática ocurre rápidamente ($k = 1.9 \cdot 10^{10} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$) en las localizaciones próximas a las fuentes de ·O₂⁻ y NO, como son los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas (Blokina and Fagerstedt 2010b; Corpas and Barroso 2014b). El peroxinitrito es un potente agente oxidante y nitrante de moléculas celulares clave como proteínas, oligonucleótidos y lípidos y tiene una vida media relativamente corta a pH fisiológico (~ 10 ms) (Liaudet et al. 2009).

Desde un punto de vista bioquímico, el ONOO⁻ causa procesos de oxidación de forma directa e indirecta sobre las biomoléculas. Los procesos de oxidación directa son aquellas reacciones que incluyen un electrón (es decir, la reacción con metales de transición) o dos electrones (es decir, la reacción con tioles) en los procesos de oxidación. En cambio, la actividad

indirecta del ONOO^- se manifiesta a través de intermediarios secundarios, como el CO_3^- (anión de trióxido de carbono), OH^\cdot (radical hidroxilo) y $\cdot\text{NO}_2$ que se forman a través de su rápida reacción con CO_2 (dióxido de carbono) o mediante la homólisis catalizada por protones. De hecho, cabe destacar el radical reactivo $\cdot\text{NO}_2$, el cual es fundamental para futuras reacciones de nitración (Bartesaghi and Radi 2018). El radical $\cdot\text{NO}_2$, también puede ser generado por la acción de la hemoperoxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y nitritos (**Fig. 2**) (Souza et al. 2008). En general, la biodisponibilidad y la bioactividad del peroxinitrito dependen de la cinética de las reacciones celulares, donde los tioles y los cambios de pH afectan a los procesos de nitración dependientes del ONOO^- (Ferrer-Sueta et al. 2018; Bartesaghi and Radi 2018; Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek 2019).

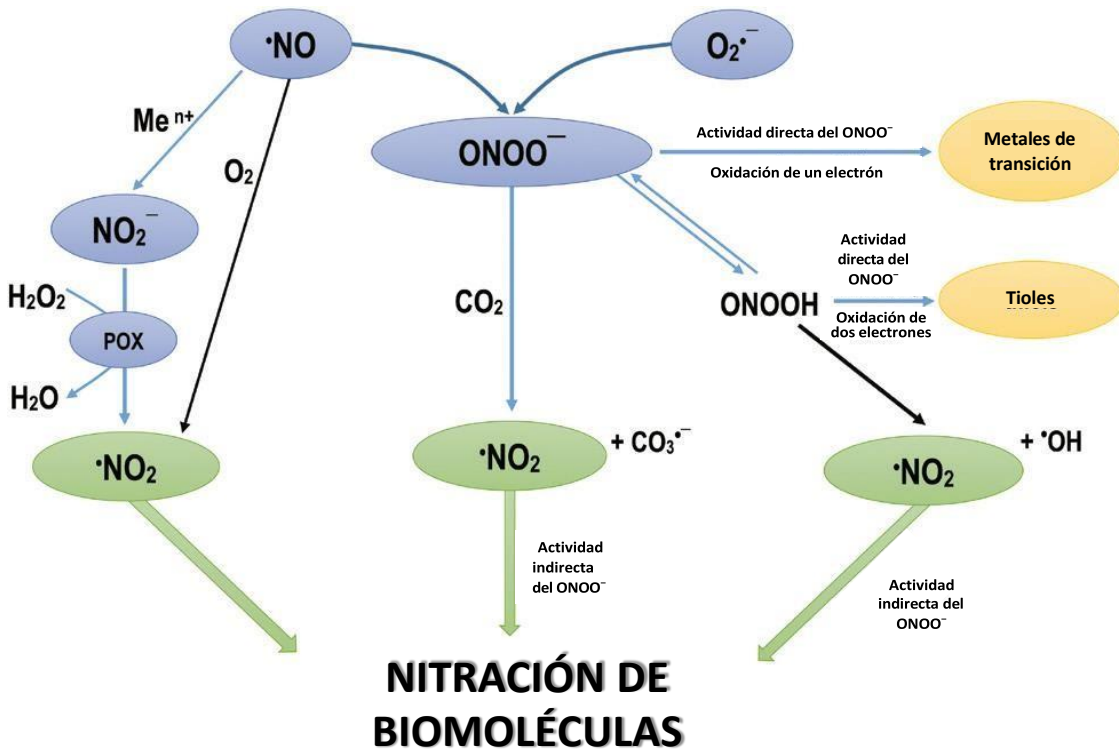


Figura 2. Reactividad del peroxinitrito. El ONOO^- puede ocasionar procesos de oxidación directos e indirectos sobre las biomoléculas. Los procesos directos incluyen oxidaciones de uno (metales de transición) o dos electrones (tioles), mientras que la participación indirecta del ONOO^- se manifiesta a través de intermediarios secundarios como el CO_3^- , el OH^\cdot y el NO_2^\cdot , este último formado a través de su rápida reacción con CO_2 o mediante la homólisis catalizada por protones. Alternativamente, el proceso de autooxidación de NO y la actividad hemoperoxidasa (POX) en presencia de peróxido de hidrógeno y nitritos puede conducir a la formación de agentes nitrantes. Las líneas negras indican rutas que se favorecen en la fase hidrofóbica (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek 2019).

ONOOH : ácido peroxinitroso.

La formación del ONOO^- en plantas es un evento integral del metabolismo de la célula que participa en la regulación redox (Romero-Puertas et al. 2004; Arasimowicz-Jelonek et al. 2016; Gzyl et al. 2016). Todo ello, está respaldado por el hecho de que las plantas presentan una amplia variedad de vías de descomposición que les permiten ajustar la concentración de ONOO^- durante las situaciones de estrés y el desarrollo. Dichas rutas de descomposición implican la participación de compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico, los flavonoides y los tocoferoles, que son abundantes en las

células vegetales y pueden proteger los compartimentos celulares contra el daño oxidativo inducido por el ONOO⁻ (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek 2011).

El ONOO⁻ puede generar la nitración de nucleótidos lo que da lugar a especies como la 8-nitroguanina (8-NO₂-G) y la 8-oxiguanina (8-Oxy-G). Esta nitración puede afectar al ADN y ARN o a nucleótidos que actúan como transductores de señales como guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato y el GMPc (Ihara et al. 2010). En sistemas vegetales, la nitración de nucleótidos que actúan como transductores de la señal secundaria, como el GMPc, se relaciona con la regulación de la apertura estomática (Joudoi et al. 2013). En cambio, la nitración de nucleótidos insertados en el ADN y el ARN se comprende menos, dado que solo se ha detectado experimentalmente en patata inoculada con *Phytophthora infestans* (Izbiańska et al. 2018) y en embriones aislados de semillas de manzana (Andryka-Dudek et al. 2019). En el estudio de Izbińska et al., el incremento en los niveles de 8-NO₂-G precedió o coincidió con los primeros síntomas de muerte celular programada durante la respuesta hipersensible tras la infección del patógeno. En cambio, en el estudio de Andryka-Dudek et al., el incremento en los niveles de ARN nitrado con el cambio de estado de inactivo a activo de los embriones de manzana. Por tanto, la nitración de nucleótidos puede constituir una parte integral del metabolismo de las células vegetales que se intensifica en respuesta al ataque de patógenos o a los estímulos del desarrollo (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek 2019).

Adicionalmente, los nucleótidos nitrados pueden afectar a la estructura secundaria del ARNm, a su estabilidad y a sus interacciones con otras moléculas como el ARNr, el ARNt, y las proteínas de unión al ARN (Hoernes and Erlacher 2017). Asimismo, los principales efectos de la nitración de nucleótidos en los procesos transcripcionales pueden estar relacionados con un deterioro selectivo de la síntesis de proteínas en respuesta a estímulos internos o externos que funcionan como un interruptor redox hacia un ajuste rápido del metabolismo. Finalmente, no se puede descartar la posibilidad de que la nitración del ARNm sea una estrategia conservada y sofisticada de la planta que ayudaría a destruir los ARN de patógenos bloqueando la expresión de proteínas codificadas por los mismos (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek 2019).

2.2.1. Nitración de lípidos

La interacción no enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados con el NO y especies derivadas como el NO₂ y el ONOO⁻ dan lugar a la formación de los ácidos grasos nitrados (NO₂-FAs), también conocidos como nitrolípidos o nitroalquenos. Los NO₂-FAs son considerados especies reactivas de lípidos (RLS), debido a su reactividad electrofílica adquirida por la ausencia de electrones en el β-carbono adyacente al carbono (α-carbono) unido al grupo nitro (-NO₂). Esta reactividad le permite establecer aductos covalentes con el glutatión (GSH) y con residuos de aminoácidos nucleofílicos como la cisteína, la histidina y la lisina, generando modificaciones post-traduccionales en las proteínas (Schopfer et al. 2011; Buchan et al. 2018b; Schopfer and Khoo 2019a; Wang et al. 2014).

El proceso de formación de los NO₂-FAs *in vivo* aún sigue siendo desconocido, sin embargo, se han propuesto dos posibles mecanismos para explicar la nitración de los ácidos grasos. Uno de los mecanismos consiste en una reacción radical-radical directa entre el radical ·NO₂ y un radical alquilo, no obstante, cabe mencionar que este proceso no tiene relevancia biológica (Buchan et al. 2018b). No es así en el caso del segundo mecanismo, que consiste en la formación de un radical centrado en carbono a través de la adición directa de un radical ·NO₂. Este radical puede reaccionar con otro radical de NO₂ para formar un nitro-nitrito o compuesto dinitro inestable, el cual se descompondrá rápidamente liberando ácido nitroso (HNO₂) y generando el NO₂-FA (**Fig. 3**) (Schopfer and Khoo 2019a; Begara-Morales et al. 2021a).

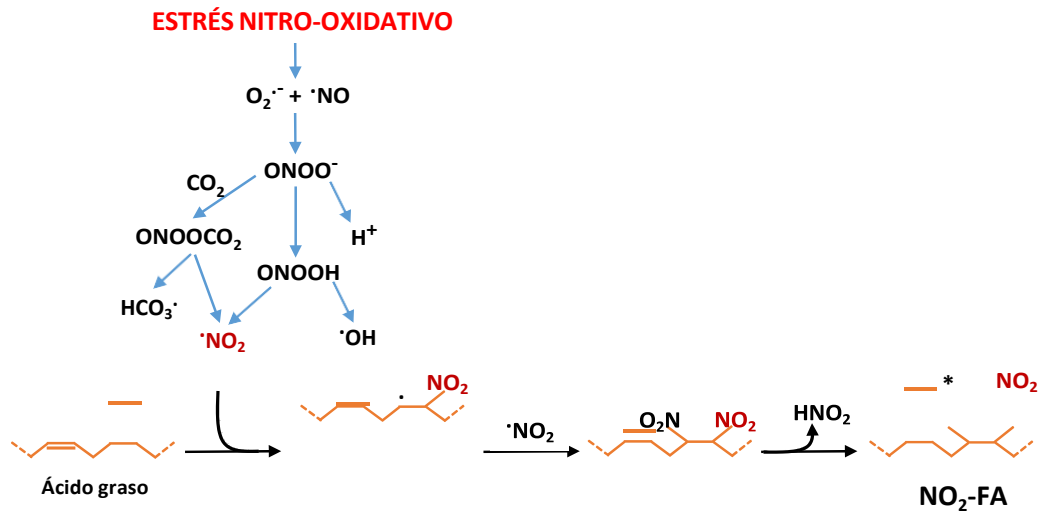
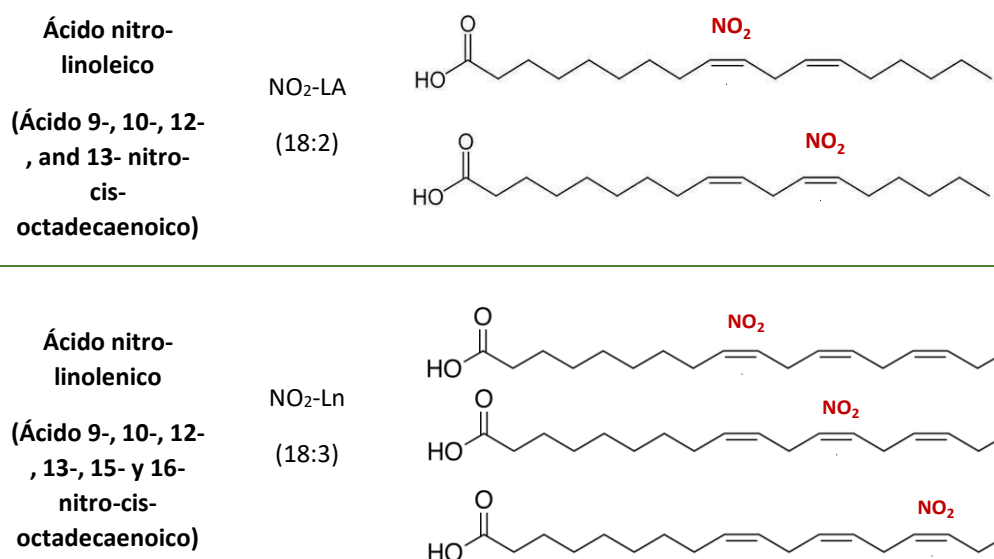


Figura 3. Mecanismo de formación de los nitrolípidos. En condiciones de estrés nitro-oxidativo, el O_2^- y $\cdot\text{NO}$ reaccionan dando lugar a la formación de ONOO^- . El ONOO^- promueve la generación del $\cdot\text{NO}_2$ a través de la homólisis del ONOOH o a partir de su reacción con el CO_2 generando nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2), el cual sufre escisión para formar el $\cdot\text{NO}_2$. La nitración de los ácidos grasos consiste en una adición directa de $\cdot\text{NO}_2$ a un doble enlace para generar un radical centrado en carbono. Este radical reaccionará con otra molécula de $\cdot\text{NO}_2$ para formar un nitro-nitrito o compuesto dinitro inestable que se descompondrá, liberando HNO_2 y formando un $\text{NO}_2\text{-FA}$ electrofílico (Begara-Morales et al. 2021a).

En sistemas animales, la presencia y las funciones biológicas de los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ están bien establecidas. En cambio, el conocimiento de estas moléculas en los sistemas vegetales es aún escaso, convirtiéndose en los últimos 5 años en un área emergente de conocimiento y de gran interés en el campo del óxido nítrico en plantas. Inicialmente, los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ se describieron en el fruto del olivo y en el aceite de oliva virgen extra (AOVE), concretamente se identificó la presencia de los ácidos nitro-oleico ($\text{NO}_2\text{-OA}$) y nitro-linoleico conjugado ($\text{NO}_2\text{-cLA}$) aductados con cisteínas (**Tabla 3**) (Fazzari et al. 2014). Más tarde, se identificó la presencia endógena de los ácidos nitro-linolénico ($\text{NO}_2\text{-Ln}$) y $\text{NO}_2\text{-OA}$ (**Tabla 3**) en diferentes especies vegetales como *Arabidopsis thaliana* (Mata-Pérez et al. 2016d), *Pisum sativum*, *Oryza sativa* (Mata-Pérez et al. 2017), *Solanum lycopersicum* (Di Palma et al. 2020) y *Brassica napus* (Vollár et al. 2020a), lo que indica una distribución ubicua de los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ en el reino vegetal (Begara-Morales et al. 2021a).

Tabla 3. Principales nitrolípidos detectados en sistemas vegetales. La línea central del doble enlace indica que el grupo nitro podría estar alojado en cualquiera de los dos carbonos adyacentes. Además, aunque los dobles enlaces podrían generar los correspondientes isómeros cis y trans, solo se muestran las formas cis (Aranda-Caño et al. 2019).

Nombre	Fórmula	Estructura química
Ácido nitro-oleico (Ácido 9-, y 10-nitro-cis-octadecaenoico)	$\text{NO}_2\text{-OA}$ (18:1)	



NO₂-LA: ácido nitro-linoleico.

Los NO₂-FAs pueden ejercer potentes propiedades biológicas, una de ellas estriba en su capacidad para liberar NO. Se han propuesto dos posibles mecanismos de liberación de NO. El primero consiste en una reacción de Nef modificada que genera un intermediario nitroso con un enlace C–N especialmente débil que se descompone rápidamente para producir NO y un radical estabilizado por conjugación con el alqueno y un grupo OH (**Fig. 4**) (Schopfer et al. 2005). El segundo mecanismo implica la reordenación del nitroalqueno en un éster de nitrito seguido de un proceso de homólisis para formar NO y un grupo enol (**Fig. 5**) (Lima et al. 2005; Baker et al. 2009).

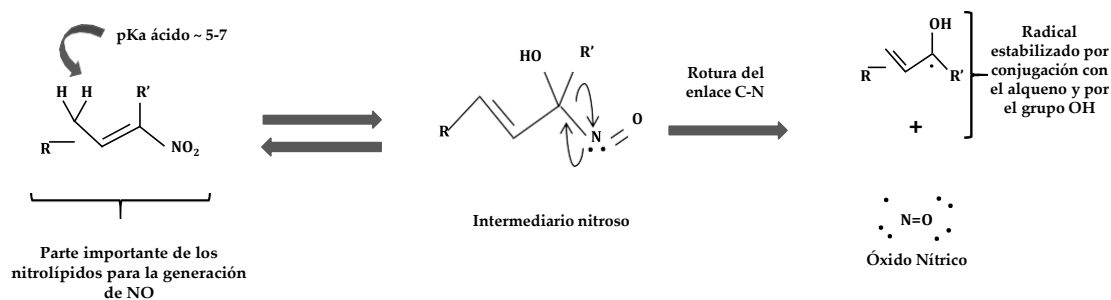


Figura 4. Mecanismo de liberación de NO a través de la reacción de Nef modificada. Este mecanismo consta de la generación de un intermediario nitroso que puede homolizarse en el medio acuoso para producir un radical de carbono y óxido nítrico (Schopfer et al. 2005).

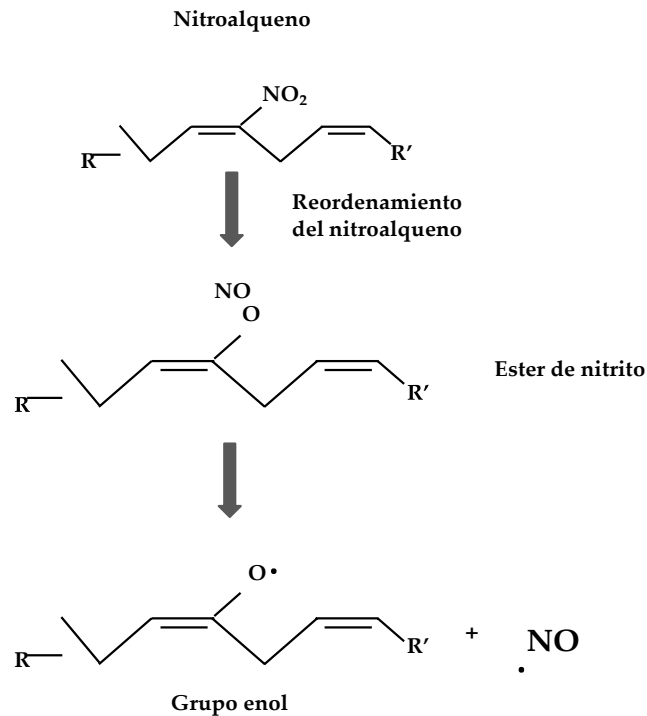


Figura 5. Liberación del NO a través de la transposición de nitroalquenos. En este mecanismo se forma un éster de nitrito que posteriormente se homoliza para formar $\cdot\text{NO}$ y un radical estabilizado (Baker et al. 2009).

Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual los NO_2 -FAs liberan NO. Varios estudios *in vitro* realizados utilizando NO_2 -Ln en soluciones acuosas han registrado un aumento progresivo en la liberación de NO durante los primeros 20 minutos seguidos de una disminución (Mata-Pérez et al. 2016b). Este comportamiento coincide con el observado en el donador biológico de NO conocido como S-nitrosoglutatión (GSNO) (Ederli et al. 2009). La capacidad de liberación de NO del NO_2 -Ln y del NO_2 -LA también fue evaluada a diferentes valores de pH utilizando quimioluminiscencia de ozono. Ambos NO_2 -FAs alcanzaron un máximo de liberación a pH neutro (pH 7,4) y un mínimo en condiciones ácidas (pH 5,4 y 6,4). Estos hallazgos destacan que la liberación de NO de los NO_2 -FAs no se ve favorecida en condiciones ácidas y esto podría tener gran relevancia en compartimentos celulares y orgánulos como mitocondrias, peroxisomas y citosol, donde los valores de pH son neutros o básicos (Mata-Pérez et al. 2016b; Mata-Pérez et al. 2017). Por otro lado, también se ha demostrado que NO_2 -Ln es capaz de liberar NO *in vivo* en hojas y raíces de plantas y en cultivos celulares de Arabidopsis (Ederli et al. 2009; Mata-Pérez et al. 2016c; Mata-Pérez et al. 2016b). Recientemente se ha descrito que el NO liberado por el NO_2 -Ln es capaz de modular los niveles de GSNO *in vitro* e *in vivo* en plantas de Arabidopsis (Mata-Pérez et al. 2020).

En un reciente estudio sobre las propiedades físico-químicas de los NO_2 -FAs, se han determinado las concentraciones micelares críticas (CMC) del NO_2 -OA, NO_2 -LA y NO_2 -cLA y se han comparado con sus formas no nitradas, los ácidos oleico (OA), linoleico (LA) y linoleico conjugado (cLA). El CMC indica la concentración a la que estos nitrolípidos van a ensamblarse para formar micelas, membranas bicapa y fases líquido-cristalinas. La formación de estas

estructuras está influenciada por el pH, la concentración de CO_2 y la temperatura. A valores de pH bajo, predominan las estructuras lipídicas en forma de vesículas, mientras que conforme aumenta el pH predomina la formación de micelas. La adición del grupo nitro aumenta el CMC en todos los NO_2 -FAs estudiados hasta el momento. Por otra parte, la formación de membranas bicapa y micelas estabiliza y secuestra aparentemente al grupo nitroalqueno, limitando la liberación de NO y la adición de Michael con los tioles (la unión de los NO_2 -FAs a las proteínas) (**Fig. 6**) (Grippio et al. 2021).

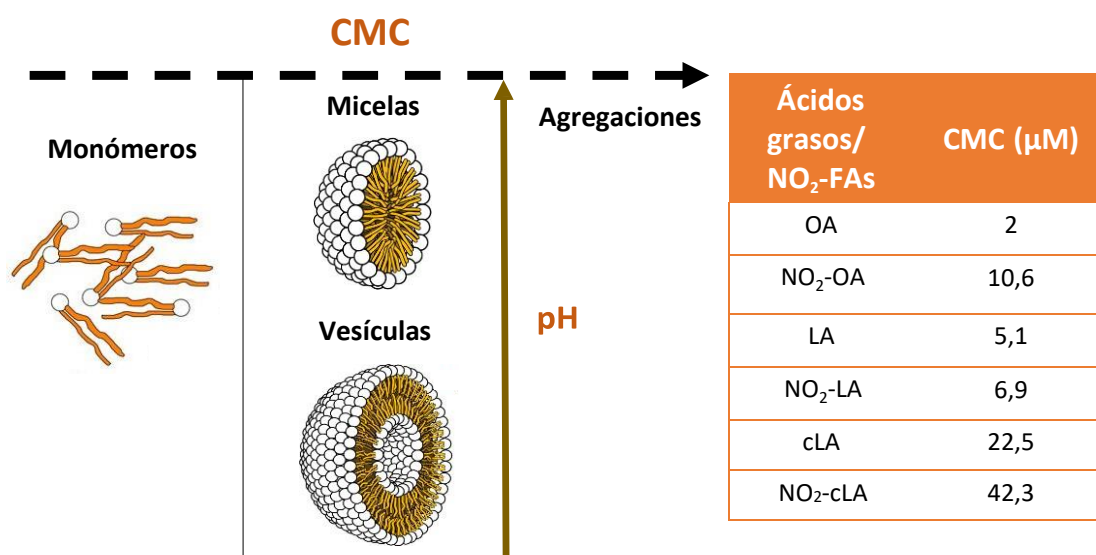


Figura 6. Representación esquemática del autoensamblaje de los ácidos grasos con respecto a la concentración micelar crítica y el pH. Se muestran los valores CMC para los ácidos grasos en su forma no nitrada y nitrada (Imagen modificada de (Grippio et al. 2021)).

Por otra parte, los NO_2 -FAs son considerados depósitos estables y ubicuos del NO, dado que el NO y sus especies derivadas presentan una vida media muy corta y ejercen su función en las inmediaciones del lugar donde se generan. Además, en un entorno acuoso, si la concentración de NO_2 -FAs excede la CMC, los monómeros de NO_2 -FAs se transforman en estructuras autoensambladas, la mayoría de las veces en micelas similares a liposomas y, como se ha indicado anteriormente, cuando los NO_2 -FAs se integran en estas agregaciones lipídicas reversibles, tienen una menor reactividad y mayor estabilidad (**Fig. 7**) (Grippio et al. 2021). En general, aún es escaso el conocimiento existente sobre las interacciones entre los NO_2 -FAs y las agregaciones lipídicas, concretamente con las biomembranas. Sin embargo, mediante diferentes técnicas de simulación por ordenador, se ha demostrado que los NO_2 -FAs pueden modificar la permeabilidad de las membranas celulares, formando grupos en el interfaz membrana-agua. Los grupos resultantes pueden afectar a la estructura dinámica de las proteínas integrales de la membrana (Franz et al. 2017).

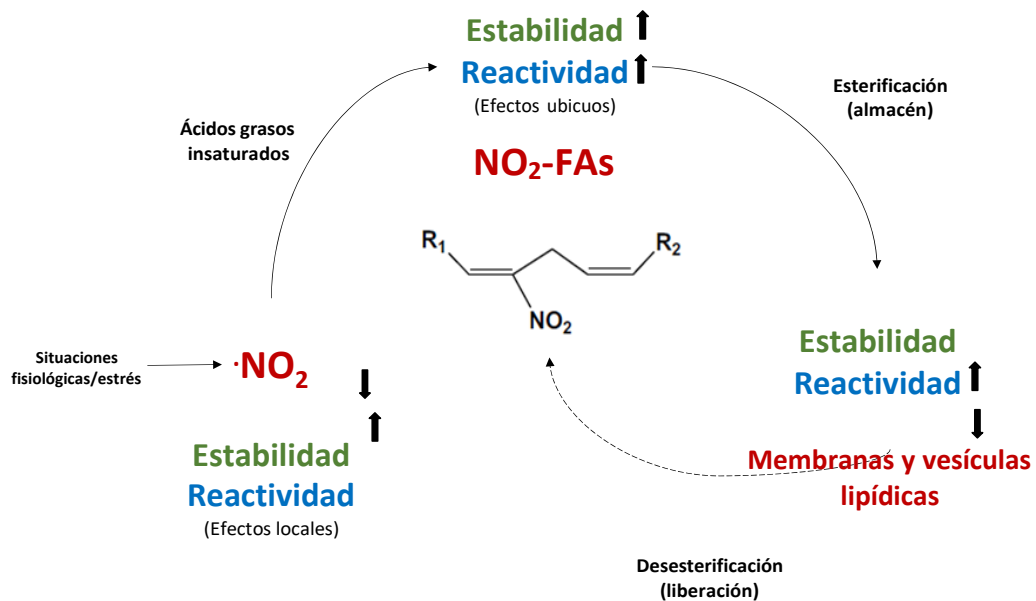


Figura 7. Biodistribución de los NO₂-FAs. El ·NO₂ generado por diferentes situaciones fisiológicas o de estrés, reacciona con los ácidos grasos insaturados para formar los NO₂-FAs electrofílicos. El NO₂-FA es más estable que las especies reactivas tanto de nitrógeno como de oxígeno, que son sus precursores. Finalmente, la esterificación reversible de los NO₂-FAs en lípidos complejos y micelares o en estructuras de membrana estabiliza estas especies (Grippio et al. 2021).

2.2.2. Modificaciones post-traduccionales de proteínas por RNS

2.2.2.1. S-nitrosilación de proteínas

La S-nitrosilación es el resultado de la interacción del NO con el grupo tiol de un residuo de cisteína o del glutatión (**Fig. 8**) (Hess et al. 2005). Sin embargo, una interacción directa no es posible debido a la baja reactividad del NO con los grupos tioles y, en consecuencia, los mecanismos químicos que conducen a la formación de nitrosotioles (SNO) implican la participación de radicales intermedios (Broniowska and Hogg 2012; Smith and Marletta 2012; Lamotte et al. 2015; Begara-Morales et al. 2019).

Es importante señalar que, mediante técnicas de espectrometría de masas, se han determinado un gran número de proteínas S-nitrosiladas localizadas en diferentes orgánulos como los peroxisomas, el núcleo, las mitocondrias y el citosol (Fares et al. 2011; Chaki et al. 2015b; Hu et al. 2015). Por tanto, las reacciones que conducen a la formación de SNO podrían tener lugar en estas ubicaciones subcelulares. Por ejemplo, el NO puede interactuar con el NO₂ para generar N₂O₃, el cual es un eficaz agente S-nitrosilante (Kharitonov et al. 1995; Keszler et al. 2010). Además, los SNO también pueden participar en las reacciones de transnitrosilación, mediante las cuales transfieren el grupo NO a otro tiol para generar un nuevo SNO. Otra vía de síntesis es a partir del ONOO⁻, el cual se puede descomponer en NO₂ y OH⁻. Estos radicales pueden oxidar el glutatión (GSH) y los grupos tioles de proteínas para generar radicales tío que, a su vez, pueden interactuar con NO en una interacción radical-radical que da lugar a la formación de SNO (**Fig. 8**) (Hess et al. 2005; Broniowska and Hogg 2012).

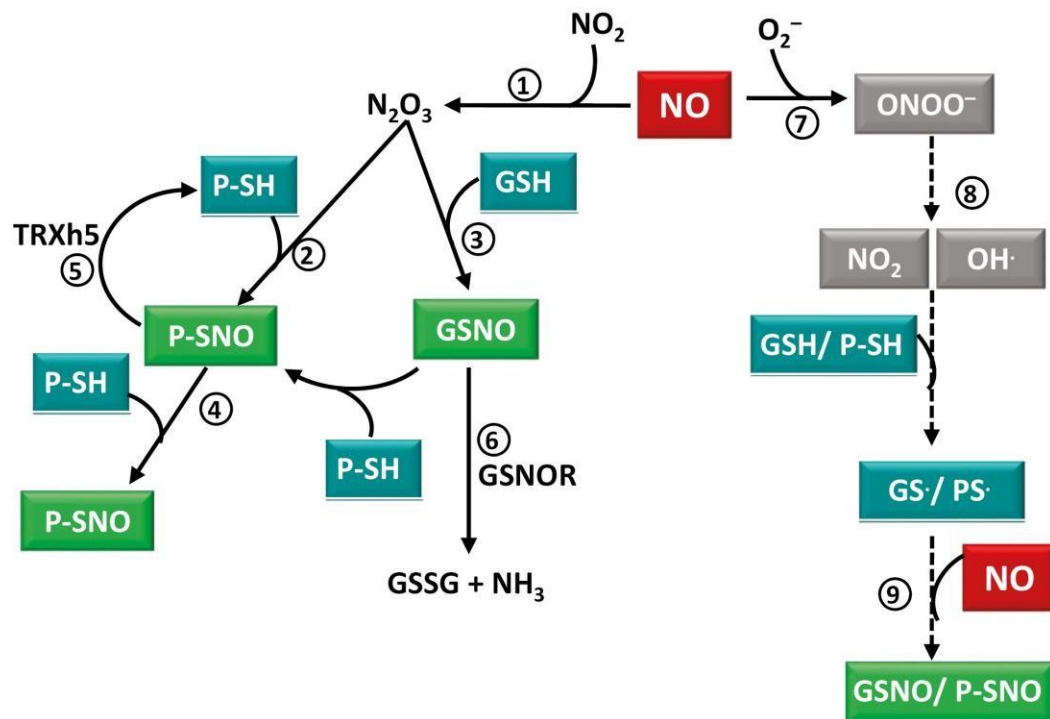


Figura 8. Modulación de los niveles de S-nitrosotioles. Existen diferentes vías de formación de S-nitrosotioles: el NO puede interactuar con el NO₂ para generar N₂O₃ (1) que a su vez es capaz de mediar la formación de S-nitrosotioles de proteínas (P-SNO) (2) o GSNO (3). Los P-SNO también pueden generar nuevos P-SNO mediante mecanismos de transnitrosilación (4). Los S-nitrosotioles también se pueden generar mediante la formación de ONOO⁻ (7) que se puede descomponer en radicales intermediarios (8) que oxidan los tioles proteicos y favorecen la posterior S-nitrosilación por NO (9). El contenido de SNO está controlado por enzimas denitrosilasas específicas como la tiorredoxina h5 (TRXh5) (5) e indirectamente por S-nitrosoglutatión reductasa (GSNOR) (6).

GS: radical glutationilo; GSSG: glutatión oxidado; P-S: grupo tiolato de la proteína; P-SH: grupo tiol de la proteína (Begara-Morales et al. 2019).

Los niveles de SNOs en la célula están estrictamente regulados. Estas moléculas se pueden descomponer de forma no enzimática o a través de enzimas como las denitrosilasas. En sistemas vegetales, el papel de las denitrosilasas aún es poco conocido, pero cabe destacar el papel de dos enzimas clave como son la GSNOR y la tiorredoxina (Hogg 2002; Begara-Morales and Loake 2016; Mata-Pérez and Spoel 2019). La GSNOR es una enzima conservada que es capaz de reducir el GSNO a GSSG y NH₃ (Fig. 8). Esta denitrosilasa no elimina el NO de una proteína S-nitrosilada, sino que controla los niveles intracelulares del GSNO e indirectamente los niveles totales de SNO (Liu et al. 2001; Feechan et al. 2005). En cambio, el sistema de la tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Trx/TrxR) es un sistema bien conocido en sistemas animales y regula la homeostasis del NO a través del control de los niveles de SNO (Benhar et al. 2008). En sistemas vegetales, hay poca información sobre la participación de este sistema Trx/TrxR en el control de los niveles de SNO. La mayoría de los datos disponibles están relacionados con la función de la Trx-h5 (Fig. 8) durante la respuesta inmune (Mata-Pérez and Spoel 2019; Kneeshaw et al. 2014). Cabe destacar, que se ha sugerido que ambas

denitrosilasas, GSNOR y Trx-h5, denitrosilan diferentes conjuntos de proteínas nitrosiladas, lo que implica una alta especificidad para regular el contenido de SNO en plantas (Mata-Pérez and Spoel 2019).

Con el objeto de predecir las cisteínas susceptibles de nitrosilarse se han definido las características del microambiente que condicionan su reactividad. En este sentido, se ha establecido que, normalmente, las cisteínas susceptibles a S-nitrosilarse se localizan dentro de un motivo ácido-base hidrofóbico. Concretamente, los sitios reactivos del tiol de la cisteína suelen estar flanqueados por residuos ácidos como el aspartato (Asp) y el glutamato (Glu) y básicos como la arginina (Arg), la histidina (His) y la lisina (Lys), siendo este el primer motivo identificado [KRHDE]-C-[DE] (Stamler et al. 2001; Greco et al. 2006). En un trabajo posterior, en el que se analizaron un total de 1195 secuencias de proteínas S-nitrosiladas, se identificaron los siguientes motivos: EXC, EC, CD, CE, CXXE, CXD, CXE, DXXC, DC y EXXXC. Todos ellos, presentan aminoácidos cargados negativamente como el glutamato o el aspartato próximos a la cisteína diana (Hu et al. 2015). Por el contrario, otros estudios han demostrado que la secuencia de aminoácidos próxima al residuo de cisteína no predice la especificidad de la S-nitrosilación, no teniendo ningún efecto en la reactividad de la cisteína. Sin embargo, estos estudios resaltan la importancia de la existencia de un motivo ácido-base alejado de la cisteína diana en la estructura primaria de la proteína que sí afectaría a su reactividad, lo que destaca la implicación del plegado tridimensional en la susceptibilidad de los residuos de cisteína a S-nitrosilarse (Kovacs and Lindermayr 2013; Marino and Gladyshev 2010). Sin embargo, estas secuencias motivo aún son objeto de discusión, ya que aún no existen reglas generales para la identificación de residuos de cisteína dianas del NO (Kolbert and Lindermayr 2021).

Hasta la fecha, las proteínas S-nitrosiladas identificadas están involucradas principalmente en procesos relacionados con la respuesta al estrés, el metabolismo, la señalización, la defensa vegetal y la fotosíntesis (Lindermayr et al. 2005; Romero-Puertas et al. 2007; Romero-Puertas et al. 2008; Abat and Deswal 2009; Kato et al. 2013; Chaki et al. 2015b; Hu et al. 2015). Las proteínas S-nitrosiladas también participan en procesos fisiológicos de las plantas, como es la germinación de semillas. En esta etapa, existe una acumulación de NO que desencadena la S-nitrosilación del ABA INSENSITIVE 5 (ABI5), un regulador del ABA responsable de la latencia de las semillas y que controla el crecimiento temprano de las plantas. La S-nitrosilación de la cisteína 153 de ABI5 favorece su degradación por el proteosoma y promueve la germinación (Albertos et al. 2015). En la **tabla 4** se recogen algunas de las proteínas S-nitrosiladas que han sido caracterizadas hasta la fecha.

Tabla 4. Caracterización funcional de proteínas S-nitrosiladas en plantas (Modificada de (Begara-Morales et al. 2019)).

Especie vegetal	Proteína	Efecto	Cisteína diana	Categoría funcional	Referencias
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Factor de transcripción ABI5	-	153	Germinación de semillas	(Albertos et al. 2015)
	Snrk 2.2	-	ND		(Wang et al. 2015c)

Arabidopsis thaliana	Snrk 2.6	-	137	Cierre estomático	(Wang et al. 2015b)
	Factor de transcripción VND7	-	264, 320	Diferenciación del xilema	(Kawabe et al. 2018)
	Subunidad mayor de la Rubisco	-	175	Fotosíntesis	(Fares et al. 2011)
	Metacaspa ARMC9	-	147	Escisión de proteínas	(Belenghi et al. 2007)
	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GADPH)	-	155, 159	Metabolismo	(Holtgreffe et al. 2008)
	Metionina adenosiltransferasa	-	114		(Lindermayr et al. 2006)
	Factor de transcripción NPR1	-	156	Señalización de la planta en la inmunidad	(Tada et al. 2008)
	Proteína de unión 3 al ácido salicílico (AtSABP3)	-	280		(Wang et al. 2009a)
	Dedo de zinc SRG1	-	87		(Cui et al. 2018)
	Factor de transcripción TGA1	+	172, 260, 287	Señalización	(Lindermayr et al. 2010)
	Receptor de auxina	+	140		(Terrile et al. 2012)
	Factor de transcripción MYB2	-	53		(Serpa et al. 2007)
	Ascorbato peroxidasa (APX)	+	32		(Begara-Morales et al. 2014)
	Deshidroascorbato reductasa (DHAR)	-	20, 147		(Fares et al. 2011); (Puyaubert et al. 2014)

	Peroxirredoxina II E (PRXIIIE)	-	121	Generación/eliminación de ROS	(Romero-Puertas et al. 2007)
	NADPH oxidasa	-	890		(Yun et al. 2011)
<i>Brassica juncea</i>	Subunidad mayor de la Rubisco	-	175	Fotosíntesis	(Abat and Deswal 2009)
<i>Kalanchoe pinnata</i>					(Abat et al. 2008)
<i>Nicotiana tabaccum</i>	Griceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (GADPH)	-	155, 159	Metabolismo	(Wawer et al. 2010)
<i>Pisum sativum</i>	Ascorbato peroxidasa (APX)	+	32	Generación/eliminación de ROS	(Begara-Morales et al. 2014)
	Monodeshidroascorbato reductasa (MDAR)	-	68		(Begara-Morales et al. 2015)
	Glutatión reductasa (GR)	=	ND		
<i>Solanum tuberosum</i>	Deshidroascorbato reductasa (DHAR)	-	20, 147		(Kato et al. 2013)

+ incremento de actividad; - disminución de actividad; = sin cambios; ND: no determinado.

Hay que destacar la participación de esta PTM en los eventos de señalización durante las respuestas a variaciones ambientales, ya que está bien establecido que diferentes estreses abióticos pueden inducir la síntesis de SNO. Asimismo, el uso de donadores de NO ha mostrado que la S-nitrosilación regula las actividades de las principales enzimas antioxidantes (Begara-Morales et al. 2019). Además, el desarrollo del método de sustitución del NO de los SNO por biotina (Biotin-switch) (Jaffrey and Snyder 2001) ha permitido identificar proteínas S-nitrosiladas tanto en condiciones fisiológicas como de estrés. La mayoría de las proteínas S-nitrosiladas identificadas están relacionadas con la generación y captación de las ROS. En este sentido, se ha establecido que las plantas mutantes de *Arabidopsis* que acumulan SNO (mutantes defectivos *gsnor1*) regulan positivamente la expresión de genes relacionados con los sistemas antioxidantes y mejoran la capacidad antioxidante del GSH. Todo ello, resalta el papel activo de los SNO en la homeostasis redox, mejorando la capacidad antioxidante y contribuyendo a la tolerancia al estrés mediante el control de los niveles de ROS y evitando la oxidación irreversible de residuos de cisteína críticos (Begara-Morales et al. 2016; Kovacs et al. 2016; Tamura et al. 2015; Begara-Morales et al. 2014).

Sin embargo, existen algunos estudios donde la acumulación de SNO no confiere resistencia al estrés abiótico. Estas contradicciones pueden ser simplemente la consecuencia de la diversidad de los estreses examinados, las diferentes estrategias utilizadas para producir mutantes que acumulen SNO, y las diferencias en la intensidad y / o duración de los estreses aplicados (Fancy et al. 2017).

El estrés salino, el cual se explica en detalle más adelante, es un tipo de estrés que afecta a la homeostasis iónica de las plantas, es el factor medioambiental más estudiado en el campo de los SNO. Este tipo de estrés afecta al metabolismo de los SNO en diferentes especies vegetales como el olivo (Valderrama et al. 2007), el guisante (Begara-Morales et al. 2014; Begara-Morales et al. 2015; Camejo et al. 2013), el tomate (Kubienová et al. 2014; Manai et al. 2014) y los cítricos (Tanou et al. 2009; Ziogas et al. 2013). Varios enfoques con plantas mutantes, han demostrado que el estrés salino induce la expresión de la calmodulina 1 y 4 (CAM1 y CAM4) y estas inhiben la actividad de la GSNOR, lo que conduce a una acumulación de NO y SNO incrementando la tolerancia de la planta al estrés salino (Zhou et al. 2016). Además, el mecanismo de *S*-nitrosilación/denitrosilación también participa en el control de la tolerancia al estrés salino en plantas de girasol, donde se observó un incremento de la *S*-nitrosilación de la monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), inhibiendo su actividad enzimática en los cotiledones y un aumento de la denitrosilación de la MDHAR, potenciándose así su actividad en raíces. En este estudio también se identificó la *S*-nitrosilación de otras proteínas importantes que participan en el metabolismo redox como la ascorbato peroxidasa (APX) y la peroxirredoxina (Prx) (Jain et al. 2018). La regulación negativa de la MDHAR cuando se encuentra *S*-nitrosilada también fue observada en hojas de guisante sometidas a estrés salino, donde además se identificó la cisteína (Cys 68 como residuo responsable de dicha inhibición. Curiosamente, otros componentes del ciclo ascorbato-glutatión como la glutatión reductasa (GR) no ven afectada su actividad por la modificación por *S*-nitrosilación (Begara-Morales et al. 2014). En cambio, la *S*-nitrosilación de la APX, concretamente en la Cys 32, favorece su actividad mientras que la denitrosilación la inhibe. Este comportamiento justifica la importancia de la *S*-nitrosilación de la Cys 32 de la APX durante la respuesta al estrés oxidativo y en la inmunidad vegetal (Begara-Morales et al. 2014; Correa-Aragunde et al. 2015; Yang et al. 2015). Recientemente se ha propuesto la implicación de la *S*-nitrosilación en la regulación de otras modificaciones post-traduccionales como la metilación de proteínas. A este respecto, se ha detectado que la *S*-nitrosilación de la proteína metiltransferasa 5 (PRTM5) en la Cys 125 favorece su actividad, lo que confiere tolerancia al estrés salino (Hu et al. 2017; Gupta et al. 2020).

También cabe destacar la participación de los SNO en el estrés biótico. Concretamente, se ha detectado que la *S*-nitrosilación de la NADPH oxidasa (RBOHD) en la Cys 890 inhibe su actividad, frenándose así la sobreproducción de ROS desencadenada por patógenos (Yun et al. 2011).

2.2.2.2. Nitración de proteínas

La nitración de proteínas es una PTM que puede afectar a dos residuos de aminoácidos: el triptófano o la tirosina. Sin embargo, la nitración de proteínas se lleva a cabo principalmente en los residuos de tirosina. Esta modificación post-traducciona, que puede ser catalizada por el ONOO⁻ o por el NO₂, consiste principalmente en que un grupo nitro se une al grupo hidroxilo del átomo de orto-carbono del anillo aromático de la tirosina, dando lugar a la 3-nitrotirosina (Y-NO₂)

(Fig. 9). El proceso tiene lugar en dos pasos: primero se forma un radical tirosil durante la oxidación de un electrón del anillo aromático. Los principales oxidantes son el OH^\cdot y el $\text{CO}_3^{\cdot-}$, radicales derivados del peroxinitrito. A la oxidación le sigue una reacción de nitración radical-radical en la que el radical dióxido de nitrógeno se agrega al radical tirosil y se forma la Y-NO₂ (Souza et al. 2008; Kolbert et al. 2017).

Las consecuencias funcionales de esta PTM son: 1) la disminución del pKa en el residuo de Y-NO₂ (de 10-10,3 a 7,2-7,5) (Creighton 1993); 2) el incremento de la hidrofobicidad del residuo y, por tanto, cambios estructurales (Souza et al. 2008) y 3) consecuencias espaciales, ya que la Y-NO₂ es más voluminosa que la tirosina, lo que puede conducir a restricciones (Savvides et al. 2002). Debido a estas alteraciones físico-químicas, la estructura y la función de la proteína diana puede cambiar. En sistemas animales, esta PTM es irreversible, pero existen evidencias de una posible actividad Y-NO₂ denitrasa que está implicada en procesos de señalización (Sabadashka et al. 2021). Por el contrario, la mayoría de las proteínas enzimáticas vegetales nitradas examinadas en detalle hasta la fecha muestran pérdida de actividad, lo que indica que la nitración de tirosinas puede ser una señal de degradación (Sainz et al. 2015; Begara-Morales et al. 2015; Corpas et al. 2013; Castillo et al. 2015; Begara-Morales et al. 2013; Begara-Morales et al. 2014; Galetskiy et al. 2011; Lozano-Juste et al. 2011; Kolbert et al. 2017; Kaur et al. 2021).

La nitración de tirosinas afecta a numerosas proteínas de plantas desarrolladas tanto en condiciones fisiológicas como de estrés. Aunque también se considera una PTM altamente selectiva, ya que solo entre el 1-2% de la tirosina total del proteoma (3%) puede experimentar nitración *in vivo* (Bartesaghi et al. 2007). Por lo tanto, el rendimiento total expresado como moles de 3-nitrotirosina/moles de tirosina es bajo, tal y como se determinó en hipocótilos de girasol cultivados en condiciones fisiológicas (Chaki et al. 2009).

Aunque la nitración de tirosinas es una PTM selectiva aún no se conoce la existencia de una secuencia consenso que garantice dicha selectividad (Bartesaghi and Radi 2018). Hasta el momento, se conocen algunas características comunes que parecen afectar la formación de Y-NO₂ como la presencia de residuos ácidos junto al sitio nitración, residuos de cisteína o metionina adyacentes al residuo de tirosina diana y la presencia de aminoácidos formadores de bucles como la prolina o la glicina (Souza et al. 2008). Otros factores adicionales que también influyen en el proceso de nitración, son la posición centrífuga-centrípeta del residuo de tirosina dentro de la estructura tridimensional (3D) de la proteína, el entorno celular y las condiciones redox de la proteína diana (Yeo et al. 2015; Bartesaghi and Radi 2018; Kolbert and Lindermayr 2021).

Hasta la fecha, el nitroproteoma identificado en plantas está asociado con procesos de crecimiento y desarrollo tales como la maduración (Chaki et al. 2015a), la senescencia (Begara-Morales et al. 2013), el crecimiento y la división celular (Jovanović et al. 2010; Mata-Pérez et al. 2016a). También son dianas de nitración las proteínas apopláticas como las peroxidasas, la enolasa y las glicoproteínas extracelulares tanto en condiciones fisiológicas como de estrés osmótico (Szuba et al. 2015)–así como las proteínas similares a las leguminosas A y las poli ADP ribosa polimerasas (Krasuska et al. 2016).

Las situaciones de estrés generan una intensificación en la nitración de tirosinas, tal y como ha sido observado cuando se practican heridas en las hojas de calabaza (Gaupels et al. 2016), bajo el estrés salino en plántulas de girasol (David et al. 2015), en estrés por cadmio en raíz de soja (Gzyl et al. 2016), tras la realización de tratamientos con selenio en plantas de guisantes (Lehotai et al. 2016) o como consecuencia del estrés por zinc en especies de Brassica (Feigl et al. 2015; Feigl et

al. 2016). Estos resultados muestran a la nitración de tirosinas como un biomarcador de estrés nitrooxidativo secundario (Kolbert et al. 2017).

Cabe destacar el papel de la nitración de tirosinas en la regulación de la actividad de las hormonas vegetales y la respuesta al estrés. Concretamente, esta PTM participa en la vía de señalización del ABA, ya que la nitración de los residuos de tirosina de los receptores del ABA (PRY1) da lugar a la degradación de los mismos. En consecuencia, esta PTM puede constituir un mecanismo regulador que limita la capacidad activadora del ABA (León et al. 2014). Además de la nitración de los receptores del ABA, otras proteínas relacionadas con la señalización y biosíntesis de ABA también se han identificado como posibles dianas de nitración, como la E3 SUMO-proteína ligasa SIZ1 y el cofactor de molibdeno de la sulfurasa codificada (Lozano-Juste et al. 2011).

Otra implicación importante de la nitración de tirosinas es su participación en la inmunidad vegetal, actuando a nivel de las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), cuya acumulación en los tejidos vegetales proporciona una línea de defensa eficaz que se activa en respuesta a varios patógenos. Algunas de estas PR se han identificado como dianas de la Y-NO₂, ese es el caso de la quitinasa nitrada (PR-3) identificada en plántulas de *Arabidopsis* (Lozano-Juste et al. 2011), en hojas y raíces de *Citrus aurantium* (Tanou et al. 2012) y en hojas de patata (Arasimowicz-Jelonek et al. 2016) y tabaco (Takahashi et al. 2016); la β-1,3-glucanasa (PR-2) nitrada identificada en hojas de patata (Arasimowicz-Jelonek et al. 2016); y la nitración de PR-1 y PR-5 en hojas de tabaco (Takahashi et al. 2016). Todas las proteínas diana de la nitración se localizan en el apoplasto, por lo que no podemos descartar que la nitración de PR de la planta pueda ser parte de la estrategia ofensiva del patógeno para atacar al huésped (Arasimowicz-Jelonek and Floryszak-Wieczorek 2019).

La nitración de tirosinas también se vincula con la fosforilación de tirosinas en sistemas biológicos. Concretamente, se ha demostrado que ambas PTMs afectan a las funciones de las proteínas citoesqueléticas y causan defectos en la organización de los microtúbulos y la morfología del vello radicular, ya que la fosforilación de Tyr participa en diferentes procesos celulares en plantas, incluida la señalización celular a través de cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Por otra parte, la nitración de las MAPK genera su inhibición, por lo que esta PTM puede proporcionar un mecanismo de retroalimentación negativa para apagar la señalización de las MAPK en plantas (Blume et al. 2008; Vandelle and Delledonne 2011).

2.2.2.3. Nitroalquilación de proteínas por ácidos grasos nitrados

Como se indicó en el apartado 2.2.1., la ausencia de electrones en el β-carbono adyacente al carbono unido al grupo nitrato (α-carbono) convierte a los NO₂-FAs en potentes electrófilos y, por ello, son considerados RLS. Su carácter electrofílico le permite reaccionar con diferentes moléculas nucleofílicas como el glutatión o residuos de aminoácidos proteicos, dando lugar a una modificación post-traducciona conocida como nitroalquilación. Concretamente la nitroalquilación tiene lugar cuando se genera un aducto nitro-lipídico-proteico con la cesión de un par de electrones del nucleófilo (proteína) al electrófilo (NO₂-FA) para formar un enlace covalente, a través de una aducción de Michael (Baker et al. 2007b; Geisler and Rudolph 2012b). Los principales nucleófilos biológicos son los tioles de la cisteína presente en las proteínas y en el GSH, seguidos por el grupo imidazol de la histidina y la amina de la lisina (**Fig. 9**) (Schopfer et al. 2011; Geisler and Rudolph 2012b). Existen múltiples factores que influyen en la reactividad y disponibilidad de los nucleófilos como son los pKa del sulfidril (SH), la nucleofilia, la solubilidad, los enlaces de

hidrógeno intramoleculares, las restricciones estéricas y las diferencias estructurales entre los nitrolípidos (Baker et al. 2007b).

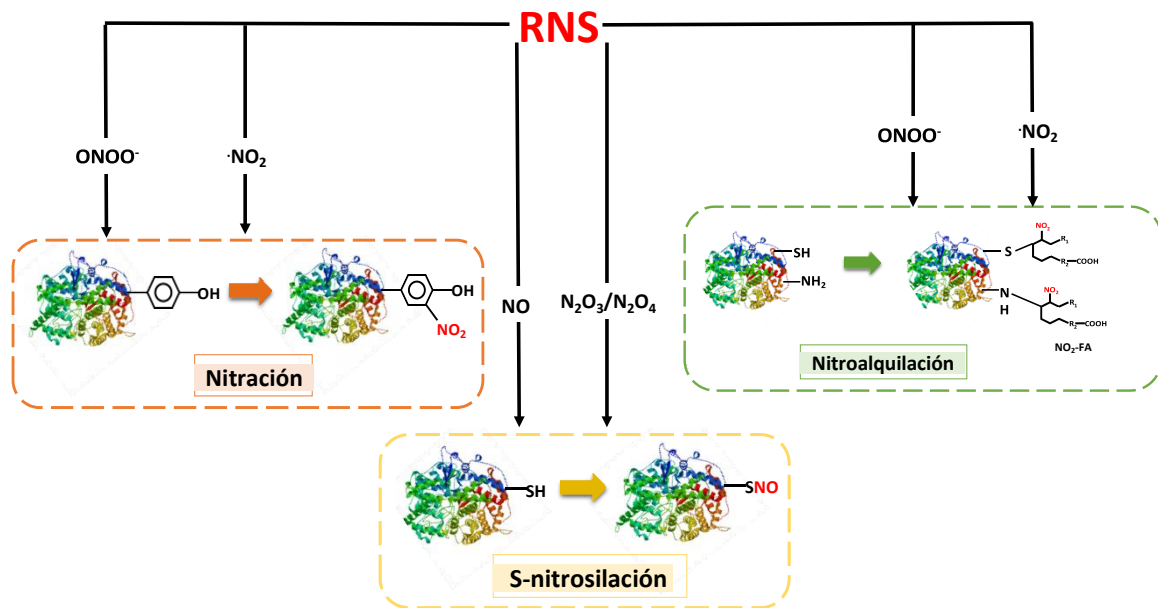


Figura 9. Modificaciones post-traduccionales de proteínas por RNS. Las RNS como el ONOO^\cdot peroxinitrito, el NO_2 , el NO , el N_2O_3 (óxido de nitrógeno (III)) y el N_2O_4 pueden llevar a cabo modificaciones post-traduccionales de proteínas. La nitración de proteínas está catalizada por el ONOO^\cdot o por el NO_2 , los cuales transfieren un grupo nitro al grupo hidroxilo del átomo de orto-carbono del anillo aromático de la tirosina. Estas RNS también pueden nitrar lípidos insaturados dando lugar a la formación de $\text{NO}_2\text{-FAs}$ electrofílicos que son capaces de reaccionar con el tiol de una cisteína o con las aminas primarias o secundarias de la histidina o la lisina de las proteínas, dando lugar a la nitroalquilación. Finalmente, la S-nitrosilación es el resultado de la interacción del NO con el grupo tiol de una cisteína proteica.

Hasta la fecha, se ha detectado la nitroalquilación de cisteínas y de histidinas de proteínas mediante enfoques proteómicos. Los aductos de cisteína son los más relevantes para la señalización de los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ y la regulación de la actividad enzimática (Jobbagy et al. 2019), mientras que los aductos de histidina son más estables (Batthyany et al. 2006; Khoo and Schopfer 2019).

También se conoce que la reacción de nitroalquilación es dependiente del pH. La constante de velocidad de segundo orden para la reacción del $\text{NO}_2\text{-OA}$ y $\text{NO}_2\text{-LA}$ con el GSH aumenta a medida que el pH se acerca al pK_a del tiol del GSH, con velocidades de reacción relativamente constantes a pH 8,9. En cambio, a valores de pH inferiores a 7,2, la reactividad es mínima debido a la protonación del ácido carboxílico del $\text{NO}_2\text{-FA}$, lo que disminuye su solubilidad. Los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ dispersos en medio acuoso o en disolventes polares a valores de pH bajos son turbios, lo que probablemente refleja su distribución micelar, que secuestraría el lípido de la reacción con aniones tiolato más polares. No obstante y, a pesar de todo lo anterior, en general, la mayoría de los tioles y de los $\text{NO}_2\text{-FAs}$, independientemente de sus estructuras específicas y microambientes químicos, son altamente reactivos entre sí (Baker et al. 2007b).

Diversos estudios han demostrado el carácter reversible de la nitroalquilación, característica que le permite actuar como una vía de señalización selectiva en las situaciones de estrés. En estas condiciones, el aumento en los niveles de ROS y RNS podría afectar a la estabilidad

de la nitroalquilación, ya que estos compuestos pueden provocar la oxidación del enlace entre los residuos de azufre y el carbono del NO₂-FA (aducto de Michael) resultando tanto en la generación de sulfóxidos y especies derivadas como en la escisión del aducto de Michael. Este proceso da como resultado la liberación del nitroalqueno y permite que la proteína recupere su estado inicial, ya que la nitroalquilación de una proteína puede influir en su estructura, en su transporte y en su función catalítica (Rudolph and Freeman 2009; Batthyany et al. 2006; Padilla et al. 2017a; Baker et al. 2009).

La reversibilidad de la reacción de los NO₂-FAs es fundamental para su actividad de señalización pleiotrópica. En los sistemas animales, la nitroalquilación se considera un recurso de señalización decisivo en procesos antiinflamatorios. Los NO₂-FAs modifican la respuesta antiinflamatoria a múltiples niveles, que incluyen la expresión génica, la traducción de proteínas (que actúa sobre factores de transcripción y receptores de lípidos), así como la función celular, ya que muchas proteínas inflamatorias contienen numerosos aminoácidos nucleofílicos que pueden ser dianas de la nitroalquilación. La **tabla 5** muestra una lista resumida de las dianas de nitroalquilación en sistemas animales y cómo se ven afectadas por dicha PTM. Todos estos efectos pleiotrópicos de los NO₂-FAs se traducen en acciones citoprotectoras en un amplio grupo de enfermedades tales como la aterosclerosis, la reestenosis, la isquemia-reperusión, el daño renal, la diabetes, el síndrome metabólico, la endotoxemia, la dermatitis y el cáncer de mama triple negativo (Koutoulogenis and Kokotos 2021; Delmastro-Greenwood et al. 2014; Woodcock et al. 2018; Rudolph et al. 2010; Mollenhauer et al. 2018; Wang et al. 2016; Wang et al. 2021).

Tabla 5. Dianas proteicas de los NO₂-FAs en sistemas animales y sus efectos sobre la función proteica (Turell et al. 2018).

Ácido graso nitrado	Proteína	Región/ residuo nucleofílico	Efecto	Referencias
NO₂-OA	GAPDH	Cys catalítica, otras Cys e His	Inhibición, aumento de la hidrofobicidad y cambio en la distribución subcelular	(Batthyany et al. 2006)
	Pro-MMP7 y Pro-MMP9	Cys del sitio activo que coordina el zinc	Liberación de zinc, escisión autocatalítica del pro-dominio. Activación MMP	(Bonacci et al. 2011)
	TRPV1, TRPA1	No detectado	Activación de los canales TRP	(Artim et al. 2011; Sculptoreanu et al. 2010)
	AT1R	No detectado	Disminución del acoplamiento con la proteína G, inhibición de la señalización aguas abajo	(Zhang et al. 2010)
	PknG	Cys del dominio no catalítico que coordina el hierro	Inhibición de la actividad quinasa	(Gil et al. 2013)

	XOR	Pterinditioleno que coordina el molibdeno	Inhibición de las reacciones de transferencia de electrones en el cofactor del molibdeno	(Kelley et al. 2008)
	HSF1	No detectado	Activación del HSFA1 y posterior inducción robusta de genes de choque térmico	(Vihervaara and Sistonen 2014; Kansanen et al. 2009a)
NO ₂ -LA	ANT1	Cys	Cardioprotección	(Nadtochiy et al. 2015)
NO ₂ -CLA	HSA	Cys		(Turell et al. 2017)
NO ₂ -AA	PGHS	Interrupción de la unión del hemo a la proteína	Inhibición de la actividad ciclooxygenasa del PGHS-1 y de la actividad peroxidasa del PGHS-1 y -2	(Trostchansky et al. 2011)
	PKC	Probable modificación covalente	Efecto inhibitorio sobre la activación de PKC	(Bonilla et al. 2013)
	NOX2	Inhibición de ensamblaje	Inhibición de la producción de superóxido	(González-Perilli et al. 2013)
	PDI	Cys y sitio activo	Inhibición de las actividades reductasa y chaperona	(González-Perilli et al. 2017)
NO ₂ -OA y NO ₂ -LA	NF-κB p65	Dominio de unión al ADN	Inhibición de la unión al ADN de NF-κB, abolición de las respuestas proinflamatorias	(Cui et al. 2006)
	PPAR-γ	Cys en el dominio de unión al ligando	Activación agonista de PPARγ	(Schopfer et al. 2010)
NO ₂ -OA, NO ₂ -LA and NO ₂ -AA	Keap1	Cys	Estabilización del complejo con Nrf2, Nrf2 recién sintetizado trasladado al núcleo	(Villacorta et al. 2007; Kansanen et al. 2011; Dinkova-Kostova et al. 2002; Diaz-Amarilla et al. 2016)

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); Pro-metaloproteinasas de matriz, (Pro-MMP7 y Pro-MMP9); Potencial de receptor transitorio (TRPV1, TRPA1); Receptor de angiotensina II (AT1R); Proteína quinasa G (PknG); Factor de choque térmico 1 (HSF1); Translocasa 1 de nucleótido de adenina (ANT1); Albúmina de suero humano (HSA); Prostaglandina endoperóxido H sintasa (PGHS); Proteína quinasa C (PKC); NADPH oxidasa 2 (NOX2); Proteína disulfuro isomerasa (PDI); Subunidad p65 del factor nuclear B (NF-B p65); Receptor activado de la proliferación de peroxisomas (PPAR-γ); Proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (Keap 1).

La mayoría de estudios sobre el efecto biológico de los NO₂-FAs por nitroalquilación solo se habían centrado en proteínas individuales bien caracterizadas y aún no se ha estudiado el alcance general de la nitroalquilación. En un trabajo reciente se han caracterizado las dianas proteicas de los NO₂-FAs en células vivas de mamíferos utilizando una estrategia de quimioproteómica-basada en la utilización de una sonda de nitro-oleato. En este contexto, se han identificado proteínas nitroalquiladas en macrófagos, algunas ya conocidas como KEAP1 y STING; proteínas

transmembrana localizadas en el retículo endoplásmico y membranas nucleares, proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos y proteínas transportadoras. Este estudio proporciona el primer perfil global de dianas proteicas de los NO₂-FAs en células vivas y es un recurso muy útil para comprender las actividades biológicas pleiotrópicas de los NO₂-FAs (Fang et al. 2021).

Aunque los efectos de la nitroalquilación se están estudiado ampliamente en organismos animales, el impacto de la acción de los NO₂-FAs en las plantas, aún no ha sido explorada, convirtiéndose así en una interesante área de investigación.

3. Funciones fisiológicas del óxido nítrico durante el desarrollo de la planta

El NO es considerado un regulador multifuncional de importantes procesos de las plantas, como el crecimiento, el desarrollo y la respuesta ambiental (**Fig. 10**).

En 1996, se descubrió que el NO regulaba el crecimiento de las plantas, ya que, se detectó la liberación simultánea de NO y etileno en plantas de guisante senescentes. En estas plantas se observó que las bajas concentraciones de NO reducían el efecto de los niveles de etileno, evidenciándose de esta manera, la interacción entre el NO y las fitohormonas (Ya'Acov and Haramaty 1996). En plantas de tabaco, se detectó que el NO inducía la expresión génica de procesos dependientes del ácido salicílico (SA) (Durner et al. 1998). Más tarde, se determinó que el efecto que ejercía el NO sobre el crecimiento era dosis-dependiente (Gouvea et al. 1997; Beligni and Lamattina 2000). En base a estos descubrimientos, el NO puede ser considerado una fitohormona no clásica, ya que la señal para llevar a cabo su función es independiente de receptores específicos y el rango de concentración efectiva es mayor que el establecido para las fitohormonas clásicas. De esta manera, el NO puede actuar como un regulador del crecimiento no clásico que actúa en combinación con las fitohormonas clásicas durante los procesos de crecimiento y desarrollo (**Fig. 10**) (Beligni and Lamattina 2001a; Beligni and Lamattina 2001b; Shapiro 2005; Lamattina and Polacco 2007).

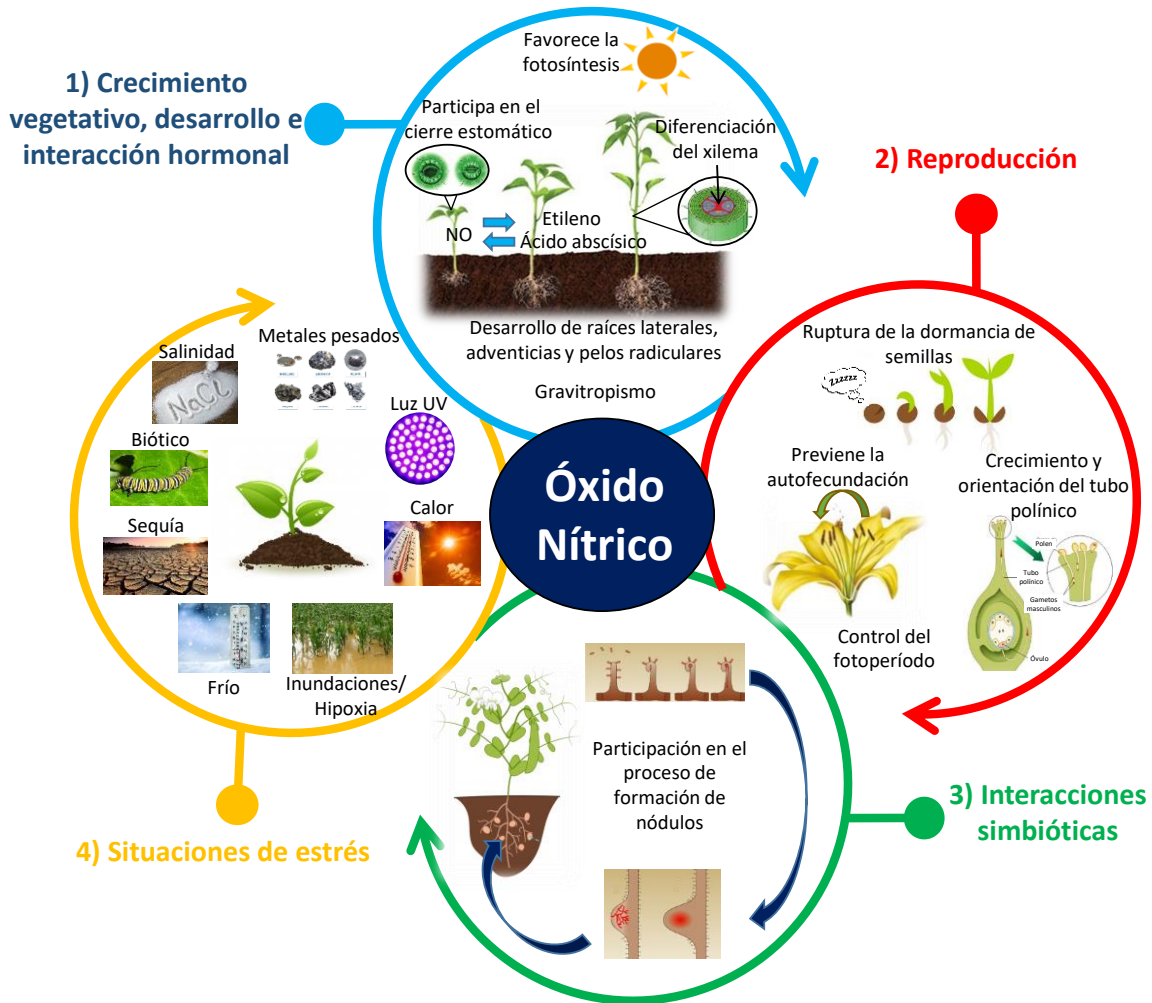


Figura 10. Funciones fisiológicas del NO. 1) El NO es capaz de interactuar con fitohormonas relacionadas con el crecimiento y el desarrollo de la planta, como el etileno y el ácido abscísico; participa en el desarrollo y en el gravitropismo de las raíces; interviene en la diferenciación del xilema; favorece la fotosíntesis; y participa en el cierre de los estomas. 2) El NO está implicado en la ruptura de la dormancia de las semillas; participa en el crecimiento y orientación del tubo polínico; previene la autofecundación promoviendo así la variabilidad genética; y es capaz de controlar el fotoperíodo. 3) El NO participa en todas las fases del proceso de formación de los nódulos. 4) Importante papel señalizador del NO en diferentes situaciones de estrés tanto biótico como abiótico.

Actualmente, los esfuerzos científicos se están centrando en conocer los mecanismos moleculares a través de los cuales el NO interviene en el crecimiento de la planta. Uno de estos mecanismos que está involucrado en la señalización hormonal y, por tanto, en el crecimiento, es la S-nitrosilación de moléculas dependiente de NO. En este sentido, se han publicado trabajos relacionados con el gen 1 no expresor relacionado con la patogénesis (NPR1) (Tada et al. 2008), la proteína de unión al ácido salicílico (SABP3) (Wang et al. 2009a; Wang et al. 2009b), el receptor de auxina (TIR1) (Terrile et al. 2012), el transductor de señal de citoquinina (AHP1) (Feng et al. 2013), el factor de transcripción ABI5 (Albertos et al. 2015) y la quinasa relacionada con la fase S (SKP1) (Iglesias et al. 2018).

Otra función del NO es su participación en el desarrollo de las raíces laterales y adventicias y de los pelos radiculares. Para ello, la auxina induce la señalización del NO, el cual es responsable del control de los genes reguladores del ciclo celular que inducen el desarrollo de las raíces laterales. Para la formación de raíces adventicias los efectos señalizadores del NO se pueden resumir en: 1) la activación de la guanilato ciclasa (GC) que, a su vez, aumenta los niveles de GMP cíclico (GMPc), 2) la formación de ácido fosfatídico (PA) a través de la actividad de la fosfolipasa D (PLD), 3) la activación de la cascada de señalización de la MAPK y 4) el aumento de la concentración de Ca^{2+} . Estas dos últimas vías de señalización también participan en la formación de los pelos radiculares (**Fig. 10**) (Pagnussat et al. 2003; Pagnussat et al. 2004; Del Castello et al. 2019). Además, el gravitropismo de las raíces también se encuentra regulado por la acumulación en raíz de GMPc y NO inducidos por auxinas (**Fig. 10**) (Hu et al. 2005).

Mediante técnicas de microscopía confocal se estableció que las células vegetales que están predeterminadas para trans-diferenciarse irreversiblemente en elementos de xilema, muestran un incremento en la producción de NO, confirmando así la participación del NO en el proceso de diferenciación del xilema (**Fig. 10**) (Gabaldón et al. 2005).

Se ha observado que la aplicación exógena de dosis bajas de NO genera un incremento en la tasa fotosintética, en el contenido en clorofilas y en la conductancia estomática, en definitiva, promueve la fotosíntesis (**Fig. 10**) (Beligni and Lamattina 2000; Hayat et al. 2011; Fan et al. 2007; Sami et al. 2018). En cambio, dosis elevadas de NO ocasionan la inhibición de la fotosíntesis, a través de la S-nitrosilación de la Rubisco y la disminución de la actividad de las enzimas fotosintéticas (Hill and Bennett 1970; Lum et al. 2005; Abat et al. 2008; Sami et al. 2018).

El NO desempeña un importante papel en la modulación funcional de las células-guarda estomáticas. Estas células se encargan de optimizar el uso del agua y la absorción de CO_2 a través del cierre de los estomas de las hojas. En este caso, el NO actúa como mensajero secundario durante el cierre estomático inducido por las hormonas. En las células guarda de varias especies, como *Arabidopsis*, Vicia y guisante, la exposición a ABA o a metil jasmonato o incluso a ciertos inductores microbianos como, por ejemplo, el quitosano, inducen la producción de NO, así como de ROS. El papel del NO en el cierre estomático se ha confirmado mediante el uso de donadores de NO, como el nitroprusiato sódico (SNP), de secuestradores de NO, como el cPTIO (2- (4-carboxifenil) -4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido) y de inhibidores de la NOS (L-NAME: L-N ω -nitroarginina metilo de éster) o de la NR (tungstato). La transducción de señales que conduce al cierre estomático en las células guarda implica la participación de otros componentes, además del NO, como el pH citosólico, las ROS, las moléculas de Ca^{2+} libre y los fosfolípidos. El uso de colorantes fluorescentes ha revelado que el aumento de NO en las células guarda ocurre después del aumento del valor del pH citoplasmático y de los niveles de ROS. El aumento de NO provoca una elevación en las concentraciones de Ca^{2+} libre citosólico promoviéndose así el flujo de salida de cationes y aniones de las células guarda (**Fig. 10**) (García-Mata and Lamattina 2002; Gonugunta et al. 2008; Islam et al. 2010; Saito et al. 2009; Liu et al. 2005; Distéfano et al. 2012; Gayatri et al. 2013).

Más allá del crecimiento vegetativo, el NO también participa en el ciclo reproductivo, desde el desarrollo de las flores hasta a la germinación de las semillas (**Fig. 10**) (Zafra et al. 2010; Šírová et al. 2011; Zhou and Zhang 2014).

Los primeros trabajos se centraron en la germinación de las semillas, en ellos se utilizaron donadores de NO, como el SNP y SNAP, rompían la dormancia. Estos estudios también determinaron que las altas concentraciones de SNP inhibían la germinación (Bethke et al. 2004a; Bethke et al. 2006).

Este comportamiento se corroboró mediante la aplicación directa de gas de NO sobre la semilla en sustitución de los donadores (**Fig. 10**) (Libourel et al. 2006). Más tarde, se exploró la similitud entre los procesos de germinación de las semillas y de las esporas de los helechos. En ambos procesos juega un papel fundamental la creación de un gradiente de calcio en la zona apical de la semilla que es donde se inicia el crecimiento, siendo esta zona la encargada de anexionar las vías de señalización con otros elementos como la calmodulina, el NO, las aneoxinas y las GTPasas. Por tanto, la interacción del calcio, el NO y otros efectores tanto en la semilla como en las esporas de los helechos sugiere la importancia de ciertas vías de señalización en la regulación de la germinación y el crecimiento temprano en la evolución de las plantas terrestres (Bushart and Roux 2007). Finalmente, se ha descubierto que el NO rompe la dormancia de las semillas a través de la S-nitrosilación de ABI5 (Albertos et al. 2015).

Otro papel clave del NO es su intervención en los procesos de crecimiento y orientación del tubo polínico junto con la señalización mediada por el GMPc (**Fig. 10**) (Prado et al. 2004; Feijó et al. 2004). Paralelamente, se determinó la presencia de ROS y de la enzima peroxidasa en la zona del estigma, que es el área encargada de recibir el polen durante la polinización (McInnis et al. 2005; McInnis et al. 2006). Curiosamente, los niveles de ROS generadas en el estigma disminuyen en presencia del polen, el cual presenta niveles elevados de NO, lo que sugirió una controversia entre las ROS y la señalización de NO. Por un lado, las ROS pueden servir de protección para el estigma, mientras que, por otro, el NO puede disminuir esta protección permitiéndose así la germinación del polen (McInnis et al. 2006). Continuando con la investigación sobre el polen, el NO parece afectar directamente a la orientación de los tubos polínicos hacia el micropilo del óvulo al modular la acción de sus factores difusibles (Prado et al. 2008). Cabe señalar que en plantas se ha detectado un análogo del ATP poco hidrolizable denominado ATP- γ -S, que inhibe tanto la germinación del polen como la elongación del tubo polínico. En sistemas vegetales, un aumento del ATP- γ -S induce un incremento de los niveles de NO celular, esto conduce a que agonistas químicos de la vía de señalización del NO reduzcan el umbral de ATP- γ -S, y por ende, permitan la germinación del polen y el alargamiento del tubo polínico (Reichler et al. 2009). Otros estudios muestran que el NO también afecta a la configuración y distribución de los componentes de la pared celular de los tubos polínicos al alterar la entrada de iones de calcio extracelular y la organización de la actina F (Wang et al. 2009b; Wang et al. 2009a).

La localización de NO y ROS dentro de los órganos reproductivos fue identificada por primera vez en plantas de olivo. Las mayores concentraciones de NO y ROS se detectaron en el estigma, las anteras y el polen muestran la mayor concentración tanto de NO como de ROS. En cambio, el estilo y el ovario no presentaban ni NO ni ROS (Zafra et al. 2010).

También cabe destacar la participación del NO en la prevención de la autofecundación, que es un proceso que permite a las plantas llevar a cabo una reproducción sexual exitosa asegurando la variabilidad genética. La prevención de la autofecundación se produce cuando se desencadena un incremento de ROS y NO, entre otros, en el polen auto-incompatible. Esto genera una desestabilización celular que conduce a la muerte celular programada (MCP), a este proceso se le denomina autoincompatibilidad (**Fig. 10**) (Serrano et al. 2015).

Con el objeto de analizar el efecto del NO en el proceso de floración, se utilizaron plantas mutantes que, o bien generaban un exceso de NO o mostraban una síntesis limitada del mismo. En este tipo de mutantes se observó que la sobreproducción de NO retrasaba la floración, y en cambio, la disminución del contenido en NO, la adelantaba. Este efecto era consecuencia de la modulación de la expresión génica llevada a cabo por el NO, ya que el NO suprime la expresión de los genes CONSTANS y GIGANTEA y mejora la expresión del FLOWERING LOCUS C, lo que indica que el NO regula el fotoperíodo (**Fig. 10**) (He et al. 2004). Más tarde, se identificó que el ácido ascórbico, molécula encargada de la homeostasis

redox en el proceso de floración, desencadenaba un aumento en los niveles de NO como consecuencia de un incremento de las actividades enzimáticas de la NR y la NiR durante la represión floral (etapa de inhibición de la floración de la planta hasta que esta alcanza la madurez). Asimismo, se observó una reducción significativa de las actividades enzimáticas de NR y NiR y los niveles de NO durante la etapa de floración. Todo ello sugiere que el NO controla la transición de fase y el proceso de floración en conjunción con el ácido ascórbico (Kumar et al. 2016).

Otro papel importante del NO es su participación en las interacciones simbióticas. Un conjunto de estudios muestra que el NO se produce, al menos, en cuatro etapas fisiológicas de la simbiosis: durante las primeras horas de la interacción entre la planta y las parejas bacterianas, al inicio de la organogénesis de los nódulos, cuando los nódulos alcanzan la madurez y durante el proceso de senescencia (**Fig. 10**) (Nagata et al. 2008; Fukudome et al. 2016; Berger et al. 2019; Baudouin et al. 2006; Horchani et al. 2011; Shimoda et al. 2009; Calvo-Begueria et al. 2018; Fukudome et al. 2019; Del Giudice et al. 2011). El NO observado en las interacciones simbióticas procedía tanto de las vías oxidativa como reductora (Hichri et al. 2015; Hichri et al. 2016; Leach et al. 2010). Durante la interacción simbiótica, el NO actúa como molécula señal, como un metabolito, pero también como un compuesto tóxico (Mur et al. 2013b; Hichri et al. 2016). En las leguminosas existen más de 400 genes que son regulados por NO durante el proceso simbiótico, incluyendo genes involucrados en el desarrollo de los nódulos que normalmente son inducidos por el simbionte. Estos hallazgos sugieren que NO participa también en la transducción de señales durante la interacción planta-simbionte (Ferrari et al. 2008; Boscari et al. 2013). Sin embargo, los niveles elevados de NO pueden tener efectos tóxicos o inhibidores durante el proceso de simbiosis, ya que podrían afectar al crecimiento del rizobio a través de la inhibición tanto de la expresión como de la actividad de la nitrogenasa bacteriana, además de desencadenar la senescencia del nódulo (Sánchez et al. 2010; Meilhoc et al. 2010; Cam et al. 2012). Por el contrario, el NO también presenta una función metabólica beneficiosa en estos procesos al participar en el ciclo respiratorio de la fitoglobina/NO que permite la regeneración del ATP bajo condiciones hipóxicas (Igamberdiev and Hill 2009; Igamberdiev et al. 2010; Gupta and Igamberdiev 2011).

1.1. Papel de los ácidos grasos nitrados durante el desarrollo de la planta

La presencia de los NO₂-FAs y sus posibles eventos de señalización en sistemas vegetales es aún un área del conocimiento poco estudiada. Un estudio pionero, logró por primera vez la detección endógena de NO₂-FAs en *Arabidopsis thaliana* mediante técnicas de espectrometría de masas. Aunque en este estudio se buscaron tres NO₂-FAs, el NO₂-OA, el NO₂-LA y el NO₂-Ln, solo se detectó la presencia del NO₂-Ln. Este resultado está asociado con una mayor presencia del precursor del NO₂-Ln, el ácido linolénico (Ln) con respecto al contenido de los ácidos oleico y linoleico. Para conocer el papel señalizador del NO₂-Ln en *Arabidopsis*, se analizó la modulación del mismo durante el desarrollo de la planta. Este trabajo mostró que los niveles de NO₂-Ln disminuyen durante el desarrollo y en la senescencia. Las concentraciones más elevadas se encontraron en semillas mientras que los niveles más bajos se localizaron en hojas de 30 y 45 días (**Tabla 6**) (Mata-Pérez et al. 2016b). Este mismo comportamiento se ha observado recientemente en el contenido en NO₂-OA en *Brassica napus*, donde el ácido oleico es el principal precursor de NO₂-FAs. En este estudio, también aparece la semilla como el principal reservorio de NO₂-OA, mientras que su concentración disminuye en plántulas de 2 y

6 días (**Tabla 6**) (Vollár et al. 2020b). Curiosamente, el rango de concentraciones detectado en los dos estudios difirió, ya que la concentración del NO₂-OA en semillas de Brassica resulta aproximadamente 150 veces superior a la de NO₂-Ln detectada en semillas de Arabidopsis (Begara-Morales et al. 2021a).

Tabla 6. Niveles endógenos de NO₂-FAs durante el desarrollo de diferentes especies vegetales.

Especie vegetal	NO ₂ -FA	Estadio de crecimiento	Concentración (pmoles/g PF)	Referencias
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NO ₂ -Ln	Semilla	11,18	(Mata-Pérez et al. 2016b)
		Plántulas de 14 días	3,84	
		Hojas de 30 días	0,36	
		Hojas de 45 días	0,54	
<i>Brassica napus</i>	NO ₂ -OA	Semilla	1700	(Vollár et al. 2020b)
		Plántulas de 2 días	370	
		Plántulas de 7 días	626	
		Brotos de 7 días	347	
		Raíces de 7 días	426	

PF: peso fresco

Ambos estudios evidencian la relevancia de los NO₂-FAs durante la primera etapa del desarrollo de las plantas, y en concreto en la semilla. Aunque, las investigaciones deben seguir profundizando en el estudio del papel señalizador que llevan a cabo los NO₂-FAs en esta etapa, numerosas evidencias científicas apuntan hacia su participación como donadores de NO, indiscutiblemente implicado en la germinación, y como inductores de modificaciones post-traduccionales de proteínas por nitroalquilación (Begara-Morales et al. 2021a; Vollár et al. 2020b; Signorelli and Considine 2018). Otro trabajo reciente ha demostrado que la aplicación exógena del NO₂-OA inhibe los procesos mitóticos de las células y, por ende, la división celular, reduciéndose así el crecimiento de la raíz primaria en Arabidopsis (Di Fino et al. 2020).

En definitiva, aunque aún es preciso ahondar en el estudio de estas moléculas, los avances realizados en estos últimos años han demostrado que la presencia de los NO₂-FAs en el reino vegetal es amplia. Además de la identificación endógena de NO₂-FAs en Arabidopsis y Brassica (**Tabla 6**), el NO₂-Ln se ha detectado en hojas de arroz (*Oryza sativa*) (0,748 pmol/g PF) y en raíces de guisante (*Pisum sativum*) (0,072 pmol/g PF). Además, en hojas de guisante se ha detectado la presencia de NO₂-Ln en diferentes orgánulos celulares como mitocondrias (0,084 pmol/g PF) y peroxisomas (0,282 pmol/g PF) (Mata-Pérez et al. 2017).

4. Implicación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en las situaciones de estrés

El estrés es una de las principales causas que generan pérdidas persistentes en la producción agraria afectando gravemente a la generación de biomasa y a la supervivencia de la mayoría de los cultivos, ya que ejerce numerosos efectos perjudiciales sobre el crecimiento y el desarrollo de las plantas. El estrés puede ser promovido por factores abióticos (físicos, químicos o ambientales) o bióticos (agentes biológicos o patógenos). La respuesta de las plantas a las situaciones de estrés desencadena una alteración de la homeostasis redox. Estas situaciones adversas se caracterizan por una rápida explosión de moléculas redox, pertenecientes a los grupos de las ROS y RNS, las cuales actúan como señales moleculares que activan los mecanismos de defensa. Dentro del grupo de las ROS

cabe destacar el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el O_2^- , el H_2O_2 y el OH^\cdot . Cuando el estrés persiste en el tiempo, la elevada concentración de ROS y RNS puede sobrepasar la capacidad de protección de los sistemas antioxidantes, perturbando así la homeostasis redox celular. Esta situación puede inducir un estrés nitro-oxidativo que finalmente causa daño celular y compromete la supervivencia de la planta (Valderrama et al. 2019; Chaki et al. 2021).

En numerosas situaciones de estrés se han detectado interacciones entre las ROS y las RNS. Este comportamiento ha sido evidenciado concretamente entre el H_2O_2 y el NO. Ambas moléculas señalizadoras, que a veces se producen de manera interdependiente, y pueden influir en la síntesis de las demás y están presentes simultáneamente durante diferentes procesos fisiológicos y de estrés. Además, el hecho de que puedan reaccionar entre ellas refuerza su interacción. Por lo tanto, la estrecha interacción entre estas dos moléculas tanto en condiciones fisiológicas como de estrés es muy importante para modular las respuestas celulares (Valderrama et al. 2019; Molassiotis and Fotopoulos 2011). A continuación, se describe la acción de las ROS y las RNS durante diferentes tipos de estreses tanto bióticos como abióticos.

4.1. Estrés biótico

Infección por patógenos

El estrés biótico consistente en la infección de la planta por patógenos desencadena una serie de respuestas en las cuales juegan un papel sumamente importante tanto el NO como las ROS (**Fig. 10**). A este respecto, cabe mencionar el efecto de ambas moléculas sobre la función de la proteína NPR1 proteína clave en la resistencia sistemática adquirida (SAR). Cuando la planta es atacada por un patógeno, se produce la translocación del NPR1 al núcleo donde, tras adquirir forma monomérica, desencadena la expresión de los genes de defensa. La regulación del estado oligomérico de la NPR1 está controlada por el NO, a través de una modificación por S-nitrosilación (Tada et al. 2008; Lindermayr et al. 2010), y por las ROS, las cuales inhiben el proceso de translocación (Peleg-Grossman et al. 2010). Utilizando líneas de plantas transformadas con la óxido nítrico sintasa neuronal de mamíferos (nNOS) se obtuvieron plantas con altos niveles de NO y de ROS. Los estudios realizados con las plantas resultantes evidenciaron la importancia del NO en el desarrollo de la SAR, a través de su participación en las vías de señalización del etileno, del ácido salicílico y del ácido jasmónico (**Fig. 11**) (Chun et al. 2012; Shi et al. 2012; Mur et al. 2013a).

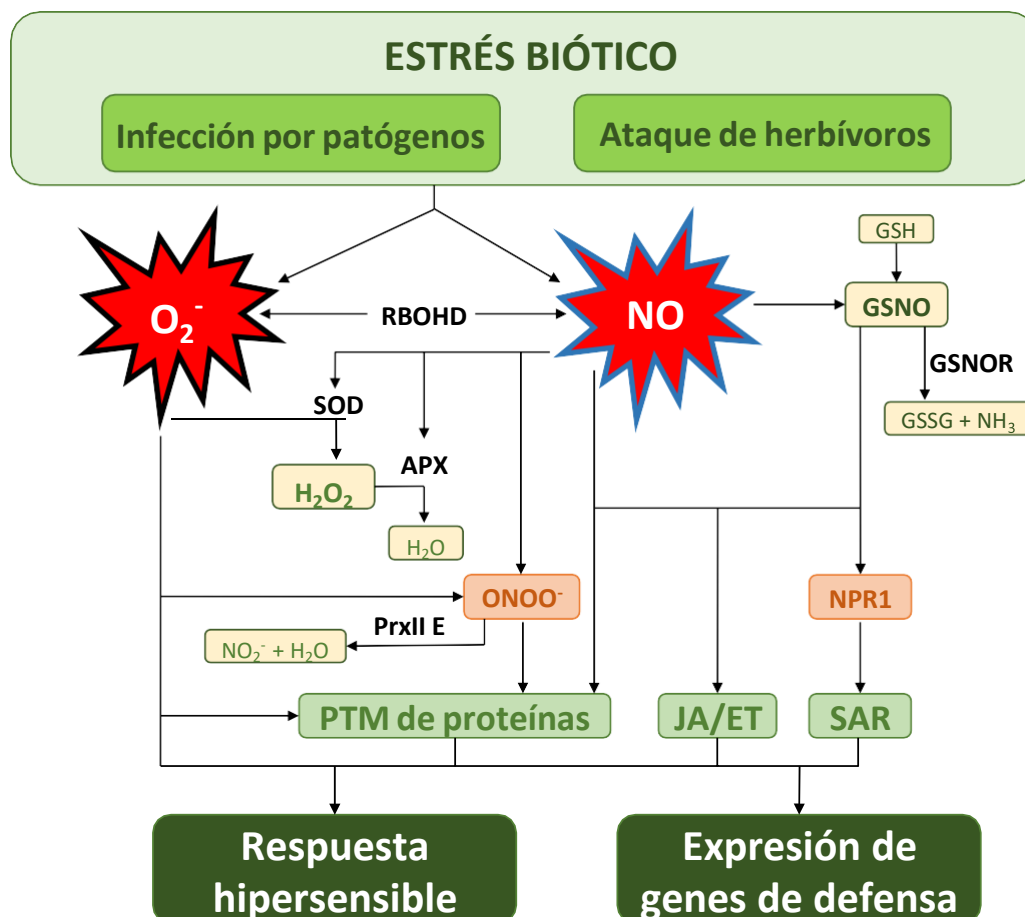


Figura 11. Representación esquemática de las interacciones del óxido nítrico (NO) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el estrés biótico de las plantas. La infección por patógenos y el ataque de herbívoros ocasiona la síntesis de NO y O₂⁻. Durante la infección por patógenos, la enzima RBOHD, principal fuente de O₂⁻, puede ser inhibida por S-nitrosilación. El NO puede reaccionar con el GSH para formar GSNO, el cual es un depósito natural de NO, que participa en la señalización de NO y puede degradarse aún más a GSSG y NH₃ por acción de la GSNOR. El NO participa en las vías de señalización dependientes del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET). También es un regulador clave de la SAR a través de la regulación del sistema NPR1. El NO y el O₂⁻ pueden mediar directamente las PTM o reaccionar juntos para formar el ONOO⁻, compuesto muy reactivo responsable de la PTM por nitración de tirosinas y que, posiblemente, es degradado por la peroxiredoxina II E (PrxII E). Se puede producir H₂O₂ a partir del O₂⁻ por acción de la superóxido dismutasa (SOD), y este puede ser degradado aún más por la APX. Ambas enzimas son sensibles al NO. Todas estas vías de señalización mediadas por el NO y por las ROS conducen al desarrollo de mecanismos de defensa en las plantas a través de la modulación de la expresión de los genes de defensa y el control de la respuesta hipersensible (Imagen modificada de (Scheler et al. 2013).

Durante el ataque de la planta por patógenos, el NO puede reaccionar con O₂⁻ para formar ONOO⁻, siendo esta molécula un compuesto común de la señalización de ROS y NO, que puede dañar lípidos, proteínas y ADN, y, además, ocasionar la modificación post-traduccionales denominada nitración de tirosinas (Vandelle and Delledonne 2011; Astier and Lindermayr 2012). Entre otros mecanismos, los niveles celulares de peroxinitrito están regulados por las Prx. De hecho, en *A. thaliana* la actividad peroxidasa y reductasa de la PrxII E se inhibe por S-nitrosilación durante el

estrés biótico, potenciando los efectos nocivos del peroxinitrito en este tipo de situaciones (**Fig. 11**) (Romero-Puertas et al. 2007).

Otro proceso que se desencadena durante este tipo de estrés biótico es la modulación de la producción de ROS dependiente del NO. En diversos trabajos científicos se ha observado que la actividad de la proteína responsable de la producción de ROS durante la infección del patógeno, RBOHD, es inhibida por S-nitrosilación (Yun et al. 2011; Suzuki et al. 2011). En cambio, en otros estudios, se ha demostrado que la producción de NO es necesaria para inducir la acumulación de H₂O₂ (Rasul et al. 2012). Estos resultados aparentemente contradictorios revelan la regulación compleja y estricta de la señalización de NO y ROS durante las respuestas de defensa de las plantas, las cuales, además dependen del modelo de infección considerado (**Fig. 11**) (Scheler et al. 2013).

Adicionalmente, la regulación de la producción de ROS por el NO modula el desarrollo de la respuesta hipersensible (HR). Esta respuesta está involucrada en la defensa de la planta a través de la activación de la muerte celular programada (Yun et al. 2011). Concretamente, la respuesta hipersensible está modulada por el estrecho equilibrio entre el NO y las ROS producidos durante la infección por el patógeno, en lugar de por estas moléculas individualmente (**Fig. 11**) (Delledonne et al. 2001; Monjil et al. 2013; Chen et al. 2014).

Desde el punto de vista del patógeno, la función del NO y de las ROS presenta otra perspectiva. Durante la infección, el patógeno *Botrytis cinerea* produce NO que puede difundir hacia a los tejidos vegetales y participar en la inducción de la respuesta hipersensible, favoreciendo la muerte celular de los tejidos vegetales (Turrión-Gómez and Benito 2011). Del mismo modo, el patógeno del arroz, *Magnaporthe oryzae*, y el hongo, *Blumeria graminis*, producen NO que modula el desarrollo del germen, concretamente, el NO participaría en el desarrollo de unas estructuras de infección especializadas llamadas apresorios y en su patogenicidad (Samalova et al. 2013; Prats et al. 2008). El avance en los estudios de la función del NO producido por patógenos pertenecientes a los reinos Chromista y Fungi indican claramente que el NO es una importante molécula reguladora que controla no solo los procesos de desarrollo, sino también la virulencia de los patógenos y su supervivencia en el huésped. Específicamente, el NO participa en diversos procesos de desarrollo como la esporulación, la germinación y la formación de cuerpos fructíferos, además de participar en la producción de toxinas y en la diferenciación de diversas estructuras infecciosas del patógeno (Arasimowicz-Jelonek et al. 2016).

De manera similar, las ROS también son producidas por el patógeno durante el proceso de infección y estas involucradas en su patogenicidad (Egan et al. 2007).

Ataque de herbívoros

El NO también desempeña un papel muy importante en la generación de heridas y lesiones en plantas como las que tienen lugar durante el ataque por organismos herbívoros y aunque, hasta la fecha, los resultados obtenidos son complejos y contradictorios. Existen estudios donde se ha identificado un incremento de los niveles de NO y de ROS en las plantas, tras la agresión de los herbívoros (**Fig. 10**) (Bricchi et al. 2010; Lin et al. 2011). Sin embargo, la

producción de NO y ROS difiere según el método de herida utilizado; las plantas que muestran lesiones por herbívoros presentan mayores niveles de NO y ROS que las plantas que han sido dañadas mecánicamente (Bricchi et al. 2010).

Las variaciones observadas en la producción de NO y ROS dependiendo del método de herida empleado son compartidas en estudios sobre la enzima GSNOR durante las interacciones planta/herbívoro (Chaki et al. 2011; Wünsche et al. 2011). La GSNOR y su sustrato, el GSNO, están íntimamente implicados en la respuesta de la planta contra el ataque de herbívoros, ya que, la actividad GSNOR está vinculada con fitohormonas de defensa como el ácido jasmónico y el etileno (**Fig. 11**) (Wünsche et al. 2011).

En plantas de *A. thaliana* dañadas mecánicamente se ha demostrado que los niveles de GSNO aumentan rápida y uniformemente en las hojas de Arabidopsis lesionadas, mientras que, en las hojas sistémicas, el GSNO se detectó primero en los tejidos vasculares y luego se extendió por el parénquima, lo que sugiere que el GSNO está involucrado en la transmisión de la señal móvil de la herida a través del tejido vascular. Además, se ha demostrado la necesidad de la acumulación de GSNO para la activación de las respuestas a las heridas dependientes del JA así como para la puesta en marcha de los mecanismos de resistencia sistémica adquirida (**Fig. 11**) (Espunya et al. 2012).

Las heridas mecánicas producidas en las plantas generan un incremento de los niveles de NO y H₂O₂, tal y como se ha mencionado anteriormente. Este NO estimula la activación de enzimas antioxidantes como la SOD y la APX. Esta activación contrarresta la producción de H₂O₂ desencadenada por las heridas, protegiendo así a las células de una muerte celular inducida por ROS (**Fig. 11**) (Lin et al. 2011).

4.2. Estrés abiótico y condiciones ambientales adversas

Estrés por metales pesados

Las principales amenazas para las plantas por metales pesados y metaloides están relacionadas con la exposición al cadmio (Cd), arsénico (As), plomo (Pb) y cobre (Cu). En determinadas circunstancias, pueden aparecer bajas concentraciones de metales pesados en suelos y aguas subterráneas o pueden bioacumularse en redes alimentarias, lo que representa una amenaza para la agricultura y para la salud humana (Gall et al. 2015; Luo et al. 2012). Una exposición aguda y crónica de las células vegetales a metales pesados induce la producción tanto de ROS como de RNS (**Fig. 10**), desarrollándose así un estrés nitroxidativo, que potencialmente conduce a una toxicidad por metales pesados, la inhibición del crecimiento, la aceleración de la senescencia, la inhibición de la absorción de nutrientes o la muerte celular (**Fig. 12**) (Gallego and Benavides 2019).

El óxido nítrico es clave en la respuesta al estrés por metales pesados, especialmente aliviando la toxicidad causada por los mismos. En los últimos años, los avances científicos han señalado que el exceso de metales pesados y metaloides podría estar afectando a la acumulación y producción del NO endógeno de las plantas (**Fig. 12**) (Wei et al. 2020).

● Cadmio

El cadmio es un metal pesado con gran toxicidad que inhibe los procesos fisiológicos de las plantas incluso a muy bajas concentraciones. Cada vez más estudios demuestran que el estrés por Cd puede inducir o reducir la producción de NO endógeno, pudiendo tener un resultado positivo o negativo en el crecimiento y desarrollo de las plantas, respectivamente.

En este sentido, se ha publicado que el tratamiento de las plantas con Cd puede causar un rápido aumento en el contenido de NO, acelerando la muerte celular programada (MCP) (De Michele et al. 2009; Arasimowicz-Jelonek et al. 2012). Los mismos autores encontraron que tras el pre-tratamiento con un inhibidor de la síntesis de NO, el L-NAME, se observaba una disminución en la producción de NO inducida por el Cd y, además, se producía una bajada en la toxicidad causada por el metal. Del mismo modo, en otro estudio se observó que las células que presentaban niveles altos de NO resultaban más sensibles a la toxicidad del Cd, además de mejorar y mostraban una mayor inducción de la MCP (Ma et al. 2010). Por el contrario, el uso de L-NAME y de un secuestrador específico de NO, cPTIO, no solo inhibía la producción de NO sino que también disminuía la acumulación de Cd y evitaba la MCP inducida por dicho metal pesado. De acuerdo con los resultados anteriores, es evidente que, el NO juega un papel positivo en los procesos de MCP inducidos por el Cd agravando, por tanto, la toxicidad del mismo. El Cd ejerce sus efectos tóxicos después de entrar a la planta. Por lo tanto, el mecanismo por el cual el NO podría modular la MCP podría pasar por la facilitación de la entrada del Cd y así promover su acumulación en las plantas (Wei et al. 2020). Mediante técnicas de espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR), se ha observado que la generación de NO endógeno inducido por el Cd, causa el acortamiento de la zona de elongación de la raíz y, en consecuencia, la posterior reducción del crecimiento de la raíz (Valentovičová et al. 2010). La acumulación de NO inducida por Cd también participa en la inhibición del transportador polar de la auxina (PIN), lo que genera una disminución en los niveles de auxinas en las raíces y la inactivación del meristemo de la raíz (Yuan and Huang 2016). Todo ello, indica que la producción de NO desencadenada por el Cd podría tener un efecto negativo sobre el desarrollo y crecimiento de las raíces de la planta (**Fig. 12**).

Además de los mostrados anteriormente, se han publicado otros estudios que reflejan el incremento en los niveles de NO tras la exposición a una situación de estrés por Cd. Estos artículos muestran como el NO se encarga de disminuir la absorción de Cd aumentando el contenido en elementos de tolerancia como las fitoquelatinas y aliviando el daño oxidativo mejorando, de esta manera, la tolerancia de la planta al Cd. En cambio, el secuestro del NO endógeno por el cPTIO provocaba el agravamiento de la toxicidad inducida por el Cd (Nahar et al. 2016; Hu et al. 2019). Por lo tanto, estos resultados indican que el estrés por Cd induce la acumulación de NO endógeno en plantas, y que este tiene un impacto positivo en los procesos de crecimiento y desarrollo pues conduce a mejorar la tolerancia frente a este metal pesado (**Fig. 12**).

Sorprendentemente, también hay trabajos donde el estrés por Cd podría reducir la acumulación de NO endógeno en las plantas (Akinyemi et al. 2017). Por

ejemplo, la exposición de las raíces de *Medicago truncatula* a Cd genera una reducción en la producción endógena de NO y en la integridad de la membrana plasmática, aumentando los niveles de ROS, mientras que la utilización de un donador de NO aliviaba el estrés oxidativo e incrementaba el crecimiento de la raíz (Xu et al. 2010). En otro estudio realizado en *Trifolium repens*, se detectó una elevación en la concentración de etileno y en la acumulación de Cd, pero disminuyeron los niveles de NO, lo que condujo a la inhibición del crecimiento de la planta. En cambio, el uso de un donador de NO disminuyó los niveles tanto de Cd como de etileno y contribuyó a la absorción de minerales, mitigando así la toxicidad del Cd (Liu et al. 2015). Del mismo modo, el estrés por Cd también afectaba negativamente al crecimiento de las raíces de las plántulas de *Oryza sativa* al disminuir el nivel endógeno de NO a través de la inhibición de la actividad NOS, esta disminución se recuperó con la utilización de donadores de NO (Xiong et al. 2009). Además, es bien conocido que la aplicación exógena de NO previene los efectos inhibitorios del estrés por Cd sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ahmad et al. 2018). Otros investigadores descubrieron que, utilizando el donador de NO, SNP, se mejoraba el crecimiento de la planta a través de la estimulación del sistema de eliminación de las ROS y previniendo los efectos inhibitorios del estrés por Cd en la fotosíntesis (Per et al. 2017). Recientemente, existen datos que ilustran que el NO mejora la respuesta fúngica al estrés por Cd a nivel de expresión génica (Li et al. 2018). En general, estos resultados sugieren que el estrés por Cd podría disminuir los niveles endógenos de NO en cierta medida para promover la toxicidad del metal, obstaculizando así varios procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas. Sin embargo, estos efectos negativos inducidos por un exceso de Cd fueron revertidos tras la aplicación exógena de NO (**Fig. 12**).

Curiosamente, también se ha demostrado que los niveles de NO endógeno inducidos por Cd son distintos en diferentes tiempos y en diferentes órganos de las plantas. Así, en raíces de *H. vulgare* se halló un aumento de la producción de NO en las primeras etapas que posteriormente disminuyó a lo largo de la progresión del estrés (Alemayehu et al. 2015). En otro estudio realizado utilizando raíces de *Pisum sativum* sometidas a estrés por Cd, se publicó una disminución en los niveles de NO en las raíces laterales y un incremento en las raíces principales (Rodríguez-Serrano et al. 2006).

Colectivamente, los cambios en los niveles de NO inducidos por el Cd podrían acelerar o inhibir la respuesta al estrés por Cd y, por lo tanto, regular el crecimiento y desarrollo de la planta. En otras palabras, tanto el NO endógeno como el exógeno juegan un papel crucial en la respuesta al estrés por Cd. Como se mencionó anteriormente, la duración del tratamiento parece afectar a la producción de NO, más concretamente a la producción de NO llevada a cabo en las raíces. Sin embargo, los resultados contrapuestos sobre los niveles de NO en las situaciones de estrés por Cd podrían ser debidos a diferencias en las especies vegetales estudiadas, en los tejidos examinados, en las concentraciones de Cd utilizadas y la duración del estrés aplicado (Wei et al. 2020).

Como se ha indicado en apartados anteriores, está bien establecido que el NO puede llevar a cabo funciones señalizadoras a través de PTMs como la S-nitrosilación de proteínas. Mediante el método de intercambio con biotina, se identificaron varias

enzimas en los peroxisomas de *Pisum sativum* que en condiciones fisiológicas aparecían S-nitrosiladas. Tal es el caso de la glicoxilato oxidasa (GOX), enzima clave de la fotorrespiración que oxida el glicolato a glioxilato y H_2O_2 y la catalasa (CAT), enzima antioxidante encargada de reducir el H_2O_2 . En ambos casos, la S-nitrosilación conducía a la inhibición de sus actividades enzimáticas. En cambio, bajo condiciones de estrés por Cd, donde se observaba una disminución en los niveles de NO, la actividad de la catalasa disminuía. En el caso de la proteína GOX, en presencia de Cd, la proteína S-nitrosilada casi desaparecía y se observaba un ligero incremento en el contenido de la proteína. Todo ello, provocaba que se incrementara su actividad enzimática en la situación de estrés. Todos estos resultados sugieren que el NO podría regular los niveles de H_2O_2 bajo el estrés por Cd a través de la S-nitrosilación de no solo el sistema de defensa antioxidante sino también de enzimas productoras de H_2O_2 (Ortega-Galisteo et al. 2012; Wang et al. 2015a; Corpas et al. 2019a; Corpas et al. 2019b).

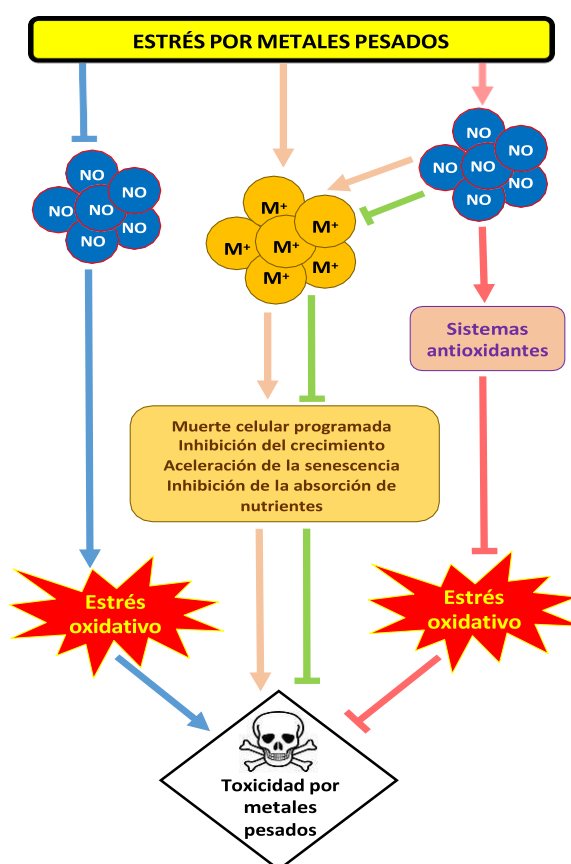


Figura 12. El efecto del óxido nítrico sobre el estrés por metales pesados en las plantas. Durante el estrés por metales pesados, se inhibe la producción de NO endógeno se induce estrés oxidativo, promoviendo así la toxicidad por metales pesados. Alternativamente, el NO endógeno puede ser inducido por este tipo de estrés abiótico favoreciendo la entrada de metales pesados en las células de las plantas desencadenando la inducción de la muerte celular programada, la inhibición del crecimiento, la aceleración de la senescencia y la inhibición de la absorción de nutrientes. Todo ello, puede revertirse a través de la disminución del contenido de metales pesados dentro de la planta por acción del NO. El NO también puede regular los sistemas antioxidantes aumentando la expresión de genes relacionados con la defensa, para aliviar así el estrés oxidativo inducido por los metales pesados. M^+ , iones de metales pesados.

○ Estrés por salinidad

El estrés por salinidad es uno de los factores ambientales que dificultan la productividad de los cultivos al perturbar los procesos fisiológicos de la planta (Kumar et al. 2013; Liang et al. 2018). Es un problema global que afecta alrededor de 831,4 millones de hectáreas de tierra, de hecho, se estima que aproximadamente el 19.5% de las tierras agrícolas son salinas (Agarwal et al. 2018). Las principales causas de la salinización del suelo son: el cambio climático, el aumento del nivel del mar, las prácticas de cultivo inadecuadas, el riego excesivo y la reducción de la sal natural por procesos de lixiviación (Kumar and Saddhe 2018).

Bajo el estrés salino, las plantas acumulan exceso de iones Na^+ (sodio) y Cl^- (cloro), lo que conduce a la limitación de la absorción de agua y nutrientes, a la alteración de las actividades metabólica y fotosintética y al aumento de la peroxidación lipídica (Liang et al. 2018; Deinlein et al. 2014).

La generación de RNS bajo el estrés salino puede ser debida a los mecanismos reductores y oxidativos correspondientes a las vías de síntesis de NO descritas anteriormente (**Fig. 10**). Cabe destacar la vía de síntesis oxidativa no enzimática llevada a cabo por las poliaminas en el apoplasto, la cual tiene gran importancia bajo condiciones de estrés salino, ya que se ha observado que las poliaminas pueden generar NO utilizando H_2O_2 a través de un mecanismo aún desconocido (Saha et al. 2015; Wimalasekera et al. 2011; Tanou et al. 2014).

La generación de RNS en respuesta al estrés salino, es responsable del inicio de las siguientes vías de señalización:

● Vía SOS

Los principales componentes de la vía SOS son: SOS1 (anti-portador de los protones de sodio de la membrana plasmática), SOS2 (sensor de calcio) y SOS3 (proteína quinasa). Estos intermediarios se encargan de aliviar el estrés salino por compartimentación y/o extrusión de Na^+ (Ji et al. 2013; Kaleem et al. 2018). Estudios realizados en plantas de maíz y caña de azúcar han revelado que las bajas concentraciones de NO inducen la expresión de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática favoreciendo, por lo tanto, el mantenimiento del equilibrio redox durante el estrés salino (Zhao et al. 2004). Sin embargo, el mecanismo por el cual se regulan estos transportadores sigue siendo un misterio. Se han propuesto dos posibles vías para el mantenimiento de la homeostasis iónica que implican intermediarios como la PLD, el PA y las proteínas quinasas y fosfatasas. En una de las vías, el NO participa en la generación de PLD apoplástica y en el otro caso, en la generación de PLD citosólica. Tanto la PLD apoplástica como la citosólica producen PA que activan aún más el NHX vacuolar (anti-portador de catión/ H^+). En definitiva, las dos vías ayudan a mantener la homeostasis iónica. Por lo tanto, existe la posibilidad de que PLD producida por la señalización de NO pueda participar en la vía SOS para mantener la homeostasis iónica (Zhang et al. 2006).

Una reciente investigación, ha planteado que los receptores de señalización de quitina CERK1, LYK4 y LYK5 también están involucrados en la percepción de los daños ocasionados por el estrés salino. Estos trabajos han demostrado una interacción física entre CERK1 y la anexina 1 (ANN1) del canal de calcio que conduce a un aumento en

los niveles de Ca^{2+} citosólico durante dicho estrés. También se ha observado que la ANN1 permite la entrada de Ca^{2+} en el citosol a través de la interacción con iones OH^- extracelulares (Espinoza et al. 2017). Estos hallazgos recientes han suscitado muchas preguntas acerca de la posible interacción de la vía SOS con los canales de calcio durante el estrés salino (Saddhe et al. 2019).

• Vía dependiente de MAPKs

La vía dependiente de las MAPKs es una de las principales rutas por las que los estímulos extracelulares se traducen en respuestas intracelulares en células eucariotas (Ichimura et al. 2002).

Bajo el estrés salino, el NO induce la regulación positiva las MAPKs denominadas ZmCIPK16 (proteína quinasa que interactuante con el CBL), ZmCIPK1 y ZmSIMK (quinasa inducida por patógenos y cloruro sódico), mejorándose así la tolerancia a dicho estrés. ZmCIPK16 y ZmCIPK1 son necesarias para la generación de NO y H_2O_2 , y además la ZmCIPK16 también activa los antiportadores de $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (NHX2 y NHX5). En cambio, la ZmSIMK activa la expresión de genes que responden a la sal como el RD29A y el P5CS1 (Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintasa 1) (Bai et al. 2011). Otros miembros de la subfamilia de quinastas como son NtOSAK (proteína quinasa activada por estrés osmótico) junto con la enzima glucolítica GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) se regulan directa o indirectamente por el NO bajo el estrés salino (Wawer et al. 2010). En otro estudio se ha propuesto la implicación del NO en la vía de señalización en la que participan las quinastas serina/treonina (SnRK2) involucradas en la respuesta de la planta al estrés abiótico, aunque aún no se ha confirmado su función exacta (Kulik et al. 2011). También se ha demostrado que el NO está implicado en el control complejo de la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxil quinasa (PEPCase-k), participando así en algunas de las respuestas de la planta a la salinidad (Monreal et al. 2013). En definitiva, existen muchas otras MAPKs involucradas en la tolerancia al estrés por salinidad, sin embargo, su conexión con las RNS es aún poco conocida (Saddhe et al. 2019).

• Vía dependiente de Ca^{2+}

Los iones Ca^{2+} , las proteínas calmodulinas dependientes de calcio, las proteínas similares a la calmodulina (CML) y las proteínas de unión a calmodulina (CaMBP) participan en la regulación de sistemas de transporte de una amplia variedad de iones, moléculas y proteínas y colaboran en la respuesta frente a diferentes estreses abióticos. Las CaMs, las CMLs y las CaMBPs mitigan los efectos del estrés salino porque mantienen la homeostasis iónica, colaboran con la vía del ABA en el cierre estomático e inducen la expresión de genes de respuesta salina (Zeng et al. 2015).

El NO media la estimulación de la liberación de Ca^{2+} a través de los canales de la membrana plasmática en respuesta al estrés por salinidad por medio de procesos de despolarización/hiperpolarización de la membrana y con la participación de radicales hidroxilo extracelulares y la anexina 1 (Zeng et al. 2015; Wilkins et al. 2016). Estudios sobre interacciones entre proteínas, han revelado que la calmodulina, AtCaM4, se une para suprimir la actividad de la enzima GSNOR, regulando así los altos niveles de NO que se producen en las situaciones de estrés por salinidad. Todo ello,

desarrolla la tolerancia de la planta al estrés (Zhou et al. 2016). También existen indicios de una posible regulación “aguas abajo” del Ca^{2+} y la calmodulina durante el proceso de tolerancia al estrés osmótico inducido por el NO (Niu et al. 2017). De todos estos avances se desprende que el NO y las vías dependientes de Ca^{2+} presentan interconexiones en los mecanismos de respuesta al estrés salino.

● Vía dependiente de las proteínas G

La señalización de las proteínas G comprende varios componentes como son: los receptores acoplados a la proteína G, la proteína G heterotrimérica (compuesta por las subunidades α , β y γ) y sus correspondientes fosfolipasas, guanilato ciclasas, fosfodiesterasas, canales iónicos y proteínas quinasas (Durner et al. 1998; Neill et al. 2003; Jones and Assmann 2004; Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek 2007). La señalización de las proteínas G en situaciones de estrés salino está involucrada en la acumulación de ROS a través de la calmodulina extracelular y la actividad de la NADPH oxidasa que estimula la producción de NO en *Arabidopsis*. Este NO generado participa en el cierre de los estomas con la participación de un aumento en la actividad de las MAPKs y de la producción de GMPc en *Arabidopsis* (Li et al. 2009). En definitiva, la señalización de las proteínas G media la producción de NO y mejora la actividad de las enzimas antioxidantes en condiciones de estrés abiótico por salinidad (Bai et al. 2011).

○ Estrés por baja temperatura

La temperatura es un factor ambiental crítico que influye en la distribución geográfica de las especies vegetales. Concretamente, el estrés por baja temperatura incluye, en función de su agresividad, el daño por frío (chilling) (0-15°C) y por congelación (freezing) (<0°C). Se trata de un estrés abiótico que afecta negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas y, por ende, a la productividad agrícola (Ding et al. 2019).

Los principales eventos que genera el estrés por frío en las células vegetales son el aumento de la permeabilidad de la membrana, la alteración de la estabilidad de las proteínas o complejos de proteínas, la reducción de las actividades de enzimas antioxidantes y la alteración en la expresión génica y la síntesis de proteínas. Todo ello, da como resultado una fotoinhibición y una fotosíntesis alterada, así como un daño considerable de la membrana (Örvar et al. 2000; Siddiqui and Cavicchioli 2006; Ruelland et al. 2009).

Sin embargo, el estrés por congelación es más dañino para las plantas que el estrés por frío, ya que puede ocasionar la muerte de la planta. La congelación genera la formación de núcleos de hielo, los cuales dan lugar a los cristales que se extienden hacia el apoplasto donde se induce la salida de agua que lleva a la deshidratación celular. Estos cristales de hielo pueden esparcirse también al interior de las células lo que conduce a un daño irreversible (Dowgert and Steponkus 1984; Pearce 2001).

Diferentes moléculas mensajeras como el H_2O_2 , el NO, el PA, el sulfuro de hidrógeno (H_2S) y el Ca^{2+} están involucradas en la percepción y transducción de señales relacionadas con la aclimatación al frío (**Fig. 10**) (Xiong et al. 2001; Zheng et al. 2021).

Concretamente, el estrés por frío estimula la producción endógena de NO por acción de la NR, la cual contribuye positivamente en la tolerancia al frío. El NO aumenta la expresión

del gen P5CS1, que codifica la proteína de síntesis de la prolina y disminuye la expresión del gen ProDH, (enzima de degradación de la prolina). El acumulo de prolina favorece la aclimatación al frío, ya que actúa como un osmolito que protege a las células vegetales de la deshidratación, funciona como un acompañante molecular que estabiliza la estructura de las proteínas y regula los sistemas antioxidantes y el potencial redox celular (**Fig. 13**) (Zhao et al. 2009; Dong et al. 2018).

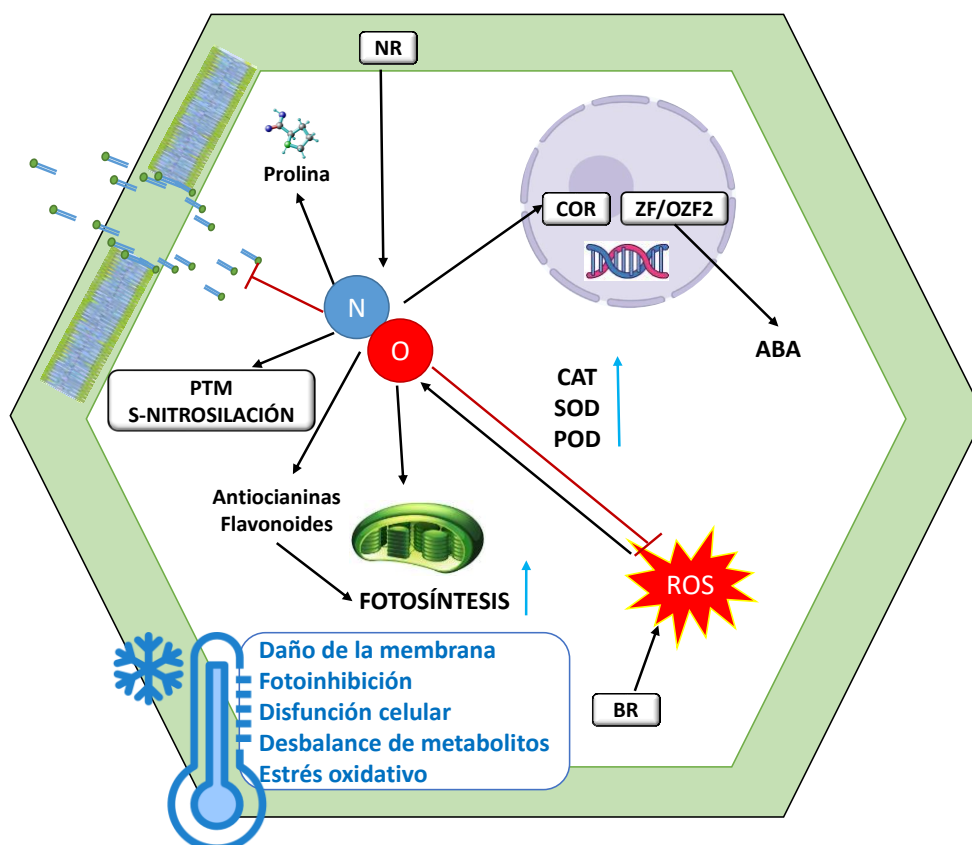


Figura 13. Efecto del óxido nítrico en el estrés por frío en plantas. El estrés por frío genera un daño oxidativo y un desbalance de metabolitos que desembocan en la desestabilización de las membranas, la disfunción celular y la fotoinhibición. Este tipo de estrés abiótico estimula la producción endógena, dependiente de la NR, de NO que modula positivamente la transcripción de los genes COR y ZF-OZF2. Los primeros previenen las alteraciones de la membrana y la agregación de proteínas mientras que, los segundos, desencadenan la cascada de señalización del ABA, fitohormona clave en la aclimatación al frío. La activación de proteínas antioxidantes como la CAT, la SOD y la POD por el NO disminuye el daño oxidativo. Los brasinoesteroides estimulan la producción de H_2O_2 , que a su vez estimula la síntesis de NO. Este NO favorece la fotosíntesis a través de la mejora en la capacidad de la oxidasa alternativa (AOX). La síntesis de prolina se activa positivamente por acción del NO, moderando de esta manera la deshidratación celular y la disfunción celular.

COR: genes sensibles al frío; POD: peroxidasa; BR: brasinoesteroides.

En plantas de tomate, se ha demostrado que la GSNOR está muy relacionada con la homeostasis del NO durante la aclimatación al frío, evitando la acumulación excesiva de RNS. Además, el NO induce la activación de MPK1/2 y la transcripción de factores de unión de repetición C (CBF), los cuales están relacionados con la tolerancia al frío (Cantrel et al. 2011; Lv et al. 2017; Costa-Broseta et al. 2019). Específicamente, los CBF activan los genes sensibles al

frío que codifican deshidrinas, proteínas de choque térmico, glucanasas y quitinasas, que son importantes para prevenir las alteraciones de la membrana y la agregación de proteínas que se producen comúnmente al modificarse las propiedades del agua (**Fig. 13**) (Ferreira et al. 2018).

Otros trabajos también sugieren que el NO controla el proceso de aclimatación al frío a través de vías reguladoras independientes de CBF. Estas vías estarían controladas por genes de “primera ola” que codifican factores de transcripción que participan en la corregulación del frío. Entre ellos destaca positivamente el ZF/OZF2 que desencadena la cascada de señales de ABA, que resulta ser una fitohormona decisiva para la aclimatización al frío. Igualmente, se inducen genes implicados en la biosíntesis de antocianinas y flavonoides, los cuales protegen los fotosistemas de la fotoinhibición, evitando la acumulación de altos niveles de ROS (**Fig. 13**) (Costa-Broseta et al. 2019).

El incremento del contenido en NO regula también positivamente la actividad de proteínas antioxidantes como la SOD, la POD y la CAT, lo que conduce a una disminución en los niveles de malodialdehído (MDA) y a un menor del daño oxidativo. Asimismo, la concurrencia del NO mejora la tasa fotosintética ya que participa en la transferencia de electrones en el fotosistema II (PSII) (**Fig. 13**) (Fan et al. 2015; Dong et al. 2018).

En un estudio reciente, se ha revelado que el H₂O₂ y el NO están implicados en la vía de señalización de la defensa contra el frío mediada por una clase de hormonas esteroideas vegetales llamadas BR. Los BR estimulan la producción de H₂O₂, que a su vez induce la síntesis de NO, que juega un papel crucial en la mejora de la capacidad de la AOX en la eliminación de ROS mitocondriales y mitiga el daño del fotosistema generado en condiciones de estrés por frío (**Fig. 13**) (Arfan et al. 2019; Sánchez-Vicente and Lorenzo 2021).

La S-nitrosilación también está presente en el estrés por frío. Concretamente, se han identificado proteínas nitrosiladas mayoritariamente relacionadas con el estrés, la defensa y la homeostasis redox (67%), mientras que el resto (33%), son proteínas que participan en el metabolismo, entre las que cabe destacar la Cu/Zn-SOD, la APX, la fructosa bisfosfato aldolasa-2 (FBA2) y la malato deshidrogenasa-1 (MDH1). Estos hallazgos indican una regulación mediada por NO de las vías redox y del metabolismo durante el estrés por frío (**Fig. 13**) (Sánchez-Vicente and Lorenzo 2021; Sehwat et al. 2019).

Estrés por alta temperatura

El aumento de la temperatura ocasionado por el cambio climático se ha convertido en una importante amenaza para el mantenimiento de la agricultura en todo el mundo. Cuando las condiciones térmicas se elevan por encima de la temperatura óptima de crecimiento de la planta, se habla de estrés por calor (Heat Stress, HS). Este tipo de estrés abiótico perjudica la germinación de las semillas, la turgencia celular, la eficiencia del uso del agua, la fotosíntesis, el crecimiento y el rendimiento vegetal (Ohama et al. 2017; Lecourieux et al. 2020).

Las consecuencias negativas que derivan del estrés por alta temperatura radican en la generación de ROS, lo que desemboca en una situación de estrés oxidativo, la perturbación del equilibrio redox y de la coordinación de los orgánulos y la alteración de la estructura y de la funcionalidad de las macromoléculas a través de la oxidación de lípidos, el daño del ADN, la desestabilización de proteínas y la agregación y alteración de las actividades enzimáticas

(Awasthi et al. 2015; Babbar et al. 2021). Para hacer frente a estas circunstancias, las plantas presentan varios mecanismos que controlan las vías de señalización implicadas en la adquisición de tolerancia al calor como son las defensas antioxidantes y la acumulación de osmoprotectores, los factores de choque térmico (HSF) y las proteínas de choque térmico (HSP) (Iqbal et al. 2021).

La relevancia de participación del NO en la mitigación del estrés por calor (**Fig. 10**) es bastante notoria debido a su impacto en las funciones celulares de las plantas. Se ha observado que las plantas mutantes deficientes en NO muestran sensibilidad a las altas temperaturas (Xuan et al. 2010), en cambio, el tratamiento exógeno con NO en situaciones de estrés por calor aminora el estrés oxidativo al promover la acumulación de osmolitos y activar antioxidantes como la catalasa y el ciclo ascorbato-glutatión (Khan et al. 2012; Hasanuzzaman et al. 2012; Siddiqui et al. 2017). En un estudio en realizado en plantas de haba, se correlacionó el incremento de NO durante el estrés por calor con el aumento en la síntesis de prolina (Alamri et al. 2019). Además, de atenuar el daño oxidativo, el NO induce rápidamente la expresión de genes relacionados con el estrés por calor (HSR) (Manafi et al. 2021).

Sin embargo, un análisis a gran escala demostró que el estrés por alta temperatura aumentaba los niveles de la PTM por el NO consistente en la nitración de tirosinas, lo que ponía de manifiesto el daño nitrooxidativo que ocasionaba dicho estrés (Chaki et al. 2011).

Estrés por luz continua

La luz es uno de los factores ambientales más determinantes que se requieren para el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas (Chen et al. 2004). A lo largo de su ciclo de vida, las plantas se pueden enfrentar tanto estacionalmente como esporádicamente a desviaciones de las condiciones óptimas de luz, tanto por exceso como por defecto. Todo ello puede conducir a un estrés oxidativo y a la fotoinhibición y limitación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Krause et al. 2012; Zhang et al. 2018).

Los cloroplastos y el aparato fotosintético son particularmente sensibles al exceso de luz visible y de radiación UV-B (Aro et al. 1993). Durante el estrés lumínico, el oxígeno, a nivel del PSII de la fotosíntesis, puede potencialmente derivar hacia la generación de ROS, lo que provoca alteraciones redox muy frecuentes en este tipo de estrés. Este desequilibrio redox desemboca en la inhibición de la fotosíntesis, de la respiración y del crecimiento vegetal (Asada 2006; Xu et al. 2013; Lopes-Oliveira et al. 2021).

En plántulas de *Brassica pekinensis*, el papel del NO en el estrés lumínico (**Fig. 10**) radica en la activación de sistemas antioxidantes como el ciclo ascorbato-glutatión para paliar el daño oxidativo (Lopes-Oliveira et al. 2021; Hu et al. 2019).

Sin embargo, en plantas de guisante, el estrés por luz continua genera un incremento en el número de proteínas nitradas, lo que indica la afectación de la planta por un estrés de tipo nitrosativo (Corpas et al. 2008).

En un reciente estudio, se ha demostrado que el estrés por luz continua genera una acumulación de NO y, a su vez, incrementa la presencia de SNO de alto y bajo peso molecular, como el GSNO. Esta acumulación de NO/SNO dependiente de la luz, modula la estructura de la cromatina a través de la acetilación de las histonas, dado que el aumento de NO S-nitrosila

los complejos de histona desacetilasa (HDA6). Esta modificación conduce a la inhibición de la actividad de la HDA6 y, por ende, a una mayor transcripción de genes involucrados en la respuesta de defensa de las plantas y en la respuesta al estrés abiótico (Mengel et al. 2017; Ageeva-Kieferle et al. 2021).

Estrés por oscuridad

La ausencia de luz (por ejemplo, la noche o la oscuridad prolongada) puede alterar la activación de las respuestas de desarrollo y/o defensa de las plantas dependientes de la luz (Ballaré 2014). El NO juega un papel crucial en estas respuestas fisiológicas y de estrés de las plantas. Sin embargo, su regulación puede ser diferente en condiciones de luz o de oscuridad.

En varios estudios independientes, se ha observado una disminución en la actividad enzimática de la NR, que iba acompañada de una disminución en los niveles de NO tras la exposición de las plantas a un estrés por oscuridad (Corpas et al. 2008; Chaki et al. 2011; Takács et al. 2016; Pokora et al. 2017; Poór et al. 2019).

Paralelamente, la disminución de NO durante la oscuridad induce la senescencia. El proceso de envejecimiento se caracteriza por la disminución del contenido en clorofila y proteína y por el aumento de la producción de ROS, de la peroxidación de lípidos y de la permeabilidad de la membrana (Luschin-Ebengreuth and Zechmann 2016). Este proceso está regulado por hormonas como el etileno, las citoquininas, el ABA, el ácido salicílico y el JA (Lim et al. 2007). Dado que el NO juega un papel crucial en las vías de señalización de varias hormonas vegetales, su papel en la senescencia inducida por la oscuridad es incuestionable (Corpas et al. 2008; Simontacchi et al. 2013; Ziogas et al. 2013; Poór et al. 2019).

4.3. Papel de los ácidos grasos nitrados en las situaciones de estrés en plantas

Tal y como se ha mencionado anteriormente, tanto las ROS como las RNS actúan como mediadoras en los eventos de señalización redox que tienen lugar cuando la planta responde a una situación de estrés. Análogamente, en apartados anteriores se indicó que los NO₂-FAs son también moléculas señalizadoras debido a que su reactividad les permite modificar diferentes proteínas por nitroalquilación, además, pueden actuar como donadores de NO. Por todo ello, se ha investigado el papel de los NO₂-FAs en la respuesta de la planta a condiciones adversas. Concretamente, plántulas y cultivos celulares de *Arabidopsis* sometidos a diferentes tipos de estreses abióticos como la salinidad, las heridas mecánicas, la baja temperatura y los metales pesados, mostraron un incremento significativo en los niveles de NO₂-Ln (**Tabla 7**) (Mata-Pérez et al. 2016b). Recientemente, se ha postulado una justificación específica para esta inducción general en los niveles de NO₂-Ln. En las situaciones adversas, se generan tanto ROS como RNS, su producción descontrolada puede conducir a la liberación de los NO₂-FAs que se encontraban aductados con proteínas. Por tanto, el proceso nitro-oxidativo generado en la situación de estrés puede dar lugar a la oxidación de los aductos de Michael con la consiguiente liberación de los NO₂-FAs que, a su vez, pueden mediar procesos de señalización en respuesta al estrés (Padilla et al. 2017b).

Tabla 7. Niveles de NO₂-Ln en diferentes situaciones de estrés abiótico en Arabidopsis (Mata-Pérez et al. 2016b; Begara-Morales et al. 2021a).

Material vegetal	Concentración basal (pmol/g PF)	Estrés	Concentración en el estrés (pmol/g PF)
Plántulas de 14 días	3,84	Daño mecánico (3 h)	7,46
		150 μM CdCl ₂	6,62
		Baja temperatura (8°C, 48 h)	5,75
Cultivos celulares de 9 días	0,28	100 mM NaCl (5 min)	0,96
		100 mM NaCl (30 min)	0,52

Por otra parte, en un estudio reciente, se ha observado que el tratamiento exógeno de cultivos celulares de tomate y de hojas de tomate y Arabidopsis con NO₂-OA, induce la producción de ROS a través de la activación de la NADPH oxidasa. Sin embargo, estos investigadores responsables de este trabajo no han conseguido detectar la presencia endógena del NO₂-OA ni en tomate ni en Arabidopsis (Arruebarrena Di Palma et al. 2020).

Mata et al. en 2016 analizaron la implicación del NO₂-Ln en diferentes situaciones de estrés mediante un análisis transcriptómico por RNA-seq (Mata-Pérez et al. 2016d). En este estudio se puso de manifiesto que el tratamiento de cultivos celulares de *A. thaliana* con NO₂-Ln provocaba la expresión diferencial de 1308 genes, de los cuales, 437 se regulaban positivamente mientras que 871 reprimían su expresión. Particularmente, el NO₂-Ln inducía la expresión de genes relacionados con el estrés abiótico (alta intensidad lumínica y temperatura) y con el estrés oxidativo. Además, los resultados del análisis transcriptómico tienen una implicación funcional dada la presencia endógena de NO₂-Ln en Arabidopsis y, por lo tanto, se puede considerar el papel potencial de este NO₂-FA como regulador de la respuesta al estrés abiótico en plantas.

Un dato llamativo de este análisis transcriptómico radicaba en que aproximadamente el 40% de los genes inducidos por el NO₂-Ln estaban implicados en la respuesta al choque térmico (HSR). Entre ellos destacaban genes codificantes de proteínas de choque térmico como HSP40, HSP60, HSP70 y HSP90 y de factores de transcripción como HSFA2 y HSFA7B. Entre la familia de genes HSR, HSP21 fue más inducido. Este gen tiene una marcada repercusión en el desarrollo del cloroplasto en situaciones de estrés por calor (Mata-Pérez et al. 2016b; Zhong et al. 2013). Resulta interesante señalar que la inducción de los genes relacionados con la HSR por el NO₂-Ln, parece ser un mecanismo conservado, ya que también se ha observado en células endoteliales humanas tratadas tanto con NO₂-OA (Kansanen et al. 2009b) como con NO₂-cLA (Lu et al. 2019).

En el estudio transcriptómico, dentro del grupo de genes inducidos por NO₂-Ln relacionados con la respuesta antioxidante cobró una especial relevancia la presencia de la APX y de la metionina sulfoxido reductasa (MSR) (Mata-Pérez et al. 2016b).

5. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo

Cuando los niveles de ROS son bajos, pueden actuar como mensajeros secundarios y participar en cascadas de señalización dentro de las células vegetales en respuesta a las situaciones de estrés. En contraposición, cuando sus niveles de síntesis se incrementan y alcanzan altas concentraciones pueden convertirse en moléculas tóxicas y ser responsables de la muerte celular. Por ello, el compromiso entre

la actividad señalizadora o tóxica de las ROS depende del equilibrio entre su producción y su eliminación (Chaudhary et al. 2020; Gill and Tuteja 2010; Camejo et al. 2016).

Los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de las plantas actúan como desintoxicantes de ROS, limitando su manteniendo sus concentraciones dentro de rangos fisiológicos en el interior de los compartimentos celulares (Martinez et al. 2016; Sachdev et al. 2021).

5.1. Antioxidantes no enzimáticos

Los principales antioxidantes no enzimáticos son el ascorbato (AsA), el GSH, el α -tocoferol, los carotenoides y los flavonoides. Esta clase de antioxidantes eliminan las ROS al interrumpir las reacciones en cadena de radicales libres (**Tabla 8**) (Ahmad et al. 2010).

Tabla 8. Sistemas de defensa antioxidante no enzimáticos y enzimáticos frente al estrés oxidativo (Hasanuzzaman et al. 2020).

Antioxidantes	Reacciones catalizadas	Lugar de la reacción catalítica
No enzimáticos		
Ácido ascórbico	Neutraliza el $O_2^{\cdot -}$, el H_2O_2 , el OH^{\cdot} y el 1O_2	Cloroplasto, peroxisomas, citosol, mitocondria y apoplasto
Glutación	Neutraliza el H_2O_2 , el OH^{\cdot} y el 1O_2	Cloroplasto, peroxisomas, citosol, mitocondria y apoplasto
α -tocoferol	Neutraliza el OH^{\cdot} , el 1O_2 , el ROO^{\cdot} y el $ROOH$	Membrana tilacoidal del cloroplasto
Carotenoides	Neutralizan principalmente el 1O_2	Cloroplasto
Flavonoides	Neutraliza el $O_2^{\cdot -}$, el H_2O_2 y el 1O_2	Cloroplasto, vacuola
Enzimáticos		
Superóxido dismutasa	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Cloroplasto, peroxisomas, citosol, mitocondria y apoplasto
Catalasa	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Peroxisomas
Peroxidasas	$2PhOH + H_2O_2 \rightarrow 2PhO^{\cdot} + 2H_2O$	Pared celular, apoplasto y vacuola
Ascorbato peroxidasa	$PhOH + AsA \rightarrow 2H_2O + MDHA$	Cloroplasto, peroxisomas, citosol, mitocondria y apoplasto
Monodeshidroascorbato reductasa	$MDHA + NAD(P)H + H^+ \rightarrow AsA + NAD(P)$	Cloroplasto, citosol y mitocondria
Deshidroascorbato reductasa	$2GSH + DHA \rightarrow GSSG + AsA$	Cloroplasto, citosol y mitocondria
Glutación reductasa	$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow GSH + NADP^+$	Cloroplasto, citosol y mitocondria
Glutación peroxidasa	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$	Citosol y mitocondria

Tiorredoxina	$\text{TRX-RS}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{TRX-R(SH)}_2 + \text{NADP}^+$	Cloroplasto, citosol y mitocondria
Peroxirredoxinas	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{PRX-S}^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{PRX-SOH}$	Cloroplasto, citosol, mitocondria, núcleo y espacio extracelular
	$\text{PRX-SOH} + \text{GSH} \rightarrow \text{PRX-SSG} + \text{H}_2\text{O}$	
	$\text{PRX-SSG} + \text{GSH} \rightarrow \text{PRX-S}^- + \text{GSSG}$	

El GSH es un tiol no proteico que participa en la degradación del H_2O_2 en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GPX). Esta molécula se considera el metabolito intracelular más importante en la defensa frente al daño oxidativo inducido por las ROS (**Tabla 8**) (Szalai et al. 2008).

El AsA o vitamina C es sintetizado en las mitocondrias, pero se encuentra comúnmente en el estroma de cloroplasto, el apoplasto, el citosol, las mitocondrias y los peroxisomas de la célula vegetal. El AsA es capaz de reaccionar con una amplia gama de ROS como el H_2O_2 , el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $^1\text{O}_2$ (**Tabla 8**) (Bartoli et al. 2017).

El α -tocoferol tiene propiedades antioxidantes como resultado de su capacidad de amortiguación, tanto de oxígeno singlete como de radicales hidroxilo. Este compuesto se localiza principalmente en las membranas de los cloroplastos (**Tabla 8**) (Sachdev et al. 2021).

Los carotenoides participan en la protección del aparato fotosintético frente a daño fotoinhibitorio ejercido por el oxígeno singlete, el cual es producido por el estado excitado de la clorofila (**Tabla 8**) (Mehla et al. 2017).

Los flavonoides e isoflavonoides tienen estructuras polifenólicas que les confieren la capacidad de eliminar radicales libres y de reducir el daño celular por peroxidación lipídica (**Tabla 8**) (Di Ferdinando et al. 2012).

5.2. Antioxidantes enzimáticos

Entre los principales antioxidantes enzimáticos encontramos la SOD que, en función del cofactor metálico que utilicen se clasifican en tres tipos principales: Cu/Zn-SOD, Fe-SOD y Mn-SOD. Este grupo enzimático lidera la primera línea de defensa antioxidante. Su catálisis consiste en la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 lo que reduce las posibilidades de formación del OH^- (**Fig. 14**) (**Tabla 8**) (Gill et al. 2015).

Otra enzima antioxidante es la catalasa. Se trata de una enzima tetramérica que contiene un grupo hemo y cataliza la dismutación de H_2O_2 en O_2 y H_2O sin utilizar sustratos reductores (**Fig. 14**) (**Tabla 8**) (Mehla et al. 2017).

Por otra parte, las peroxidasas oxidan principalmente compuestos fenólicos (PhOH) produciendo radicales fenoxilo (PhO), más comúnmente conocidos como quinonas (Q_A). En estas reacciones, el H_2O_2 acepta un electrón y se convierte en H_2O . En presencia de AsA, el PhO reacciona con el AsA generando monodeshidroascorbato (MDHA) y, posteriormente, deshidroascorbato (DHA) (Jovanović et al. 2018). A esta enzima dependiente de ascorbato se le denomina APX y participa en el ciclo del ascorbato-glutatión. En las células vegetales existen diferentes isoformas de la APX localizadas en el citosol (cAPX), la mitocondria (mtAPX), el cloroplasto (chlAPX) y el peroxisoma/glioxisoma (mAPX). El MDHA generado en el ciclo del ascorbato-glutatión se convierte en AsA por acción de la monodeshidroascorbato reductasa dependiente de NADPH (MDHAR). Esta enzima contiene un grupo tiol que regenera el AsA por reducción de radicales fenoxilo

(Hasanuzzaman et al. 2019). De manera espontánea, el MDHA se reduce a DHA, que luego se recicla a AsA por la actividad de la deshidroascorbato reductasa (DHAR), enzima que utiliza el GSH como fuente de poder reductor. En esta reacción, el GSH se oxida a GSSG, que a su vez se vuelve a reducir por acción de la GR dependiente de NADPH (Couto et al. 2016). Otro miembro de la familia de las peroxidasa, es la GPX). Esta enzima cataliza la reacción de oxidación de glutatión a glutatión disulfuro utilizando para ello H_2O_2 (**Fig. 14**) (**Tabla 8**) (Bela et al. 2015).

Las tioredoxinas (TRX) destacan por poseer un sitio activo redox, que se encarga de reducir los enlaces disulfuro a ditiol por H_2O_2 . Estas enzimas se relacionan con la homeostasis redox del cloroplasto al reducir las cisteínas de las PRX, las cuáles quedan en esta oxidado tras realizar su ciclo catalítico. Las PRX también son enzimas antioxidantes y catalizan una actividad similar a la de las POX neutralizando los peróxidos en el citosol, los cloroplastos, las mitocondrias y el núcleo de las células vegetales. Las PRX son dependientes de tior (GSH o cualquier otro tior), y juegan un papel vital en la regulación de las ROS (**Fig. 14**) (**Tabla 8**) (Pedrajas et al. 2016).

Por otra parte, en las mitocondrias, la TRX participa con la PRX y la sulfiredoxina en la activación de la defensa antioxidante (**Fig. 14**) (**Tabla 8**) (Sevilla et al. 2015).

Finalmente, hay que mencionar el NADPH, pues es un coenzima reductor esencial en procesos biosintéticos y de desintoxicación en células. Además, es requerido por sistemas antioxidantes como el ciclo ascorbato-glutatión. También es necesario para la generación de radicales superóxido por las NADPH oxidasas vegetales y para la generación de NO por la NOS dependiente de L-arginina. Este coenzima es principalmente regenerado por un grupo de enzimas denominadas NADP-deshidrogenasas, en el que se incluyen la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), ambas pertenecientes a la vía de las pentosas fosfato, el enzima málico dependiente de NADP (NADP-ME) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (Corpas and Barroso 2014a).

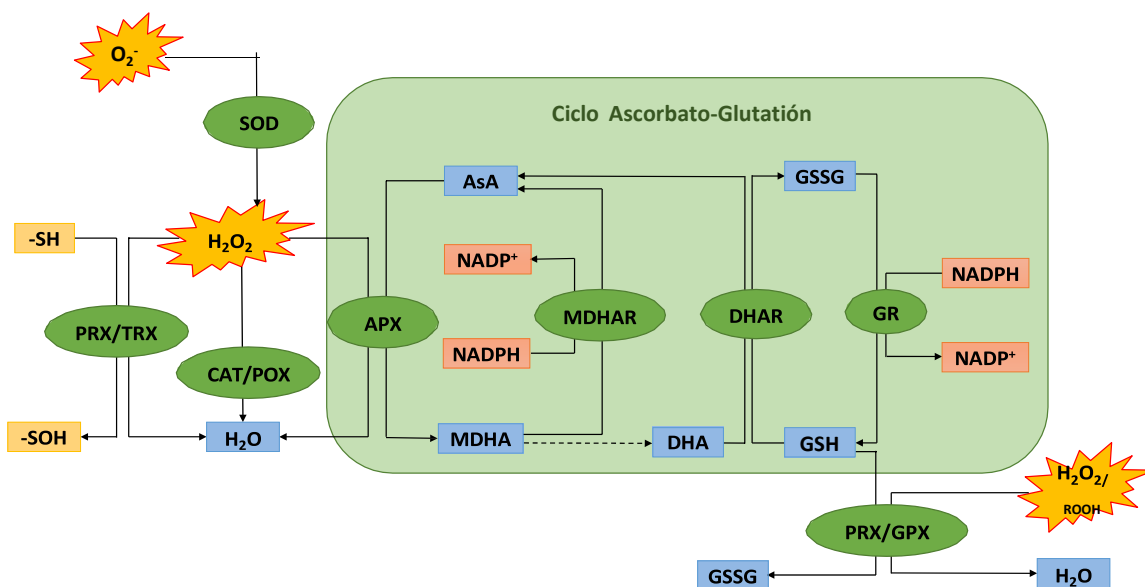


Figura 14. Descripción general de los mecanismos de actuación de los sistemas antioxidantes de las plantas. ROOH: hidroperóxidos; -SOH: ácido sulfénico (Hasanuzzaman et al. 2020).

Objetivos

El objetivo principal del trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral fue el análisis de los mecanismos de señalización por lípidos nitrados durante el desarrollo y el estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana*. Para llevar a cabo este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Detección e identificación de los ácidos grasos nitrados presentes en *Arabidopsis thaliana*.
- Identificación y cuantificación de los niveles de los ácidos grasos nitrados en los diferentes almacenes biológicos durante el desarrollo y en diferentes situaciones de estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana*.
- Detección e identificación *in vivo* de las dianas celulares de nitroalquilación mediadas por ácidos grasos nitrados durante el desarrollo y en situaciones de estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana*.
- Análisis de la modulación funcional por nitroalquilación de las dianas celulares identificadas *in vivo*.
- Estudio del papel señalizador de los NO₂-FAs en el estrés biótico en células de *Nicotiana tabacum*.
- Identificación y caracterización del efecto del NO₂-OA en la respuesta antioxidante mediada por la Tsa1 en *Saccharomyces cerevisiae*.

***Material y
Métodos***

6. Material de experimentación

Para la realización de este trabajo de investigación se ha utilizado principalmente la especie vegetal de *Arabidopsis thaliana*, aunque también se ha trabajado con *Nicotiana tabacum* y con células de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

6.1. *Arabidopsis thaliana*

Con respecto a la especie vegetal *A. thaliana* se han utilizado tanto cultivos celulares en suspensión, como semillas y plántulas en diferentes estadios de desarrollo según se describe a continuación.

6.1.1. Cultivos celulares

En este trabajo se han utilizado cultivos de células en suspensión de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (**Fig. 15**). Los cultivos celulares se mantuvieron en 200 ml de un medio de crecimiento basado en una adaptación del medio JPL a esta especie vegetal (Jouanneau 1967; Axelos et al. 1992). Las principales condiciones de cultivo fueron: agitación continua de 140 rpm, temperatura constante de 24°C e iluminación continua con luz blanca fotosintética (PAR, Photosynthetically Active Radiation) de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad. La renovación del cultivo se realizó cada 7 días bajo condiciones de estricta esterilidad subcultivando un volumen de 3 ml de células sedimentadas en 200 ml de medio JPL modificado. Los cultivos celulares utilizados para los experimentos se recolectaron a los 9 días tras el subcultivo.



Figura 15. Cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*.

6.1.2. Semillas

Otro tipo de material vegetal utilizado para llevar a cabo extracciones lipídicas, análisis bioquímicos y para obtener plántulas en diferentes estadios de desarrollo fueron las semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (**Fig. 16**). Antes del proceso de siembra, las semillas se esterilizaban durante 10 minutos en una solución de etanol al 70% (v/v) que contenía 0,1% de

dodecilsulfato sódico (SDS) (p/v). Después, se sumergían durante 20 min en agua estéril con 20% de lejía (v/v) y 0,1 % de SDS (p/v). Se continuaba con varios enjuagues con agua estéril seguidos de una incubación de 5 minutos en una dilución 1/200 de alguicida. Finalmente, se lavaban 4 veces con agua estéril, siendo la duración de cada lavado 5 minutos, y se mantenían a 4°C durante dos días para romper la dormancia. Transcurrido ese tiempo, se utilizaban para sembrar.



Figura 16. Semillas de *Arabidopsis thaliana*.

6.1.3. Desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

En este trabajo de Tesis se ha caracterizado la modulación de los NO₂-FAs a lo largo del desarrollo de las plantas de *Arabidopsis*. Con el objeto de seleccionar las etapas a considerar, se utilizó la escala BBCH, que es una escala genérica para la asignación de etapas de crecimiento en plantas de cultivo y malas hierbas (Lancashire et al. 1991) que se ha adaptado a los fenotipos de crecimiento de *Arabidopsis* (Boyes et al. 2001).

De esta manera, se ha caracterizado el crecimiento temprano utilizando plántulas de 5 y 14 días crecidas en placas de Petri. Las etapas relacionadas con el desarrollo de la hoja y la flor, la maduración de las silicuas y la senescencia se han estudiado utilizando plántulas obtenidas mediante cultivos hidropónicos.

- **Plántulas de 5 días**

Las semillas esterilizadas se sembraron en placas de Petri a las que previamente se había adicionado un medio de crecimiento basal compuesto de 4,32 g/l de medio MS (Murashige and Skoog) con pH 5,5, conteniendo 1% de sacarosa y 0,8% de fitoagar en condiciones estériles. Tras la siembra, dichas placas de Petri se introdujeron cámaras de cultivo en condiciones de 16 h de luz a 22°C, 8 h de oscuridad a 18°C, humedad del 60% e intensidad de luz de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 5 días (**Fig. 17**).

Desde un punto de vista fenotípico estas plantas se caracterizan por presentar los dos cotiledones totalmente abiertos, lo que representa el estadio inicial en el desarrollo de la hoja (**Fig. 17**).



Figura 17. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 5 días (apertura de los cotiledones).

- **Plántulas de 14 días**

Estas plántulas se sembraron siguiendo el protocolo anteriormente descrito, aunque se mantuvieron creciendo durante 14 días. En estas plántulas, comenzaba a apreciarse la disposición circular de las hojas (roseta) que en total eran 4, además de los 2 cotiledones (**Fig. 18**).



Figura 18. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 14 días (inicio de la roseta).

- **Plántulas de 24 días**

La siembra de *Arabidopsis* en cultivos hidropónicos se realizaba utilizando tubos eppendorf opacos de 0,5ml a los que se les había seccionado la parte inferior. Una vez cortados, los tubos eppendorf se rellenaron con fitoagar al 0,7% previamente disuelto con calor y atemperado y, una vez solidificado, se situaron en los recipientes de cultivo y se sembraron tres semillas de *Arabidopsis* previamente esterilizadas en cada tubo eppendorf. A continuación, los recipientes se rellenaron con solución nutritiva y se protegieron las semillas con film transparente. La solución nutritiva se preparó a partir de las siguientes soluciones stock de macro y micronutrientes:

- ✔ Soluciones stock de macronutrientes: KNO_3 1 M; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 M; MgSO_4 1 M; KH_2PO_4 1 M y Fe-EDTA 100 mM.
- ✔ Solución stock de micronutrientes: H_3BO_3 0,5 M; $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M y $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M. A continuación, los micronutrientes se preparan en una disolución 1000X compuesta por H_3BO_3 46 mM; $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 10 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,77 mM; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,32 mM; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,58 mM y $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01 mM.

Posteriormente, el medio de cultivo va a contener macronutrientes KNO_3 0,25 mM; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,25 mM; MgSO_4 0,25 mM; KH_2PO_4 0,25 mM y Fe-EDTA 0,012 mM y la disolución de micronutrientes 1000X se queda al 1X.

Una vez sembrados, los recipientes se mantuvieron en la cámara de cultivo en condiciones de 16 h de luz a 22°C y 8 h de oscuridad a 18°C, humedad del 60% e intensidad de luz de $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Aproximadamente, transcurridos los 7 días, se retiró el film transparente y en el momento en que se detectaba la aparición de la raíz por la parte inferior del tubo, se activaba un sistema de burbujeo lento y continuo que favorecía la oxigenación de la solución nutritiva. A partir de ese momento, la solución se renovó semanalmente.

Para el estudio del desarrollo de *Arabidopsis*, se utilizaron plántulas de diferentes edades y se analizaron por separado los tejidos de hoja y raíz. Así, las plántulas de 24 días cultivadas en estas condiciones, constituyeron la primera etapa de crecimiento a estudiar. En este estadio la planta presentaba una roseta constituida por su número máximo de hojas (alrededor de 13 -14) (**Fig. 19**).



Figura 19. Plántulas de 24 días de *A. thaliana* (roseta).

- **Plántulas de 34 días**

El siguiente punto de recogida se estableció aproximadamente a los 34 días que es cuando las plántulas presentaron estructuras de reproducción sexual, es decir, cuando aparecieron las flores (**Fig. 20**).



Figura 20. Plántulas de 34 días de *A. thaliana* (floración).

- **Plántulas de 36 días**

Tras la floración, rápidamente la planta inicia la producción de semillas. Este proceso se inicia con la formación del fruto, que en *Arabidopsis* es una vaina alargada que alberga las semillas denominada silicua. Este acontecimiento tenía lugar aproximadamente tras 36 días de cultivo en las condiciones hidropónicas detalladas anteriormente (**Fig. 21**).

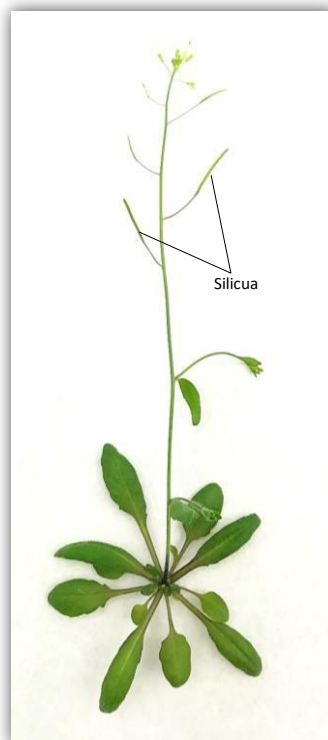


Figura 21. Plántulas de 36 días de *A. thaliana* (producción de semillas).

- **Plántulas de 53 días**

La última etapa del desarrollo vegetal es la senescencia, que se alcanza cuando la planta entra en un proceso de muerte celular programa. Desde un punto de vista fenotípico, en esta esta fase, la mayoría de las silicuas de la planta están maduras y adquieren un color amarillo-marrón, además, muchas de ellas se encuentran completamente abiertas, liberando así sus semillas. Estas características se observaron a los 53 días de crecimiento (**Fig. 22**).



Figura 22. Plántulas de 53 días de *A. thaliana* (senescencia).

6.1.4. Situaciones de estrés abiótico en plántulas de Arabidopsis

6.1.4.1. Estrés por salinidad

Para realizar el estrés salino se sembraron dos grupos de placas de Petri. El primero de ellos, se correspondía con la situación control y contenía semillas de *A. thaliana* que se mantuvieron durante 14 días en las condiciones de crecimiento anteriormente descritas. El segundo grupo de semillas creció durante 14 días en un medio MS suplementado con 100 mM de NaCl en las mismas condiciones que las placas control (**Fig. 23**). Tras los 14 días de crecimiento, se recolectaron las plántulas y se procesaron convenientemente para los estudios posteriores de espectrometría de masas.

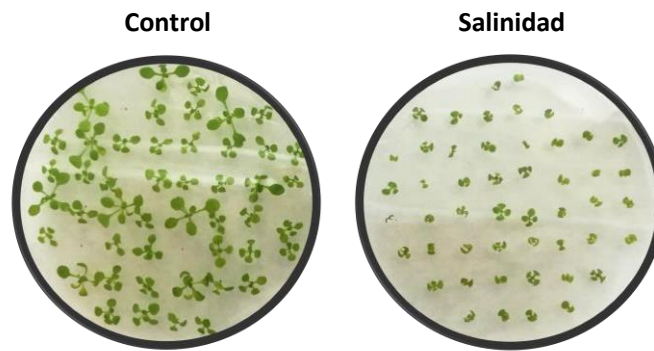


Figura 23. Plántulas de *Arabidopsis* tras 14 días de estrés por salinidad.

6.1.4.2. Estrés por metales pesados (Cadmio)

El metal pesado utilizado para realizar este estrés fue el cadmio. En este caso, también se sembraron semillas en dos grupos de placas: un grupo control y otro grupo en el que las semillas crecieron durante 14 días en un medio de cultivo que contenía $150 \mu\text{M}$ de cloruro de cadmio (CdCl_2) (**Fig. 24**). Transcurridos los 14 días las plántulas completas se recolectaron para los posteriores análisis de espectrometría de masas.

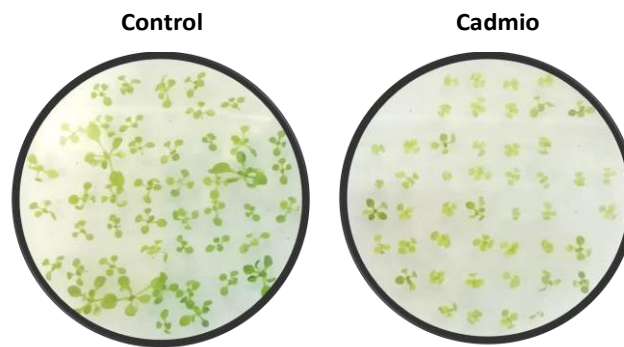


Figura 24. Plántulas de *Arabidopsis* tras 14 días de estrés por metales pesados (cadmio).

6.1.4.3. Estrés por baja temperatura

El estrés por baja temperatura se realizó empleando plántulas de 14 días que habían crecido en las condiciones de cultivo anteriormente expuestas para este material vegetal. Estas plántulas se mantuvieron durante 24 horas sobre bandejas con hielo (pero sin contactar directamente con él) dentro de una cámara con una temperatura estable de 4°C . En cambio, el grupo control se mantuvo durante ese tiempo en las condiciones óptimas de luz, temperatura y humedad para *Arabidopsis* (**Fig. 25**).

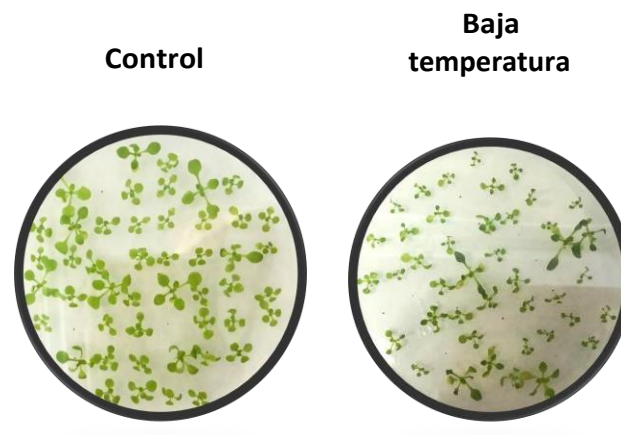


Figura 25. Efecto del estrés por baja temperatura (4°C) durante 24 horas.

6.1.4.4. Estrés por luz continua

Para realizar el estrés por luz continua se utilizaron plántulas de Arabidopsis que durante 14 días habían crecido en condiciones óptimas de iluminación, temperatura y humedad. A continuación, las plántulas se expusieron a una intensidad lumínica continua de $190 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 48 horas. Transcurrido ese período se recolectaron para los posteriores análisis de espectrometría de masas (Fig. 26).

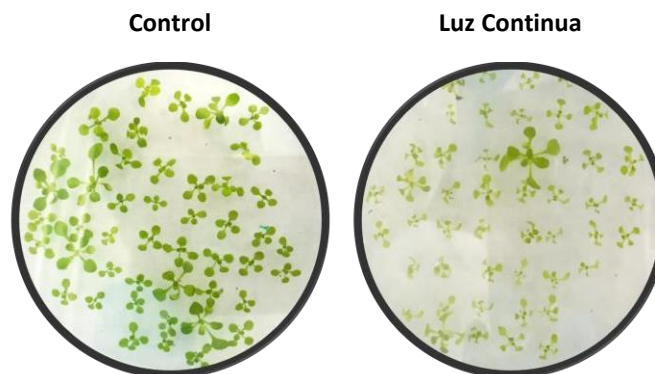


Figura 26. Efecto del estrés por luz continua ($190 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 48 horas.

6.1.4.5. Estrés por oscuridad

Este tipo de estrés abiótico se realizó utilizando plántulas de 14 días que habían crecido en condiciones óptimas. Seguidamente, se mantuvieron durante 48 horas en oscuridad, en cambio, el grupo control continuó con su ciclo de luz/oscuridad establecido (Fig. 27). Una vez transcurrido el periodo de estrés, se recolectaron las plántulas con las que se realizaron los estudios posteriores de espectrometría de masas.

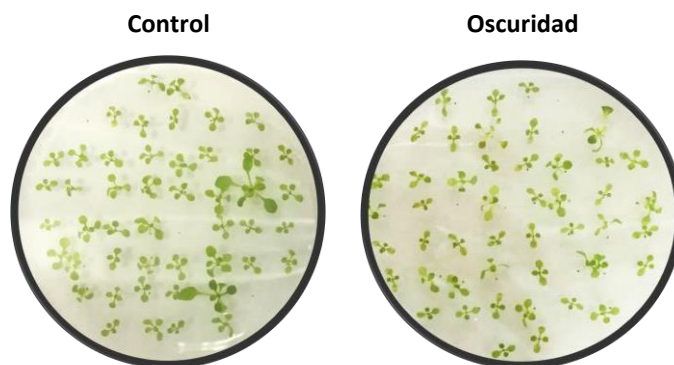


Figura 27. Efecto del estrés por oscuridad durante 48 horas.

6.2. *Nicotiana tabacum*

6.2.1. Cultivos celulares

Otro tipo de material vegetal utilizado en esta Tesis Doctoral fueron los cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* (tabaco). Estos cultivos celulares se mantuvieron en 100 ml de un medio de crecimiento basado en el descrito por (Chandler et al. 1972). Las principales condiciones de cultivo fueron: agitación continua (150 rpm), temperatura constante de 25°C e iluminación continua con luz blanca fotosintética. La renovación del cultivo se realizó cada 7 días bajo condiciones de estricta esterilidad subcultivando un volumen de 10 ml de células en suspensión en 100 ml de medio. Los cultivos celulares utilizados para los experimentos se recolectaron a los 4 días tras el subcultivo.

6.3. *Saccharomyces cerevisiae*

6.3.1. Cultivos de levaduras

Para realizar los experimentos indicados en este trabajo se utilizó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de tipo salvaje (BY4741: MATa; his3D1; leu2D0; met15D0; ura3D0) de EUROSCARF. Las células de levadura se cultivaron a 30°C y en agitación en un medio (YPGE) que contenía extracto de levadura al 1 % (p/v). Para realizar los análisis bioquímicos y de espectrometría de masas se utilizaron cultivos de levadura a una densidad óptica (DO_{600}) de crecimiento de 0,6.

6.3.2. Estrés por choque térmico

Cuando los cultivos de levadura alcanzaron una $DO_{600} = 0,6$ en las condiciones de crecimiento anteriormente detalladas, una fracción del cultivo se sometió a un choque térmico de 37°C durante una hora. La otra fracción del cultivo constituyó la muestra de control. Las células procedentes de ambas situaciones, se recogieron por centrifugación a 3000 xg durante 5 minutos y 4°C. El sedimento celular se lavó con agua destilada fría y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Este proceso se repitió una vez más.

7. Obtención del extracto proteico vegetal por precipitación con acetona

En primer lugar, la muestra vegetal se homogeneizó en nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino al que se añadió un tampón específico en proporción 1:2 (p:v) (Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, sacarosa 7 % (p/v); PVPP 7 % (p:v); Triton X-100 0,05 % (v/v) y EDTA 0,1 mM). A continuación, la muestra se centrifugó a 10.000 *xg* durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante, que se volvió a centrifugar una vez más en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante obtenido se precipitó con acetona fría (-20 °C) al 70% y se almacenó toda una noche a -20 °C. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 10.000 *xg* durante 15 minutos a 4°C. En este caso, se desechó el sobrenadante. El precipitado se reservó y se utilizó para llevar a cabo las determinaciones de los niveles de NO₂-FAs que se encontraban aductados con proteínas y para la identificación de las proteínas nitroalquiladas por nano-LC/MS-MS.

8. Obtención del extracto libre de células (ELC) de levaduras

Las células de levadura se lisaron por sonicación durante 1 hora a 4°C en un tampón de homogeneización [Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 0,1 mM, Triton X-100 0,1 % (p/v), EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, cóctel comercial de inhibidores de proteasas al 10 % (AEBSF, 1,10-fenantrolina, pepstatina A, leupeptina, bestatina y E-64 de Sigma-Aldrich) y 5 mg de zimoliasa por gramo de células] añadido en una proporción de 1:5 (p de células: volumen de tampón de homogeneización). A continuación, las células sonicadas se centrifugaron a 10.000 *xg* durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante constituyó el extracto libre de células (ELC).

9. Determinación de la concentración de proteínas totales (Bradford)

Los niveles de proteínas totales se determinaron mediante el método de Bradford (Bradford 1976) y utilizando una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (0 - 0,6 mg/ml). Se realizaron tres diluciones de cada muestra en un volumen final de 800 µl a los que se añadieron 200 µl de reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad Protein Assay Reagent). Seguidamente, se agitaron los tubos y tras una incubación de 10 min a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 595 nm frente a un blanco que contenía 800 µl de agua milli Q y 200 µl de reactivo de Bradford.

10. Detección de marcadores de la homeostasis redox

10.1. Detección y cuantificación de los niveles de malondialdehído

Uno de los marcadores del estado redox celular es el MDA, el cual es generado por la ruptura de los ácidos grasos insaturados como consecuencia de la oxidación por ROS de los lípidos de membrana (peroxidación lipídica). Por tanto, el MDA es utilizado como un marcador de estrés oxidativo.

Las muestras control y las procedentes de los diferentes estreses estudiados en las plántulas de *Arabidopsis* se homogeneizaron con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino. A continuación, se añadió el reactivo TBA-TCA-HCl (15 % (p/v) ácido tricloroacético (TCA), 0,37 % (p/v) ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), 0,25 M ácido clorhídrico (HCl)) en proporción 1/10 (p/v) y se incubaron las muestras en tubo pyrex durante 30 minutos a 85°C. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar en hielo y se centrifugaron a 11000 *xg* durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante para volver a centrifugarlo en las mismas condiciones. Finalmente, se separó el sobrenadante para determinar su absorbancia espectrofotométrica a 535 y 600 nm. El cálculo de

los niveles de MDA se realizó restando a la Abs a 535 nm la obtenida a 600 nm para descartar impurezas y teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del MDA: $\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

10.2. Detección y cuantificación de los niveles de H₂O₂ en *Arabidopsis thaliana*

Los niveles de H₂O₂, otro marcador de estrés oxidativo, se analizaron tanto en las muestras control como en las procedentes de los diferentes estreses ensayados utilizando el kit comercial Amplex Red (Sigma) (Karakuzu et al. 2019) y en un lector de microplacas. En primer lugar, el material vegetal se homogeneizó con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino al que se añadió un tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7 en proporción 1:4 (p:v) (para las muestras de desarrollo) o 1:2 (para las muestras de los estreses). A continuación, las muestras se centrifugan a 16000 *xg* durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.

En cada pocillo de microplaca se dispusieron 50 μl de muestra, patrón o blanco y se añadieron 25 μl de Amplex Red 0,2 mM y 25 μl de solución de peroxidasa de rábano picante 0,4 U/ml en tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7. Tras una incubación de 10 minutos, se determinó la absorbancia a 570 nm. Para cuantificar los niveles de H₂O₂, se utilizó una recta patrón con diferentes concentraciones de H₂O₂ (0 - 10 μM).

10.3. Detección y cuantificación de los niveles de H₂O₂ en *Saccharomyces cerevisiae*

En el caso, de las muestras control y de estrés estudiadas en *S. cerevisiae*, el H₂O₂ se midió siguiendo el método descrito por (Bellincampi et al. 2000) con algunas modificaciones. En primer lugar, se eliminó la presencia de reductores en el ELC mediante el uso de columnas desaladoras NAP10 (GE Healthcare). Para ello, 1ml de muestra se introdujo en una columna de desalación equilibrada previamente con Tris-HCl 0,1mM, pH 7,6 y, posteriormente, la muestra se eluyó con 1,5 ml de dicho tampón.

A continuación, se incubó un volumen de 500 μL de ELC libre de reductores con el mismo volumen del reactivo de ensayo, que contenía 500 μM de sulfato ferroso amónico, 50 mM de H₂SO₄, 200 μM de naranja de xilenol y sorbitol 200 mM durante 45 minutos en oscuridad. La oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³ mediada por el H₂O₂ se determinó espectrofotométricamente midiendo el complejo Fe⁺³-naranja de xilenol a $\lambda = 560 \text{ nm}$. El trazado de una recta patrón de H₂O₂ (0 - 9,8 μM) permitió cuantificar los niveles de H₂O₂ presentes en las muestras.

10.4. Detección y cuantificación de los niveles de ROS extracelulares en los cultivos celulares de *Nicotiana tabacum*

En los cultivos celulares de *N. tabacum* de 4 días tratados con las elicinas y los NO₂-FAs se determinaron los niveles de ROS extracelulares por quimioluminiscencia en un lector de microplacas. Para ello, en cada pocillo se añadieron 140 μl del tampón de reacción (50mM MES, pH 6,5, 175 mM manitol, 0,5 mM CaCl₂ y 0,5 mM K₂SO₄) y 135 μl del cultivo celular o de medio de cultivo (blanco). A continuación, 25 μl de luminol (25 μM) fueron dispensados automáticamente en cada pocillo y, finalmente, se determinó la quimioluminiscencia a 450 nm (Noirot et al. 2014). Los niveles de ROS extracelulares se expresaron en unidades relativas de ROS (unidades de luminiscencia).

11. Síntesis del ácido nitro-oleico (NO₂-OA), del ácido nitro-oleico marcado con carbono 13 (¹³C₁₈-NO₂-OA), del ácido nitro-linoleico (NO₂-LA) y del ácido nitro-linolénico (NO₂-Ln)

La síntesis del NO₂-OA se llevó a cabo siguiendo un método consistente en la nitroselenación, oxidación y eliminación de hidroselenóxido, similar al descrito previamente en los trabajos de (Alexander et al. 2006; Baker et al. 2004). El proceso se inició mezclando ácido oleico comercial (1 g, 3,05 mmol), cloruro de mercurio sólido (1,15 g, 4,23 mmol), bromuro de fenilselenilo (0,93 g, 3,93 mmol) y nitrito de sodio (0,49 g, 7,19 mmol) que se disolvieron en una mezcla de tetrahidrofurano - acetonitrilo (1:1, v/v, 24 ml) en atmósfera de Ar durante 12 h. Después de la incubación, los sólidos se eliminaron por filtración y el disolvente se evaporó. A continuación, el residuo se disolvió en tetrahidrofurano (12 ml), se añadió gota a gota peróxido de hidrógeno al 33% (3,63 ml) y se incubó durante 1 hora en agitación y manteniendo la reacción en un baño con hielo. Seguidamente, se realizó una extracción con hexano, se lavó con solución saturada de cloruro de sodio, se secó con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó el solvente. El residuo seco se recogió en una mezcla de hexano/éter dietílico/ácido acético (5 ml, 80:20:0,5, v/v/v) y se descontaminó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (gel de sílice 60) con una mezcla de hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:0,5, v/v/v). Las fracciones de interés se seleccionaron mediante TLC en placas de gel de sílice 60 (tamaño de partícula 25 mm, 0,2 mm de espesor, láminas Fluka Alu), eluidas con una mezcla de hexano/éter dietílico/ácido acético (80:20:0,5, v/v/v). Las TLC se revelaron con luz ultravioleta (el grupo nitro absorbe la luz ultravioleta) y con yodo (que reacciona con los dobles enlaces de la molécula). De esta forma, se seleccionaron las fracciones enriquecidas en NO₂-OA y libres de la presencia de ácido oleico que no hubiera reaccionado. Finalmente, se analizó su estructura por RMN con un espectrómetro Bruker Avance 400 (Billerica, MA) operando a 400.13 MHz para ¹H. El procesamiento y los cálculos de los espectros se realizaron con el software ACD/Labs versión 12.01, 2009 (Advanced Chemistry Development, Toronto, Ontario, Canadá).

El NO₂-OA marcado con carbono 13 (¹³C₁₈-NO₂-OA), que se utilizó como patrón interno en el protocolo de cuantificación de los NO₂-FAs, se sintetizó tal y como se ha descrito anteriormente.

Para la síntesis del NO₂-LA y del NO₂-Ln también se siguió el protocolo anterior con la diferencia de que el período de incubación del proceso de nitroselenación se realizó durante 4 horas en atmósfera de Ar en lugar de extenderse 12 horas.

12. Detección de los ácidos grasos nitrados

12.1. Detección de los NO₂-FAs de los depósitos lipídicos

12.1.1. Extracción lipídica

La detección de los niveles de NO₂-FAs que se encontraban esterificados con lípidos más complejos se llevó a cabo en muestras de *Arabidopsis thaliana* y en *Saccharomyces cerevisiae*. En primer lugar, las muestras fueron homogeneizadas en nitrógeno líquido para conseguir una mayor disgregación de las paredes celulares y del tejido en general. A continuación, se realizó la extracción del material lipídico utilizando la técnica de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1959). El primer paso de la extracción lipídica consistió en añadirle a 1g de material vegetal o de levaduras, 13ml de una mezcla de hexano/isopropanol/ ácido fórmico 1M (30:20:2, v:v:v) seguido de una fuerte agitación durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 13 ml de hexano, se volvió a agitar vigorosamente durante 2 minutos y se centrifugó a 2500 xg a 4°C durante 2 minutos. Transcurrida la centrifugación, se pudieron observar perfectamente dos fases: la fase orgánica superior, que contenía las moléculas apolares, como los lípidos y la fase acuosa inferior, que

contenía las moléculas polares, como proteínas y pigmentos. Se recogió la fase orgánica superior y se evaporó con corriente de nitrógeno líquido.

12.1.2. Extracción en fase sólida

El material lipídico se separó cromatográficamente en las diferentes clases de lípidos utilizando columnas de extracción en fase sólida (SPE) Strata-NH₂ con una capacidad máxima de 500 mg /6 ml (Zou 2011; Pietsch and Lorenz 1993). En primer lugar, las columnas se activaron con 4 ml de acetona/H₂O (7:1, v:v) y se equilibraron con 4 ml de hexano. A continuación, se añadió la muestra solubilizada en 300 µl de una mezcla de hexano/metil tert-butil eter/ácido acético (100:3:0,3, v:v:v) y los ésteres de fitoesteres (SE), los triacilglicéridos (TAG), los mono y diacilglicéridos (MAG-DAG), los ácidos grasos libres (FFA), la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI) fueron secuencialmente eluidos con 12ml de hexano, hexano/cloroformo/etil acetato (100:5:5, v/v/v), cloroformo/isopropanol (2:1, v/v), dietil-éter/ácido acético al 2%, acetonitrilo/1-propanol (2:1, v/v), metanol, isopropanol/HCl metanólico (4:1, v/v) y metanol/HCl metanólico (9:1, v/v), respectivamente. Finalmente, las diferentes fracciones obtenidas se evaporaron con nitrógeno líquido.

12.1.2.1. Confirmación de la clase de lípidos

Las columnas de cromatografía Strata-NH₂ separaron a los lípidos complejos en función de su polaridad mediante el uso de disolventes con polaridad creciente. De esta manera, se obtuvieron las siguientes 8 fracciones en orden creciente de polaridad: ésteres de fitoesteres, triacilglicéridos, mono y diacilglicéridos, ácidos grasos libres, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. A continuación, se ha corroborado mediante técnicas espectrofotometría y de espectrometría de masas la presencia mayoritaria de cada una de las clases de lípidos en su fracción cromatográfica correspondiente.

En la fracción de los ésteres de fitoesteres, concretamente se identificó la presencia de los ésteres de colesterol mediante un método enzimático espectrofotométrico. La fracción de SE se solubilizó en metanol, se le añadió una mezcla de enzimas (colesterol esterasa, colesterol oxidasa, peroxidasa y 4-aminofenazona) y se incubó durante 5 minutos a 37 °C. Los ésteres de colesterol presentes en la muestra se reducían por la colesterol esterasa dando lugar a colesterol y ácidos grasos. El colesterol liberado se oxidaba por la colesterol oxidasa en 4-colestenona y H₂O₂. Finalmente, el H₂O₂ en presencia del 4-aminofenazona y peroxidasa generaba una molécula llamada quinonimina que absorbía luz a 505 nm.

La detección de TAG, MAG-DAG, PC, PE, PS y PI se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Gutbrod et al. 2021) mediante espectrometría de MS/MS por infusión directa. Para ello, las fracciones de TAG, MAG-DAG, PC, PE, PS y PI se solubilizaron en 100 µl de una mezcla de metanol/cloroformo/acetato de amonio 300 mM (665:300:35, v:v:v), con excepción de la PS, a la que también se añadieron 8 µl de ácido acético. El análisis MS/MS se llevó a cabo en un espectrómetro de masas QTOF de Agilent que enviaba las muestras directamente a la fuente de iones (que funcionaba en modo positivo). Todos los lípidos se midieron utilizando los siguientes ajustes del equipo: flujo del gas de secado: 4 l/min de nitrógeno; voltaje del fragmentador: 100 V; temperatura del gas: 325 °C; velocidad de barrido: 1 espectro/s.

Para identificar cada clase de lípido, se utilizó como patrón una determinada especie molecular representativa en las hojas de las plantas, de las cuales conocíamos el ion del aducto molecular $[M + H]^+$ o $[M + NH_4]^+$ y la masa molecular correspondiente al ion del aducto (m/z). La

fragmentación de los TAG y DAG se caracteriza por la pérdida neutra del aducto correspondiente al ácido graso+NH₃, que se pudo detectar mediante un escaneo de la pérdida neutra para la masa indicada. La fragmentación de los fosfolípidos, con excepción de la PC, también se detectó por la búsqueda en barrido de la diferencia de la pérdida neutra correspondiente al aducto formado por el grupo de cabeza del fosfolípido. En el caso de la PC, la detección se llevó a cabo mediante el escaneo del ion precursor correspondiente a su grupo de cabeza (**Tabla 9**).

Tabla 9. Iones moleculares, iones generados tras la fragmentación y parámetros para el análisis de TAG, DAG y fosfolípidos mediante Q-TOF MS/MS.

Clase de lípido	Especie molecular (Ejemplo)	Ion del aducto molecular	Ion del aducto molecular (m/z)	EC (V)	Método de detección	Diferencia de masa de escaneo de la pérdida neutra
TAG	54:9-TAG	[M + NH ₄] ⁺	890,7238	20	Pérdida neutra	295,2511 (Gutbrod et al. 2021)
DAG	34:3-DAG	[M + NH ₄] ⁺	608,5254	20	Pérdida neutra	273,2667, 295,2511 (Gutbrod et al. 2021)
PC	36:6-PC	[M + H] ⁺	778,5382	35	Ion precursor	184,0739 (Brügger et al. 1997)
PE	34:3-PE	[M + H] ⁺	714,5069	20	Pérdida neutra	141,0191 (Brügger et al. 1997)
PS	34:3-PS	[M + H] ⁺	758,4967	22	Pérdida neutra	185,0089 (Brügger et al. 1997)
PI	34:2-PI	[M + NH ₄] ⁺	852,5597	20	Pérdida neutra	277,0563 (Taguchi et al. 2005)

EC: energía de colisión; V: voltaje.

12.1.3. Hidrólisis ácida

Las fracciones cromatográficas obtenidas, con excepción de la fracción de ácidos grasos libres, se sometieron a una hidrólisis ácida, siguiendo el protocolo de (Fazzari et al. 2017; Aveldaño and Horrocks 1983) pero añadiendo ligeras modificaciones para adaptarlo al material vegetal. Mediante este procedimiento se liberaron los ácidos grasos que se encontraban esterificados en cada uno de los lípidos complejos.

Inicialmente, las fracciones cromatográficas evaporadas se solubilizaron con 50 µl de metanol y se añadió una concentración conocida ¹³C₁₈-NO₂-OA (10 nM), el cual es utilizado como patrón interno para determinar la pérdida de ácidos grasos generada durante el proceso de hidrólisis ácida y por el efecto matriz de las muestras en los análisis de MS/MS. Para limitar las reacciones de nitración catalizadas por ácidos artificiales, se añadieron 250 µl de sulfanilamida metanólica (1 g /10 ml), que es un secuestrador del NO₂ y se incubó durante 20 minutos. A continuación, las muestras se evaporaron por corriente de nitrógeno líquido y se incubaron con 2,5 ml de acetonitrilo/HCl (9:1, v:v) a 90°C durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo la extracción de los ácidos grasos liberados añadiendo 5ml de hexano y 2,5ml de H₂O y agitando vigorosamente la mezcla durante 1 minuto. La centrifugación de la mezcla a 1000 xg durante 5 minutos a 4°C nos permitió diferenciar perfectamente las dos fases generadas. Se recogió la fase orgánica (superior) donde se encontraban disueltos los ácidos grasos libres, se evaporó con corriente de nitrógeno líquido y se resuspendió con 200 µl de metanol. Finalmente, las muestras se filtraron a través de filtros de teflón de 0,45 µM antes de ser analizadas por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

12.2. Detección de los NO₂-FAs de los depósitos proteicos

La detección de los niveles de NO₂-FAs que se encontraban aductados con proteínas se llevó a cabo en las muestras procedentes de las diferentes etapas de crecimiento y estreses de *Arabidopsis thaliana*. Los extractos proteicos obtenidos de la precipitación con acetona de las diferentes situaciones mencionadas anteriormente, se solubilizaron en 2ml de metanol.

A continuación, se llevó a cabo la oxidación de la unión del NO₂-FA con las proteínas, es decir, la oxidación del aducto de Michael, utilizando para ello el método descrito por (Padilla et al. 2017a) pero con algunas modificaciones. En primer lugar, la muestra se dividió en dos partes iguales:

- ✔ Una de las partes no se oxidó y se utilizó para cuantificar los niveles de NO₂-FAs libres que se hubieran podido arrastrar durante la precipitación con acetona, por tanto, estos NO₂-FAs no procedían de la unión con proteínas.
- ✔ La otra parte de la muestra se incubó con 50 mM de H₂O₂, que se añadió por infusión cada 20 minutos durante 3 horas y 20 minutos y en agitación. El tratamiento con el H₂O₂ oxidará los aductos de Michael con la consiguiente liberación del NO₂-FA.

A continuación, tanto a la muestra no oxidada como a la oxidada se les añadió una concentración conocida del patrón interno ¹³C₁₈-NO₂-OA (10 nM). Seguidamente, se procedió a la extracción de los ácidos grasos libres añadiendo 7,5ml de hexano y agitando vigorosamente durante 2 minutos. Para separar bien las fases, se centrifugó a 1000 xg durante un minuto a 4°C y la fase superior apolar correspondiente al hexano, rica en ácidos grasos, se recogió y se evaporó con corriente de nitrógeno líquido. Finalmente, las muestras se hicieron pasar a través de filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,45 µm antes de ser analizadas por espectrometría de masas (LC-MS/MS).

12.3. Detección e identificación de los NO₂-FAs por LC-MS/MS

La detección, identificación y cuantificación de la presencia de NO₂-FAs en las muestras de levaduras y plantas se realizó utilizando un espectrómetro de masas triple cuadrupolo con trampa lineal (QTRAP 6500+) de Sciex acoplado a un cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UHPLC) ExionLC AD de la misma marca. Los extractos lipídicos se separaron mediante una columna Kinetex 1,7 µm C18 100 Å (150 x 2,1 mm) en un sistema de solventes compuesto por agua con 0,1% de ácido fórmico (A) y metanol con 0,1% de ácido fórmico (B) y con el siguiente programa de gradiente: comienzo con 10% B y ascenso a 95% en 5 min, de los 5 a los 10 min el gradiente fue isocrático a 95% B. A los 10,1 min se volvió a las condiciones iniciales y permaneció así durante 5 min para reequilibrar la columna. El flujo se mantuvo constante a 0,3 ml/min.

El análisis MS/MS se realizó en modo de iones negativos, utilizando una energía de colisión oscilante y una temperatura de desolvatación de 350 °C. La presencia de los diferentes NO₂-FAs se detectó usando el modo de escaneo de monitorización de reacciones múltiples (MRM) con transiciones MRM específicas correspondientes al NO₂-OA (326/46 y 326/279 m/z), al ¹³C₁₈-NO₂-OA (344,1/46 m/z), al NO₂-LA (324/46 y 324/277 m/z) y al NO₂-Ln (322/46 y 322/275 m/z) (Baker et al. 2005; Bonacci et al. 2012).

La cuantificación de los niveles de NO₂-FAs se realizó mediante una curva de calibración elaborada con el estándar de referencia para cada NO₂-FA, con un rango de concentraciones entre 0,5 nM y 18,75 nM y con la presencia del ¹³C₁₈-NO₂-OA como patrón interno para corregir la pérdida causada por el procesamiento. En todos estos casos, los datos obtenidos fueron analizados y procesados utilizando el software Sciex OS (Absciex). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

13. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

13.1. Fosfoglicerato quinasa (PGK) de *Arabidopsis thaliana*

La expresión y purificación de la PGK se realizó utilizando el plásmido pHTP1 que es un vector de expresión que forma parte del sistema de expresión y clonación NZYEasy (NZYTech S.L.). El gen de la PGK se incluyó en el plásmido pHTP1 y se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21. Las células transformadas se cultivaron en medio LB complementado con NZY auto-inducción y suplementado con Kanamicina a 37°C hasta alcanzar una fase de crecimiento estacionaria. Finalmente, la temperatura de los cultivos se redujo a 25 °C y se mantuvieron a esta temperatura durante 16 horas.

La purificación de la proteína recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). El protocolo cromatográfico incluía un paso de lavado (repetido dos veces) con tampón de lavado (imidazol 10 mM, NaHepes 50 mM pH 7,5, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM), un segundo paso de lavado con imidazol 35 mM, NaHepes 50 mM pH 7,5, NaCl, CaCl₂ 5 mM, un tercer paso de lavado con imidazol 60 mM, NaHepes 50 mM pH 7,5, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM. Finalmente, las proteínas recombinantes se eluyeron con imidazol 300 mM, NaHepes 50 mM pH 7,5, NaCl 1 M, CaCl₂ 5 mM.

La PGK purificada se analizó mediante SDS-PAGE al 14 % y el resultado de la electroforesis se tiñó con colorante azul de Coomassie. El valor teórico predicho para su masa molecular era de 50,1 kDa, sin embargo, la masa molecular de la proteína recombinante fue de 53,1 kDa, ya que la secuencia contenía una etiqueta de histidinas seguida de una secuencia de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (TEV) en el extremo N-terminal (**Fig. 28**).

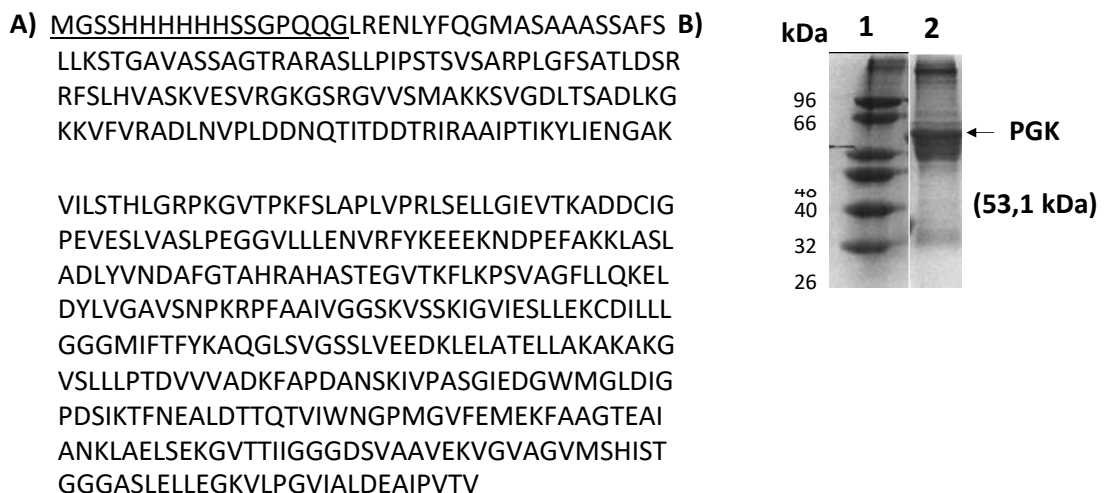


Figura 28. PGK recombinante de *Arabidopsis thaliana*. A) Secuencia de la PGK recombinante. El área subrayada representa la etiqueta de histidinas seguida de una secuencia de reconocimiento de la proteasa del TEV. B) SDS-PAGE de la PGK recombinante. En la línea 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en la línea 2, la proteína purificada con un peso molecular de 53,1 kDa.

13.2. Triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Arabidopsis thaliana*

La expresión y purificación de la TPI se realizó utilizando también el sistema de expresión y clonación NZYEasy (NZYTech S.L.). El marcaje de la proteína con una etiqueta de 6 histidinas permitió su purificación mediante IMAC, siguiendo el protocolo cromatográfico anteriormente descrito.

La TPI purificada se analizó mediante SDS-PAGE al 14 % y el resultado de la electroforesis se tiñó con colorante azul de Coomassie. El valor teórico predicho para su masa molecular era de 27,2 kDa, sin embargo, la masa molecular de la proteína recombinante obtenida fue de 30,1 kDa, debido a la etiqueta de histidinas seguida de la secuencia de reconocimiento de la proteasa del TEV en el extremo N-terminal (**Fig. 29**).

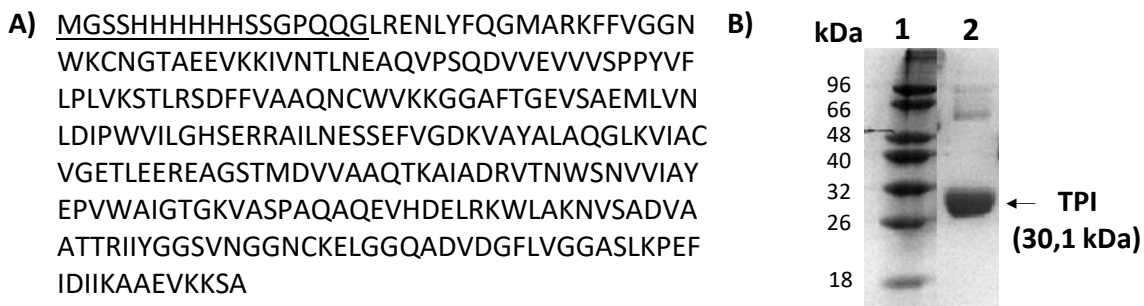


Figura 29. TPI recombinante de *Arabidopsis thaliana*. A) Secuencia de la TPI recombinante. El área subrayada representa la etiqueta de histidinas seguida de la secuencia de reconocimiento de la proteasa del TEV. B) SDS-PAGE de la TPI recombinante. En la línea 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en la línea 2, la proteína purificada con un peso molecular de 30,1 kDa.

13.3. Enzima málico dependiente de NADP de *Arabidopsis thaliana*

La sobreexpresión del NADP-ME se llevó a cabo utilizando el sistema de producción CASCADE™ (Biomedal, S.L.). Este sistema de expresión presenta dos elementos reguladores, uno se encuentra a nivel cromosómico en la cepa REG-1 de *Escherichia coli* (nahR/Psal::xyLS2) y el otro se encuentra en el plásmido pALEXB (Pm/LacO/c-lytAG::gen de interés). El salicilato actúa como inductor, en concreto, actúa sobre las proteínas activadoras de la transcripción presentes en este sistema, NAHR y XYLS2. El efecto sinérgico de dos reguladores de la transcripción en un sistema de cascada secuencial, permite un aumento de la expresión proteica de unas 20 veces con respecto a otros sistemas de expresión convencionales.

El gen del NADP-ME se incluyó en el plásmido pALEXB y se introdujo por transformación en células *E. coli*, BIVU0811. Las células transformadas se cultivaron en medio LB que contenía Kanamicina y Ampicilina.

La inducción de la proteína se logró cultivando las células transformantes, que se encontraban en estado exponencial de crecimiento, a 30°C durante 4,5 h y a 20°C durante toda una noche.

La purificación de la proteína recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina LYTRAP (BIOMEDAL) como fase estacionaria. El protocolo cromatográfico incluía un paso de lavado con 20 volúmenes de tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7, 300 mM de NaCl, 5 mM de colina. La elución de la proteína se realizó añadiendo el mismo tampón fosfato

potásico, pero con 100 mM NaCl y diferentes concentraciones de colina: 20 mM (E1), 50 mM (E2), 75 mM (E3), 100 mM (E4), 150 mM (E5), 175 mM (E6), 200 mM (E7) y 500 mM (E8).

El NADP-ME purificado se analizó mediante SDS-PAGE al 12 % y el gel resultante se tiñó con colorante azul de Coomassie. El valor teórico predicho para su masa molecular era de 64,4 kDa, sin embargo, la masa molecular de la proteína recombinante obtenida fue de 84 kDa, ya que la secuencia recombinante contenía el Lytag, el cual es un dominio proteico de *Streptococcus pneumoniae* (Fig. 30).

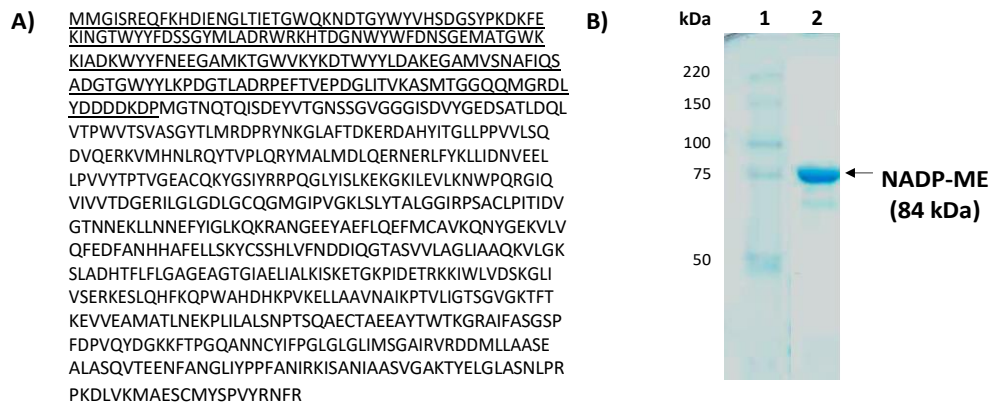


Figura 30. NADP-ME recombinante de *Arabidopsis thaliana*. A) Secuencia del NADP-ME recombinante. El área subrayada representa la secuencia Lytag. B) SDS-PAGE del NADP-ME recombinante. En la línea 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en la línea 2, la proteína purificada eluida en la 6ª fracción con un peso molecular de 84 kDa.

13.4. Isocitrato deshidrogenasa citosólica de *Arabidopsis thaliana*

La expresión de la ICDH se llevó a cabo con el sistema de producción CASCADE™ (Biomedal, S.L.) y siguiendo el mismo protocolo que el del NADP-ME descrito anteriormente.

La purificación de la proteína recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando la resina LYTRAP (BIOMEDAL) como fase estacionaria. El protocolo cromatográfico incluía un paso de lavado con 10 volúmenes de tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7, 300 mM NaCl, 5 mM colina. La elución de la proteína se realizó añadiendo el mismo tampón fosfato potásico pero con 100 mM NaCl y un gradiente continuo de colina de 20 mM a 1000 mM (10 fracciones).

La ICDH purificada se analizó mediante SDS-PAGE al 12,5 % y el gel resultante se tiñó con colorante azul de Coomassie. El valor teórico predicho para su masa molecular era de 45,7 kDa, sin embargo, la masa molecular de la proteína recombinante resultó ser de 67,2 kDa, debido a la secuencia Lytag de *Streptococcus pneumoniae* (Fig. 31).

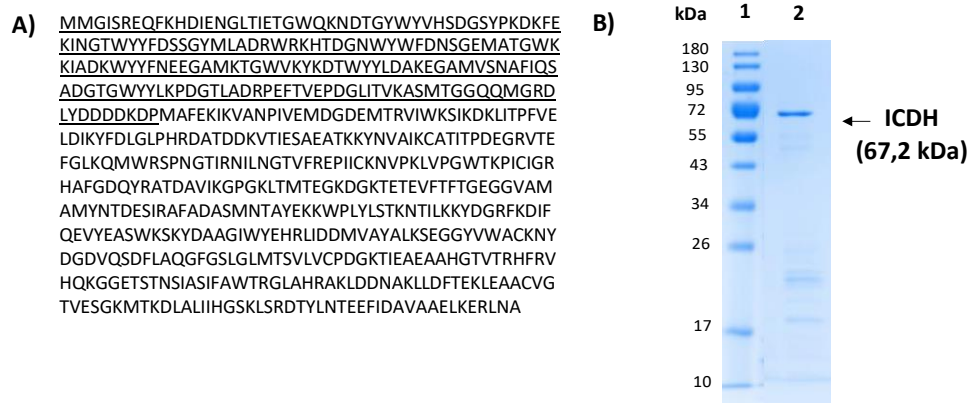


Figura 31. ICDH recombinante de *Arabidopsis thaliana*. A) Secuencia de la ICDH recombinante. El área subrayada representa la secuencia Lytag. B) SDS-PAGE de la ICDH recombinante. En la línea 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en la línea 2, la proteína purificada eluida en la 6ª fracción con un peso molecular de 67,2 kDa.

13.5. Glutatión S-transferasa (GST) de *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de la proteína recombinante GST se utilizó el sistema de expresión y clonación NZYEasy (NZYTech S.L.). La proteína se purificó mediante IMAC siguiendo el protocolo cromatográfico anteriormente descrito para la la PGK.

El valor teórico predicho para su masa molecular era de 25,1 kDa, sin embargo, la masa molecular de la proteína recombinante obtenida fue de 28,1 kDa como consecuencia de la etiqueta de histidinas seguida de la secuencia de reconocimiento de la proteasa del TEV presente en el extremo N-terminal de la proteína recombinante (**Fig. 32**).

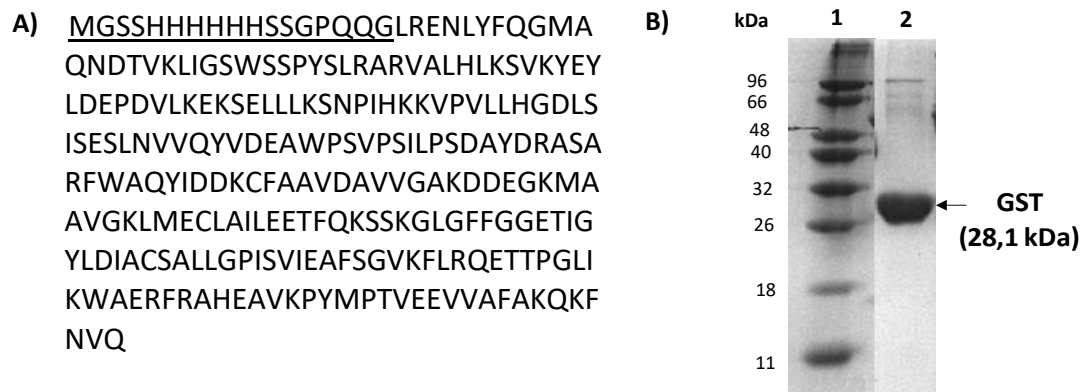


Figura 32. GST recombinante de *Arabidopsis thaliana*. A) Secuencia de la GST recombinante. El área subrayada representa la etiqueta de histidinas seguida de la secuencia de reconocimiento de la proteasa del TEV. B) SDS-PAGE de la GST recombinante. En la línea 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en la línea 2, la proteína purificada con un peso molecular de 28,1 kDa.

13.6. Catalasa (Cat) de *Arabidopsis thaliana*

La expresión y purificación de la Cat se realizó utilizando el plásmido pHTP10 el cual es un vector de expresión que forma parte del sistema de expresión y clonación NZYEasy (NZYTech S.L.). El gen de la catalasa se incluyó en el plásmido pHTP10 y se utilizó para transformar células *E. coli* BL21. Las células transformadas se cultivaron en medio LB suplementado con Kanamicina (50 µg

/ml) a 37 °C hasta que alcanzaron una fase de crecimiento exponencial temprana ($A_{600nm} = 0,4-0,6$). La producción de proteína recombinante se produjo después de una incubación adicional a 16°C durante 16 horas.

La purificación de la proteína recombinante se realizó mediante IMAC. El protocolo cromatográfico incluía un paso de lavado (repetido dos veces) con tampón de lavado (imidazol 10 mM, NaHepes 50 mM pH 7,5, NaCl 1 M, $CaCl_2$ 5 mM), un segundo paso de lavado con imidazol 35 mM, NaHepes 50 mM pH 7,5, NaCl, $CaCl_2$ 5 mM, un tercer paso de lavado con imidazol 60 mM, NaHepes 50 mM pH 7,5, NaCl 1 M, $CaCl_2$ 5 mM. Finalmente, las proteínas recombinantes se eluyeron con imidazol 300 mM, NaHepes 50 mM pH 7,5, NaCl 1 M, $CaCl_2$ 5 mM.

La catalasa purificada se analizó mediante SDS-PAGE al 12 % y el gel resultante se tiñó con colorante azul de Coomassie. El valor teórico predicho para su masa molecular era de 56,9 kDa, sin embargo, la masa molecular de la Cat recombinante sintetizada fue de 57 kDa (**Fig. 33**).

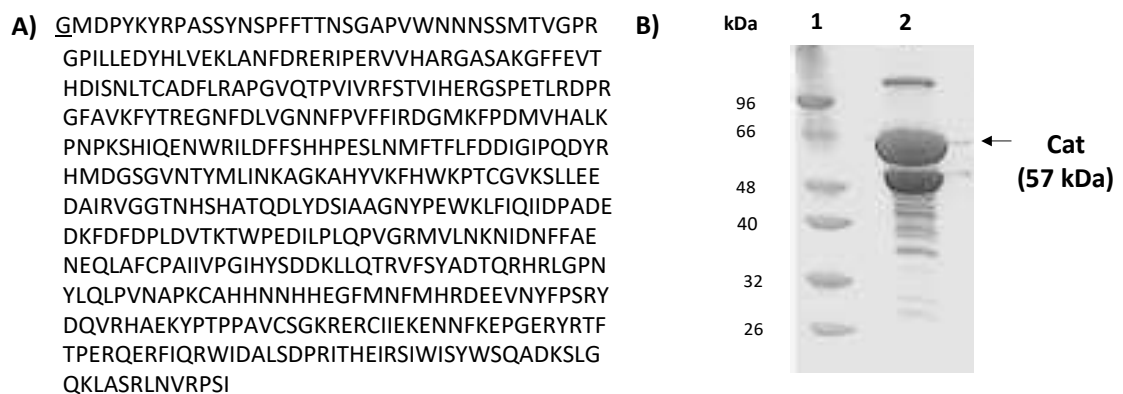


Figura 33. Catalasa recombinante de *Arabidopsis thaliana*. A) Secuencia de la Cat recombinante. B) SDS-PAGE de la Cat recombinante. En la línea 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en la línea 2, la proteína purificada con un peso molecular de 57 kDa.

13.7. Ascorbato peroxidasa de *Arabidopsis thaliana*

La expresión de la APX se llevó a cabo en el sistema de producción CASCADE™ (Biomedal, S.L.) y la purificación de la misma se realizó por cromatografía de afinidad utilizando la resina LYTRAP (BIOMEDAL) siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la ICDH.

La APX purificada se analizó mediante SDS-PAGE al 12,5 % y el gel obtenido tras la electroforesis se tiñó con colorante azul de Coomassie. El valor teórico de su masa molecular era de 28 kDa, sin embargo, la masa molecular obtenida fue de 49,4 kDa, debido a la presencia en la secuencia recombinante del dominio proteico Lytag de *Streptococcus pneumoniae* (**Fig. 34**).



Figura 34. APX recombinante de *Arabidopsis thaliana*. A) Secuencia de la APX recombinante. El área subrayada representa la secuencia Lytag. B) SDS-PAGE de la APX recombinante. En la línea 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en la línea 2, la proteína purificada eluida en la 4ª fracción con un peso molecular de 49,4 kDa.

13.8. Peroxirredoxina Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae*

La sobreexpresión de la Tsa1 se llevó a cabo empleando el plásmido pHTP1 el cual, es un vector que forma parte del sistema de expresión y clonación NZYEasy (NZYTech S.L.). La purificación de la proteína recombinante se realizó por IMAC, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para la catalasa.

La Tsa1 purificada se analizó mediante SDS-PAGE al 14 % y el resultado de la electroforesis se tiñó con colorante azul de Coomassie. El valor teórico predicho para su masa molecular era de 21,6 kDa, sin embargo, la masa molecular de la proteína recombinante resultó ser de 24,5 kDa como consecuencia de la presencia en ella de una etiqueta de histidinas seguida de una secuencia de reconocimiento para la proteasa del TEV en el extremo N-terminal (**Fig. 35**).

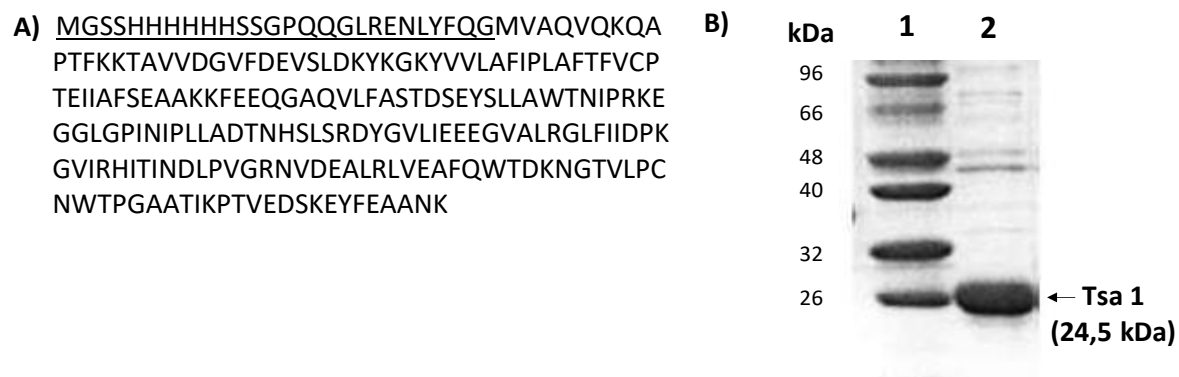


Figura 35. Tsa1 recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Secuencia de la Tsa1 recombinante. El área subrayada representa la etiqueta de histidinas seguida de una secuencia de reconocimiento de la proteasa del TEV. B) SDS-PAGE de la Tsa1 recombinante. En la línea 1 se muestran los marcadores de peso molecular y en la línea 2, la proteína purificada con un peso molecular de 24,5 kDa.

14. Tratamiento con los diferentes NO₂-FAs

14.1. Tratamiento de las proteínas recombinantes de *Arabidopsis thaliana* con los diferentes NO₂-FAs

Las diferentes proteínas recombinantes de *A. thaliana* se incubaron con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln a un ratio de concentración proteína: NO₂-FA determinado para cada proteína recombinante. Utilizando los mismos ratios de concentración aplicados en los tratamientos con NO₂-FAs, se incubaron las proteínas recombinantes con las correspondientes formas no nitradas (OA, LA y Ln). Los tratamientos con NO₂-FAs y su forma no nitrada se realizaron empleando tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7,4 durante 30 minutos a 37 °C y con agitación. Tras la incubación, se realizó la medida espectrofotométrica de la actividad enzimática y detectó la presencia de nitroalquilación por nanoLC-MS/MS.

14.2. Tratamiento de la peroxirredoxina Tsa1 de *Saccharomyces cerevisiae* con NO₂-OA

Antes de realizar el tratamiento con el NO₂-OA, la Tsa 1 recombinante se incubó con el reductor de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) a una relación de concentración de 1:20 (proteína : agente reductor) con el objeto de reducir los puentes de disulfuro que se hubieran podido establecer entre los residuos de cisteína de las proteínas. El proceso de reducción se realizó utilizando un tampón HEPES 50 mM, pH 7 e incubando durante 30 minutos con agitación. A continuación, se eliminó la presencia del reductor en la muestra mediante el uso de columnas Spin desalting (Thermo Scientific). En primer lugar, se eliminó el líquido de conservación de las columnas por centrifugación a 1500 xg durante 1 minuto. Seguidamente, se adicionaron a la columna 400 µl del tampón HEPES anteriormente indicado y se centrifugó a 1500 xg durante 1 minuto. Este proceso se repitió una vez más. A continuación, se cargó la muestra y se centrifugó a 1500 xg durante 2 minutos, obteniéndose así la muestra de Tsa1 libre de reductores.

El proceso continuó con la incubación de la Tsa1 recombinante con el NO₂-OA a una relación de concentración de 1:10 (proteína: NO₂-OA) durante 30 minutos a 37°C y con agitación. En estas mismas condiciones, la Tsa1 recombinante se trató con metanol (disolvente del NO₂-OA) y con ácido oleico (OA, forma no nitrada del NO₂-OA) en una relación de concentración de 1:10.

Para comprobar que el NO₂-OA no liberaba NO durante el tratamiento de nitroalquilación, se incubó Tsa1 recombinante con el secuestrador de NO denominado cPTIO a una concentración 200 µM durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se agregó el NO₂-OA a un ratio de concentración 1:10 y se incubó durante 30 minutos con agitación y a 37°C. Tras la incubación, se realizó la medida espectrofotométrica de la actividad enzimática y se detectó la presencia de nitroalquilación por nanoLC-MS/MS.

14.3. Tratamiento de los extractos proteicos de los cultivos celulares de *Arabidopsis* con NO₂-Ln

Los cultivos celulares de 9 días se filtraron a través de una membrana de nylon para eliminar el medio de cultivo y, seguidamente, se realizan dos lavados con agua ultrapura y, después, se eliminó el exceso de agua de las células con papel de filtro.

A continuación, se homogeneizó el material vegetal con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino y se añadió un tampón (Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, sacarosa al 7%, triton X-100 0,05%, EDTA 0,1 mM y PVPP 7%) en proporción 1:2 (p/v). A continuación, el homogenado se centrifugó a

10000 *xg* durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se centrifugó en las mismas condiciones una vez más.

Seguidamente, a 2,4 mg de proteína del extracto de cultivos celulares se añadieron 100 µM o 10 mM de NO₂-Ln y se incubó durante 30 minutos a 37°C y en agitación. Tras la incubación, se precipitaron las proteínas con acetona fría (-20 °C) al 70% quedando la mezcla durante toda una noche a -20°C. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a 10.000 *xg* durante 15 minutos a 4°C. Después, el sobrenadante se desechó, el precipitado se solubilizó y se digirió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 15.1. Más tarde, los péptidos obtenidos tras la digestión se enriquecieron en péptidos nitroalquilados (véase apartado 15.2.), y se llevó a cabo la detección e identificación de proteínas nitroalquiladas por nanoLC-MS/MS (véase apartado 15.4.).

14.4. Tratamiento de los cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* con los diferentes NO₂-FAs

Para realizar este tratamiento se utilizaron cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* de 4 días. Para ello, utilizando material autoclavado, se retiró el medio de cultivo de células mediante una bomba de vacío, después, rápidamente se pesaron 2 g de material vegetal y se resuspendieron en 20ml de medio de cultivo (véase apartado 6.2.1.). A continuación, las células se mantuvieron durante 2h y 30min a 25°C y en agitación (160 rpm) para restablecerlas.

Tras este periodo de tiempo, el cultivo se trató con 100 µM de NO₂-OA, NO₂-LA o NO₂-Ln durante 30 minutos a 25°C con agitación (160 rpm). En estas mismas condiciones, los cultivos celulares se trataron con metanol (solvente de los NO₂-FAs) y con 100 µM de los OA, LA y Ln, como formas no nitradas de los NO₂-FAs.

15. Detección e identificación de las proteínas nitroalquiladas

15.1. Digestión proteolítica de las proteínas

Las proteínas precipitadas con acetona procedentes de las muestras de Arabidopsis (cultivos celulares, etapas de desarrollo y estreses) así como las muestras control y estrés de *Saccharomyces cerevisiae*, se solubilizaron en un 1ml de bicarbonato amónico 50 mM, pH 8. A continuación, las muestras de Arabidopsis se digirieron con tripsina en una proporción 1:20, (concentración de proteasa: concentración de proteína), mientras que la quimotripsina (1:20, (concentración de proteasa: concentración de proteína)) fue la proteasa utilizada para digerir las muestras de *Saccharomyces*. La digestión proteolítica se realizó a 37°C y en agitación durante 12 horas (over night).

Las proteínas recombinantes tratadas con los NO₂-FAs también fueron digeridas con tripsina, en el caso de las proteínas de Arabidopsis o quimotripsina, para la proteína de *Saccharomyces*.

15.2. Enriquecimiento y desalado de los péptidos nitroalquilados de las proteínas

La unión de un NO₂-FA a una proteína puede aumentar su hidrofobicidad debido a la naturaleza apolar de los nitrolípidos, sin embargo, en el caso de la proteína completa, a efectos prácticos, apenas se modifica su hidrofobicidad. No ocurre igual en el caso de los péptidos que se generan tras la ruptura proteolítica de las proteínas, proceso requerido antes de llevar a cabo los análisis de espectrometría de masas. De hecho, la bibliografía científica recoge que la presencia de un NO₂-FA unido a un péptido proteico aumenta su hidrofobicidad con respecto al mismo péptido no nitroalquilado (Batthyany et al. 2006; Turell et al. 2018). En base a estos antecedentes, se diseñó

una estrategia de enriquecimiento basada en la polaridad de los péptidos con la finalidad de facilitar la detección de los péptidos nitroalquilados por nanoLC-MS/MS, puesto que esta PTM, igual que las demás modificaciones postraduccionales, presenta una abundancia muy baja en el proteoma de la planta.

Para realizar la puesta a punto del método de enriquecimiento de péptidos nitroalquilados se utilizaron extractos proteicos de cultivos celulares de Arabidopsis de 9 días tratados con 100 μ M y 10 mM de NO₂-Ln, con la idea de aumentar la presencia de proteínas aductadas con NO₂-Lny facilitar la posterior detección.

Para ello, en primer lugar, se realizó una extracción de los péptidos nitroalquilados añadiendo hexano (disolvente con apolaridad elevada, índice de polaridad =0,1) en proporción 1:1 y agitando vigorosamente durante 2 minutos. La separación de las fases se optimizó centrifugando la muestra a 5000 xg durante 5 minutos a 4°C. Tras ello, se recogió la fase superior que es la que correspondía al hexano y contenía los péptidos apolares. Sin embargo, el enriquecimiento con hexano provocó una muy baja en la detección de péptidos nitroalquilados, demostrándose así que la presencia del NO₂-FA no incrementaba la apolaridad de los péptidos.

Por ello, se sustituyó el hexano por dietil-éter (disolvente de apolaridad intermedia, índice de polaridad =2,8). En este caso, si se logró un aumento en la detección de péptidos nitroalquilados detectados lo que evidenció el carácter apolar intermedio que presentan los péptidos nitroalquilados.

Este método de enriquecimiento, basado en la utilización de dietil-éter, fue el aplicado, tal y como se ha descrito anteriormente, para la determinación de péptidos nitroalquilados en las diferentes etapas de desarrollo y en los estreses de Arabidopsis y en el estrés por choque término ensayado en Saccharomyces. Tras la centrifugación, la fase superior se evaporó bajo corriente de nitrógeno. Seguidamente, las muestras se resuspendieron en ácido fórmico al 0.1% (v/v) y se cuantificó la concentración de los péptidos por fluorimetría mediante el kit de Qubit protein (Molecular Probes Life Technologies). Antes de la inyección de las muestras en el espectrómetro de masas, todas las muestras se normalizaron a una concentración de 0,1 μ g/ μ l y se filtraron a través de filtros de PTFE de 0,2 μ m.

15.3. Desalado de los péptidos de las proteínas recombinantes tratadas con NO₂-Ln

En el caso de las proteínas recombinantes ensayadas (ICDH, Cat y APX de Arabidopsis y Tsa1 de Saccharomyces) no se realizó ningún tipo de enriquecimiento en péptidos nitroalquilados pues no era necesario por tratarse de proteínas purificadas, por esta razón, simplemente se realizó el desalado de las muestras a través de columnas C18 (Thermo Scientific).

En primer lugar, se activó la columna añadiendo 200 μ l de la solución de activación (Metanol 50%) y se centrifugó 1500 xg durante un minuto. Este proceso se repitió una vez más. A continuación, se procedió a realizar el equilibrado de la columna añadiendo 200 μ l de la solución de equilibrado (ácido trifluoroacético (TFA) 0,5% (v/v) y acetonitrilo (ACN) 5% (v/v)) y se centrifugó 1500 xg durante un minuto. Este proceso también se repitió una vez más. Después, se cargó la muestra, que contenía tampón de la muestra (TFA 2% (v/v) y ACN 20% (v/v)) en proporción 3:1, en la columna. Más tarde, se añadieron 200 μ l de la solución de lavado (TFA 0,5% (v/v) y ACN 5% (v/v)), se centrifugó a 1500 xg durante un minuto. El proceso de lavado se repitió una vez más. La elución de la muestra se realizó aplicando en la columna 20 μ l de tampón de elución (ACN 70% (v/v)) y se centrifugó a 1500 xg durante un minuto. Este proceso se repitió una vez más. La muestra eluida se evaporó bajo corriente de nitrógeno líquido, se resuspendió en ácido fórmico 0,1% (v/v) y se hizo pasar a través de filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,2 μ m antes de inyectarse en el espectrómetro de masas.

15.4. Detección de la nitroalquilación de proteínas por nanoLC-MS/MS

La detección de la modificación postraducciona por nitroalquilación se realizó mediante espectrometría de masas. La cromatografía nanolíquida (nano-LC) se realizó en un EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) con una columna EASY-SPRAY RSLC C18 2 μm , 50cm X 75 μm (Thermo Scientific). Previamente, la mezcla de péptidos se cargó en una precolumna PEPMAP100 C18 3 μm de 75 μm x 2 cm NANOVIPER 2P (Thermo Scientific) durante 5 min a un flujo de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. La separación de péptidos se realizó a 40°C para todos los ensayos. El tampón A de la fase móvil estaba compuesto por agua y ácido fórmico al 0,1% (v/v). La fase móvil B consistió en acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1% (v/v).

Las muestras se separaron aplicando un flujo de 200 nL/min. La fase móvil B aumentó del 8 % al 65 % durante 130 min y del 65 % al 100 % B durante 1 min. Después, se programó un lavado de 5 min al 100 % B y un reequilibrio de 26 min al 2 % B, lo que constituyó un tiempo total de cromatografía de 162 minutos. Tras la elución, los cationes peptídicos se convirtieron en iones en fase gaseosa mediante ionización por nanoelectrospray (ESI) y se analizaron en un equipo Thermo Orbitrap Q-Exactive (Thermo Scientific). El espectrómetro de masas operó en modo positivo durante el programa de exploración completa (Full-scan). Para el análisis de masas MS1 se realizó la búsqueda de péptidos precursores en un rango de 300 a 1500 m/z, con una resolución de 70.000, un control automático de ganancia (AGC) de 1e6 y un tiempo máximo de inyección de 50 ms. Para el análisis de masas en tándem MS2 se estableció un rango de péptidos entre 200 y 2000 m/z, una resolución de 17.500, un control automático de ganancia (AGC) de 2e5, un tiempo máximo de inyección de 80 ms y una energía de colisión (NCE) de 15.

Merece la pena mencionar que se hicieron pruebas utilizando diferentes energías de colisión (10, 15, 27 y 50) para fragmentar los iones en MS2. De ellas, la NCE 15 proporcionó resultados óptimos. Por el contrario, la NCE 10 era demasiado baja y no causaba la correcta fragmentación de los péptidos y las NCE 27 y 50 eran tan elevadas que provocaban la ruptura del aducto de Michael.

15.5. Procesamiento de los datos de MS/MS e identificación de proteínas nitroalquiladas

Los datos de espectrometría de masas obtenidos fueron analizados con el objeto de identificar la secuencia proteica, para ello se utilizó el software Proteome Discoverer 2.5. (Thermo Scientific) con el motor de búsqueda SEQUEST HT y la base de datos UniProt *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*. Las modificaciones que se establecieron en la búsqueda fueron la carbamidometilación en cisteína (+57,021 Da) como modificación fija y, como modificaciones dinámicas, la oxidación de metionina (+15,995 Da) y la modificación de interés para el estudio, la nitroalquilación mediada por el NO₂-OA (+327 Da), el NO₂-LA (+324 Da) y el NO₂-Ln (+322 Da). La tripsina se fijó como la enzima proteolítica cuando se analizaron muestras de Arabidopsis y la quimotripsina para el caso de las muestras de Saccharomyces. Se permitieron hasta 4 sitios de escisión faltantes. Las tolerancias de masa para los iones originales y para los fragmentos se establecieron en 10 ppm y 0,02 Da.

La validación estadística de los resultados obtenidos para las muestras de cultivos celulares y proteínas recombinantes de Arabidopsis y para las muestras de Saccharomyces, se obtuvo aplicando la herramienta Percolator con un FDR (tasa de falsos descubrimientos) del 1%. Finalmente, se seleccionaron proteínas con, al menos, 3 péptidos únicos identificados. Para la validación estadística de las muestras de desarrollo y de estreses en Arabidopsis, se aplicó la

herramienta Percolator con un FDR del 5% y se consideraron proteínas con, al menos, 1 péptido único identificado.

15.6. Cuantificación relativa de los niveles de nitroalquilación en las proteínas recombinantes por nanoLC-MS/MS

En determinadas proteínas recombinantes de *Arabidopsis* (Cat y APX) y en la peroxirredoxina Tsa1 de *Saccharomyces*, se llevó a cabo la cuantificación relativa de los niveles de nitroalquilación mediante la búsqueda dirigida de los péptidos de interés. Para desarrollar este método dirigido, se requirió información sobre el comportamiento espectrométrico de los péptidos de interés. Por esta razón, para cada proteína recombinante nitroalquilada se definieron las ventanas de búsqueda de los iones precursores en relación al parámetro masa/carga (m/z) y al tiempo de retención cromatográfico (RT) (**Tablas 10, 11 y 12**).

Tabla 10. Caracterización cromatográfica y espectrométrica (péptidos experimentales, carga, peso molecular y RT) de los iones precursores que contienen las dianas susceptibles de nitroalquilación en la catalasa recombinante tratada con $\text{NO}_2\text{-Ln}$. En la tabla se muestra información tanto de los péptidos no modificados como nitroalquilados que contienen la diana susceptible de nitroalquilación (se destaca en minúscula).

Residuo diana de la nitroalquilación	Péptido experimental	Fórmula química	Peso molecular (Da)	Carga	Tiempo de retención (RT) (min)	Ventana de RT (min)
His 46	GPILLEDYHLVE K	C71H112N16O 21	1524,8188	+3	39	34-44
	GPILLEDYhLVE K	C89H141N17O 25	1848,0284	+2	64,3	59-69
His 108	FSTVIHER	C44H69N13O1 3	987,5138	+2	20,4	15-25
	FSTVIHER	C62H98N14O1 7	1310,7234	+3	49,1	44-54
His 156	FPDMVHALKP NPK	C69H108N18O 17S1	1492,7861	+3	27,1	22-32
	FPDMVhALKP NPK	C87H137N19O 21S1	1815,9957	+4	56,1	51-61
His 165	SHIQENWR	C46H68N16O1 4	1068,51	+2	17,9	12-22
	ShIQENWR	C64H97N17O1 8	1391,7197	+2	54,3	49-59
His 201	HMDGSGVNTY MLINK	C71H114N20O 23S2	1678,7807	+3	31,8	26-36
	hMDGSGVNTY MLINK	C89H143N21O 27S2	2001,99	+3	63,7	58-68

His 248 o 250	VGGTNHSHAT QDLYDSIAAG NYPEWK	C124H179N35 O42	2830,2947	+4	31,4	26-36
	VGGTNhShAT QDLYDSIAAG NYPEWK	C142H208N36 O46	3153,5043	+4	56,2	51-61

His: histidina.

Tabla 11. Caracterización cromatográfica y espectrométrica (péptidos experimentales, carga, peso molecular y RT) de los iones precursores que contienen las dianas susceptibles de nitroalquilación en la ascorbato peroxidasa recombinante tratada con NO₂-Ln. En la tabla se muestra información tanto de los péptidos no modificados como nitroalquilados que contienen la diana susceptible de nitroalquilación (se destaca en minúscula).

Residuo diana de la nitroalquilación	Péptido experimental	Fórmula química	Peso molecular (Da)	Carga	Tiempo de retención (RT) (min)	Ventana de RT (min)
His 32 o Cys 33	HCAPIVLR	C40H69N 13O9S1	907,5062	+2	18,4	13-23
	hcAPIVLR	C58H98N 14O13S1	12307159	+2	60	55-65
His 43	LAWHSAGTF DVK	C62H90N 16O17	1330,6669	+3	38,2	33-43
	LAWhSAGTF DVK	C80H119 N17O21	1653,8766	+3	60,7	55-65
His 63 o His 69	HPQELAHDA NNGLDIAVR	C83H132 N28O28	1968,9766	+3	25,4	20-30
	hPQELAhDA NNGLDIAVR	C101H16 1N29O32	2292,1862	+3	57,1	52-62
His 163	MGLNDKDIV ALSGGHTLGR	C82H140 N26O27S 1	1953,0102	+3	31,8	26-36
	DIVALSGGHT LGR	C55H94N 18O18	1294,6993	+2	31,3	26-36
	MGLNDKDIV ALSGGhTLGR	C100H16 9N27O31 S1	2276,2198	+3	58,5	53-63

His 239	DIVALSGGhT LGR	C73H123 N19O22	1617,909	+3	63	59-69
	YAADEDAFFE DYTEAHLK	C97H131 N21O34	2133,9167	+3	61,6	56-66
	YAADEDAFFE DYTEAhLK	C115H16 ON22O38	2457,1264	+3	67	62-72

Cys: cisteína.

Tabla 12. Caracterización cromatográfica y espectrométrica (péptidos experimentales, carga, peso molecular y RT) de los iones precursores que contienen las dianas susceptibles de nitroalquilación en la peroxirredoxina Tsa1 recombinante tratada con NO₂-Ln. En la tabla se muestra información tanto de los péptidos no modificados como nitroalquilados que contienen la diana susceptible de nitroalquilación (se destaca en minúscula).

Residuo diana de la nitroalquilación	Péptido experimental	Fórmula química	Peso molecular (Da)	Carga	Tiempo de retención (RT) (min)	Ventana de RT (min)
Cys 48	VCPTEIIAF	C46H73N 9O13S1	992,51208	+1	78,5	73-83
	TFVCPTEIIAF	C59H89N 11O16S1	1240,6303 7	+2	79,7	75-85
	TFVcPTEIIAF	C77H122 N12O20S 1	1567,8674	+2	104,57	100-110
	AFIPLAFTFVcP TEIIAF	C118H17 9N19O27 S1	2327,3013	+2	117,63	113-123
	AFTFVcPTEIIA F	C89H136 N14O22S 1	1785,9745	+2	107,61	103-113
Cys 171	TDKNGTVLPC NW	C58H90N 16O19S1	1347,6345 7	+2	42,05	37-47
	TDKNGTVLPcN W	C76H123 N17O23S 1	1674,8759	+2	85,18	80-90
	TDKNGTVLPcN WTPGAATIKPT VEDSKEY	C155H24 8N36O51 S1	3462,7828	+4	65,84	60-70
	QWTDKNGTVL PcNW	C92H141 N21O26S 1	1989,0121	+2	83,73	79-89

His 105	TNIPRKEGGLG PINIPLLADTNH SL	C116H19 4N34O36	2640,4447 2	+4	44,68	39-50
	LADTNHSLSRD Y	C58H90N 18O22	1391,6555 7	+2	21,59	16-27
	ADTNHSLSRDY	C52H79N 17O21	1278,5708 5	+3	18,96	13-24
	LADTNhSLSRD Y	C76H123 N19O26	1718,8925	+3	61,88	56-66
	ADTNhSLSRDY	C70H112 N18O25	1605,8095	+3	59,54	55-65
	LADTNhSL	C54H92N 12O18	1197,6737	+2	66,52	61-71
His 136	IIDPKGVI RHITI NDLPVGRNVD EAL	C127H21 5N37O38	2867,5997	+3	46,19	41-51
	IIDPKGVI RHITI NDLPVGRNVD EALRL	C139H23 8N42O40	3136,7875	+5	47,04	42-52
	IIDPKGVI RHITI NDLPVGRNVD EALRLVEAF	C161H26 8N46O46	3583,0099	+3	57,71	52-62
	IIDPKGVI RhITI NDLPVGRNVD EAL	C145H24 8N38O42	3194,8492	+3	65,96	60-70

A continuación, se utilizó el espectrómetro de masas para realizar la búsqueda dirigida de los péptidos que contenían las dianas de nitroalquilación, tanto en su forma modificada (nitroalquilada) como sin modificar (no nitroalquilada), con el fin de detectar el número de coincidencias del espectro peptídico (PSM) de cada uno de los péptidos seleccionados y realizar una cuantificación relativa cada uno de los residuos susceptibles a nitroalquilarse.

15.7. Detección de péptidos nitroalquilados endógenos por búsqueda bioinformática en el MS1

La detección y cuantificación relativa de los residuos nitroalquilados *in vivo* se realizó en las muestras control y de estrés por choque térmico de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando, para ello, el programa Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Los parámetros espectrométricos (m/z y RT) de los péptidos/iones precursores que contenían las dianas de nitroalquilación detectadas en el tratamiento de la Tsa1 recombinante con NO₂-OA se utilizaron como estándares de nitroalquilación para su búsqueda *in vivo*. Para ello, en el MS1 de las muestras control y estrés, se realizó la búsqueda bioinformática de la m/z del ion precursor con una tolerancia de masa de 25ppm utilizando, además, su tiempo de retención (RT) con una variación de $\pm 0,2$ min (**Tabla 13**).

Tabla 13. Relación m/z y tiempo de retención cromatográfico característicos de los péptidos que contienen las dianas de nitroalquilación de la Tsa1.

Patrón de nitroalquilación: Tsa1 recombinante tratada con NO ₂ -OA			
Diana de nitroalquilación			
	Péptido nitroalquilado		
	m/z		
	RT		
Cys 48	TFVcPTEIIAF	784,9	104,57
	AFIPLAFTFVcPTEIIAF	1164,6	117,63
	AFTFVcPTEIIAF	893,9	107,6
Cys 171	TDKNGTVLPcNW	838,4	85,18
	TDKNGTVLPcNWTPGAATIKPTVEDSKEY	866,6	65,84
	QWTDKNGTVLPcNW	995,5	83,73
His 105	LADTNhSLSRDY	573,9	61,88
	ADTNhSLSRDY	536,2	59,54
	LADTNhSL	599,8	66,52
His 136	IIDPKGVIRhitINDLPVGRNVDEAL	1065,9	65,96

16. Análisis bioinformático de las proteínas nitroalquiladas

La lista de proteínas nitroalquiladas obtenidas de los cultivos celulares de *Arabidopsis* tratados con NO₂-Ln y no tratados (FDR 1%) y de las diferentes etapas de crecimiento y estreses de *Arabidopsis* (FDR 5%), se procesaron utilizando el programa Proteome Discoverer 2.5 y, posteriormente, se clasificaron en función de diferentes categorías funcionales bajo los siguientes términos de “Gene Ontology”, también conocidos como términos GO. Los términos de enriquecimiento GO son una herramienta comúnmente utilizada para evaluar las características de los conjuntos de genes. En primer lugar, mediante la base de datos Uniprot se obtuvieron los códigos genéticos de los genes que codificaban a las proteínas nitroalquiladas detectadas. Una vez obtenida la lista de genes, se introdujo en la base de datos TAIR (The Arabidopsis Information Resource), especializada en genética y biología molecular de la planta de *Arabidopsis thaliana*. El TAIR utiliza un servicio web, proporcionado por PANTHER DB, que facilita el análisis de enriquecimiento de los términos GO (Gene Ontology) para *Arabidopsis* y otros genomas de plantas. En nuestro caso, las proteínas nitroalquiladas fueron clasificadas en las categorías funcionales de: procesos biológicos, función molecular y compartimentos celulares de localización.

17. Determinación de las actividades enzimáticas de las proteínas recombinantes

17.1. Fosfoglicerato quinasa

Fundamento

En el protocolo utilizado se determinó el incremento de NAD⁺ generado por la oxidación del NADH midiendo su absorbancia a 340 nm (Macioszek et al. 1990).

Reactivos

- ✔ Tampón de ensayo: 50 mM HEPES-KOH, pH 7,8, 10 mM KCl y 1 mM EDTA.
- ✔ NADH 20 mM. Preparado de forma extemporánea.

Técnica

La mezcla de reacción contenía NADH 0,2 mM, 3-fosfoglicerato 5 mM, ATP 5 mM, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 10 U/ml y 10 mM MgCl₂ en tampón de ensayo. La reacción se inició añadiendo 1 µL de la enzima fosfoglicerato quinasa (1 mg/ ml). Durante la reacción se monitorizó el incremento de NAD⁺ midiendo la absorbancia a 340 nm durante dos minutos. La actividad enzimática se calculó a partir del incremento de la absorbancia experimental por minuto y del coeficiente de extinción molar del NADH (6220 M⁻¹ cm⁻¹).

17.2. Triosa fosfato isomerasa

Fundamento

En este caso, se valoró la formación de NADH mediante un ensayo colorimétrico utilizando un kit comercial (Triose phosphate isomerase activity colorimetric assay kit, Sigma-Aldrich). El NADH reaccionaba con un componente del kit y se formaba un producto coloreado que absorbía a 450nm.

Reactivos

- ✔ Tampón de ensayo (B)
- ✔ Sustrato (S)
- ✔ Mezcla enzimática (E)
- ✔ Desarrollador del TPI (D)
- ✔ Estándar de NADH 1,25 mM (N)

Técnica

La mezcla de reacción contenía: 2 µl de S, 2 µl de E, 2 µl de D, 1 µl de TPI (0,5 µg/ ml) y 93 µl de B. Se midió el incremento de absorbancia del producto coloreado durante 5 min a 450nm. La actividad enzimática se calculó a partir de la siguiente ecuación: $V_0 = (\Delta A/\text{min}) \cdot 10^6 / 6400$.

17.3. Enzima málico dependiente de NADP

Fundamento

El método de (Barroso et al. 1998) fue el utilizado para determinar la actividad de este enzima en función de la reducción de β-NADP a 340 nm.

Reactivos

- ✔ Tampón HEPES-NaOH 76,92 mM, pH 7,6 conteniendo MgCl₂ 3,07 mM.
- ✔ β-NADP 8 mM
- ✔ L-malato 50 mM

Técnica

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml a 25 °C utilizando una mezcla de reacción que contenía tampón HEPES-NaOH 50 mM pH 7,6 con MgCl₂ 2 mM, NADP⁺ 0,8 mM y hasta 150 µl de muestra. La reacción se inició con la adición del sustrato L-malato a una concentración final de 5 mM.

17.4. Isocitrato deshidrogenasa

Fundamento

En este caso, también se siguió el método de (Barroso et al. 1998) basado en la detección de la reducción de β-NADP a 340 nm.

Reactivos

- ✔ Tampón HEPES-NaOH 76,92 mM, pH 7,6 conteniendo MgCl₂ 3,07 mM.

- ✔ β -NADP 8 mM
- ✔ DL-isocitrato 100 mM

Técnica

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 1 ml a 25 °C utilizando una mezcla de reacción que contenía tampón HEPES-NaOH 50 mM pH 7,6 con $MgCl_2$ 2 mM, $NADP^+$ 0,8 mM y hasta 150 μ l de muestra. La reacción se inició con la adición del sustrato DL-isocitrato a una concentración final de 10 mM.

17.5. Glutación S-transferasa

Fundamento

En el protocolo utilizado se determinó el incremento de absorbancia por minuto a 340nm ocasionado por la formación de un aducto GS-DNB.

Reactivos

- ✔ Tampón fosfato sódico 25 mM, pH 6,5.

Técnica

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l utilizando una mezcla de reacción que contenía 1 mM GSH, 1 mM CDNB y 50 μ l de GST (1,37 mg/ ml) en tampón fosfato sódico 25 mM, pH 6,5. La actividad enzimática se calculó a partir del incremento de la absorbancia experimental por minuto y del coeficiente de extinción molar del aducto GS-DNB ($9600 M^{-1} cm^{-1}$).

17.6. Catalasa (Cat)

Fundamento

La actividad enzimática de la catalasa se determinó siguiendo el método de (Aebi 1984) que se basa en la medida de la desaparición del H_2O_2 a 240 nm.

Reactivos

- ✔ Tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,8
- ✔ H_2O_2 10,6 mM en el tampón anterior

Técnica

La actividad se determinó a 25 °C en la disolución anterior de tampón fosfato con peróxido de hidrógeno. La reacción se inició añadiendo volúmenes de muestra entre 1-100 μ l. La actividad enzimática se calculó a partir del incremento de la absorbancia experimental por minuto y de un coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 de $39,58 M^{-1} cm^{-1}$.

17.7. Ascorbato peroxidasa

Fundamento

En el método utilizado se determinaba la disminución en el contenido en ascorbato por oxidación a una absorbancia de 290 nm.

Reactivos

- ✔ Tampón de ensayo: Tampón HEPES-NaOH 76,92 mM, pH 7,6 conteniendo ascorbato 0,2 mM.
- ✔ H_2O_2 12 mM.

Técnica

La mezcla de reacción contenía HEPES 50 mM pH 7,6 y ascorbato 0,13 mM. A continuación, se añadía un volumen máximo de muestra más agua de 325 μ l, disparando la reacción con 0,3 mM de H_2O_2 . Durante la reacción se monitorizó la desaparición de ascorbato midiendo la absorbancia a 290 nm durante dos min.

La actividad enzimática se calculó a partir del incremento de la absorbancia experimental por minuto y del coeficiente de extinción molar del ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

17.8. Peroxirredoxina Tsa1

Fundamento

En el protocolo de actividad de la Tsa1 se determinaba la disminución del contenido en NADPH midiendo la absorbancia a 340nm.

Reactivos

- ✔ Tampón HEPES 50 mM, pH 7
- ✔ NADPH 250 μM
- ✔ H_2O_2 0,1 mM

Técnica

La actividad de la peroxirredoxina se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía tampón HEPES 50 mM, pH 7,0, NADPH 250 μM , Trr2p 0,5 μM , Trx3p 5 μM , peroxirredoxina Tsa1 2,5 μM y H_2O_2 100 μM . Se monitorizó espectrofotométricamente la desaparición de NADPH a 340 nm durante 10 min. Antes de la adición del peróxido, la mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 5 min.

Es importante señalar que el peróxido utilizado para determinar la actividad enzimática de Tsa1 recombinante fue el H_2O_2 . En cambio, para determinar la actividad de la Tsa1 en el extracto de levaduras se utilizó el t-BuOOH, ya que este peróxido era reducido únicamente por las peroxirredoxinas, mientras que el H_2O_2 podría ser sustrato de otras enzimas además de las peroxirredoxinas.

18. Modelización molecular *in silico* de la ICDH, Cat y APX

Las estructuras tridimensionales de las enzimas ICDH, Cat y APX de *Arabidopsis thaliana* se modelizaron utilizando el programa Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/>) y, a través de la aplicación Jmol, se identificaron y destacaron los residuos catalíticos y los nitroalquilados.

19. Tratamiento de los cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* con elicinas

Utilizando material autoclavado y una bomba de vacío, se retiró el medio nutritivo de cultivos celulares de 4 días de *Nicotiana tabacum*. Después, rápidamente se pesaban 2g de células y se resuspendían en 20 ml de medio de cultivo (véase apartado 6.2.1.). A continuación, las células se mantuvieron durante 2h y 30min a 25°C en agitación (160 rpm) para restablecer las células.

Tras este periodo de tiempo, el cultivo se trató con 50 nM de las elicinas: β -criptogenina (CRY) e infectina (INF) y se incubó en las condiciones de crecimiento anteriores.

Adicionalmente, se hicieron otros ensayos pretratando las células con 100 μM de los tres NO_2 -FAs así como con sus formas no nitradas y metanol durante 30 minutos. Seguidamente, se realizó el tratamiento con las dos elicinas (β -CRY y INF) a 50 nM incubándose en las condiciones especificadas anteriormente.

En ambos tipos de tratamientos, se monitorizaron los niveles de ROS extracelulares (apartado 10.4.) y la viabilidad celular en el tiempo 0 (corresponde en el momento justo de después de añadir las elicinas), a los 30 minutos, a la 1 y 2 horas.

20. Viabilidad celular de los cultivos de *Nicotiana tabacum*

La viabilidad de los cultivos celulares de 4 días de *Nicotiana* se determinó por fluorescencia en utilizando un lector de microplacas. En cada pocillo, se añadieron 170 μl de medio de cultivo y 10 μl de la solución de trabajo de diacetato de fluoresceína (FDA). La solución de trabajo de FDA se preparaba en fresco y contenía 20 μl del stock de FDA 12mM (FDA disuelto en acetona 0,5%, v/v) y 980 μl de agua. Por último, se añadieron a los pocillos 20 μl de cultivo de células y se realizó la lectura de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 493 nm y una longitud de onda de emisión de 515 nm durante 120 segundos. Se realizaron medidas de fluorescencia cada 10 segundos y, después, se calculó la media de todos los valores generados. Los datos de viabilidad se expresaron en porcentaje en comparación con el control (100% de viabilidad).

21. Inmunodetección de la peroxirredoxina Tsa1

21.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Para realizar la separación de las proteínas procedentes del ELC de las muestras control y del estrés por choque térmico de *Saccharomyces cerevisiae*, se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli 1970) en un sistema de minigeles verticales discontinuos (Bio-Rad Mini-Protean II).

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes minimiza la agregación molecular y asegura la completa disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas individuales, para este propósito se utiliza el SDS en combinación con el agente reductor DTT y calor. Al aplicar un campo eléctrico, la gran carga negativa que impone el SDS a pH básico enmascara la carga original de las proteínas de manera que todas ellas exhiben idénticas relaciones carga/masa. Por tanto, mediante esta técnica las proteínas se separan de acuerdo a sus masas moleculares debido a la selección de tamaños impuesta por los poros del gel. Con el objeto de determinar la masa molecular de una proteína, se somete a una misma electroforesis una mezcla de patrones de proteínas de masas moleculares conocidas.

Reactivos

- ✔ Tampón gel concentrador: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.
- ✔ Tampón gel separador: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.
- ✔ Acrilamida-bisacrilamida 30%
- ✔ SDS 10% (p/v).
- ✔ Tampón de tratamiento de muestra 4x: Tris-HCl 0,425 M, pH 6,8; glicerol 40% (v/v); SDS 8% (p/v); azul de bromofenol 0.4% (p/v).
- ✔ Tampón de electroforesis: Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3; glicina 0,192 M y SDS 0,1% (p/v).
- ✔ Persulfato amónico 10% (p/v).

Preparación de geles y electroforesis

En este caso se han utilizado geles de dimensiones 7.5 x 8.0 cm con 1 mm de grosor y un porcentaje de acrilamida del 12% en el gel separador. Las muestras para la SDS-PAGE se prepararon añadiendo el tampón de tratamiento de muestra 4x en proporción 1/4. Para llevar a cabo la electroforesis, se normalizó la cantidad de proteínas de cada muestra a razón de 20 μg por pocillo. En la electroforesis se cargaron también marcadores tanto de alto como de bajo peso molecular (Bio-Rad). La electroforesis se desarrolló, utilizando el tampón de electroforesis

anteriormente descrito, a 100 V durante 15 min y, posteriormente, se aumentó el voltaje a 200 V hasta que el frente de azul de bromofenol llegó al límite del gel inferior.

21.2. Transferencia semiseca de proteínas

Tras la SDS-PAGE, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0.45 μm (Inmobilon-P, Millipore). Para ello, se utilizó un sistema de transferencia semiseco Trans-Blot SD (Bio-Rad). Debido a su naturaleza hidrofóbica, las membranas se incubaron primero durante 15 s en metanol 100% (v/v), se lavaron después 2 min con agua milli Q. Posteriormente, se equilibraron en tampón de transferencia (CAPS 10 mM, pH 11 y metanol 10% (v/v)). Se prepararon papeles Whatman nº 3 cortados con las mismas dimensiones del gel (6 para cada gel). Estos papeles juntos con los geles se equilibraron en el tampón de transferencia. La transferencia se realizó a una intensidad de 1.5 mA/cm² de membrana y un voltaje de 25 V durante 1h 30min.

21.3. Detección inmunológica (Western Blot)

Tras finalizar la transferencia de las proteínas desde el gel a la membrana, ésta se lavó con agua miliQ y se sumergió en la solución de bloqueo (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 180 mM y leche desnatada en polvo 5%; p/v) durante 1h y 30min en agitación a temperatura ambiente. Tras este periodo de incubación, la membrana se sumergió en una solución de lavado (Tris-HCl 20mM, pH 7,8, NaCl 180mM y tween 0,1%) durante 1 hora para eliminar los restos de la solución de bloqueo. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario anti-Tsa1 (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:500 en Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 180 mM durante 12 horas, en agitación y a 4°C. Posteriormente, se volvió a lavar la membrana con solución de lavado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 180 mM, tween 0,1% (v/v) y leche 1% (p/v)) durante 1h y 30min. El proceso continuó con la incubación de la membrana durante 1h en agitación y a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano. Este anticuerpo se preparó a una dilución 1:10000 en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 180 mM. Finalmente, se lavó la membrana con una solución de lavado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,8, NaCl 180 mM y tween 0,1% (v/v)) durante 1h.

Para la detección de las proteínas por quimioluminiscencia, la membrana se incubó de 1 a 5 min y en oscuridad en una solución de revelado (8 mg de luminol disuelto en 20 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 8,6, NaCl 150 mM, con 3,2 μl de H₂O₂ al 30% (v/v) y 200 μl de 4-iodofenol). La reacción quimioluminiscente (Bunkelmann and Trelease 1996) ocurre cuando la energía de una reacción química se emite en forma de luz. La peroxidasa de rábano (HRP) catalizaba la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno, dando lugar a un compuesto intermediario activado que emitía luz. La emisión de luz se potenciaba en presencia del 4-iodofenol e impresionaba una película de autorradiografía tipo "Hiperfilm" (Amersham) que contactaba con la membrana en el interior de un cassette de exposición (Kodak).

Resultados

22. Identificación de los principales NO₂-FAs endógenos en *Arabidopsis thaliana*

Hasta la fecha, en *Arabidopsis* solo se había establecido la presencia endógena del NO₂-Ln tanto a lo largo del desarrollo de la planta como en diferentes situaciones de estrés (Mata-Pérez et al. 2016d). En esta Tesis Doctoral, además del anterior, se ha identificado por primera vez la presencia endógena de otros dos ácidos grasos nitrados que son el NO₂-OA y el NO₂-LA. La optimización del método de procesamiento y la reciente adquisición por la Universidad de Jaén de un espectrómetro de masas de última generación (QTRAP 6500⁺, Sciex), han permitido incrementar los niveles de detección y alcanzar la sensibilidad requerida para identificar los nitrolípidos NO₂-OA y NO₂-LA a pesar de su baja abundancia.

Con este objetivo, se ha llevado a cabo una extracción lipídica en diferentes muestras de *Arabidopsis*, desde cultivos celulares hasta plántulas en diferentes etapas de crecimiento siguiendo el método descrito en el apartado de Material y Métodos. Las diferentes fracciones lipídicas obtenidas se sometieron a hidrólisis ácida y su contenido fue analizado por LC-MS/MS en el modo de escaneo MRM. En el análisis de espectrometría de masas se monitorizaron diferentes transiciones MRM: la m/z 326/46 correspondiente al NO₂-OA, la 324/46 para el NO₂-LA y finalmente, la 322/46 para el NO₂-Ln.

Las muestras mostraron un pico cromatográfico coincidente con la transición MRM 326/46 que compartía el mismo tiempo de retención que el estándar de NO₂-OA (**Fig. 36: Panel A**). Este mismo comportamiento fue observado para la transición MRM 324/46 correspondiente al NO₂-LA (**Fig. 36: Panel B**). Estos resultados evidencian que en *Arabidopsis*, además de la presencia endógena del NO₂-Ln, ya recogida en publicaciones previas (Mata-Pérez et al. 2016d) y corroborada en esta tesis (**Fig. 36: Panel C**), también cabe señalar la presencia endógena de los ácidos grasos nitrados NO₂-OA y NO₂-LA como posibles moléculas electrofílicas señaladoras.

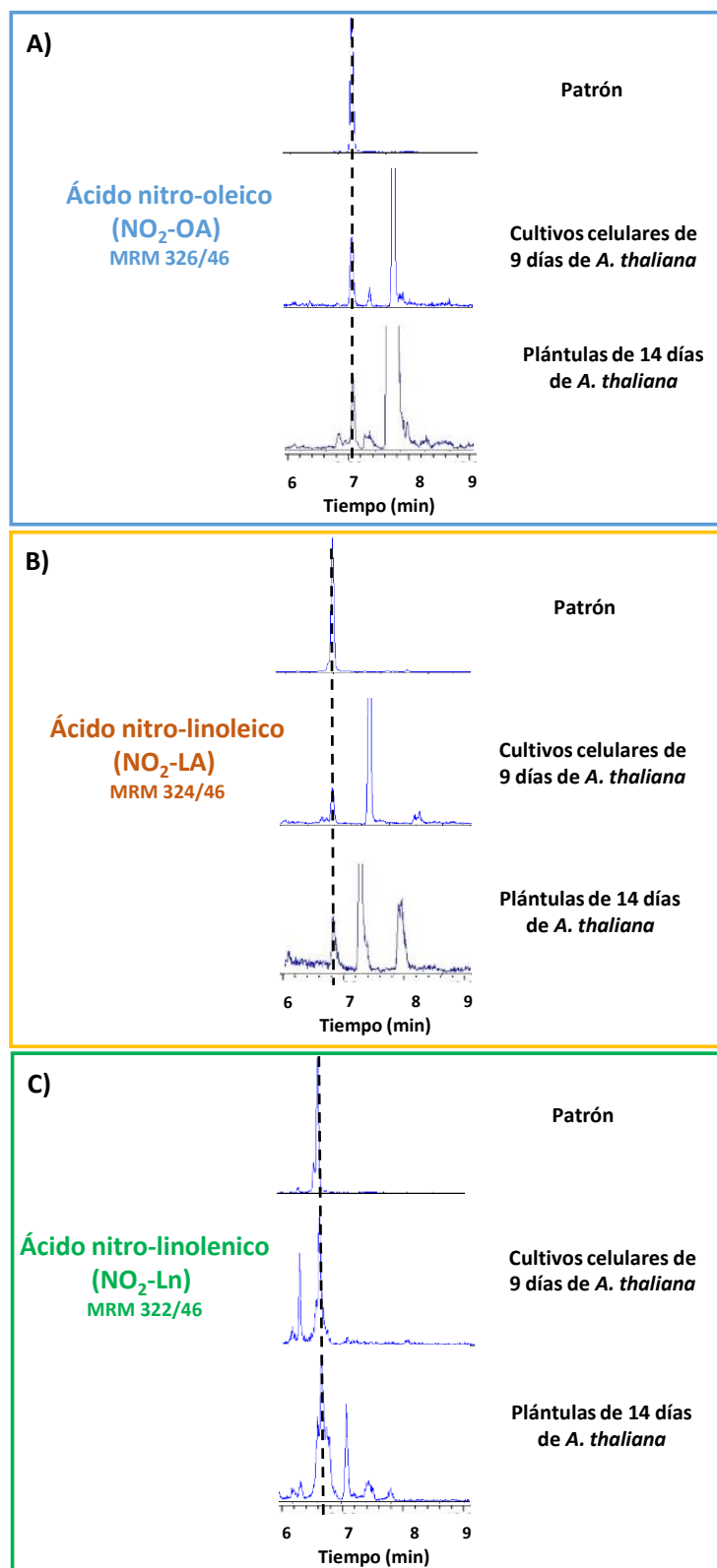


Figura 36. Detección de los principales ácidos grasos nitrados presentes en *Arabidopsis thaliana*. En cada uno de los paneles se muestra el cromatograma correspondiente al patrón de cada ácido graso nitrado, NO₂-OA (Panel A), NO₂-LA (Panel B) y NO₂-Ln (Panel C). Sus tiempos de retención coinciden con los picos cromatográficos

detectados en los extractos lipídicos de *Arabidopsis* procedentes de cultivos celulares de 9 días y de plántulas de 14 días. Los picos están referidos a una intensidad total de iones correspondiente a $1,8 \times 10^5$ para la transición m/z 326/46 del $\text{NO}_2\text{-OA}$, $1,6 \times 10^5$ para el $\text{NO}_2\text{-LA}$ (m/z 324/46) y $4,5 \times 10^4$ para el $\text{NO}_2\text{-Ln}$ (m/z 322/46). La línea vertical punteada indica picos con el mismo tiempo de retención.

Tras constatar la presencia de los tres $\text{NO}_2\text{-FAs}$ en *Arabidopsis*, se llevó a cabo la cuantificación de sus niveles en *A. thaliana*, tanto en los cultivos celulares de 9 días como en las plántulas de 14 días. Para ello, se adicionó un estándar interno isotópico, el $^{13}\text{C}18\text{-NO}_2\text{-OA}$ durante el proceso de hidrólisis y extracción de los $\text{NO}_2\text{-FAs}$, para poder así determinar, por espectrometría de masas, la pérdida de $\text{NO}_2\text{-FAs}$ generada por el procesamiento de las muestras. De este modo, se cuantificó el contenido en $\text{NO}_2\text{-OA}$, $\text{NO}_2\text{-LA}$ y $\text{NO}_2\text{-Ln}$ en las muestras de *Arabidopsis* por LC-MS/MS. Los niveles más elevados se observaron en plántulas de 14 días, donde el $\text{NO}_2\text{-FA}$ más abundante fue el $\text{NO}_2\text{-Ln}$ ($1,945 \pm 0,032$ pmoles/g peso fresco), seguido del $\text{NO}_2\text{-LA}$ ($0,563 \pm 0,016$ pmoles/g peso fresco) y del $\text{NO}_2\text{-OA}$ ($0,476 \pm 0,007$ pmoles/g peso fresco). En los cultivos celulares también fue mayoritario el $\text{NO}_2\text{-Ln}$ ($0,421 \pm 0,01$ pmoles/g peso fresco), seguido por el $\text{NO}_2\text{-OA}$ ($0,289 \pm 0,003$ pmoles/g peso fresco) y el $\text{NO}_2\text{-LA}$ ($0,095 \pm 0,005$ pmoles/g peso fresco) (**Fig. 37**).

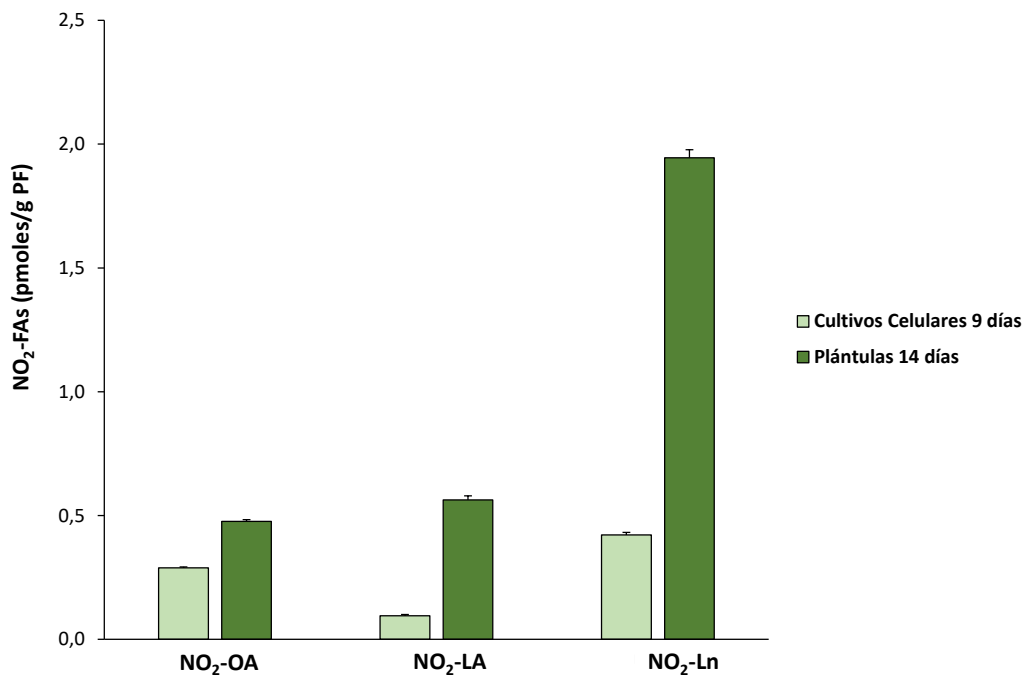


Figura 37. Niveles endógenos de $\text{NO}_2\text{-FAs}$ en *Arabidopsis*. En esta figura se muestran los niveles endógenos de $\text{NO}_2\text{-OA}$, $\text{NO}_2\text{-LA}$ y $\text{NO}_2\text{-Ln}$ en pmoles/g PF tanto en cultivos celulares de 9 días como en plántulas de 14 días. Los valores de $\text{NO}_2\text{-FAs}$ son el resultado de la media \pm SEM de, al menos, diez experimentos independientes. PF: peso fresco.

22.1. Caracterización de los principales almacenes de $\text{NO}_2\text{-FAs}$ en *Arabidopsis*

Las propiedades físico-químicas que presentan los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ les permiten esterificarse con lípidos más complejos y con proteínas, moléculas que, de ese modo, se convierten en almacenes de $\text{NO}_2\text{-FAs}$. En sistemas animales, se ha documentado la esterificación de los $\text{NO}_2\text{-FAs}$ en lípidos complejos, siendo los TAG el principal almacén de los mismos (Fazzari et al. 2015; Fazzari et al.

2019). Paralelamente, también se han caracterizado en animales diferentes proteínas susceptibles a la unión de los NO₂-FAs (**Tabla 5**). Sin embargo, en sistemas vegetales todos estos aspectos han sido poco explorados y constituyen el objeto de esta Tesis Doctoral en la cual se van a caracterizar los principales almacenes de NO₂-FAs y como éstos se modulan a lo largo del desarrollo y en diferentes situaciones de estrés abiótico.

La caracterización de los almacenes lipídicos de los NO₂-FAs se ha llevado a cabo a través de la modificación de un método cromatográfico que previamente había sido utilizado en sistemas animales (Fazzari et al. 2015). Este método permite separar los lípidos complejos en función de su polaridad mediante el uso de disolventes. De esta manera, se obtienen 8 fracciones que, ordenadas en orden creciente de polaridad son: SE, TAG, MAG y DAG, FFA, PC, PE, PS y FI. Adicionalmente, se ha caracterizado una 9ª fracción que se corresponde con el almacén de los NO₂-FAs en componentes proteicos.

Para llevar a cabo la identificación y caracterización de los almacenes de NO₂-FAs se utilizaron plántulas de *Arabidopsis* de 14 días, que son plantas juveniles donde no han tenido lugar aún procesos de floración ni de gametogénesis. A continuación, se muestran los niveles de cada uno de los NO₂-FAs en cada una de las fracciones.

✔ Ésteres de fitoesteroles

Los SE están formados por la unión de un ácido graso al grupo β-hidroxilo del C3 de los fitoesteroles a través de un enlace éster. Los principales fitoesteroles en plantas son el β-sitosterol, el campesterol, el estigmasterol y el colesterol (Dyas and Goad 1993). Como consecuencia de su gran apolaridad es la 1ª fracción obtenida en el método de extracción lipídica. Los 3 NO₂-FAs se esterifican fitoesteroles, tal y como se muestra en la **Fig. 38. Panel A**, siendo el NO₂-Ln el más abundante ($0,064 \pm 0,007$ pmoles/g peso fresco), seguido estrechamente por el NO₂-LA ($0,039 \pm 0,007$ pmoles/g peso fresco) y el NO₂-OA ($0,029 \pm 0,005$ pmoles/g peso fresco).

✔ Triacilglicéridos

La 2ª fracción lipídica que se obtiene está formada mayoritariamente por TAG. Estas moléculas también apolares, se generan combinando un glicerol con tres moléculas de ácidos grasos. En este depósito, los 3 NO₂-FAs están presentes de manera muy similar siendo sus niveles: $0,04 \pm 0,007$ pmoles/g peso fresco para el NO₂-OA, $0,035 \pm 0,008$ pmoles/g peso fresco para el NO₂-LA y $0,032 \pm 0,003$ pmoles/g peso fresco para el NO₂-Ln (**Fig. 38. Panel B**).

✔ Mono y diacilglicéridos (MAG y DAG)

Los MAG y DAG fueron identificados en la 3ª fracción a través de la detección MS/MS por infusión directa en el cuadrupolo de tiempo de vuelo (QTOF). En este depósito lipídico destaca la presencia tanto de NO₂-Ln ($0,099 \pm 0,011$ pmoles/g peso fresco) como de NO₂-OA ($0,067 \pm 0,012$ pmoles/g peso fresco), sin embargo, el NO₂-LA está menos representado ($0,022 \pm 0,003$ pmoles/g peso fresco) (**Fig. 38. Panel C**).

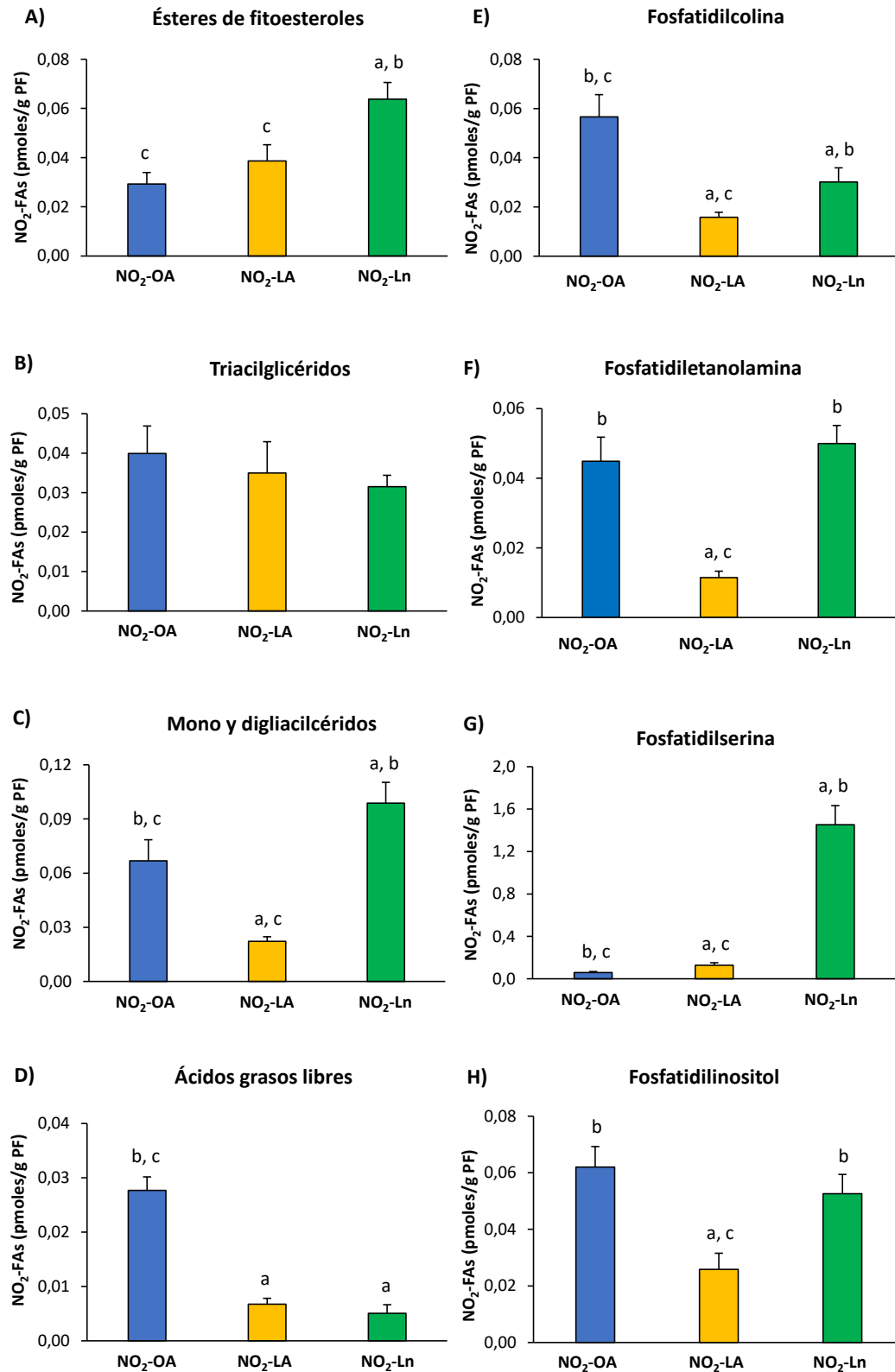


Figura 38. Distribución y cuantificación de los niveles endógenos de NO₂-FAs en las diferentes fracciones lipídicas. En la figura se muestran los niveles de NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln que se encuentran esterificados en diferentes lípidos complejos como son los ésteres de colesterol (A), los triacilglicéridos (B), los mono y diacilglicéridos (C), la fosfatidilcolina (E), la fosfatidiletanolamina (F), la fosfatidilserina (G) y el fosfatidilinositol (H) identificados en plántulas de Arabidopsis de 14 días. En el panel D aparecen los niveles de NO₂-FAs libres. Los valores de NO₂-FAs que se muestran son la media ± SEM de al menos diez experimentos independientes. La letra a indica diferencias

significativas ($p < 0,05$) con respecto al NO₂-OA; la letra b con respecto al NO₂-LA y la letra c con respecto al NO₂-Ln.

✔ **Ácidos grasos libres**

En esta 4^º fracción eluyeron aquellos ácidos grasos que no se encontraban esterificados con lípidos complejos. La presencia de NO₂-FAs en esta fracción es muy baja debido a su naturaleza electrofílica que ocasiona que reaccionen rápidamente con otras moléculas (**Fig. 38. Panel D**).

✔ **Fosfatidilcolina**

La PC es un fosfoglicerolípido estructural de las membranas y debido a su polaridad eluye en 5^º lugar. En este fosfolípido predomina la presencia de NO₂-OA ($0,057 \pm 0,009$ pmoles/g peso fresco), seguido del NO₂-Ln ($0,03 \pm 0,006$ pmoles/g peso fresco) y del NO₂-LA ($0,016 \pm 0,002$ pmoles/g peso fresco) (**Fig. 38. Panel E**).

✔ **Fosfatidiletanolamina**

Otro tipo de fosfolípido estructural de las membranas es la PE que eluye entre las últimas fracciones (6^º) más polares. El NO₂-OA ($0,045 \pm 0,007$ pmoles/g peso fresco) y el NO₂-Ln ($0,05 \pm 0,005$ pmoles/g peso fresco) mostraron una abundancia similar en esta fracción, mientras que el NO₂-LA ($0,011 \pm 0,002$ pmoles/g peso fresco) presentó una participación minoritaria (**Fig. 38. Panel F**).

✔ **Fosfatidilserina**

Otro componente importante de las membranas es la FS. En este depósito se localiza principalmente el NO₂-Ln ($1,453 \pm 0,18$ pmoles/g peso fresco), mientras que los otros dos NO₂-FAs son minoritarios (NO₂-LA $0,127 \pm 0,024$ pmoles/g peso fresco y NO₂-OA $0,059 \pm 0,009$ pmoles/g peso fresco) (**Fig. 38. Panel G**).

✔ **Fosfatinositol**

El último fosfolípido polar en eluir fue el PI en la 8^º fracción, y este fosfolípido también lo vamos a encontrar en las membranas. El PI está integrado por concentraciones similares de NO₂-OA ($0,062 \pm 0,007$ pmoles/g peso fresco) y de NO₂-Ln ($0,053 \pm 0,007$ pmoles/g peso fresco) mientras que, en niveles menores ($0,026 \pm 0,006$ pmoles/g peso fresco), se identifica también el NO₂-LA (**Fig. 38. Panel H**).

✔ **Proteínas**

El carácter reactivo de los NO₂-FAs los lleva a reaccionar con residuos aminoacídicos de proteínas, dando lugar a la PTM conocida como nitroalquilación. Estos NO₂-FAs que se encuentran nitroalquilados pueden ser liberados en ambientes nitro-oxidativos a través de la oxidación del aducto de Michael. Por tanto, las proteínas son otra fuente de NO₂-FAs a considerar.

Para identificar y cuantificar los niveles de NO₂-FAs que se encontraban nitroalquilados con proteínas, se realizó un tratamiento en condiciones oxidantes (con H₂O₂) con el objeto de romper la PTM por nitroalquilación. Los NO₂-FAs liberados se caracterizaron por LC-MS/MS utilizando el método MRM. Ordenados según su abundancia, se detectaron el NO₂-LA ($0,15 \pm$

0,02 pmoles/g peso fresco), el NO₂-Ln (0,13 ± 0,02 pmoles/g peso fresco) y, en último lugar, el NO₂-OA (0,1 ± 0,01 pmoles/g peso fresco) (**Fig. 39**).

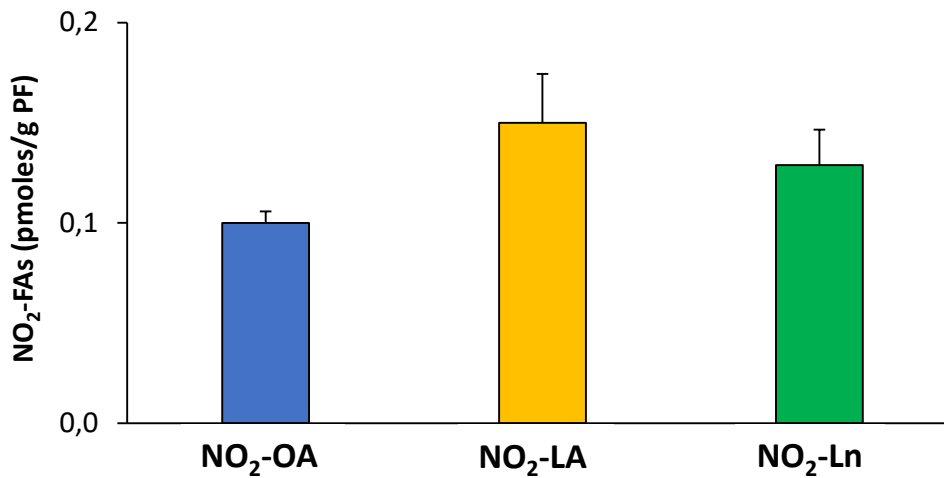


Figura 39. Niveles endógenos de NO₂-FAs aductados con proteínas en plántulas de 14 días. Los valores de NO₂-FAs corresponden a la media ± SEM de, al menos, diez experimentos independientes.

El análisis conjunto de los resultados mostrados previamente en las **Figuras 38 y 39** evidencia la distribución amplia y ubicua de los NO₂-FAs tanto en reservorios lipídicos como proteicos. Cuando se conjuga toda la información obtenida en nuestros experimentos relativa a la biodistribución de los NO₂-FAs en ambos tipos de reservorios biológicos (lipídicos y proteicos) cabe subrayar a la fracción lipídica como el principal reservorio de NO₂-OA y de NO₂-Ln, siendo los fosfolípidos la localización preferencial. El caso del NO₂-LA es algo distinto pues presenta niveles similares tanto en proteínas como en fosfolípidos, de modo que no se puede señalar ningún reservorio principal. Además, los 3 NO₂-FAs muestran patrones de almacenamiento diferentes. En este sentido, los almacenes de NO₂-Ln ordenados de mayor a menor abundancia son: fosfolípidos, proteínas junto con triacilglicéridos y, finalmente, ésteres de fitoesteroles. En el caso del NO₂-LA, tanto los fosfolípidos como las proteínas son reservorios preferenciales, seguidos de los triacilglicéridos y de los ésteres de fitoesteroles. Finalmente, el NO₂-OA tiene una mayor participación en fosfolípidos, después en triacilglicéridos y en proteínas, apareciendo los ésteres de fitoesteroles como el reservorio minoritario. Los niveles de NO₂-FAs en su forma libre prácticamente fueron indetectables (**Fig. 40**).

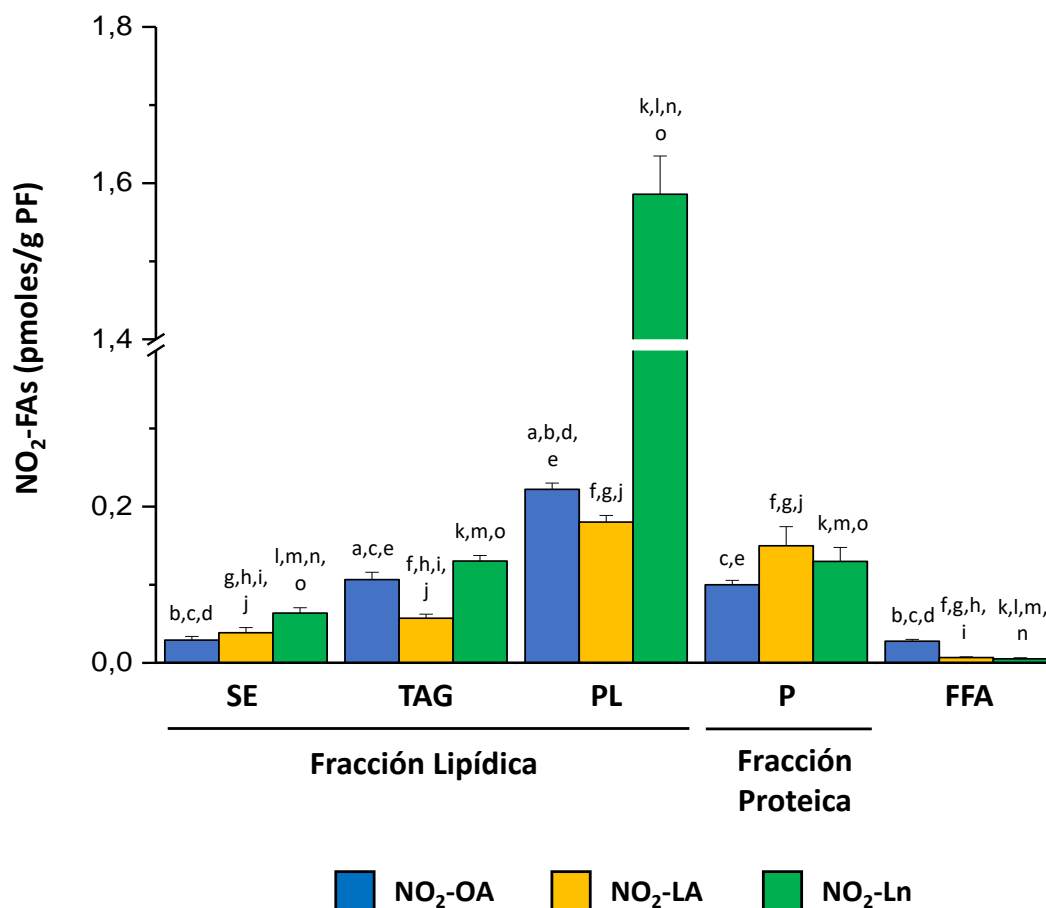


Figura 40. Principales almacenes de NO₂-FAs en Arabidopsis. En esta figura se muestran los diferentes almacenes lipídicos y proteicos de NO₂-FAs identificados en plántulas de Arabidopsis de 14 días. La fracción lipídica estaba formada por los ésteres de fitoesteres, los triacilglicéridos (incluyendo los mono y diacilglicéridos) y los 4 tipos de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiltenolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol). La fracción proteica está representada por los NO₂-FAs que estaban aductados con proteínas y, finalmente, se muestran los niveles de NO₂-FAs libres no esterificados ni aductados. Las letras a, b, c, d y e indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de NO₂-OA que encontramos en los SE (a), los TAG (b), los PL (c), las P (d) y los FFA (e). Las letras f, g, h, i y j indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de NO₂-LA que encontramos en los SE (f), los TAG (g), los PL (h), las P (i) y los FFA (j). Las letras k, l, m, n y o indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los niveles de NO₂-Ln que encontramos en los SE (k), los TAG (l), los PL (m), las P (n) y los FFA (o).

PL: fosfolípidos; P: proteínas

23. Biodistribución de los almacenes de NO₂-FAs en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*




Tras identificar y caracterizar los principales almacenes lipídicos y proteicos de NO₂-FAs utilizando plántulas de Arabidopsis de 14 días, a continuación, se estudió la distribución y modulación de los NO₂-FAs en los diferentes almacenes a lo largo del desarrollo de Arabidopsis. Para ello, se seleccionaron diferentes etapas de crecimiento que abarcan los principales acontecimientos que tienen lugar durante el desarrollo de la planta y que se explican a continuación.




Semillas


El punto de partida en el desarrollo de una planta es la semilla ya que alberga el embrión del que surgirá una nueva planta en el caso de existir condiciones apropiadas. Por este motivo, se seleccionó este material vegetal para llevar a cabo la detección y cuantificación de los NO₂-FAs en los diferentes almacenes por LC-MS/MS (**Tabla 14**).

En la **figura 41 (Panel A)**, se puede observar cuál es el NO₂-FA predominante en cada uno de los almacenes (lipídicos y proteicos) existentes en semillas. En resumen, el NO₂-OA presenta niveles bastantes homogéneos cuando se comparan los diferentes depósitos, con excepción de la fosfatidilserina, donde su participación con respecto a los demás NO₂-FAs es muy reducida. Por otra parte, el NO₂-LA también tiene una amplia distribución, destacando, sobre todo, en los depósitos de triacilglicéridos y en proteínas, siendo muy escaso en los ésteres de fitoesteroles y en la fracción de fosfatidilserina. Finalmente, NO₂-Ln está presente principalmente en los ésteres de colesterol y en la fosfatidilserina, aunque también podemos encontrarlo en los demás depósitos.

Tabla 14. Niveles endógenos de NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en los diferentes almacenes lipídicos y en el reservorio proteico durante las etapas de desarrollo seleccionadas de *Arabidopsis thaliana*.

Etapa	Material vegetal	Fracción	NO ₂ -OA (pmoles/g PF)	NO ₂ -LA (pmoles/g PF)	NO ₂ -Ln (pmoles/g PF)
Semilla 	Semillas	SE	0,366± 0,038	0,352± 0,072	5,137± 1,002
		TAG	0,101± 0,019	0,194± 0,032	0,165± 0,028
		MAG+DAG	0,029± 0,004	0,087± 0,007	0,142± 0,028
		PC	0,029± 0,004	0,089± 0,012	0,103± 0,013
		PE	0,033± 0,004	0,090± 0,023	0,137± 0,032
		PS	0,027± 0,003	0,079± 0,010	2,367± 0,329
		PI	0,032± 0,003	0,033± 0,006	0,091± 0,011
		Proteínas	0,030± 0,011	0,040± 0,014	0,030± 0,013
Apertura de los cotiledones (5 días) 	Plántula completa	SE	0,008± 0,001	0,026± 0,002	0,086± 0,009
		TAG	0,009± 0,001	0,013± 0,002	0,031± 0,001
		MAG+DAG	0,012± 0,001	0,007± 0,002	0,039± 0,006
		PC	0,012± 0,001	0,012± 0,001	0,028± 0,005
		PE	0,013± 0,002	ND	0,036± 0,007
		PS	0,016± 0,002	0,016± 0,004	0,479± 0,092
		PI	0,015± 0,002	0,009± 0,001	0,023± 0,001
		Proteínas	0,100± 0,016	0,200± 0,014	0,140± 0,025
Inicio de la roseta (14 días) 	Plántula completa	SE	0,029± 0,005	0,039± 0,007	0,064± 0,022
		TAG	0,040± 0,007	0,035± 0,008	0,032± 0,004
		MAG+DAG	0,067± 0,012	0,022± 0,003	0,099± 0,043
		FC	0,057± 0,009	0,016± 0,002	0,030± 0,010
		FE	0,045± 0,007	0,011± 0,002	0,050± 0,014
		FS	0,059± 0,010	0,127± 0,024	1,453± 0,165
		FI	0,062± 0,007	0,026± 0,006	0,053± 0,002
		Proteínas	0,100± 0,006	0,150± 0,024	0,130± 0,018
FFA	0,028± 0,002	0,007± 0,001	0,005± 0,001		

Etapa	Material vegetal	Fracción		NO ₂ -OA (pmoles/g PF)	NO ₂ -LA (pmoles/g PF)	NO ₂ -Ln (pmoles/g PF)
Roseta (24 días) 	Hojas y raíces de hidropónicos	SE	H	0,009± 0,001	0,02± 0,004	0,077± 0,007
			R	0,008± 0,001	ND	0,020± 0,004
		TAG	H	0,008± 0,001	0,007± 0,001	0,045± 0,008
			R	0,007± 0,001	0,002± 0,001	0,036± 0,007
		MAG+DAG	H	0,010± 0,001	0,004± 0,002	0,035± 0,006
			R	0,009± 0,001	0,024± 0,002	0,038± 0,007
		PC	H	0,016± 0,002	0,003± 0,001	0,005± 0,002
			R	0,009± 0,001	0,008± 0,001	0,011± 0,002
		PE	H	0,019± 0,002	0,002± 0,001	0,005± 0,001
			R	0,009± 0,001	0,004± 0,001	0,011± 0,001
		PS	H	0,014± 0,004	0,010± 0,001	0,329± 0,034
			R	0,010± 0,001	0,005± 0,001	0,203± 0,017
		PI	H	0,025± 0,003	0,003± 0,001	0,017± 0,003
			R	0,017± 0,002	0,007± 0,001	0,006± 0,001
Proteínas	H	0,030± 0,003	0,200± 0,030	0,070± 0,023		
	R	ND	0,020± 0,008	0,080± 0,029		
FFA	H	0,014± 0,003	ND	0,027± 0,002		
	R	0,011± 0,001	0,007± 0,001	0,018± 0,001		
Floración (34 días) 	Hojas y raíces de hidropónicos	SE	H	0,009± 0,002	0,036± 0,006	0,077± 0,016
			R	0,007± 0,001	ND	0,034± 0,003
		TAG	H	0,019± 0,003	0,011± 0,002	0,070± 0,008
			R	0,006± 0,001	ND	0,025± 0,002
		MAG+DAG	H	0,013± 0,002	0,004± 0,002	0,137± 0,025
			R	0,007± 0,001	0,006± 0,001	0,007± 0,003
		PC	H	0,015± 0,002	0,036± 0,008	0,028± 0,005
			R	0,009± 0,001	0,003± 0,001	0,011± 0,001
		PE	H	0,023± 0,004	0,005± 0,002	0,038± 0,007
			R	0,007± 0,001	0,006± 0,001	0,008± 0,004
		PS	H	0,020± 0,004	0,046± 0,002	0,928± 0,094
			R	0,007± 0,001	0,021± 0,002	0,880± 0,211
		PI	H	0,035± 0,007	0,021± 0,007	0,090± 0,014
			R	0,009± 0,001	0,010± 0,001	0,006± 0,001
Proteínas	H	0,130± 0,036	0,140± 0,066	0,160± 0,059		
	R	ND	ND	0,050± 0,017		
FFA	H	0,013± 0,002	0,006± 0,001	0,012± 0,001		
	R	0,007± 0,001	0,001± 0,000	0,030± 0,003		
Producción de semillas (36 días) 	Hojas y raíces de hidropónicos	SE	H	0,011± 0,002	0,024± 0,003	0,024± 0,006
			R	0,007± 0,001	0,001± 0,000	0,030± 0,005
		TAG	H	0,016± 0,001	0,006± 0,001	0,013± 0,001
			R	0,010± 0,001	0,003± 0,001	0,021± 0,003
		MAG+DAG	H	0,019± 0,001	ND	0,021± 0,004
			R	0,039± 0,020	0,035± 0,009	0,027± 0,004
		PC	H	0,012± 0,002	0,001± 0,000	0,005± 0,003
			R	0,012± 0,003	0,003± 0,001	0,011± 0,002
		PE	H	0,030± 0,005	ND	ND
			R	0,014± 0,004	0,008± 0,003	0,005± 0,002
		PS	H	0,016± 0,002	0,044± 0,004	0,947± 0,097
			R	0,021± 0,002	0,031± 0,005	0,718± 0,059
		PI	H	0,024± 0,004	0,060± 0,011	0,113± 0,023
			R	0,008± 0,001	0,003± 0,001	0,009± 0,002
Proteínas	H	0,040± 0,005	0,090± 0,029	0,060± 0,025		
	R	0,040± 0,005	0,080± 0,023	0,080± 0,048		
FFA	H	0,009± 0,001	0,001± 0,001	0,005± 0,003		
	R	0,014± 0,001	0,005± 0,002	0,026± 0,003		

Etapa	Material vegetal	Fracción		NO ₂ -OA (pmoles/g PF)	NO ₂ -LA (pmoles/g PF)	NO ₂ -Ln (pmoles/g PF)
Senescencia (53 días) 	Hojas y raíces de hidropónicos	SE	H	0,005± 0,001	0,021± 0,003	0,016± 0,002
			R	0,006± 0,001	ND	0,035± 0,003
		TAG	H	0,005± 0,001	0,011± 0,001	0,015± 0,002
			R	0,007± 0,001	ND	0,003± 0,002
		MAG+DAG	H	0,011± 0,002	0,006± 0,003	0,038± 0,006
			R	0,008± 0,001	0,013± 0,002	0,02± 0,003
		PC	H	0,010± 0,001	0,011± 0,002	0,022± 0,003
			R	0,008± 0,001	0,006± 0,001	0,01± 0,0004
		PE	H	0,008± 0,001	ND	0,01± 0,002
			R	0,007± 0,001	0,001± 0,001	ND
		PS	H	0,006± 0,001	0,014± 0,002	0,280± 0,035
			R	0,009± 0,001	0,020± 0,002	0,154± 0,028
		PI	H	0,001± 0,002	0,001± 0,001	0,011± 0,002
			R	0,002± 0,001	0,002± 0,001	0,002± 0,001
		Proteínas	H	0,040± 0,009	0,060± 0,008	0,030± 0,002
			R	0,020± 0,009	0,060± 0,036	0,010± 0,006
		FFA	H	0,006± 0,001	ND	0,004± 0,002
			R	0,008± 0,001	ND	0,018± 0,002

ND: no detectado; H: hojas; R: raíz.

Plántulas de 5 días

Tras conocer la distribución de los NO₂-FAs en la semilla, para la siguiente etapa de crecimiento se seleccionaron plántulas de 5 días que habían desarrollado la radícula y el hipocótilo y presentaban los cotiledones completamente abiertos. Debido a su reducido tamaño, la distribución y los niveles endógenos de los NO₂-FAs se analizaron utilizando la plántula completa (**Tabla 14**). La cuantificación de los espectros de MS/MS mostró que el NO₂-Ln, era el NO₂-FA predominante en la mayoría de los almacenes lipídicos analizados, resaltado su gran esterificación en fosfatidilserina. En cambio, el NO₂-LA desaparecía de los almacenes de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y presentaba una gran contribución en la fracción proteica. El NO₂-OA mostró una participación homogénea en los diferentes depósitos, con excepción de la fosfatidilserina, donde su participación era mínima (**Fig. 41, Panel B**).

Plántulas de 14 días

Las plántulas de 14 días se encuentran en un estadio juvenil representado por el crecimiento y desarrollo de las hojas, que comienzan a disponerse en roseta. En esta etapa, los NO₂-FAs están presentes en todos los almacenes, pero con predominancia distinta. En este sentido, el NO₂-OA resalta en la fosfatidilcolina, el NO₂-LA en las proteínas y la fosfatidilserina sigue siendo el principal depósito del NO₂-Ln. Estos análisis también se realizaron utilizando la planta completa (**Tabla 14**) (**Fig. 41, Panel C**).

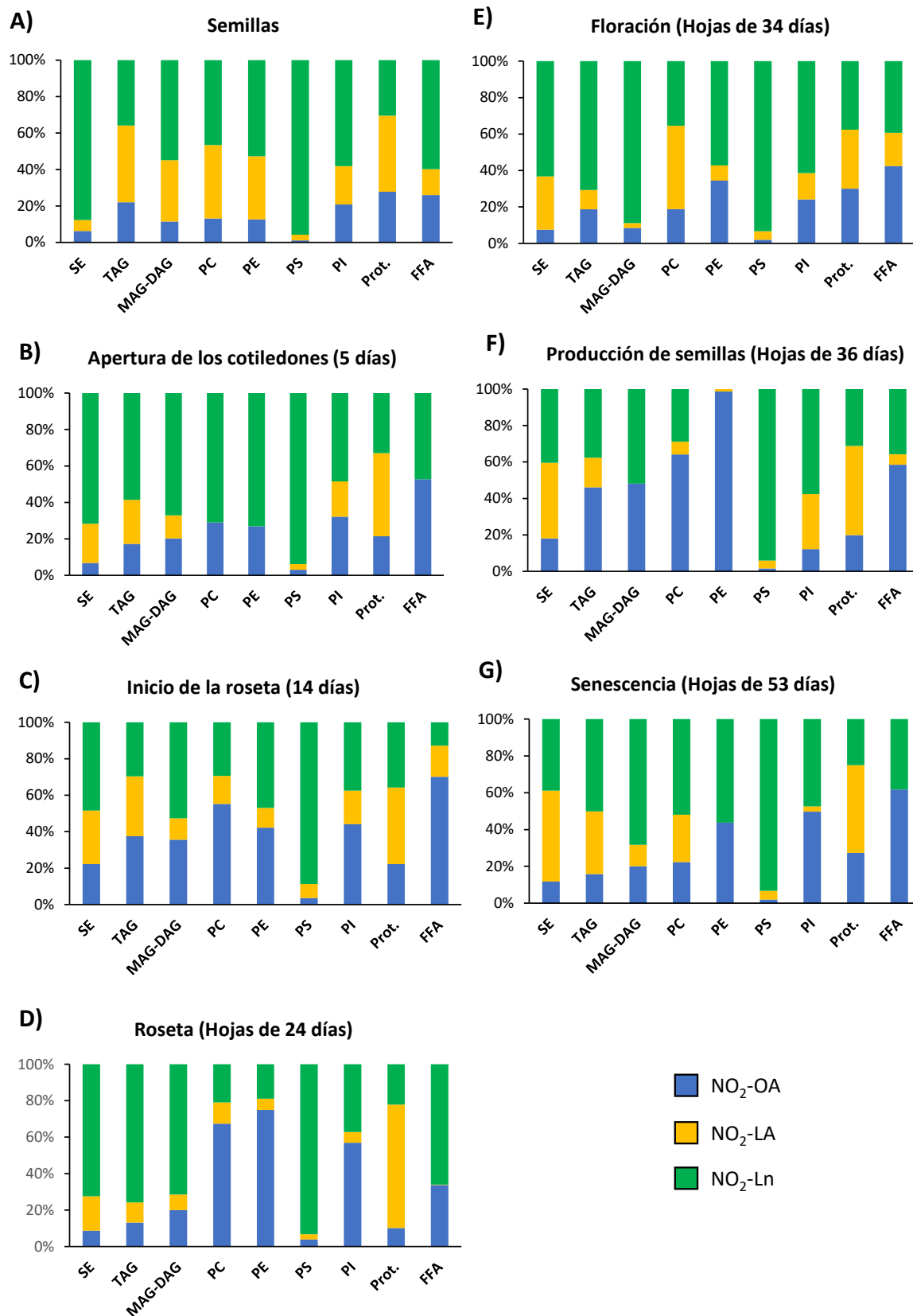


Figura 41. Distribución relativa de NO₂-FAs en los diferentes almacenes lipídicos y en el reservorio proteico durante las etapas de crecimiento de *Arabidopsis* seleccionadas. En esta figura se muestra la concentración relativa (expresada en porcentaje) que presenta cada uno de los NO₂-FAs en los diferentes almacenes presentes

en semillas (A); en plántulas completas de 5 (B) y 14 días (C); y en hojas de hidropónicos de 24 (D), 34 (E), 36 (F) y 53 días (G).

Prot: proteínas.

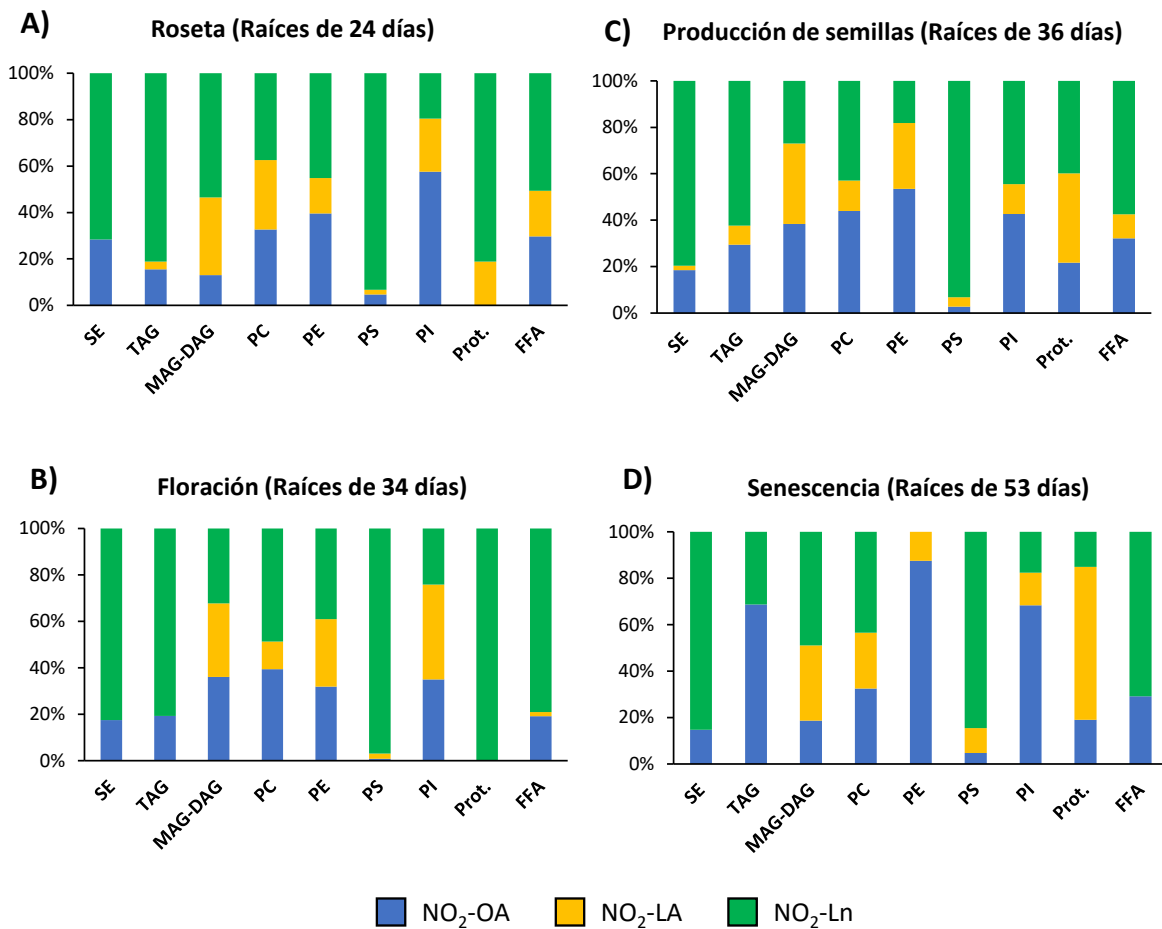


Figura 42. Composición relativa de NO₂-FAs en los diferentes almacenes lipídicos y proteicos de raíces de plantas de Arabidopsis en diferentes etapas de crecimiento. En esta figura se muestra la concentración relativa (expresada en porcentaje) que presenta cada uno de los NO₂-FAs en los diferentes almacenes presentes en raíces de hidropónicos de 24 (A), 34 (B), 36 (C) y 53 días (D).

🌱 Hidropónicos de 24 días

En esta etapa se utilizaron plantas cultivadas mediante un sistema hidropónico. El material vegetal empleado aún se encontraba en crecimiento vegetativo y mostraba una roseta completamente formada constituida por 13-14 hojas. En este caso, se determinó la distribución de los NO₂-FAs en los diferentes almacenes mediante LC-MS/MS pero separando hojas y raíces. Cabe concluir que todos los NO₂-FAs estaban presentes en todas las localizaciones objeto de estudio de los dos tejidos analizados, con excepción del NO₂-LA, el cual no apareció en los ésteres de fitoesteres de las raíces. En hojas, los fosfolípidos estaban formados principalmente por NO₂-OA, exceptuando la fosfatidilserina, mayoritariamente esterificada con NO₂-Ln. En los almacenes proteicos predominaba el NO₂-LA, mientras que, en los demás reservorios analizados, el NO₂-Ln tenía una mayor participación (**Tabla 14**) (**Fig. 41, Panel D**). En raíces, este patrón de dominancia descrito en hojas se mantenía para el NO₂-Ln en la fosfatidilserina, los triacilglicéridos, los ésteres de fitoesteres y las proteínas. En cambio,

el NO₂-OA solo era mayoritario en el fosfatidilinositol y el NO₂-LA no tenía un papel predominante en ninguno de los almacenes (**Tabla 14**) (**Fig. 42, Panel A**).

🌱 Hidropónicos de 34 días

Las plántulas de 34 días, también obtenidas mediante cultivo hidropónico, se caracterizan por la presencia de estructuras de reproducción sexual, las flores, pues se encontraban en la etapa de floración. Estas características modulan la distribución de los NO₂-FAs en los almacenes presentes tanto en las hojas como en las raíces. De manera general, en hojas, el papel predominante lo tiene el NO₂-Ln, sobre todo, en la fosfatidilserina y en los mono y diacilglicéridos. Aunque también es destacable la gran participación del NO₂-LA en fosfatidilcolina. El NO₂-OA está presente en todos los almacenes, pero sin tener un papel predominante en ninguno (**Tabla 14**) (**Fig. 41, Panel E**). En cambio, si observamos lo que ocurre en raíces podemos ver que en los almacenes de ésteres de fitoesteres, triglicéridos y proteínas no está presente el NO₂-LA. El NO₂-Ln tiene una amplia y gran participación en la mayoría de las localizaciones, destacando la fosfatidilserina, los ésteres de fitoesteres, los triacilglicéridos y las proteínas. Curiosamente, en este último almacén, el NO₂-Ln era el único NO₂-FA presente. Finalmente, el NO₂-OA presenta una distribución homogénea, que se vio disminuida en la fosfatidilserina (**Tabla 14**) (**Fig. 42, Panel B**).

🌱 Hidropónicos de 36 días

Tras la floración, la planta inicia la formación del fruto que en *Arabidopsis* se denomina silicua y que contiene las semillas. En este caso, también se utilizaron cultivos hidropónicos y se estudió por separado la presencia de los NO₂-FAs en los depósitos lipídicos y proteicos. En hojas hay que destacar el papel preeminente del NO₂-OA en la mayoría de los almacenes, sobre todo en la fosfatidiletanolamina. Mientras que, en lo que respecta a los otros NO₂-FAs, cabe destacar la dominancia del NO₂-Ln en la fosfatidilserina y la ausencia del NO₂-LA en los mono y diacilglicéridos (**Tabla 14**) (**Fig. 41, Panel F**). En cambio, en raíces, la fosfatidiletanolamina se reveló como el principal almacén de NO₂-OA aunque no de forma tan contundente como ocurría en hojas. El NO₂-LA predominaba en proteínas y el NO₂-Ln estaba presente de una forma notoria en los almacenes de ésteres de fitoesteres, triacilglicéridos y fosfatidilserina (**Tabla 14**) (**Fig. 42, Panel C**).

🌱 Hidropónicos de 53 días

La última etapa del desarrollo vegetal es la senescencia, donde la planta entra en un proceso de muerte celular programada. Los cultivos hidropónicos de *Arabidopsis* de 53 días muestran estas características fenotípicas. El análisis por LC-MS/MS de hojas y raíces de este tipo de plantas mostró una distribución ubicua de los NO₂-FAs en los diferentes depósitos. En la mayoría de los almacenes de las hojas, los NO₂-FAs presentaron un patrón de abundancia homogéneo, salvo en el caso de la fosfatidiletanolamina, en la cual solo estaban presentes el NO₂-OA y el NO₂-Ln; la fosfatidilserina donde seguía predominando de manera casi absoluta el NO₂-Ln y el fosfatidilinositol donde el NO₂-OA destacaba levemente (**Tabla 14**) (**Fig. 41, Panel G**). En raíces, no todos los almacenes contienen los 3 NO₂-FAs, así, el NO₂-LA fue indetectable en los ésteres de fitoesteres y en los triglicéridos, igual que el NO₂-Ln en la fosfatidiletanolamina (**Tabla 14**) (**Fig. 42, Panel D**).

Hasta el momento, se ha destacado el NO₂-FA preferencial esterificado en cada uno de los almacenes presentes cada etapa desarrollo. En la **figura 43**, se muestra la abundancia relativa de cada

nitrolípido en la totalidad de reservorios y etapas de desarrollo consideradas. De este modo, se expone cual es el almacén proteico o lipídico más rico en NO₂-OA (**Panel A**), en NO₂-LA (**Panel B**) o en NO₂-Ln (**Panel C**) en cada una de las etapas de desarrollo y como esta disposición mayoritaria en un determinado almacén va cambiando conforme la planta va creciendo y desarrollándose.

El punto de partida en el desarrollo de una planta es la semilla, en este material vegetal los tres NO₂-FAs se esterifican principalmente con ésteres de fitoesteres. Los NO₂-OA y NO₂-LA se encuentran almacenados considerablemente en triacilglicéridos, en cambio, la fosfatidilserina es el 2º almacén de NO₂-Ln. El proceso de germinación de las semillas (plántulas de 5 días) convierte a las proteínas en el principal almacén del NO₂-OA, NO₂-LA y en una menor relevancia el NO₂-Ln, dado que para este NO₂-FA el principal almacén en esta etapa de crecimiento es la fosfatidilserina. Las etapas siguientes de crecimiento como el desarrollo de la roseta (plántulas de 14 días e hidropónicos de 24 días), la floración (hidropónicos de 34 días), la producción de semillas (hidropónicos de 36 días) y la senescencia (hidropónicos de 53 días) muestran, en el caso del NO₂-Ln, a la fosfatidilserina como el depósito principal siendo las proteínas el reservorio primordial tanto del NO₂-LA como del NO₂-OA. Sin embargo, en el caso del NO₂-OA, hay que aclarar que presenta un reparto homogéneo en los diferentes depósitos al inicio del crecimiento vegetativo (plántulas de 14 días). También es importante resaltar que, en general, existe un patrón similar en la disposición preferencial de los NO₂-FAs entre los tejidos de hoja y raíz, aunque existen algunas diferencias en etapas concretas. Ejemplo de ello, son las raíces de los hidropónicos en floración (34 días), donde los fosfolípidos son los principales depósitos del NO₂-LA (**Fig. 43**).

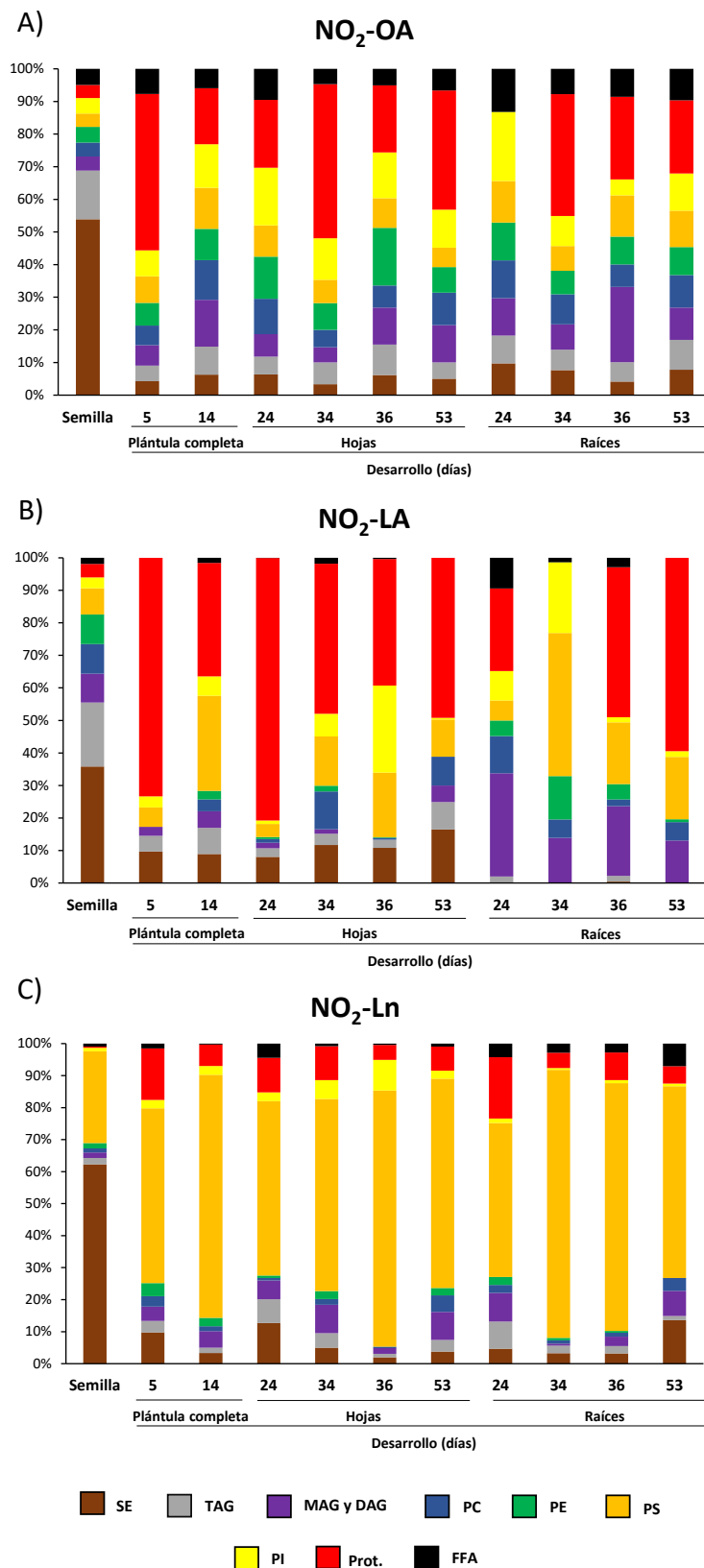


Figura 43. Modulación de la composición nitro-lipídica presente en los depósitos de la planta durante el desarrollo de Arabidopsis. En cada una de las gráficas de barras se muestra cual es el almacén preferencial de

cada uno de los NO₂-FAs (NO₂-OA en el panel A; NO₂-LA en el panel B y NO₂-Ln en el panel C) y cómo esta composición preferencial se modula durante las diferentes etapas de desarrollo. Para caracterizar el desarrollo, se han utilizado semillas, plántulas completas de 5 y 14 días y hojas y raíces de hidropónicos de 24, 34, 36 y 53 días.

Tras identificar los principales depósitos de cada uno de los NO₂-FAs y cómo se distribuyen a lo largo del desarrollo de la planta de Arabidopsis, en **la figura 44** se muestran los niveles endógenos de los NO₂-FAs que se encuentran esterificados con los almacenes lipídicos (**panel A**), los niveles de NO₂-FAs aductados con proteínas (**panel B**) y los niveles endógenos totales (**panel C**) que presenta la planta en cada una de las etapas de desarrollo.

En los almacenes lipídicos el NO₂-Ln es el más abundante, seguido del NO₂-OA y NO₂-LA, los cuales presentan una abundancia similar entre ellos. En general, se observa que los niveles de NO₂-FAs descienden durante el desarrollo, aunque existen fluctuaciones en determinados puntos como ocurre en las plántulas de 5 días y en los hidropónicos de 24 días, donde se observa una disminución acusada en los niveles de los tres NO₂-FAs (**Fig. 44. Panel A**).

En cambio, en los almacenes proteicos encontramos unos niveles similares entre los tres NO₂-FAs en cada una de las etapas de desarrollo. Si se analiza el comportamiento en su conjunto, se detectan unos niveles minoritarios en semillas, los cuales se incrementan para los 3 NO₂-FAs en las plántulas de 5 días. Estos niveles elevados se mantienen similares en las plántulas de 14, 24 y 34 días (estos dos últimos están referidos a las muestras de hojas). Cuando la planta tiene 36 días se genera un descenso en los niveles de NO₂-FAs presentes en las proteínas, y estos niveles se mantienen similares en las hojas de hidropónicos de 53 días. En el caso de las raíces, se han detectado unos valores equivalentes entre las diferentes etapas de desarrollo (**Fig. 44. Panel B**).

Finalmente, si analizamos los niveles endógenos totales de los 3 NO₂-FAs durante el desarrollo, se observa un comportamiento similar al descrito anteriormente por los NO₂-FAs que están esterificados con lípidos más complejos (**Fig. 44. Panel C**).

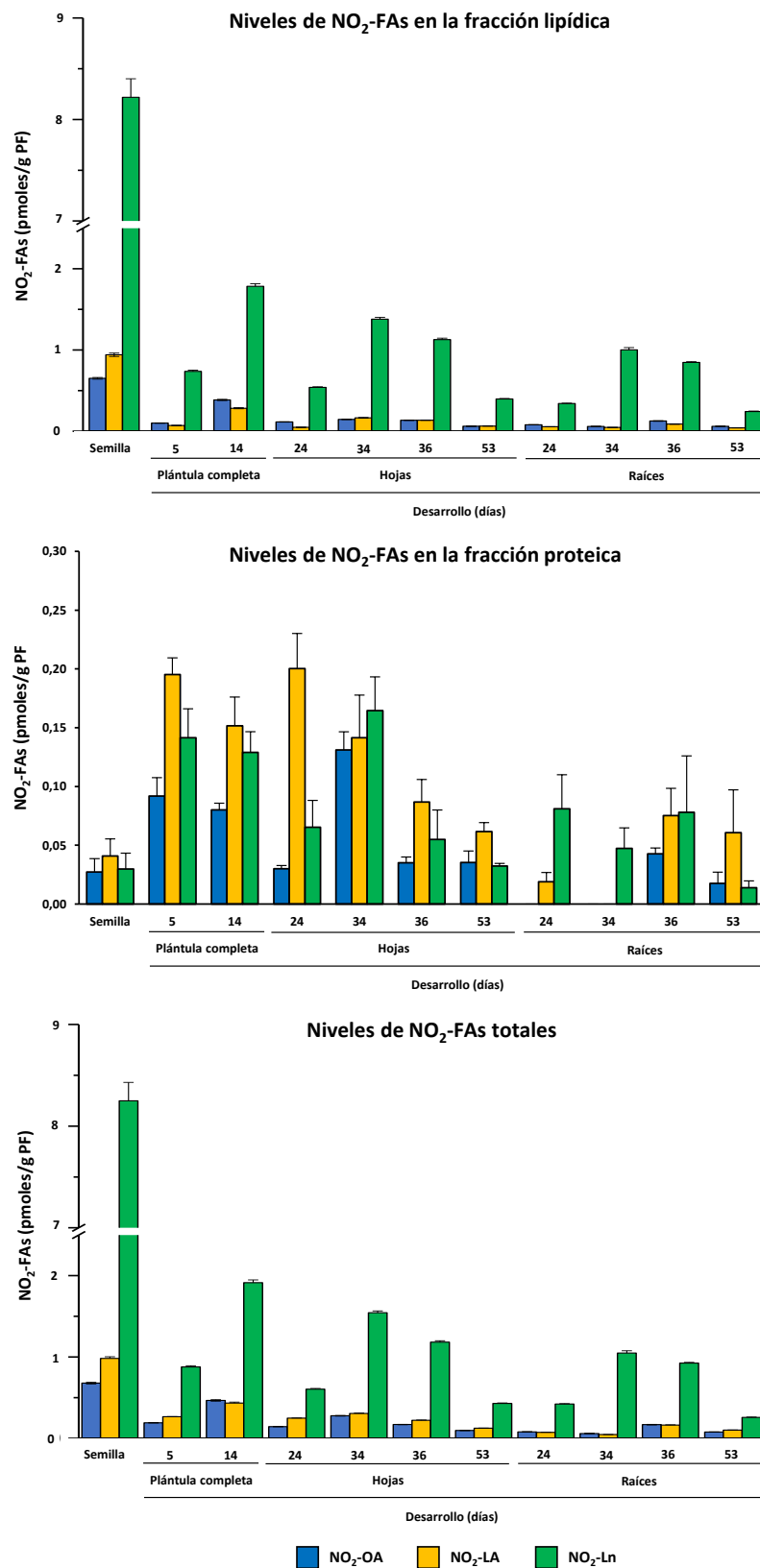


Figura 44. Niveles endógenos de NO₂-FAs durante el desarrollo de Arabidopsis. En esta figura, se muestra la distribución de los niveles de los 3 NO₂-FAs, NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln, durante las diferentes etapas de desarrollo

de la planta que abarcan desde la semilla, la germinación de las semillas (plántulas de 5 días), el desarrollo inicial y completo de la roseta (plántulas de 14 días e hidropónicos de 24 días, respectivamente), la floración (hidropónicos de 34 días), la producción de semillas (hidropónicos de 36 días) y, finalmente, la senescencia (hidropónicos de 53 días). En el panel A encontramos los niveles endógenos de los NO₂-FAs que se encuentran esterificados con los almacenes lipídicos; en el panel B) los niveles de NO₂-FAs aductados con proteínas y finalmente, en el panel C) se muestran los niveles endógenos totales que presenta la planta en cada una de las etapas de desarrollo. Los valores de NO₂-FAs se corresponden con la media \pm SEM de al menos diez experimentos independientes.

24. Identificación y caracterización de las proteínas nitroalquiladas en *Arabidopsis thaliana*

Hasta ahora, se han cuantificado los niveles de NO₂-FAs que se encuentran aductados con proteínas y se ha demostrado cómo la presencia de los NO₂-FAs en el depósito proteico se modula durante del desarrollo. En el este apartado se van a identificar las proteínas que se encuentran nitroalquiladas, es decir, aductadas con NO₂-FAs.

Para ello, durante esta Tesis doctoral se ha desarrollado un método de identificación de las proteínas nitroalquiladas por espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS). La aducción del nitrolípido a una proteína genera una serie de cambios estructurales y funcionales, entre los que destaca un incremento de la masa molecular en 322 Da si se une el NO₂-OA, 324 Da si se une el NO₂-LA o 327 Da si se une el NO₂-Ln. Además, la unión de un NO₂-FA puede aumentar la hidrofobicidad de la molécula a la que se ha unido, ya que el NO₂-FA es una molécula apolar, aunque en el caso de las proteínas esta propiedad apenas se modifica. No ocurre así con los péptidos proteicos que se generan tras la digestión proteolítica. En estos casos se ha observado que la presencia del NO₂-FA en el péptido proteico aumenta su hidrofobicidad con respecto al mismo péptido no nitroalquilado. Basándonos en estas evidencias, se ha diseñado un método de enriquecimiento de péptidos nitroalquilados para mejorar su detección por espectrometría de masas mediante una extracción con dietil-éter, un disolvente con un grado de apolaridad intermedio. Los péptidos proteicos más hidrofóbicos se disolverán en la fase del dietil-éter, mientras que aquellos polares se mantendrán en la disolución acuosa. Para corroborar este comportamiento y poner a punto el método de enriquecimiento se han utilizado como material vegetal los cultivos celulares de 9 días, ya que estos presentan una matriz menos compleja (una menor presencia de pigmentos vegetales u otros interferentes). Además, se aumentó el número de dianas proteicas nitroalquiladas tratando los extractos proteicos de los cultivos celulares con 100 μ M y 10 mM de NO₂-Ln lo que facilitó la detección de proteínas nitroalquiladas por espectrometría de masas y propició el conocimiento del perfil global de proteínas que eran susceptibles de nitroalquilarse por NO₂-Ln.

Tras el análisis de los espectros de MS/MS generados en las muestras de cultivos celulares tratados con NO₂-Ln, se identificaron un total de 677 proteínas con un FDR del 1% (**Tabla 1, Anexo III**). A continuación, se realizó el análisis bioinformático de enriquecimiento de ontología génica para buscar aquellas funciones o características preferenciales de las proteínas nitroalquiladas. El análisis de rutas y procesos biológicos reveló que las proteínas nitroalquiladas estaban presentes en procesos como: respuesta al estrés, biosíntesis, desarrollo del organismo y procesos metabólicos, de transporte y reproductivos, entre otros (**Fig. 45. Panel A**). Entre las funciones moleculares, las actividades catalítica, transferasa, e hidrolasa y la unión a proteínas, a ADN y a ARN fueron las mayoritarias (**Fig. 45. Panel B**). Compartimentos celulares como el citoplasma, el núcleo y el cloroplasto se enriquecieron significativamente en proteínas nitroalquiladas (**Fig. 45. Panel C**).

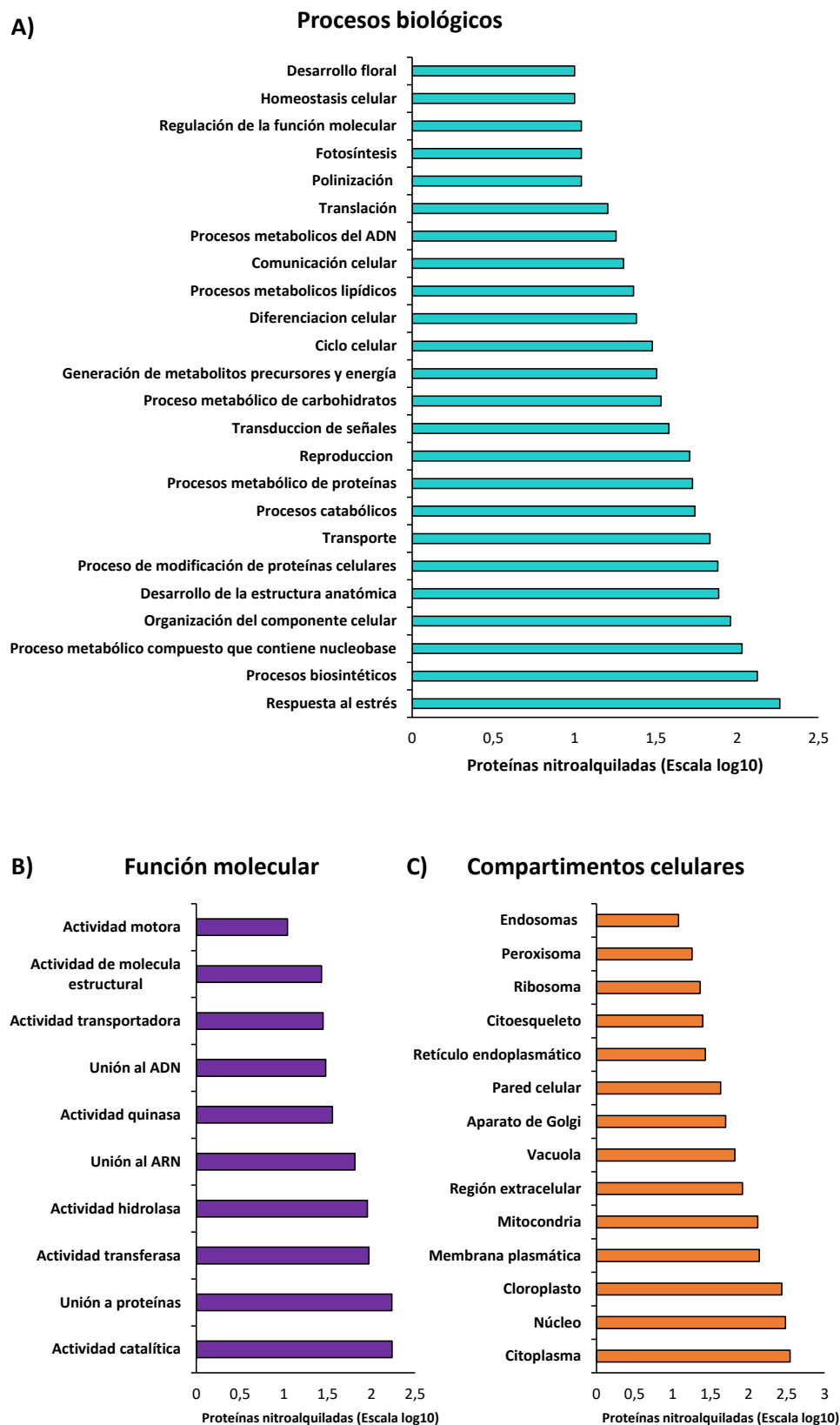


Figura 45. Clasificación funcional de las proteínas nitradas identificadas en los cultivos celulares de *Arabidopsis* de 9 días tratados con $\text{NO}_2\text{-Ln}$ (100 μM y 10 mM). Análisis bioinformático GO de los procesos

biológicos (A), de la función molecular (B) y de los compartimentos celulares (C) de las proteínas nitroalquiladas detectas con un FDR del 1%.

24.1. Detección e identificación de las proteínas nitroalquiladas endógenas en los cultivos celulares de Arabidopsis

La optimización de un método de enriquecimiento para detectar las proteínas nitroalquiladas, permitió la identificación y caracterización del perfil endógeno de proteínas aductadas con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en los cultivos celulares de Arabidopsis de 9 días. Tras el análisis de los resultados de nanoLC-MS/MS se identificaron 157 proteínas aductadas con NO₂-OA, 233 con NO₂-LA y 98 con NO₂-Ln, con un FDR del 1% (**Tablas 2-4, Anexo III**). Los análisis de GO enriquecimiento mostraron un patrón similar para los tres NO₂-FAs, con algunas excepciones que se detallan a continuación. El análisis bioinformático de los procesos biológicos en los que participan las proteínas nitroalquiladas mostró una distribución amplia y homogénea entre los tres NO₂-FAs, resaltando su participación en procesos biosintéticos, de respuesta al estrés y metabólicos, similar a lo descrito anteriormente en el caso de los cultivos celulares tratados con NO₂-Ln (**Fig. 46: Panel A**). Las proteínas nitroalquiladas implicadas en procesos de unión a proteínas y en actividades catalítica, transferasa e hidrolasa resultaron mayoritarias (**Fig. 46: Panel B**). Finalmente, aunque la distribución subcelular de las proteínas nitroalquiladas resultó bastante ubicua, ya que estaban presentes en la mayoría de los orgánulos celulares, el núcleo se reveló como el principal orgánulo celular donde se acumulaban proteínas nitroalquiladas por los 3 NO₂-FAs, seguido del cloroplasto y del citoplasma (**Fig. 46: Panel C**).

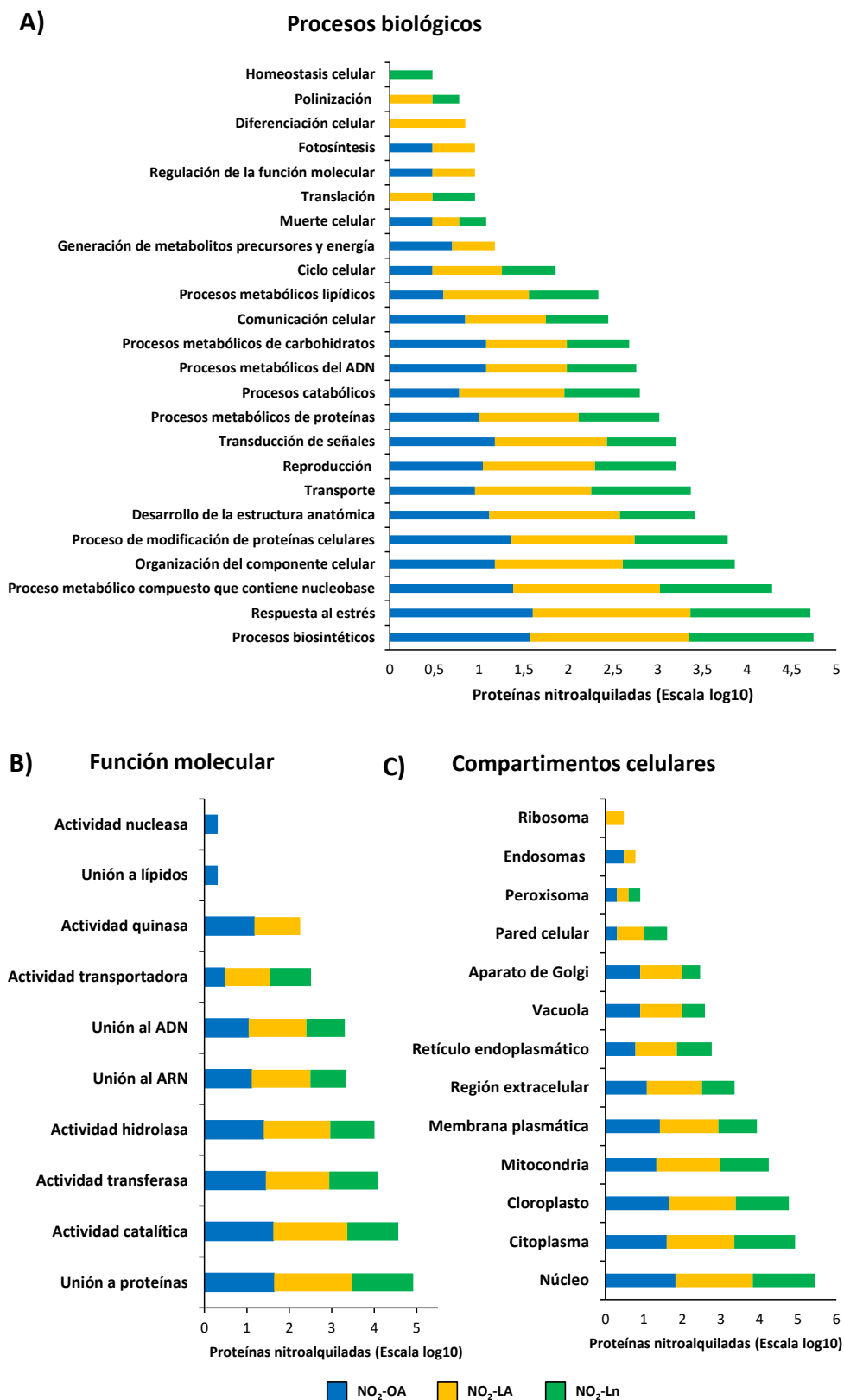


Figura 46. Clasificación funcional de las proteínas endógenas nitroalquiladas por NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln identificadas en cultivos celulares de *Arabidopsis* de 9 días. En la figura se muestra la clasificación de las proteínas nitroalquiladas en diferentes categorías funcionales según los siguientes términos GO: procesos biológicos (A), función molecular (B) y compartimentos celulares (C) con un FDR del 1%.

24.2. Caracterización funcional de las proteínas nitroalquiladas

El análisis por nanoLC-MS/MS para detectar la nitroalquilación endógena de los cultivos celulares de *Arabidopsis* de 9 días y la nitroalquilación generada por el tratamiento de los cultivos celulares con el NO₂-Ln permitió identificar un amplio grupo de proteínas susceptibles a la modificarse mediante esta PTM. Entre las dianas de nitroalquilación identificadas caben destacar enzimas que participan en procesos biosintéticos en la célula, como la triosa fosfato isomerasa, la fosfoglicerato quinasa, isocitrato deshidrogenasa y el enzima málico. Además se identificaron proteínas relacionadas con la respuesta al estrés como la glutatión S-transferasa, la catalasa y la ascorbato peroxidasa. En este apartado, se va a abordar, mediante el uso de proteínas recombinantes, la caracterización de la modulación funcional de estas proteínas nitroalquiladas que participan en los procesos biológicos en los que la nitroalquilación está presente.

• Procesos biosintéticos

Dentro del término GO denominado procesos biosintéticos se incluyen proteínas del metabolismo que requieren energía para transformar sustancias más simples en otras más complejas.

✔ Fosfoglicerato quinasa

La PGK es una enzima cloroplastídica involucrada en el ciclo de Calvin, la cual participa en la biosíntesis de carbohidratos (Rosa-Téllez et al. 2018). El tratamiento de la proteína recombinante con los diferentes NO₂-FAs provocó una disminución significativa en sus niveles de actividad enzimática. En concreto, el NO₂-OA generó una disminución del 60% de la actividad enzimática, el NO₂-LA un 40% y el NO₂-Ln un 30%. Este efecto negativo en la actividad, no se observó tras el tratamiento con las formas no nitradas (ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolenico) (**Fig. 47**).

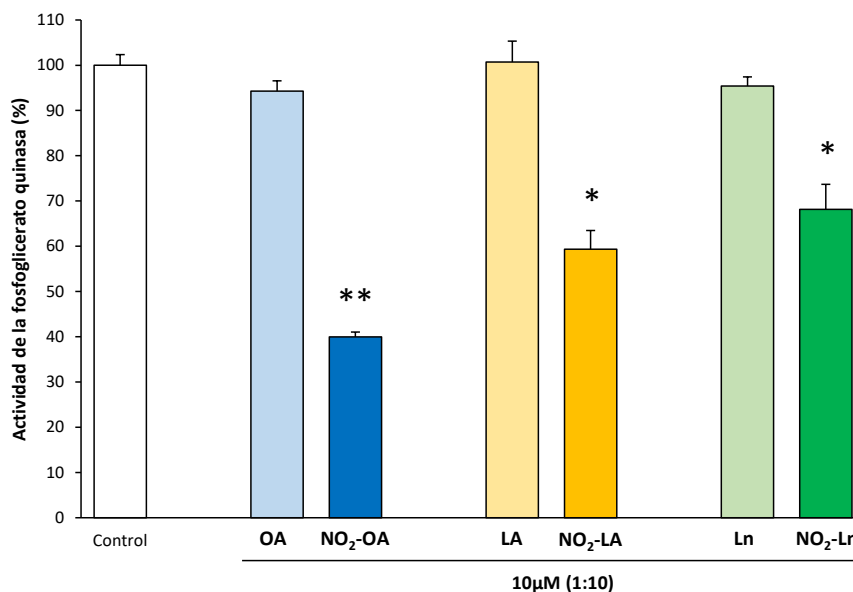


Figura 47. Actividad enzimática de la fosfoglicerato quinasa recombinante tras el tratamiento con los diferentes NO₂-FAs. En la figura se muestra el tratamiento de la proteína recombinante

con los tres NO₂-FAs y sus respectivas formas no nitradas a un ratio de concentración de proteína: NO₂-FA o FA de 1:10. El asterisco (*) y doble asterisco (**) indican diferencias significativas de $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente, con respecto al control. Los valores de actividad enzimática son la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. FA: ácido graso.

Triosa fosfato isomerasa

Esta proteína está involucrada en la gluconeogénesis, por lo que forma parte de la biosíntesis de carbohidratos (Shih 1994). El tratamiento de la proteína recombinante con NO₂-OA y NO₂-LA causó una disminución significativa en la actividad de dicha proteína (aproximadamente un 70%) observable a un ratio de concentración relativamente bajo (1:2). Este comportamiento también se observó tras el tratamiento con NO₂-Ln (90% de reducción), pero a un ratio de concentración más elevado (1:10). En cambio, el tratamiento de la proteína recombinante con las diferentes formas no nitradas de los NO₂-FAs no supuso cambios significativos en los niveles de actividad (Fig. 48).

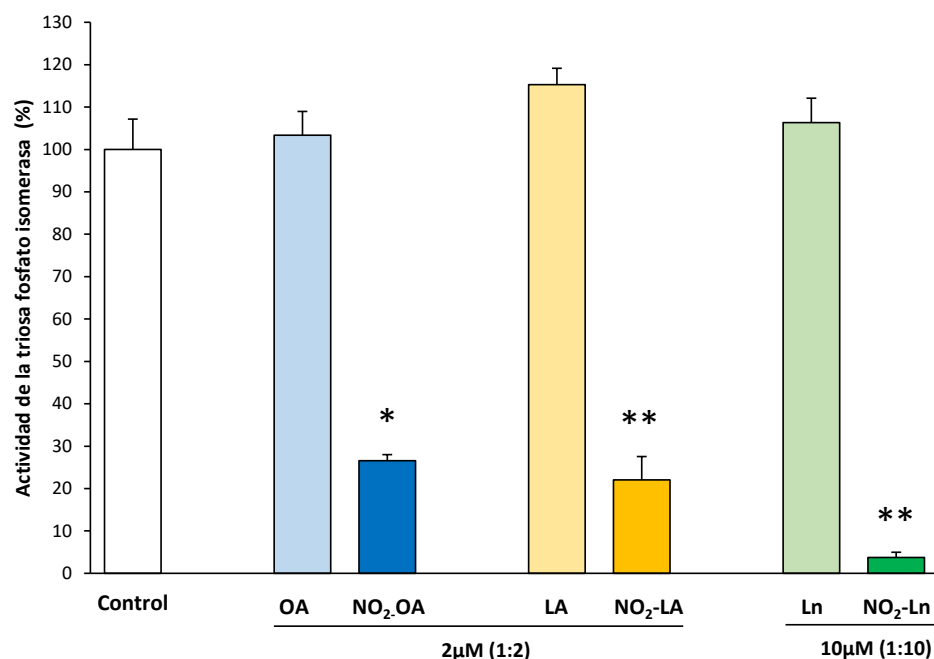


Figura 48. Actividad enzimática de la triosa fosfato isomerasa recombinante tras el tratamiento con los diferentes NO₂-FAs. En la figura se muestra el tratamiento de la proteína recombinante con los tres NO₂-FAs y sus respectivas formas no nitradas a un ratio de concentración proteína: NO₂-FA ó FA, 1:2, con excepción del Ln y el NO₂-Ln que se incubaron a un ratio 1:10. El asterisco (*) y doble asterisco (**) indican diferencias significativas de $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente, con respecto al control. Los valores de actividad enzimática son la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes.

Enzima málico dependiente de NADP

La NADP-ME es una enzima que cataliza la descarboxilación oxidativa del L-malato, para producir piruvato, CO₂ y NADPH. Esta enzima está implicada en los procesos metabólicos del malato y es una fuente de NADPH y piruvato en la planta

(Drincovich et al. 2001). El tratamiento de la NADP-ME con los diferentes NO₂-FAs a un ratio de concentración 1:15 (proteína: NO₂-FA) generó un comportamiento similar al determinado en enzimas anteriores originando una disminución significativa en los niveles de actividad enzimática con respecto al control. En concreto, el NO₂-OA originó una disminución del 25%, el NO₂-LA del 40% y el NO₂-Ln del 70%. Sin embargo, cabe destacar genera una reducción más acentuada como consecuencia del tratamiento con NO₂-Ln (**Fig. 49**).

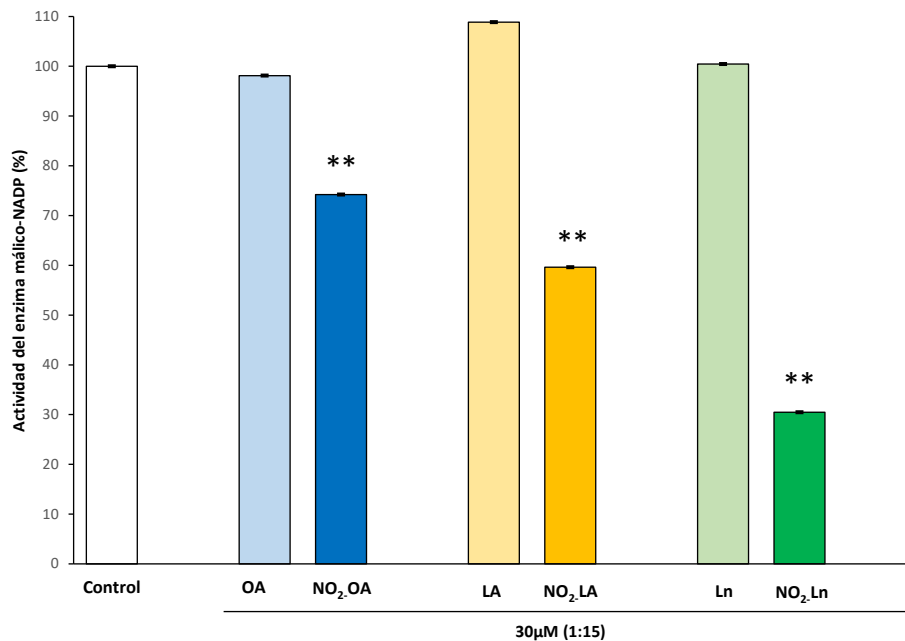


Figura 49. Actividad del enzima málico dependiente de NADP recombinante tras el tratamiento con los diferentes NO₂-FAs. En la figura se muestra la incubación de la proteína recombinante con los tres NO₂-FAs y sus respectivas formas no nitradas a un ratio de concentración proteína: NO₂-FA o FA, 1:15. El asterisco (**) indica diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al control. Los valores de actividad enzimática son la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes.

🌱 Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)

La isocitrato deshidrogenasa es una enzima que participa en el ciclo de Krebs catalizando la descarboxilación oxidativa del isocitrato para formar 2-oxoglutarato y NADPH. En términos generales, la ICDH está involucrada en el metabolismo de los carbohidratos y es una enzima generadora de poder reductor (NADPH) (Chen 1998). En este caso, el tratamiento con el NO₂-Ln a un ratio de concentración 1:5 disminuyó bruscamente la actividad enzimática de la proteína (90% de disminución), siendo una de las enzimas más sensible de entre las estudiadas al tratamiento con este ácido graso nitrado, ya que se consiguió una inactivación casi completa de la proteína con un ratio de NO₂-Ln relativamente bajo (**Fig 50: Panel A**). El análisis de MS/MS reveló que la nitroalquilación de la ICDH afectaba a un amplio número de residuos como cisteínas, histidinas y lisinas (**Fig 50: Panel B**). Aunque ninguna de estas dianas de nitroalquilación tenía actividad catalítica (**Fig 50: Panel C**), la modelización “*in silico*” de la ICDH mostró que las cisteína 131 y la histidina 135 se situaban muy próximas a

los residuos de arginina 111 y 134, las cuales sí intervienen en la catálisis de la enzima ya que son sitios de unión del sustrato (**Fig 50: Panel D**).

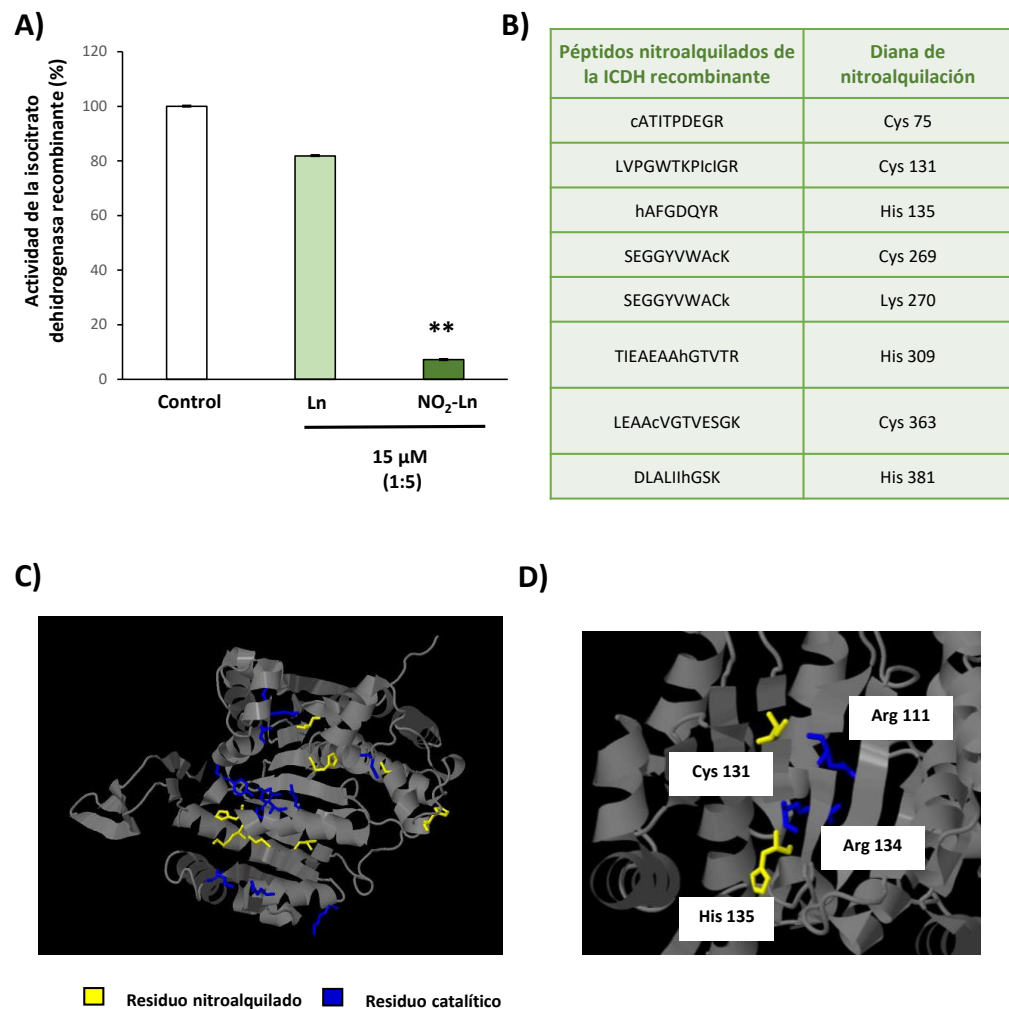


Figura 50. Análisis de la modulación por nitroalquilación de la isocitrato deshidrogenasa citosólica recombinante de *Arabidopsis*. A) Actividad enzimática de la ICDH tras el tratamiento con Ln y NO₂-Ln a un ratio de concentración 1:5. El doble asterisco (**) indica diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al control. Los valores de actividad enzimática son la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. B) Detección de los péptidos modificados por la nitroalquilación e identificación de aquellos residuos de aminoácidos diana de esta modificación post-traduccional. C) Localización de los residuos nitroalquilados y catalíticos en la modelización “in silico” de la ICDH recombinante. D) Identificación de los residuos nitroalquilados con una posible implicación en la catálisis de la enzima. Arg: arginina; Lys: lisina.

- **Respuesta al estrés**

El término GO de respuesta al estrés está relacionado con cualquier proceso que suponga un cambio en el estado o actividad de una célula como resultado de un estímulo que exponga al organismo a una situación de estrés.

Glutación S-transferasa

La glutación S-transferasa es una enzima citoplasmática involucrada en la eliminación de sustancias tóxicas debido a su conjugación con el glutati3n. Tambi3n participa en la atenuaci3n del estr3s oxidativo y en el transporte hormonal (Gullner et al. 2018). La incubaci3n de la GST con NO₂-OA y NO₂-LA a un ratio de concentraci3n 1:5 (prote3na: NO₂-FA) gener3 una disminuci3n significativa de alrededor del 70% en su actividad enzimatica. Sin embargo, el tratamiento con NO₂-Ln a ese mismo ratio, no gener3 cambios significativos con respecto al control (**Fig. 51**).

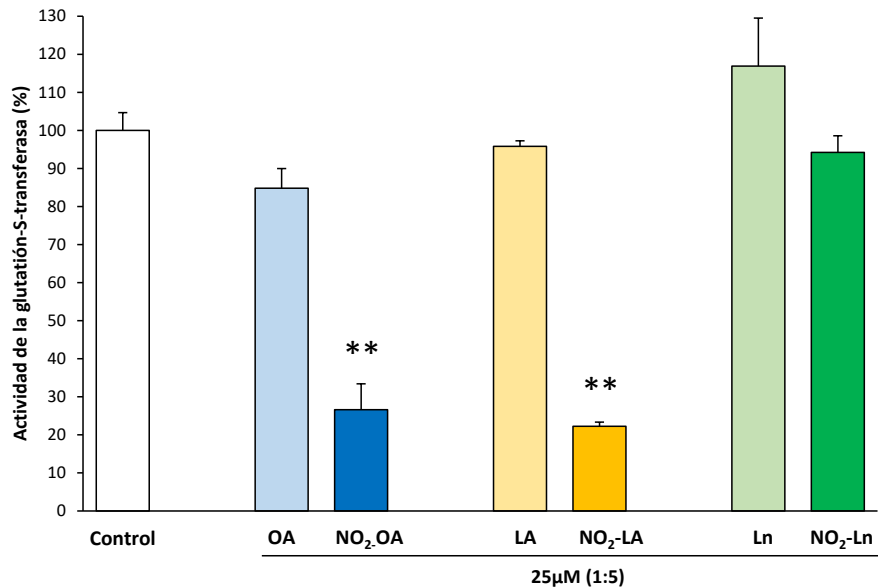


Figura 51. Actividad enzimática de la glutati3n S-transferasa recombinante tras el tratamiento con los diferentes NO₂-FAs. En la figura se muestra la incubaci3n de la prote3na recombinante con los tres NO₂-FAs y sus respectivas formas no nitradas empleando un ratio de concentraci3n prote3na: NO₂-FA o FA de 1:5. El asterisco (**) indica diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al control. Los valores de actividad enzimática son la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes.

Catalasa

La catalasa es una enzima detoxificante de H₂O₂ por lo que juega un papel muy importante en la respuesta antioxidante de la planta (Mhamdi et al. 2010). El tratamiento de los cultivos celulares con NO₂-Ln permiti3 detectar la presencia de la catalasa 3 (CAT3) nitroalquilada. Concretamente se identific3 la nitroalquilaci3n en los residuos de histidina 46 y 156, cuya su implicaci3n en la actividad catalítica de la enzima se desconoce. Con el fin de evaluar y profundizar en el conocimiento del efecto de la nitroalquilaci3n sobre esta prote3na se ha utilizado la prote3na recombinante catalasa 2 (CAT2). La secuencia de la CAT2 presenta un 78% de similitud con la secuencia de la CAT3 y entre los residuos compartidos se encuentran las dos dianas de nitroalquilaci3n anteriormente mencionadas. Otra diferencia entre las dos isoformas estriba en su localizaci3n subcelular. La CAT2 est3 presente en peroxisomas, citoplasma y gliosisomas, mientras que la CAT3 solo se encuentra en peroxisomas. A

pesar de estas diferencias, se seleccionó la CAT2 por su mayor distribución y teniendo en cuenta el alto grado de similitud existente entre ambas.

La proteína recombinante CAT2 se trató con 34 μM de $\text{NO}_2\text{-Ln}$, lo que se corresponde con un ratio de concentración de proteína: $\text{NO}_2\text{-Ln}$ de 1:100. Tal y como se puede observar en la **Figura 52: Panel A**, el tratamiento afectó significativamente a la actividad enzimática de la catalasa provocando una disminución de aproximadamente el 30% con respecto a la situación control. A continuación, se detectaron por nanoLC-MS/MS los péptidos de la CAT2 que se habían nitroalquilado y se identificaron los residuos de aminoácidos modificados que, a su vez, podrían ser los responsables de la bajada de actividad indicada anteriormente. En total, se identificaron 9 residuos nitroalquilados correspondientes a histidinas situadas a lo largo de la secuencia de la CAT2, aunque también se detectó una lisina en la posición 150 (**Fig. 52: Panel B**). Para seleccionar las principales dianas de nitroalquilación, se realizó un análisis dirigido de búsqueda de péptidos que contuvieran las dianas de nitroalquilación en su forma nitroalquilada y no modificada. Todo ello, nos permitió realizar una cuantificación relativa de la abundancia de la diana nitroalquilada con respecto a su forma no modificada. De esta manera, la histidina 108 resultó ser la principal diana de nitroalquilación de la CAT2, seguida de la His 156 (**Fig 52: Panel C**). Finalmente, se analizó la localización de los residuos nitroalquilados mediante una modelización “in silico” de la proteína recombinante con la idea de determinar si se encontraban próximos a los residuos implicados en la actividad enzimática, ya que las dianas nitroalquiladas identificadas no participaban directamente en el proceso catalítico. Sin embargo, los residuos nitroalquilados no se encontraron próximos a los residuos catalíticos sino que se situaban en la periferia de la proteína (**Fig. 52: Panel D**).

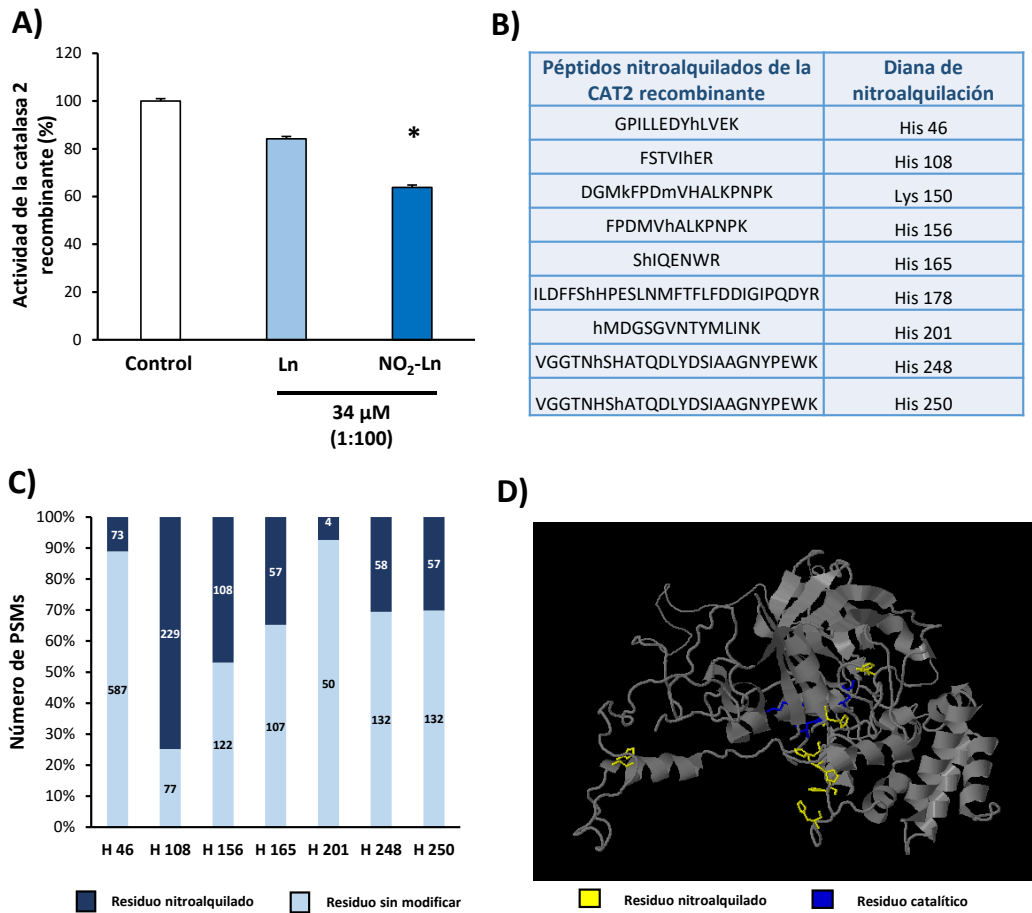


Figura 52. Efecto de la nitroalquilación sobre la catalasa 2 recombinante de *Arabidopsis*. A) Actividad enzimática de la CAT2 tratada con Ln y el NO₂-Ln a un ratio de concentración proteína: Ln ó NO₂-Ln 1:100. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control. Los valores de actividad enzimática son la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. B) Detección por nanoLC-MS/MS de los péptidos nitroalquilados de la CAT2 tratada con NO₂-Ln e identificación de los residuos diana de la aducción con NO₂-Ln. C) Cuantificación relativa de los residuos nitroalquilados identificados tras el tratamiento de la proteína recombinante con NO₂-Ln. En cada una de las barras del gráfico, se muestra el número de PSM identificado para cada residuo en su forma nitroalquilada y no modificada. D) Localización de los residuos nitroalquilados y catalíticos en la modelización “in silico” de la CAT2 recombinante.

Ascorbato peroxidasa

La ascorbato peroxidasa es una enzima que participa en el ciclo del ascorbato-glutatión. Esta proteína antioxidante se detectó nitroalquilada en los cultivos celulares tratados con NO₂-Ln lo que la convirtió en una importante candidata para estudiar su modulación por nitroalquilación. Para tal fin se utilizó la proteína recombinante ascorbato peroxidasa 2 (APX2). Desde un punto de vista enzimático, la unión del NO₂-Ln a la APX2 afectó negativamente a su actividad, ya que disminuyó significativamente (50%) (**Fig. 53: Panel A**). Esta regulación negativa puede asociarse a la nitroalquilación de diferentes residuos de histidina y de una cisteína (**Fig. 53: Panel B**). Sin embargo, la cuantificación relativa de estos residuos mostró que las histidinas 43 y 163 eran las

dianas más susceptibles a nitroalquilarse (**Fig. 53: Panel C**) y podrían ser las responsables directas de la reducción de la actividad enzimática de la APX2, ya que la histidina 43 está situada en el sitio activo de la proteína y la His 163 también participa en la catálisis actuando como sitio de unión al metal (**Fig. 53: Panel D**).

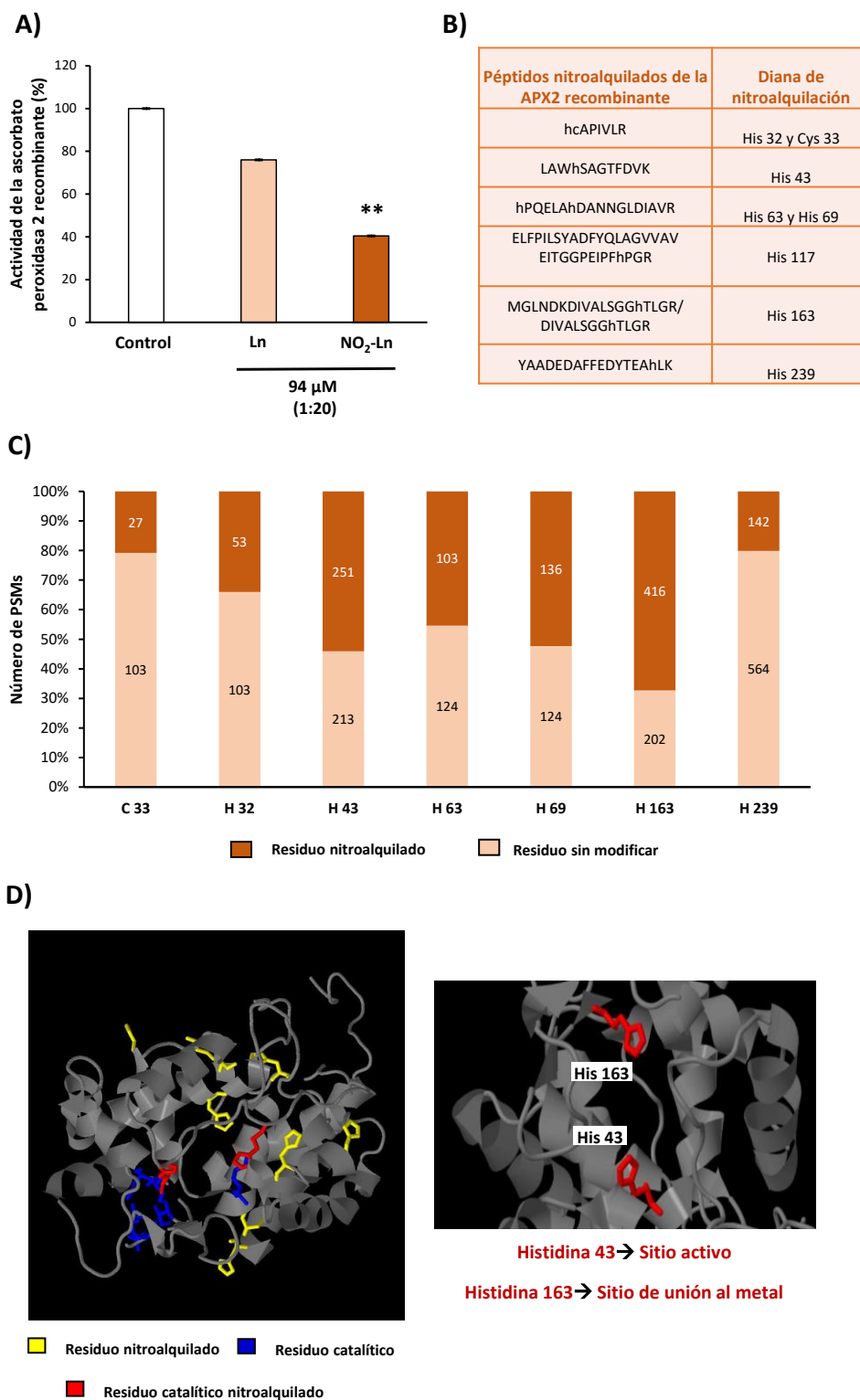


Figura 53. Modulación por nitroalquilación de la ascorbato peroxidasa recombinante de *Arabidopsis*. A) Efecto del tratamiento con Ln y NO₂-Ln (ratio 1:20) sobre la actividad enzimática

de la APX2. El doble asterisco (**) indica diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al control. Los valores de actividad enzimática son la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes B) Identificación de los péptidos y residuos nitroalquilados con el NO₂-Ln tras el análisis de los espectros de MS/MS. En cada una de las barras del gráfico, se muestra el número de PSM identificado para cada residuo en su forma nitroalquilada y no modificada. PSM: número de coincidencias del espectro de péptidos. C) Cuantificación relativa de los residuos nitroalquilados identificados tras el tratamiento de la proteína recombinante con NO₂-Ln. D) Localización de los residuos nitroalquilados y catalíticos en la modelización “in silico” de la APX2 recombinante.

25. Caracterización del perfil de proteínas nitroalquiladas durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

En apartado anterior (véase apartado 23) se han descrito en detalle los niveles de NO₂-FAs presentes en los depósitos proteicos y lipídicos y, además se han identificado dichos almacenes lipídicos. En el siguiente apartado, se muestran y caracterizan las proteínas que se encuentran unidas a los diferentes NO₂-FAs y cómo estos reservorios proteicos cambian a lo largo del desarrollo, utilizando para ello, el método de enriquecimiento de péptidos nitroalquilados que se indicó en el apartado anterior.

✔ Semillas

El punto de partida del desarrollo de cualquier planta es la semilla. En este tejido, el número de proteínas nitroalquiladas por los tres NO₂-FAs detectado por nanoLC-MS/MS fue minoritario (**Tabla 5, Anexo III**), esto se aplica especialmente a las proteínas aductadas con NO₂-Ln (**Fig. 54**). A pesar de la escasez de proteínas nitroalquiladas en semillas, las que se identificaron participaban en procesos biosintéticos y en procesos relacionados con el desarrollo del organismo (**Fig. 55: Panel A**). La función molecular de estas proteínas nitroalquiladas estaba relacionada con la unión al ADN y a proteínas (**Fig. 55: Panel B**) y su localización celular preferencial fue el núcleo (**Fig. 55: Panel C**).

✔ Plántulas de 5 días

En la etapa de crecimiento correspondiente a los 5 días, las plántulas habían desarrollado por completo sus cotiledones y se produjo un marcado incremento en el número de proteínas nitroalquiladas con los 3 NO₂-FAs con respecto a las semillas (**Fig. 54**) (**Tabla 6, Anexo III**). En general, este amplio grupo de proteínas nitroalquiladas participaba en procesos biológicos variados, destacando la respuesta al estrés y los procesos biosintéticos. Además, las proteínas aductadas con NO₂-OA y el NO₂-Ln también jugaban un papel importante en procesos relacionados con el desarrollo del organismo (**Fig. 56: Panel A**). Las principales funciones moleculares de estas proteínas modificadas son las actividades catalítica, transferasa e hidrolasa y la unión a proteínas, entre otras (**Fig. 56: Panel B**). Con respecto a la localización celular, estas proteínas nitroalquiladas se localizaron mayoritariamente en núcleo, citoplasma, cloroplasto y aparato de Golgi (**Fig. 56: Panel C**).

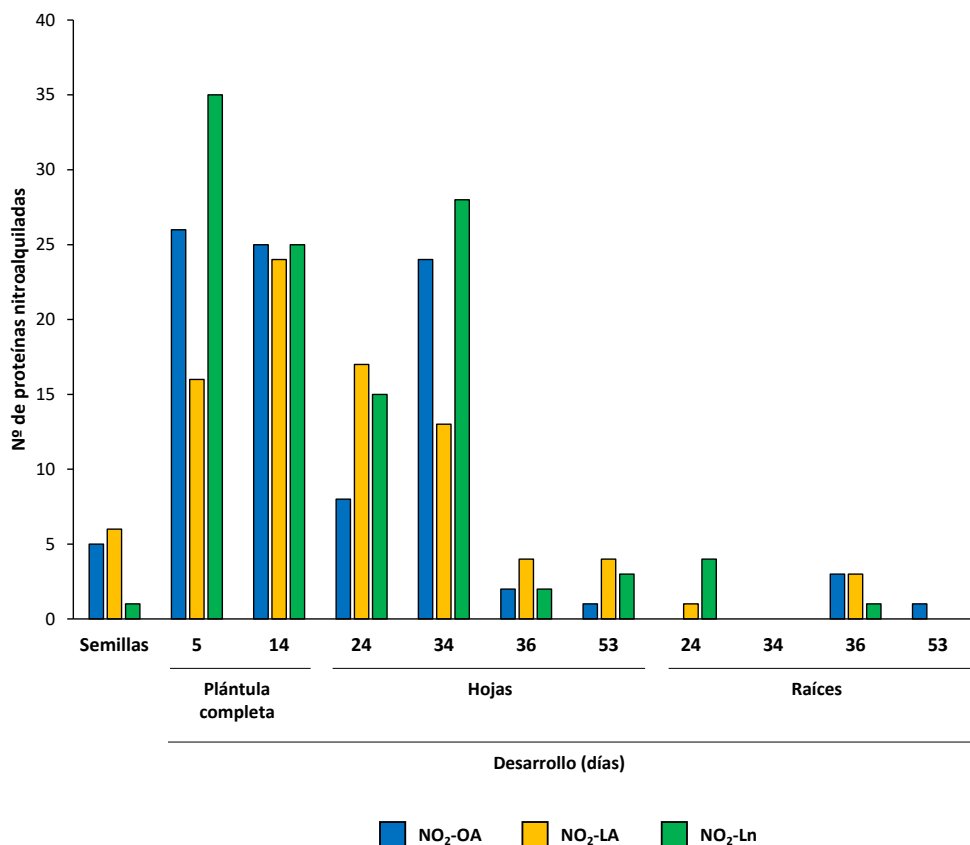


Figura 54. Cuantificación del número de proteínas nitroalquiladas por los diferentes NO₂-FAs durante el desarrollo de *Arabidopsis* mediante espectrometría de masas.

🌱 Plántulas de 14 días

El número de proteínas nitroalquiladas por los 3 NO₂-FAs en plántulas de 14 días fue similar al detectado en la etapa de crecimiento anterior (**Fig. 54**) (**Tabla 7, Anexo III**). En esta fase, las plántulas desarrollaron sus primeras hojas en forma de roseta. Los procesos biológicos en los cuales hubo una mayor identificación de proteínas nitroalquiladas fueron la respuesta al estrés y las rutas de biosíntesis y de desarrollo del organismo. El perfil de procesos biológicos en los que participa este conjunto de proteínas nitroalquiladas fue similar a lo descrito en las plántulas de 5 días. No obstante, en las plántulas de 14 días, las proteínas implicadas en los procesos de desarrollo del organismo no solo estaban modificadas por NO₂-OA y NO₂-Ln, sino también por NO₂-LA (**Fig. 57: Panel A**). Las funciones moleculares más representativas de estas proteínas nitroalquiladas fueron la actividad catalítica y la unión a proteínas. En este caso, es importante destacar que una gran parte de las proteínas nitroalquiladas con NO₂-Ln presentó actividad hidrolasa (**Fig. 57: Panel B**). Con respecto a la localización de estas proteínas modificadas, vuelven a destacar el núcleo, citoplasma y cloroplasto aunque también aparecen en la región extracelular (**Fig. 57: Panel C**).

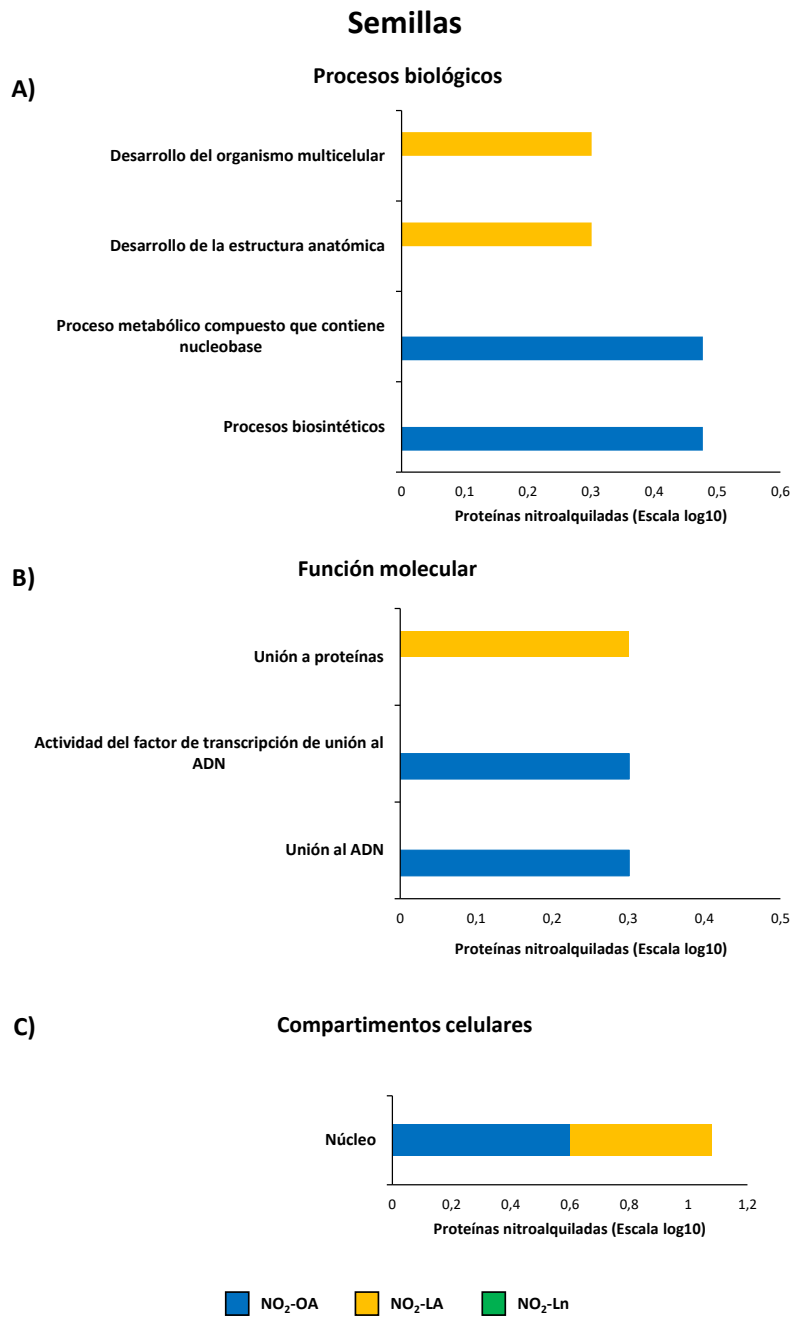


Figura 55. Clasificación funcional de las proteínas nitradas con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en semillas. En la figura se muestra, la clasificación de las proteínas nitradas en diferentes categorías funcionales bajo los siguientes términos GO: procesos biológicos (A), funciones moleculares (B) y compartimentos celulares (C).

Apertura de los cotiledones (5 días)

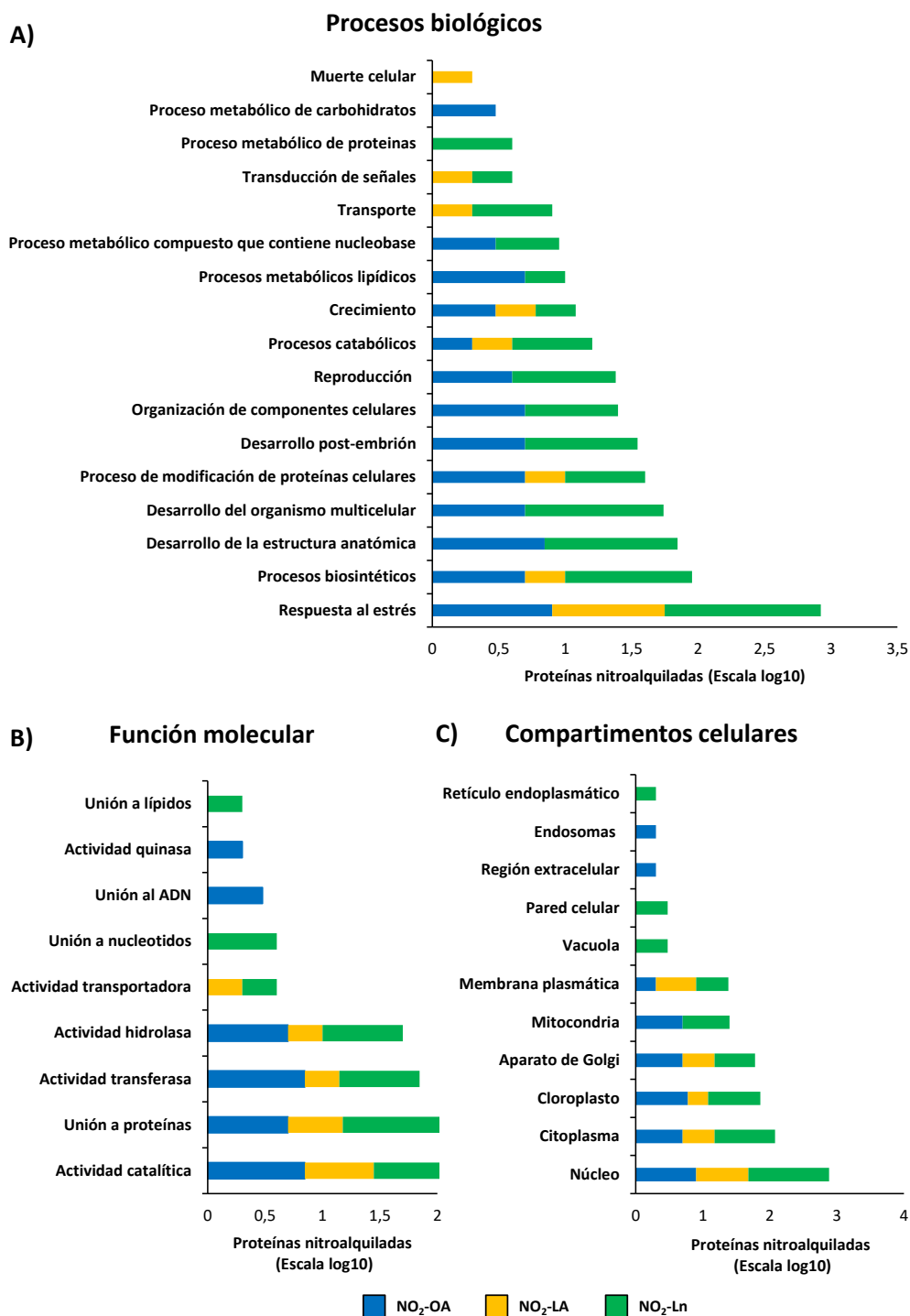


Figura 56. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en plántulas que presentan los cotiledones totalmente abiertos, las cuales se corresponden con plántulas de 5 días. En la figura se muestra, la clasificación de las proteínas nitroalquiladas en diferentes categorías funcionales bajo los siguientes términos GO: procesos biológicos (A), funciones moleculares (B) y compartimentos celulares (C).

Inicio de la roseta (14 días)

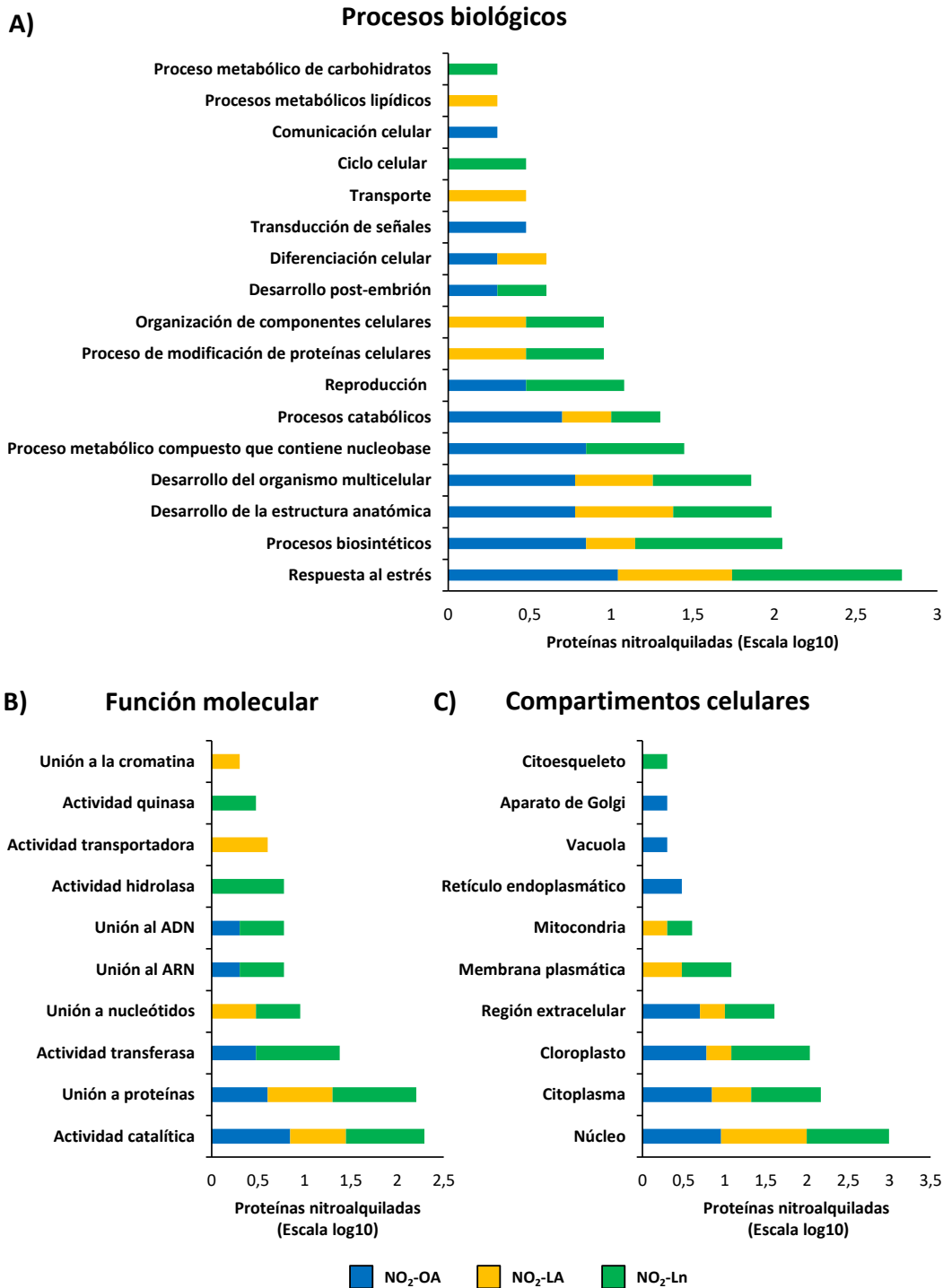


Figura 57. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en plántulas que han desarrollado sus primeras hojas en la disposición de roseta, las cuales se corresponden con plántulas de 14 días. En la figura se muestra, la clasificación de las proteínas nitroalquiladas en diferentes categorías funcionales bajo los siguientes términos GO: procesos biológicos (A), funciones moleculares (B) y compartimentos celulares (C).

• Hidropónicos de 24 días (Hojas)

La detección por nanoLC-MS/MS de proteínas nitroalquiladas en hojas de plantas de 24 días cultivadas en condiciones hidropónicas, mostró un leve descenso con respecto a las plántulas de 14 días, siendo minoritaria la nitroalquilación mediada por NO₂-OA (**Fig. 54**) (**Tabla 8, Anexo III**). A pesar de este descenso en el número de proteínas, los procesos biológicos como la respuesta al estrés y los procesos de desarrollo y biosintéticos seguían siendo las principales funciones de las proteínas nitroalquiladas. Sin embargo, es importante destacar la ausencia de proteínas aductadas con NO₂-OA implicadas en procesos biosintéticos, a pesar de que en la etapa anterior tenían una gran contribución (**Fig. 58: Panel A**). La actividad catalítica continuó siendo la principal función molecular de las proteínas nitroalquiladas identificadas seguida de la unión a ácidos nucleicos (**Fig. 58: Panel B**). En la localización celular de las proteínas nitroalquiladas identificadas en esta etapa siguió destacando el núcleo, el citoplasma y el cloroplasto, aunque en estos dos últimos compartimentos celulares no se detectaron proteínas aductadas con NO₂-OA (**Fig. 58: Panel C**).

• Hidropónicos de 34 días (Hojas)

Cuando los hidropónicos de *Arabidopsis* alcanzan los 34 días de edad, la planta desarrolla la flores entrando así en la etapa de reproducción. Los análisis de MS/MS de las hojas de estas plantas mostraron un incremento en el número de proteínas nitroalquiladas por NO₂-OA y NO₂-Ln con respecto a los datos obtenidos en las hojas de plantas de 24 días. Sin embargo, el número de proteínas modificadas por el NO₂-LA fue similar en ambas etapas (**Fig. 54**) (**Tabla 9, Anexo III**). En esta fase se produjo un cambio importante con respecto a los principales procesos biológicos en los que participaban las proteínas nitroalquiladas, destacando los procesos de desarrollo del organismo y reproducción para los 3 NO₂-FAs. Además, es importante señalar, que los procesos biosintéticos y de respuesta al estrés, que en todas las etapas previas habían sido prioritarios, ahora dejan de serlo (**Fig. 59: Panel A**). La actividad catalítica continuó siendo la función molecular principal de las proteínas nitroalquiladas aunque también tuvo una gran relevancia la actividad transferasa y la unión a proteínas (**Fig. 59: Panel B**). La localización celular principal de las proteínas nitroalquiladas en esta etapa de crecimiento volvió a ser el núcleo (**Fig. 59: Panel C**).

• Hidropónicos de 36 días (Hojas)

Tras la floración, las plantas desarrollan el fruto que contiene las semillas. En las hojas de estas plantas se detectó una abrupta disminución en el número de proteínas nitroalquiladas por los tres NO₂-FAs con respecto a la etapa de crecimiento anterior siendo la abundancia detectada comparable a la observada en semillas (**Fig. 54**) (**Tabla 10, Anexo III**). Este pequeño grupo de proteínas nitroalquiladas identificadas en las hojas de hidropónicos de 36 días participaba en procesos biológicos característicos para cada NO₂-FA. En concreto, las proteínas aductadas con NO₂-LA participaban fundamentalmente en procesos biosintéticos, las nitroalquiladas por NO₂-OA, en transducción de señales y, finalmente, las proteínas modificadas por NO₂-Ln llevaban a cabo procesos metabólicos de carbohidratos y transporte (**Fig. 60: Panel A**). En este caso, las principales funciones moleculares fueron la actividad catalítica y la de unión a proteínas (**Fig. 60: Panel B**) y las

localizaciones preferenciales fueron el núcleo, el citoplasma, la región extracelular y el cloroplasto (Fig. 60: Panel C).

Roseta (Hojas de 24 días)

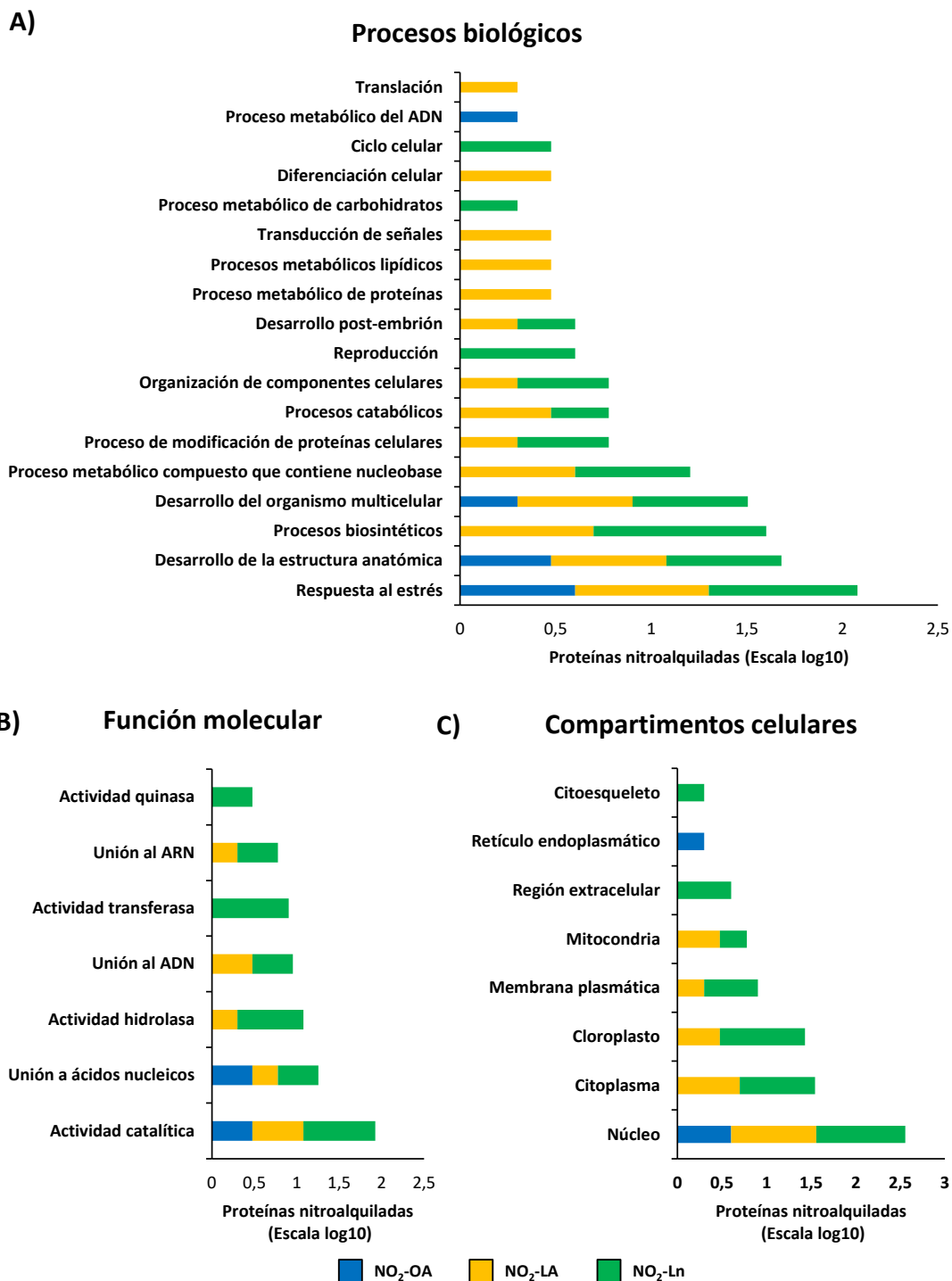


Figura 58. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en las hojas de los hidropónicos que presentan una roseta totalmente desarrollada, y estos acontecimientos tienen lugar cuando los hidropónicos tienen 24 días. En la figura se muestra, la clasificación de las proteínas nitroalquiladas en diferentes categorías funcionales bajo los siguientes términos GO: procesos biológicos (A), funciones moleculares (B) y compartimentos celulares (C).

Floración (Hojas de 34 días)

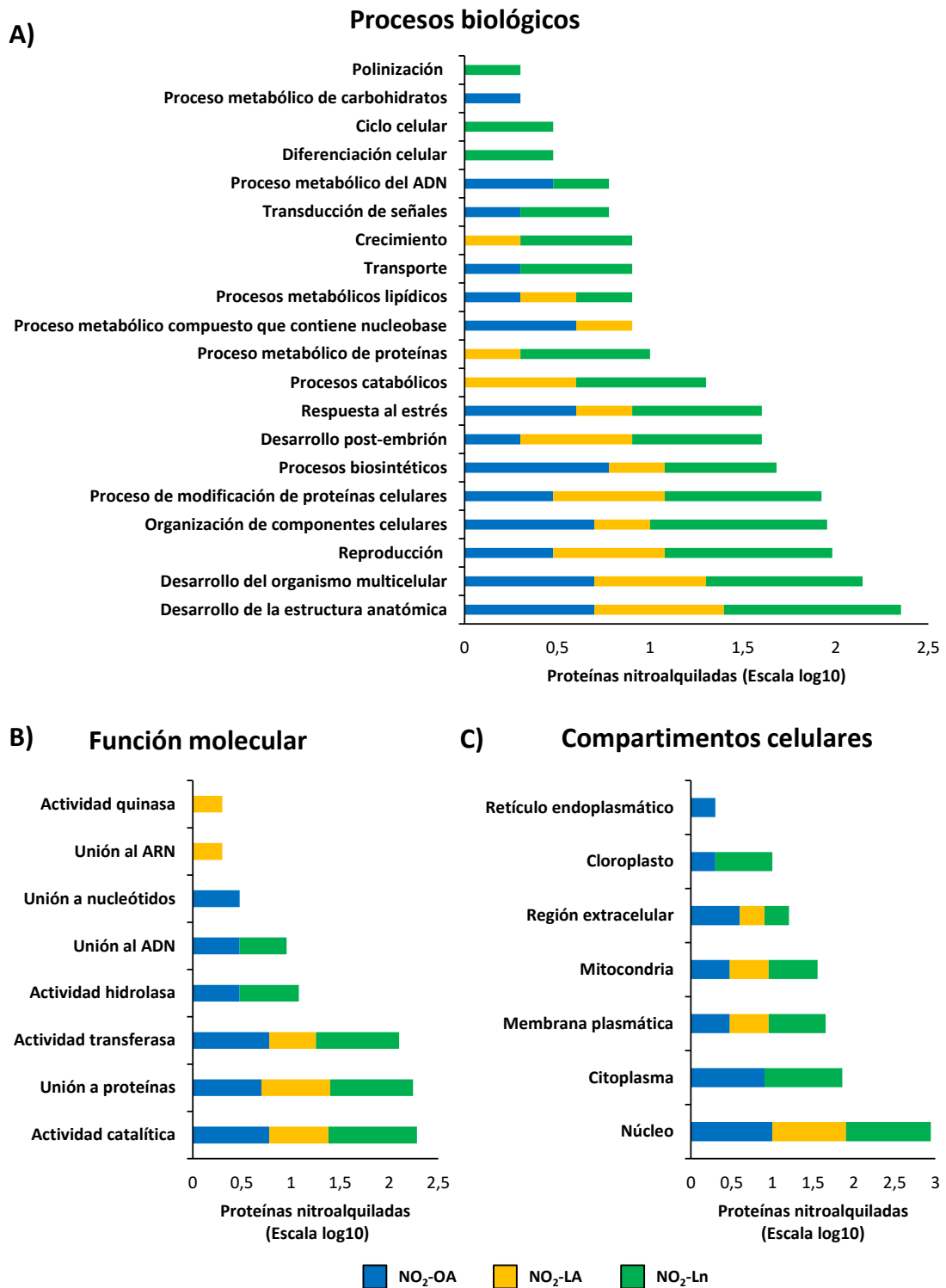


Figura 59. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en las hojas de los hidropónicos que se encuentran en floración, en concreto, cuando la planta tiene 34 días. En la figura se muestra, la clasificación de las proteínas nitroalquiladas en diferentes categorías funcionales bajo los siguientes términos GO: procesos biológicos (A), funciones moleculares (B) y compartimentos celulares (C).

Producción de semillas (Hojas de 36 días)

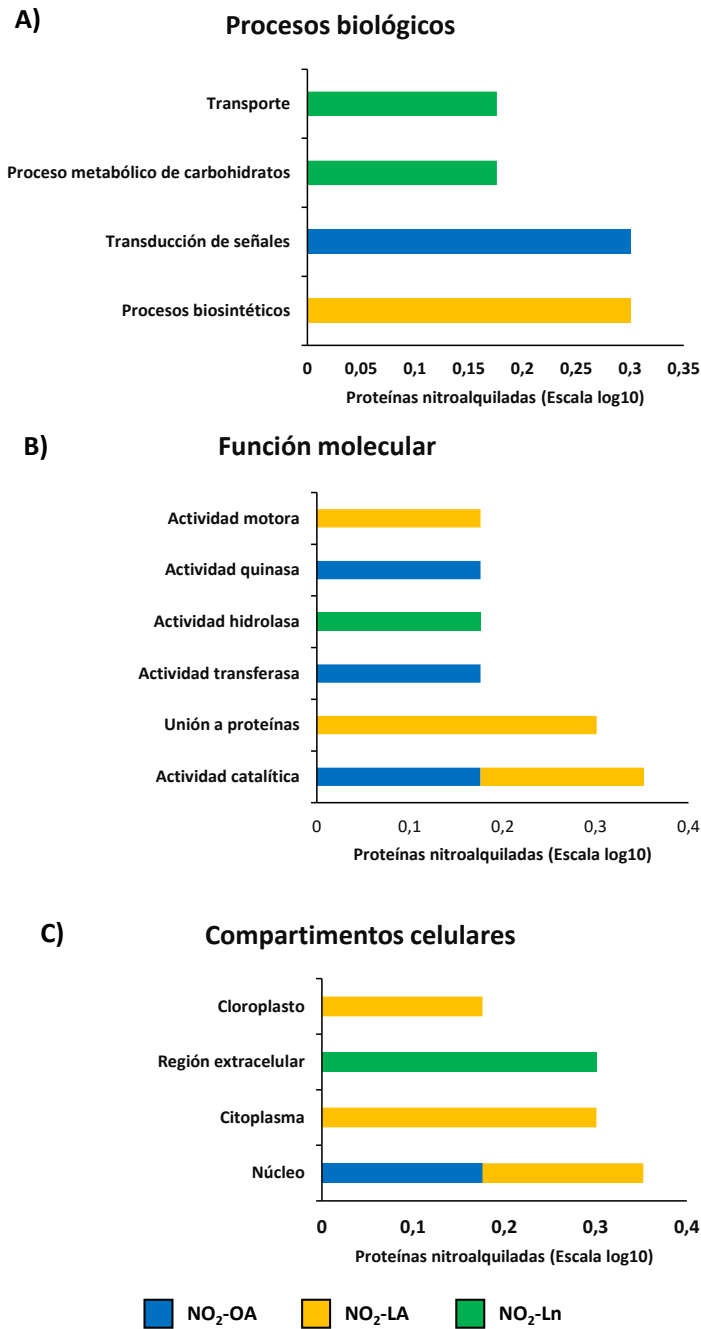


Figura 60. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en las hojas de los hidropónicos que se encuentran produciendo semillas, etapa que se corresponde con hidropónicos de 36 días. En la figura se muestra, la clasificación de las proteínas nitroalquiladas en diferentes categorías funcionales bajo los siguientes términos GO: procesos biológicos (A), funciones moleculares (B) y compartimentos celulares (C).

🌱 Hidropónicos de 53 días (Hojas)

En la etapa senescente (hidropónicos de 53 días) se encontró un número muy reducido de proteínas nitroalquiladas, similar al identificado en la etapa anterior y en semillas (**Fig. 54**) (**Tabla 11, Anexo III**). Estas proteínas nitroalquiladas participaban fundamentalmente en procesos de desarrollo y de respuesta al estrés (**Fig. 61: Panel A**), su función molecular principal fue la unión a proteínas (**Fig 40: Panel B**) y se localizaban mayoritariamente en las mitocondrias (**Fig. 40: Panel C**).

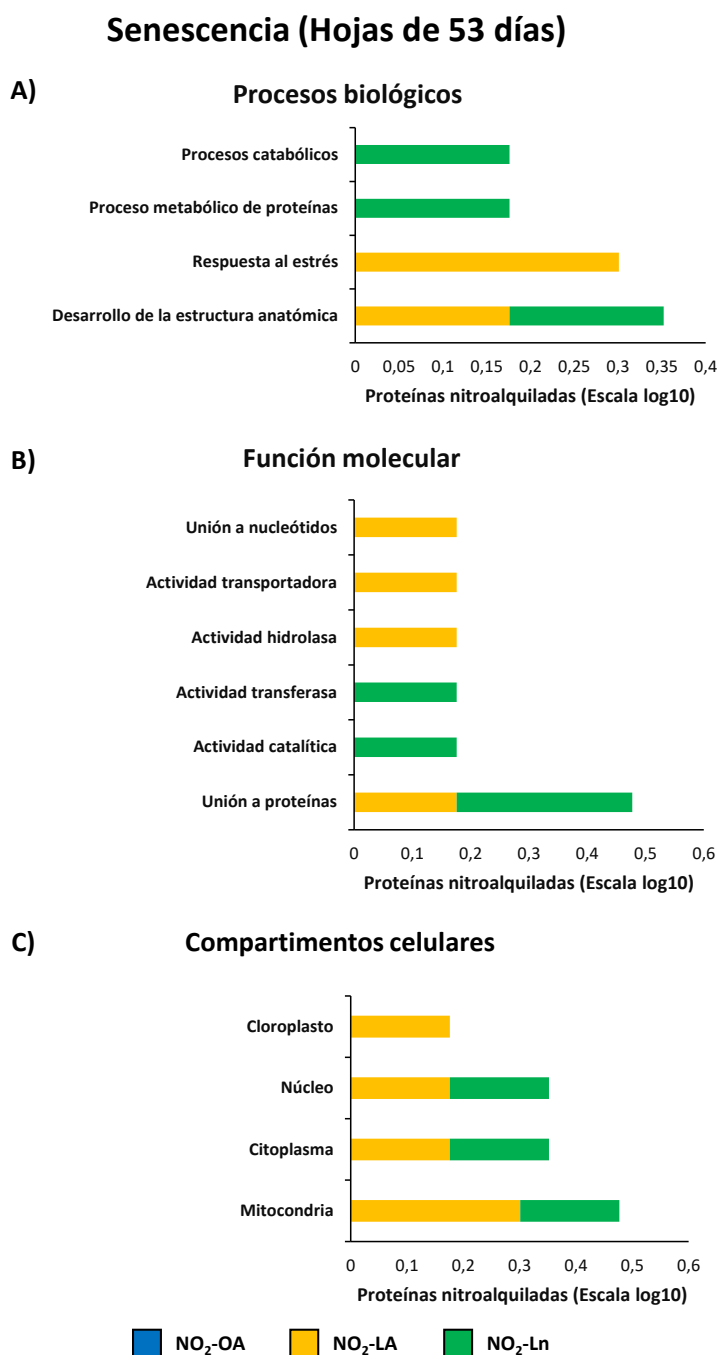


Figura 61. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas con NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln en las hojas de los hidropónicos senescentes, que se corresponde con plantas de 53 días. En la figura se muestra, la clasificación

de las proteínas nitroalquiladas en diferentes categorías funcionales bajo los siguientes términos GO: procesos biológicos (A), funciones moleculares (B) y compartimentos celulares (C).

Raíces

En general, el número de proteínas nitroalquiladas identificadas en las raíces de hidropónicos de difentes edades de crecimiento (24, 34, 36 y 53 días) fue relativamente escaso. En la **tabla 15** se encuentra la información del análisis de enriquecimiento determinado de estas muestras, identificándose así los procesos biológicos, la función molecular y los compartimentos celulares en los que participaban las proteínas nitroalquiladas. Es importante resaltar que en las raíces de los hidropónicos de 34 días no se detectó ninguna proteína nitroalquilada.

Tabla 15. Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) de las proteínas nitroalquiladas identificadas en raíces de hidropónicos de 24, 34, 36 y 53 días.

	Proteína nitroalquilada	Proceso biológico	Función molecular	Compartimento celular
Roseta (Raíces de 24 días)				
NO ₂ -OA	ND			
NO ₂ -LA	Protein MIZU-KUSSEI 1	Organización de los componentes celulares, tropismo	<i>No definido</i>	Retículo endoplasmático
NO ₂ -Ln	Pentatricopeptide repeat-containing protein, chloroplastic	Modificación del ARN	Unión al ARN	Cloroplasto
	Pentatricopeptide repeat-containing protein, mitochondrial			Mitocondria
	Polyamine transporter RMV1	Transporte	Actividad transportadora	Membrana plasmática
	Serine/threonine-protein kinase-like protein CCR2	<i>No definido</i>	Actividad quinasa	Otras membranas
Floración (Raíces de 34 días)				
NO ₂ -OA	ND			
NO ₂ -LA	ND			
NO ₂ -Ln	ND			

Producción de semillas (Raíces de 36 días)				
NO ₂ -OA	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein	<i>No definido</i>	Unión al ión de zinc	Otras membranas
	Aspartyl protease UND	Polinización	Actividad endopentidasa	Región extracelular
	Non-specific serine/threonine protein kinase	<i>No definido</i>	Actividad quinasa	<i>No definido</i>
NO ₂ -LA	Putative cysteine-rich receptor-like protein kinase 31	Respuesta al estrés		Membrana plasmática
	At4g22400	<i>No definido</i>	<i>No definido</i>	<i>No definido</i>
	Probable S-adenosylmethionine carrier 2, chloroplastic	<i>No definido</i>	Actividad transportadora	Cloroplasto
NO ₂ -Ln	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs)	<i>No definido</i>	Unión al ARN	<i>No definido</i>
Senescencia (Raíces de 53 días)				
NO ₂ -OA	3-ketoacyl-CoA synthase 21	Procesos biosintéticos	Actividad sintasa	Otras membranas
NO ₂ -LA	ND			
NO ₂ -Ln	ND			

26. Modulación de los almacenes de NO₂-FAs en el estrés abiótico

Para estudiar cómo se modulaban los almacenes de NO₂-FAs durante el estrés abiótico, se analizaron diferentes tipos de estrés en plántulas de *Arabidopsis* de 14 días como la salinidad, los metales pesados (cadmio), la baja temperatura, la luz continua y la oscuridad. En cada una de estas situaciones se caracterizó el estado redox y la modulación de los almacenes proteicos y lipídicos para los 3 NO₂-FAs.

En primer lugar, se caracterizó el estado oxidativo de las plantas en cada una de las situaciones de estrés a través de la detección de marcadores de la homeostasis redox como son el H₂O₂ y el MDA, siendo este último un indicador de la peroxidación lipídica. En las situaciones de estrés abiótico se ha observado, bien un incremento del contenido en H₂O₂ o MDA, como es el caso de los estreses por cadmio y baja temperatura o bien un aumento en los niveles de ambos marcadores (**Fig. 62**).

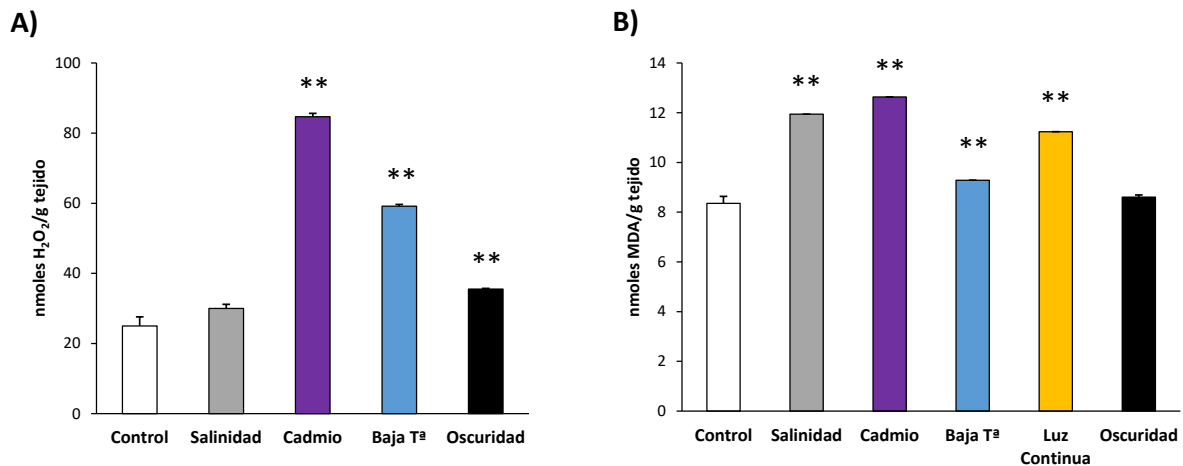


Figura 62. Detección de marcadores de la homeostasis redox en las diferentes situaciones de estrés abiótico. Se utilizaron dos marcadores del estado redox, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (A) y el malondialdehído (MDA) (B). El doble asterisco (**) indica que los niveles de H₂O₂ o MDA detectados eran significativos ($p < 0,001$) con respecto a la situación control.

Tras valorar el estado oxidativo de las diferentes situaciones de estrés abiótico, se analizaron por LC-MS/MS los niveles totales de NO₂-FAs procedentes tanto de los depósitos proteicos como lipídicos. En general, la mayoría de situaciones de estrés abiótico generó un incremento en los niveles de NO₂-OA, NO₂-LA y, sobre todo, de NO₂-Ln. No obstante, existen algunas variaciones importantes a destacar. Por ejemplo, en los estreses por salinidad y baja temperatura, los niveles de NO₂-OA fueron similares a los detectados en la situación control, lo mismo ocurrió en el estrés por oscuridad con los niveles de NO₂-Ln. Además, en el estrés por luz continua encontramos un comportamiento diferencial para cada NO₂-FA. Las diferencias consistieron en: una disminución en los niveles de NO₂-OA, un incremento en el contenido de NO₂-Ln y ningún cambio en el caso del NO₂-LA (**Fig. 63**).

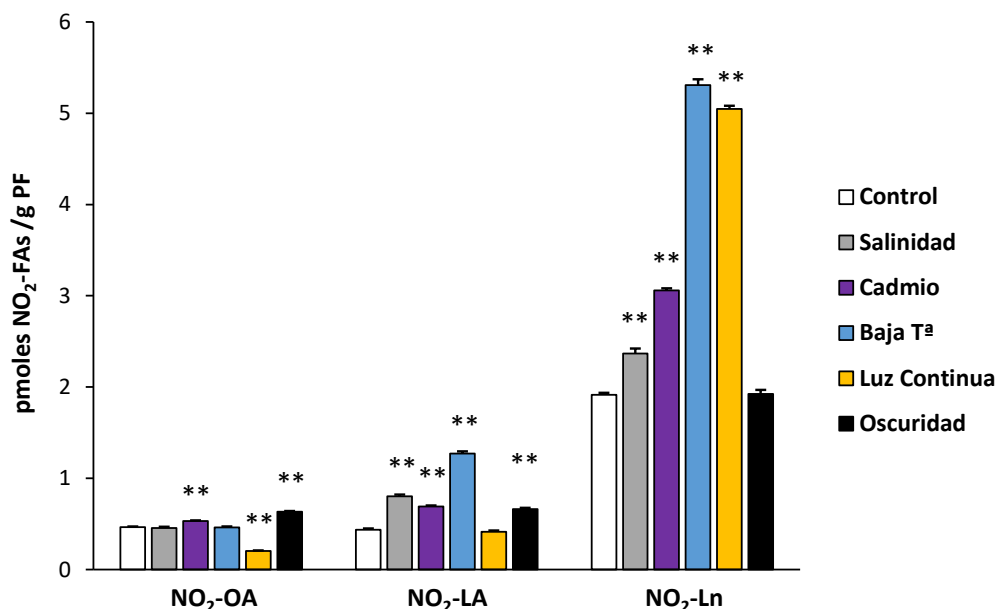


Figura 63. Niveles totales de NO₂-FAs en las diferentes situaciones de estrés abiótico. En esta figura se muestra los niveles de NO₂-FAs totales procedentes de los depósitos proteicos y lipídicos cuantificados por LC-MS/MS en las diferentes situaciones de estrés abiótico. El asterisco doble (**) indica que los niveles de NO₂-FAs detectados fueron significativos ($p < 0,001$) con respecto a la situación control.

Tras evidenciar los cambios en los niveles totales de NO₂-FAs como consecuencia de las situaciones de estrés abiótico, se estudió en detalle lo que ocurría de manera aislada en cada uno de los reservorios para así poder determinar el depósito o los depósitos responsables del cambio en los niveles de NO₂-FAs. En primer lugar, se muestran los niveles de NO₂-FAs procedentes de los depósitos proteicos. En general, en la mayoría de estreses, se observó una disminución en los niveles de NO₂-FAs aductados con proteínas con respecto a la situación control. El estrés por salinidad no generó cambios en los niveles de nitroalquilación para el NO₂-OA y el NO₂-Ln y sólo se observó una disminución en la abundancia de proteínas aductadas con NO₂-LA. Adicionalmente, en el estrés por baja temperatura no se detectaron cambios en los niveles de proteínas aductadas con NO₂-Ln (**Fig. 64**).

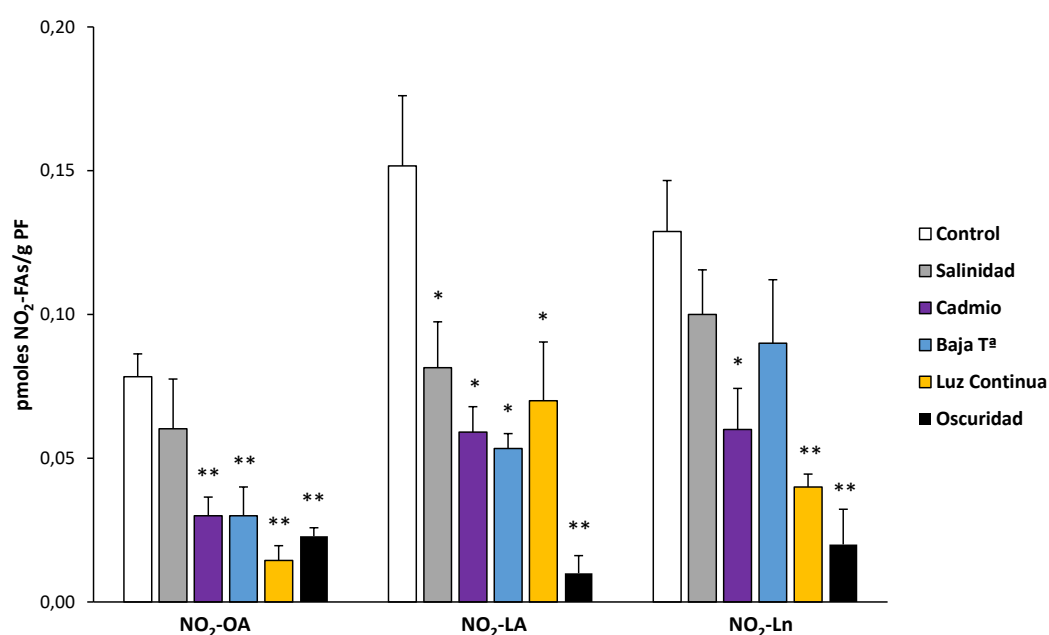


Figura 64. Modulación de los niveles endógenos de NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln aductados con proteínas en las diferentes situaciones de estrés abiótico. Los valores de NO₂-FAs cuantificados son la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los niveles de NO₂-FAs detectados son significativos con respecto a la situación control cuando aparece un asterisco (*; $p < 0,05$) o un doble asterisco (**; $p < 0,001$).

A continuación, se presenta el comportamiento de los NO₂-FAs que se encontraban almacenados en lípidos más complejos en las diferentes situaciones de estrés abiótico. En este caso, se observó que las situaciones de estrés provocaron un incremento en los niveles de NO₂-FAs libres (**Fig. 65**). Este comportamiento coincidió con el observado en los niveles totales de NO₂-FAs (**Fig. 63**) ya que la aducción de NO₂-FAs en la fracción lipídica era superior a la proteica. Sin embargo, es importante señalar algunas variaciones detectadas. Por ejemplo, en el estrés por salinidad se observaron niveles de NO₂-OA similares a los detectados en el control, en el estrés por oscuridad se produjo la misma respuesta, aunque en el caso del NO₂-Ln. Finalmente, el estrés por luz continua mostró unos niveles de NO₂-OA inferiores a los detectados en la situación control (**Fig. 65**).

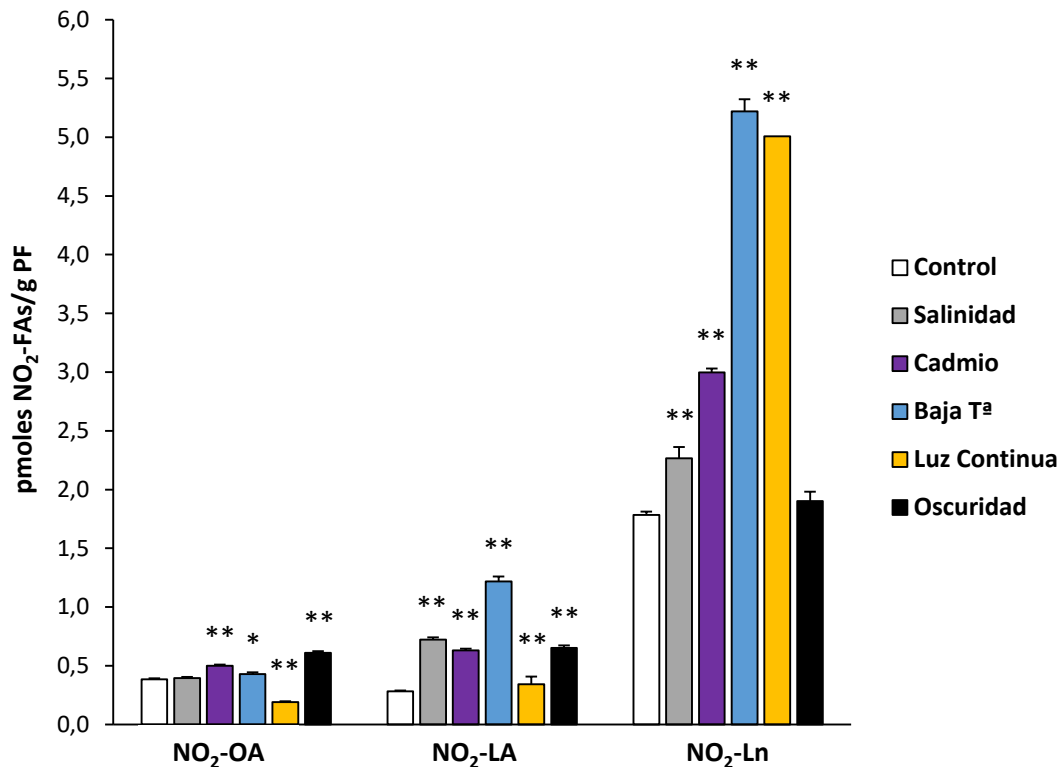


Figura 65. Modulación de los niveles endógenos de NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln esterificados en los almacenes lipídicos en las diferentes situaciones de estrés abiótico. Los valores de NO₂-FAs mostrados son la media \pm SEM de al menos 10 experimentos independientes. Los niveles de NO₂-FAs detectados son significativos con respecto a la situación control cuando aparece un asterisco (*; $p < 0,05$) o un doble asterisco (**; $p < 0,001$).

El conjunto de resultados previos demuestra que las situaciones de estrés generaban una disminución en los niveles de nitroalquilación y un incremento en la esterificación de los NO₂-FAs con lípidos más complejos. A continuación, se van a mostrar los resultados que permitieron determinar los depósitos lipídicos responsables de los cambios observados como consecuencia de cada situación de estrés. Dado que este comportamiento difirió entre los diferentes estreses y también dependía del NO₂-FA que se considerara, los resultados se analizaron por separado.

En el estrés por salinidad, se observaron variaciones en los niveles de los tres NO₂-FAs. El NO₂-OA aumentó su esterificación en la fosfatidilcolina y disminuyó en la fosfatidilserina. En cambio, los niveles de NO₂-LA se incrementaron en la fosfatidilcolina, en el fosfatidilinositol y, sobre todo, en los ésteres de fitoesteroles. En los mono y diacilglicéridos y en la fosfatidilserina disminuyó el contenido en NO₂-LA con respecto a la situación control. Finalmente, del comportamiento del NO₂-Ln en el estrés por salinidad cabe destacar un incremento de su esterificación con la fosfatidilcolina y una disminución en los mono y diacilglicéridos y en los ésteres de fitoesteroles (**Fig. 66; Panel A**).

El estrés por cadmio ocasionó cambios en los niveles de los 3 NO₂-FAs esterificados con fosfatidilinositol. En concreto, se observó un aumento en el contenido en NO₂-LA en esta fracción lipídica y lo contrario en los casos del NO₂-OA y el NO₂-Ln. En el resto de fosfolípidos, la tendencia generalizada consistió en el incremento de los niveles de NO₂-LA. Este incremento también se observó en la fosfatidilserina con el NO₂-Ln y en la fosfatidilcolina con el NO₂-OA. Otros almacenes lipídicos, como los triacilglicéridos y los mono y diacilglicéridos, solo mostraron cambios en el contenido en NO₂-

Ln, el cual aumentó como consecuencia del estrés. Por último, destacar el incremento de NO₂-OA libre como consecuencia del crecimiento de las plántulas en presencia del metal pesado (**Fig. 66; Panel B**).

Los depósitos de mono y diacilglicéridos aumentaron su contenido en los tres NO₂-FAs en respuesta al estrés por baja temperatura. Análogamente, en otros almacenes también se incrementó la presencia de NO₂-FAs, como el NO₂-LA en la fosfatidilcolina, el NO₂-Ln en la fosfatidilserina y ambos en los triacilglicéridos y ésteres de fitoesteres. Por el contrario, la presencia de NO₂-OA disminuyó en la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol (**Fig. 66; Panel C**).

El estrés por luz continua provocó una disminución en los niveles de NO₂-OA en todas las fracciones excepto en la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, donde no se detectaron cambios significativos. El NO₂-Ln presenta un patrón de comportamiento similar, aunque afectó a un menor número de almacenes. En concreto, los mono y diacilglicéridos y todos los fosfolípidos, con excepción de la fosfatidilserina, redujeron su contenido en NO₂-Ln. El caso de la fosfatidilserina fue llamativo pues incrementó de forma notoria sus niveles de NO₂-Ln. Por último, el NO₂-LA disminuyó ligeramente en la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol y también aumentó notablemente en la fosfatidilserina (**Fig. 66; Panel D**).

En la distribución que presentan los NO₂-FAs en el estrés por oscuridad cabe reseñar el notable incremento de los tres NO₂-FAs en la fracción de fosfatidilinositol. En los demás fosfolípidos existieron comportamientos heterogéneos dependiendo del NO₂-FA analizado. En este sentido, en la fosfatidilcolina aumentó el contenido de NO₂-LA, en la fosfatidiletanolamina, por el contrario, disminuyó la presencia de NO₂-OA y NO₂-Ln y en la fosfatidilserina incrementó el NO₂-OA y se redujo el NO₂-LA. En los demás almacenes lipídicos, el NO₂-OA aumentó su abundancia en los ésteres de fitoesteres y en los mono y diacilglicéridos. El NO₂-LA y el NO₂-Ln también ampliaron sus niveles en triacilglicéridos (**Fig. 66; Panel E**).

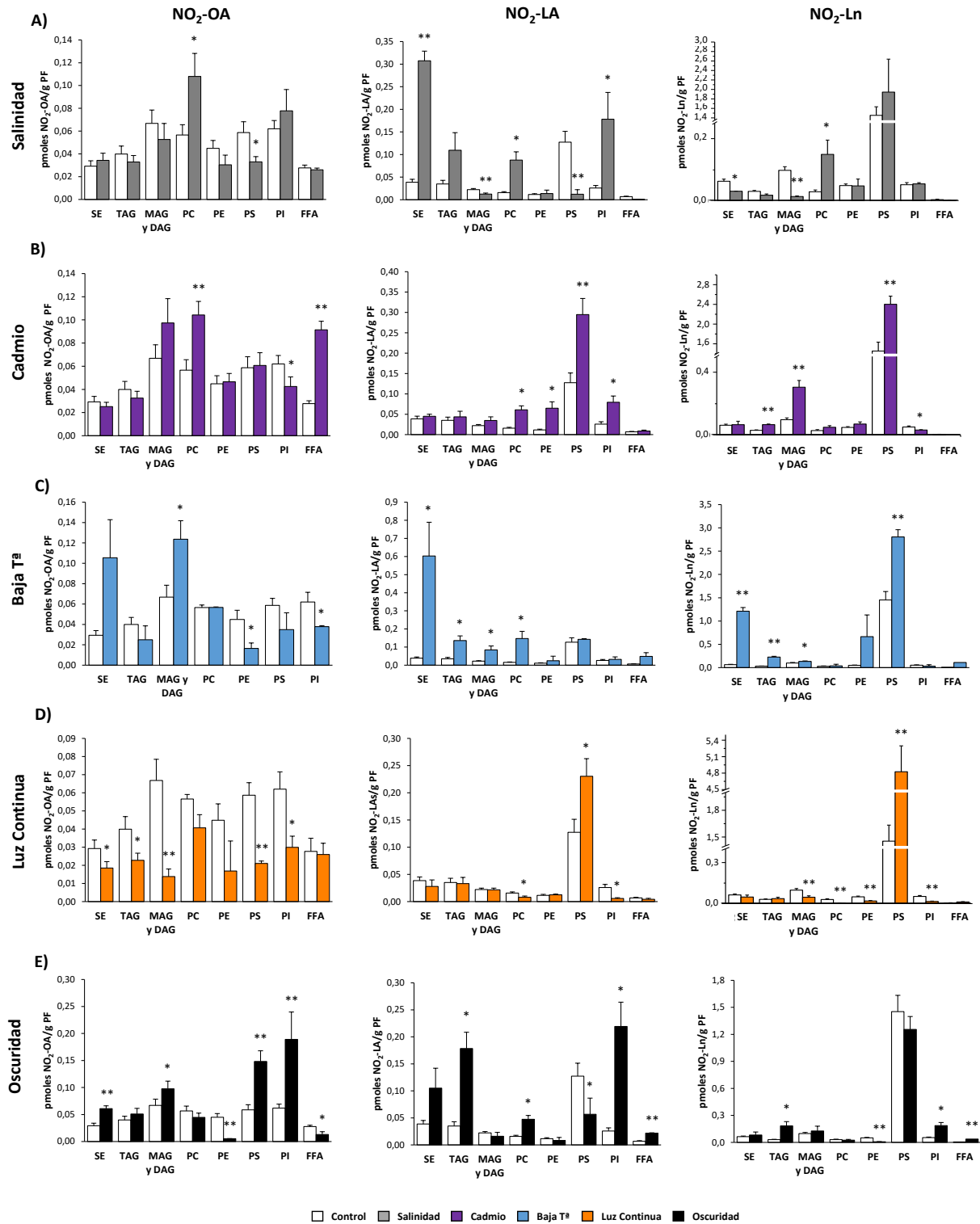


Figura 66. Biodistribución de los NO₂-FAs esterificados con lípidos complejos en las diferentes situaciones de estrés abiótico. En esta figura se muestra, como se modulan los niveles de cada uno de los NO₂-FAs en cada uno de los almacenes lipídicos en diferentes situaciones estrés como salinidad (A), cadmio (B), baja temperatura (C), luz continua (D) y oscuridad (E). Los valores de NO₂-FAs mostrados se corresponden con la media ± SEM de al menos 10 experimentos independientes. Los niveles de NO₂-FAs detectados son significativos con respecto a la situación control, cuando aparece un asterisco (*; p < 0,05) o un doble asterisco (**; p < 0,001).

27. Caracterización del perfil de proteínas nitroalquiladas durante las situaciones de estrés abiótico

Tras analizar cómo se modulaban los niveles de NO₂-FAs procedentes de los distintos depósitos (lipídicos y proteicos) en respuesta cada una de las situaciones de estrés, se abordó la identificación de las proteínas aductadas. En la siguiente figura (**Fig. 67**) se muestra el número total de proteínas identificadas en los análisis de nanoLC-MS/MS tanto en el control como en las diferentes situaciones de estrés. En términos generales, el número total de proteínas identificadas en los estreses fue inferior a la situación control.

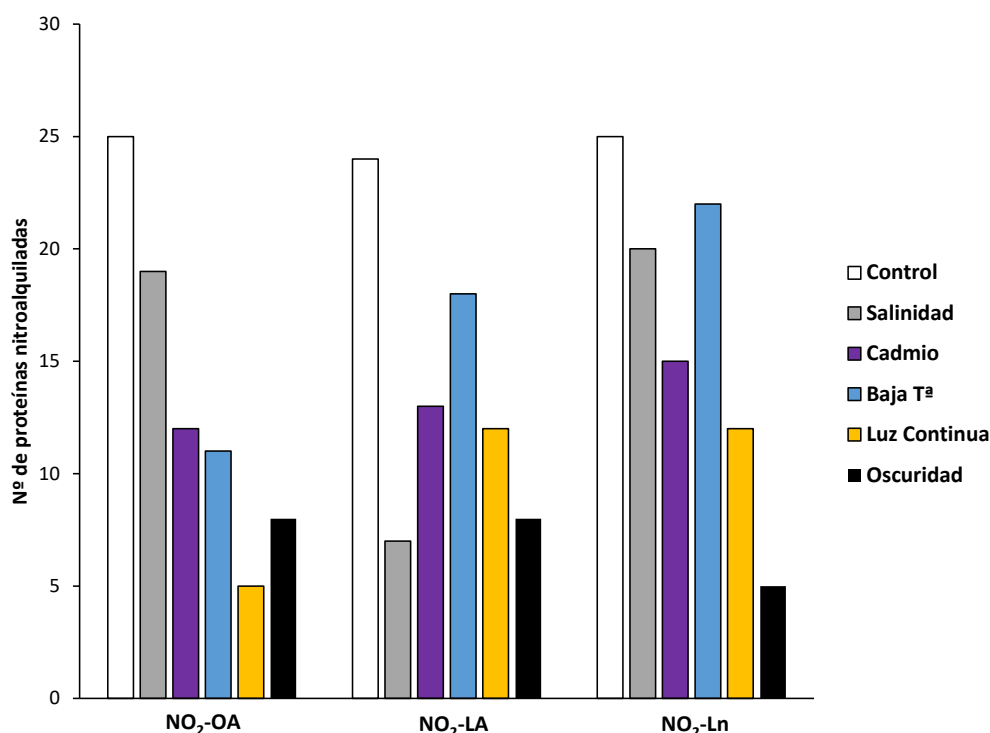


Figura 67. Cuantificación de proteínas nitroalquiladas por los diferentes NO₂-FAs en el control y en las diferentes situaciones de estrés tras el análisis por nanoLC-MS/MS.

27.1. Salinidad

En el estrés por salinidad el número de proteínas nitroalquiladas disminuyó con respecto al control. La reducción fue algo más marcada en el caso de la nitroalquilación con NO₂-LA (**Fig. 67**) (**Tabla 7 y 12, Anexo III**). El análisis bioinformático para realizar la clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas en el estrés por salinidad y su comparación con las detectadas en el control, mostró un importante descenso en el número de proteínas modificadas que participaban en procesos biológicos en general, y en la respuesta al estrés en particular. Sin embargo, en procesos como el transporte y la modificación de proteínas celulares, las proteínas nitroalquiladas se incrementaron tras la situación de estrés (**Fig. 68**). Atendiendo a la función molecular, en el estrés por salinidad las proteínas nitroalquiladas tuvieron una menor participación en la actividad catalítica y en la unión a proteínas con respecto al control (**Fig. 1 y 2, Anexo I**). Las principales localizaciones celulares de las proteínas nitroalquiladas fueron el núcleo, el citoplasma y el cloroplasto, aunque en una menor proporción con respecto al control (**Fig. 3 y 4, Anexo I**).

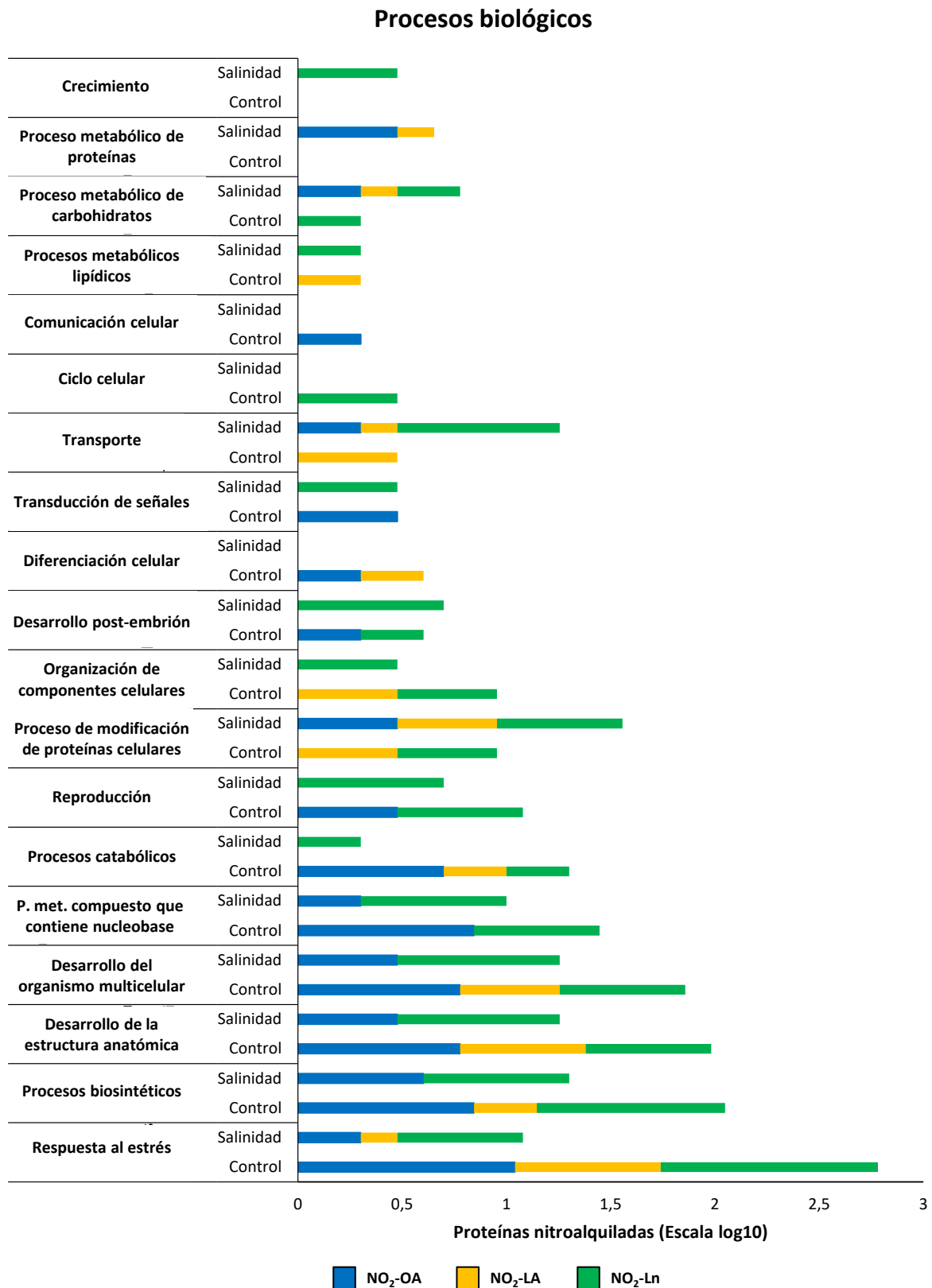


Figura 68. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por salinidad. En la figura se muestran los procesos biológicos más representativos en los que participan las proteínas nitroalquiladas detectadas en el control y en el estrés por salinidad.

27.2. Cadmio

El número de proteínas nitroalquiladas detectadas por nanoLC-MS/MS en el estrés por cadmio fue menor con respecto al número de proteínas identificadas en el control (**Fig. 67**) (**Tabla 7 y 13, Anexo III**). En este tipo de estrés abiótico, observamos un comportamiento similar al descrito anteriormente, el proceso biológico de respuesta al estrés contenía el menor número de proteínas nitroalquiladas en comparación con el control, además en la situación de estrés no se detectaron proteínas nitroalquiladas implicadas en procesos catabólicos (**Fig. 69**). La actividad catalítica y la unión a proteínas fueron las funciones moleculares que más se redujeron en el estrés por cadmio (**Fig. 5 y 6, Anexo I**). El núcleo, el citoplasma y el cloroplasto continuaron siendo los compartimentos celulares preferentes de las proteínas nitroalquiladas tanto en la situación control como de estrés (**Fig. 7 y 8, Anexo I**).

27.3. Baja temperatura

El estrés por baja temperatura también generó una disminución en el número de proteínas nitroalquiladas, especialmente en el caso del NO₂-OA (**Fig. 67**) (**Tabla 7 y 14, Anexo III**). Esta disminución se manifestó principalmente en las proteínas nitroalquiladas implicadas en la respuesta al estrés, ya que en los demás procesos biológicos no se observaron cambios significativos con respecto al control. Sin embargo, en procesos de modificación de proteínas celulares y en desarrollo post-embrionario, la cantidad de proteínas nitroalquiladas identificadas se incrementó con respecto a la situación control (**Fig. 70**). En cuanto a la función molecular (**Fig. 10 y 9, Anexo I**) y a los compartimentos celulares (**Fig. 11 y 12, Anexo I**) no existen cambios reseñables entre las situaciones control y de estrés.

27.4. Luz Continua

La detección e identificación por nanoLC-MS/MS mostró un número de proteínas nitroalquiladas por los tres NO₂-FAs minoritario en el estrés por luz continua con respecto a las plántulas control (**Fig. 67**) (**Tabla 7 y 15, Anexo III**). La mayoría de las proteínas nitroalquiladas en este tipo de estrés abiótico se relacionaron con procesos de respuesta al estrés, biosintéticos, metabólicos y de modificación de proteínas celulares, pero sus niveles siempre fueron menores a los detectados en las plántulas control. Es importante destacar la ausencia de proteínas nitroalquiladas en los procesos relacionados con el desarrollo del organismo en la situación de estrés a pesar de que se detectaron muchas proteínas nitroalquiladas en la situación control (**Fig. 71**). Entre las funciones moleculares de las proteínas nitroalquiladas en el estrés por luz continua destacaron las actividades catalítica y transferasa. No se detectaron proteínas nitroalquiladas destinadas a la unión a otras proteínas (**Fig. 13 y 14, Anexo I**). El núcleo, el citoplasma y el cloroplasto continuaron siendo los principales compartimentos celulares que albergaron las proteínas nitroalquiladas en esta situación de estrés, aunque siempre en una proporción menor que el control (**Fig. 15 y 16, Anexo I**).

Procesos biológicos

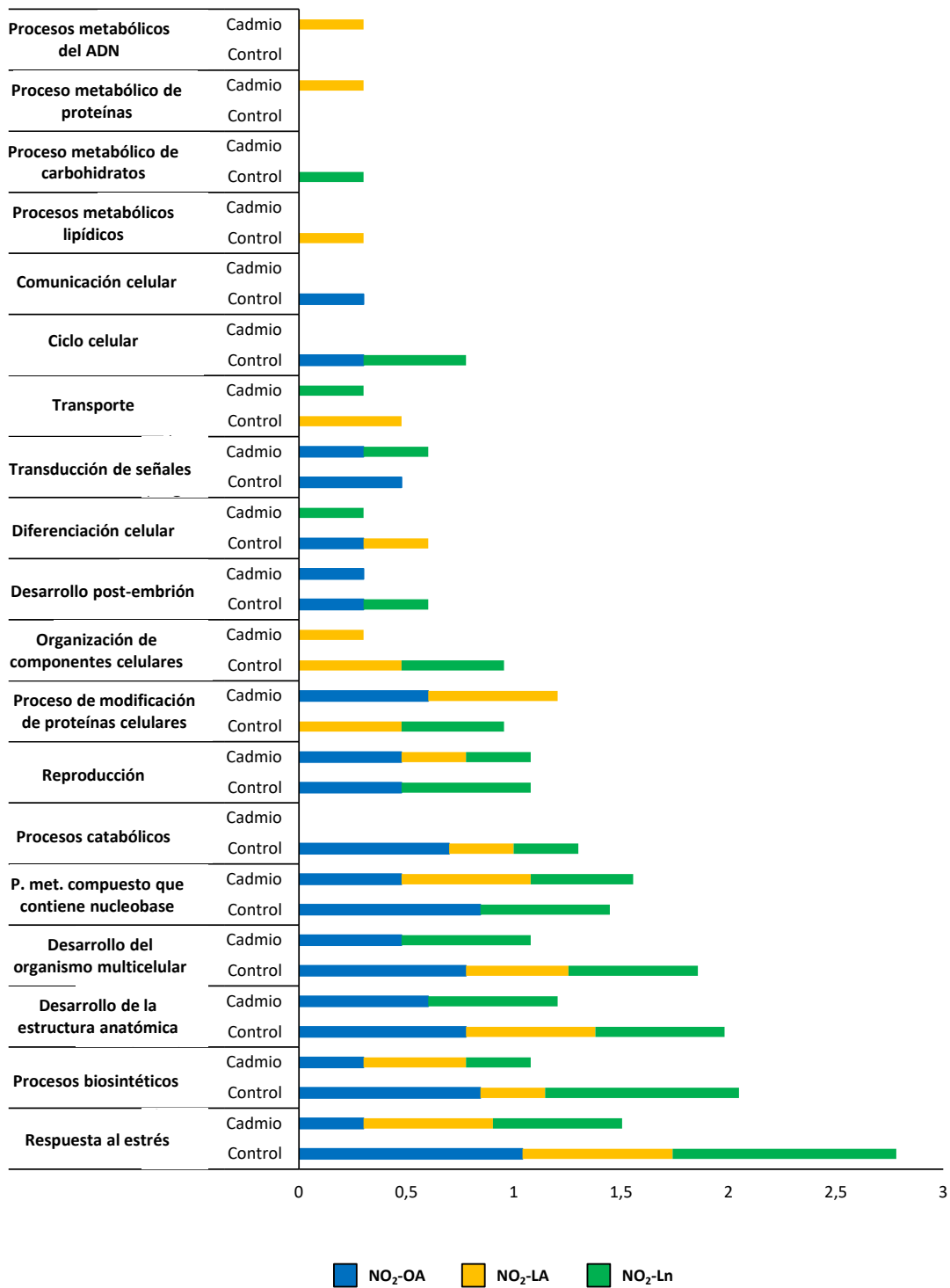


Figura 69. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por cadmio. En la figura se muestran los procesos biológicos más representativos en los que participan las proteínas nitroalquiladas detectadas en el control y en el estrés por cadmio.

Procesos biológicos

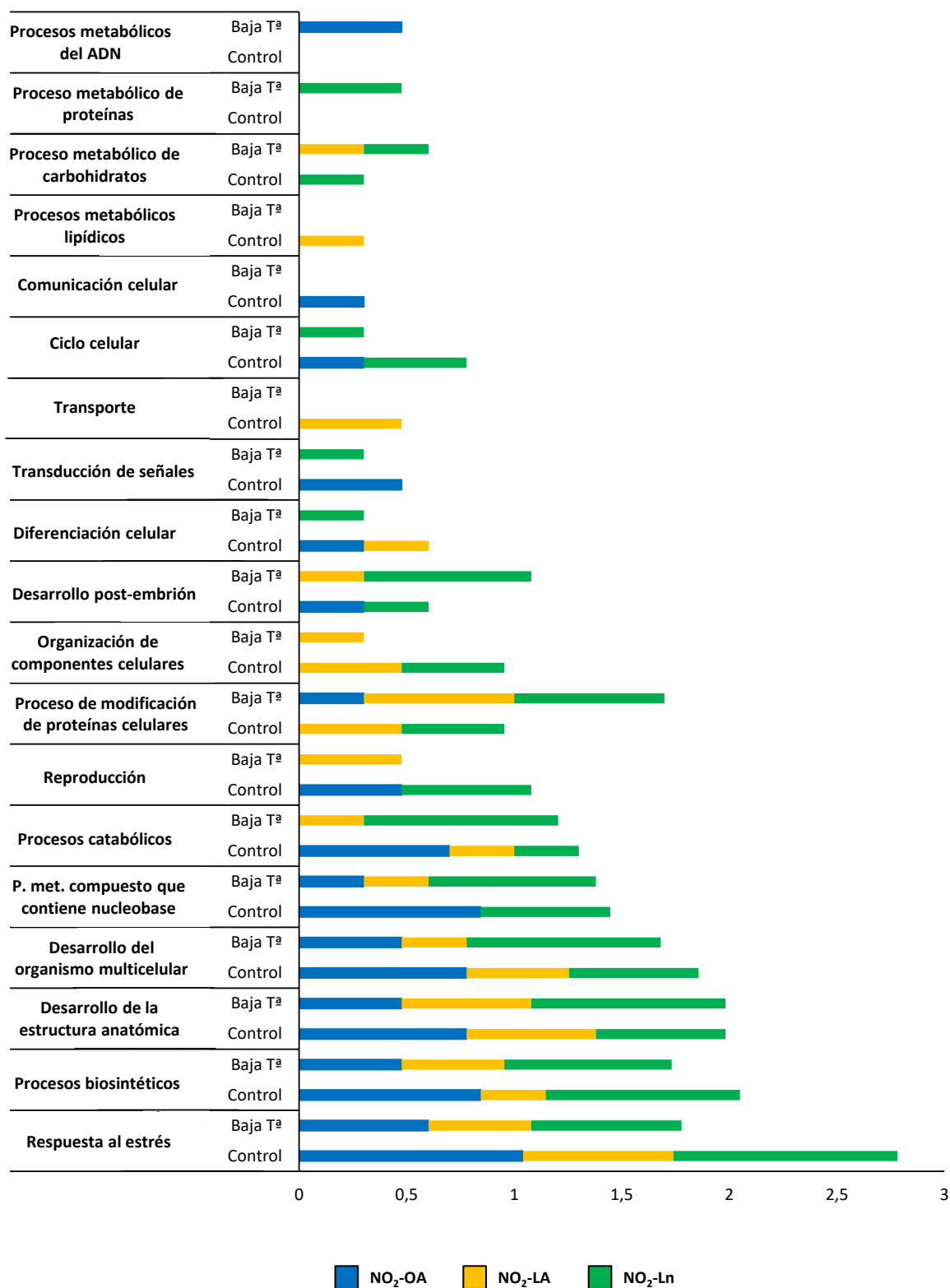


Figura 70. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por baja temperatura. En la figura se muestran los procesos biológicos más representativos en los que participan las proteínas nitroalquiladas detectadas en el control y en el estrés por baja temperatura.

Procesos biológicos

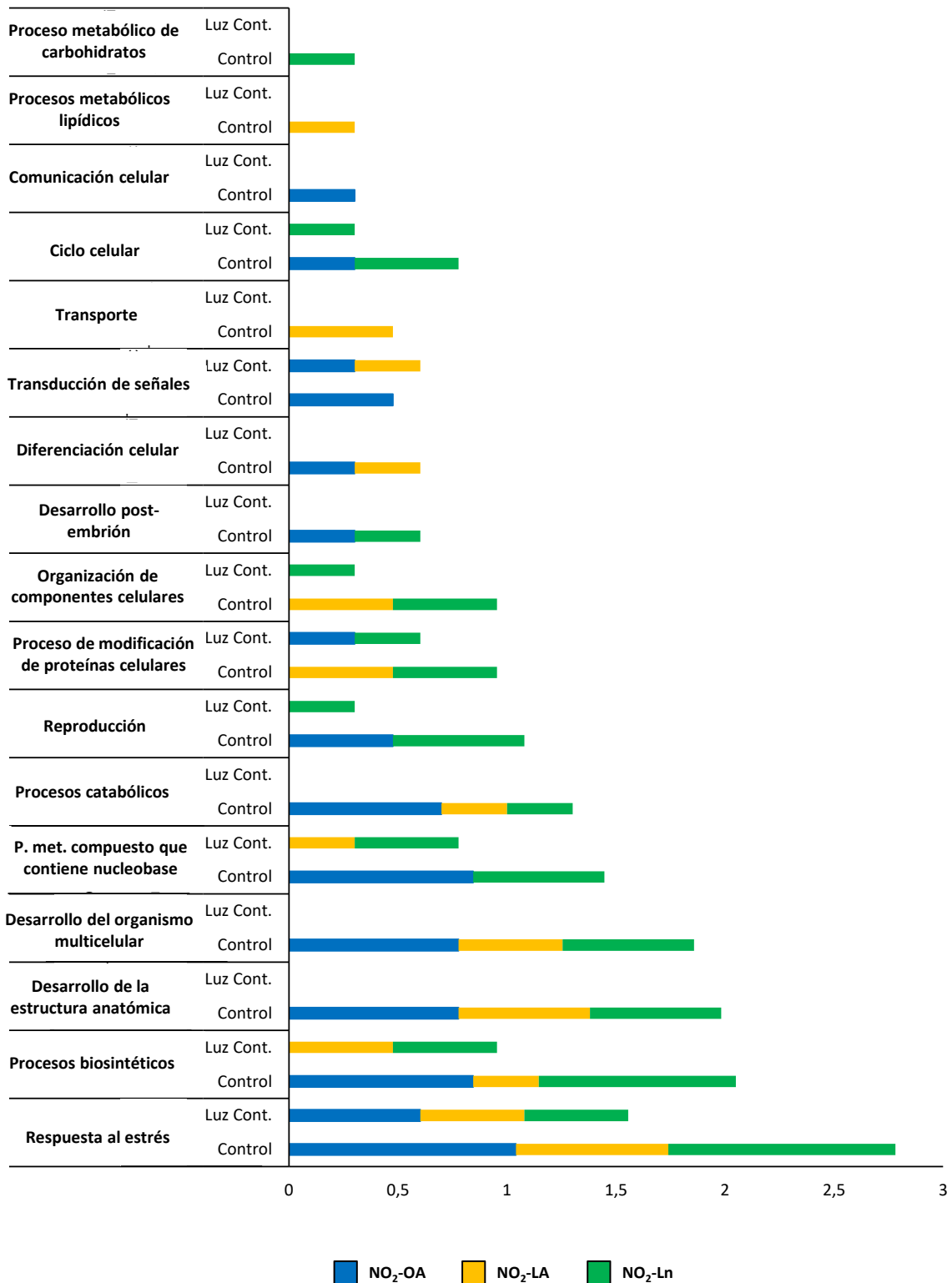


Figura 71. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por luz continua. En la figura se muestran los procesos biológicos más representativos en los que participan las proteínas nitroalquiladas detectadas en el control y en el estrés por luz continua.

27.5. Oscuridad

En el estrés por oscuridad se encontró una presencia muy reducida de proteínas nitroalquiladas (**Fig. 67**) (**Tabla 7 y 16, Anexo III**), las cuales participaban mayoritariamente en procesos de modificación de proteínas celulares y en organización de los componentes celulares. Resulta llamativo que los procesos biológicos en los que participan preferencialmente las proteínas nitroalquiladas detectadas en la situación control, como son los procesos de respuesta al estrés, biosintéticos y de desarrollo, resultaran minoritarios en la situación de estrés (**Fig. 72**). Las actividades catalítica, transferasa y de unión a proteínas fueron las funciones moleculares principales de las proteínas nitroalquiladas en este tipo de estrés abiótico (**Fig. 17 y 18, Anexo I**). La localización preferencial de las proteínas nitroalquiladas en el estrés por oscuridad volvió a ser el núcleo y el citoplasma aunque cabe destacar su ausencia en el cloroplasto (**Fig. 19 y 20, Anexo I**).

Procesos biológicos

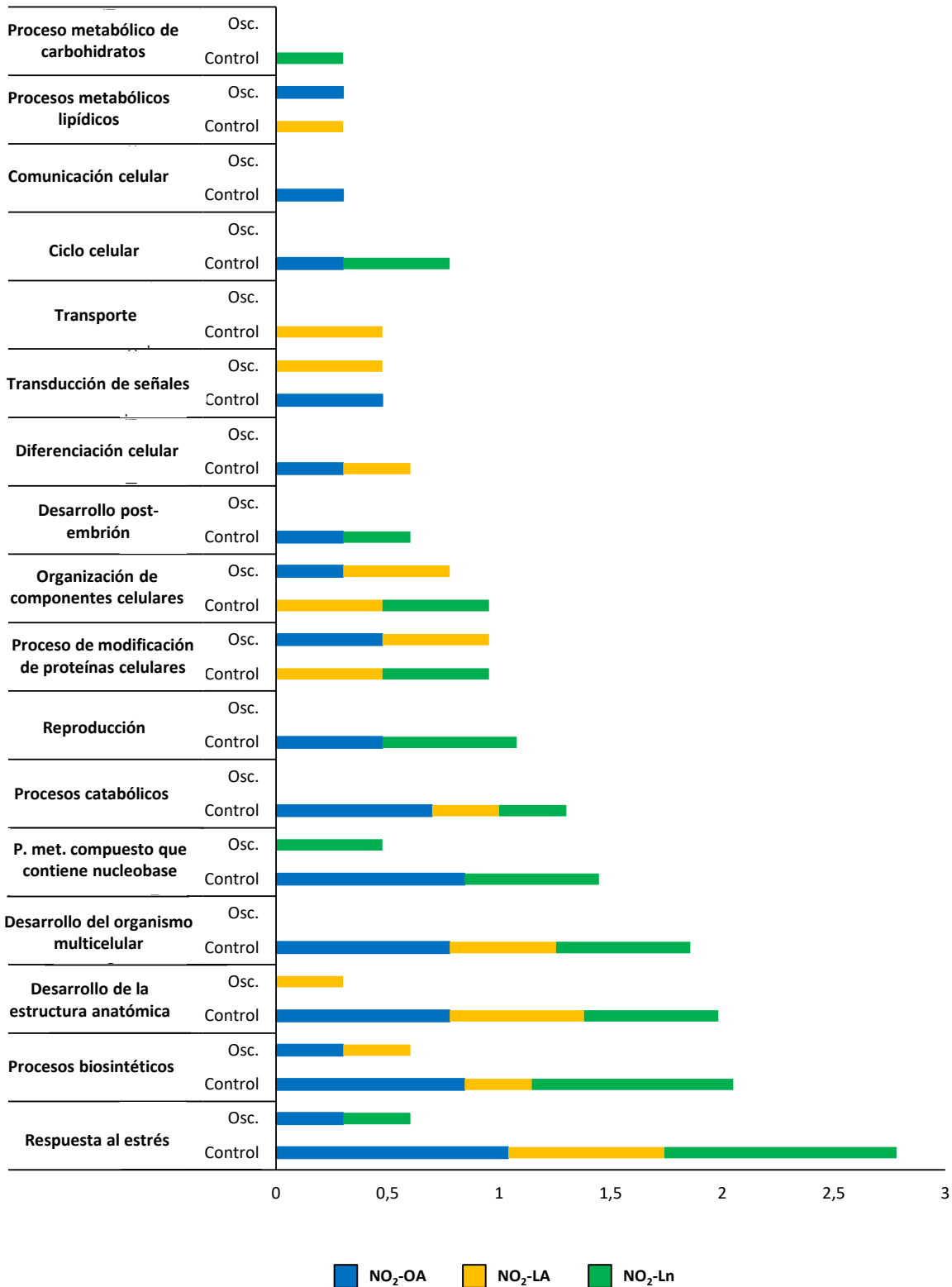


Figura 72. Clasificación funcional de las proteínas nitroalquiladas identificadas en el estrés por oscuridad. En la figura se muestran los procesos biológicos más representativos en los que participan las proteínas nitroalquiladas detectadas en el control y en el estrés por oscuridad.

28. Papel de los NO₂-FAs durante el estrés biótico

Los resultados mostrados hasta el momento reflejan el papel de los NO₂-FAs durante el desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* y en la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico. A continuación, se presentan los resultados que evidencian la implicación de estas moléculas señalizadoras en un estrés de tipo biótico. Estos experimentos derivan de mi estancia en el laboratorio de la Dra. Lenka Luhová de la Universidad de Olomouc (República Checa) y consistieron en la utilización de un modelo de estrés biótico por patógenos que estribaba en el tratamiento de cultivos celulares de tabaco con elicinas. Las elicinas son unas proteínas secretadas por los patógenos que inducen la producción de ROS a través de la activación de la NADPH oxidasa. La sobreproducción de ROS puede conducir a la muerte celular. Para realizar el estrés biótico se utilizaron dos tipos de elicinas: una beta-elicina básica, la criptogenina (CRY) y una alfa-elicina ácida, la infectina (INF). La principal diferencia entre ellas hace referencia a su toxicidad, siendo la básica mucho más tóxica. Por tanto, en primer lugar, se trataron los cultivos celulares de tabaco con una concentración 50 nM cada una de las elicinas y se monitorizó durante 2 horas la respuesta del cultivo a nivel de producción de ROS y de viabilidad celular.

El tratamiento con criptogenina disminuyó la viabilidad celular aproximadamente al 40% tras los primeros 30 minutos de incubación, descenso que se mantuvo durante las siguientes horas de tratamiento. En cambio, la infectina no afectó a la viabilidad celular del cultivo (**Fig. 73**).

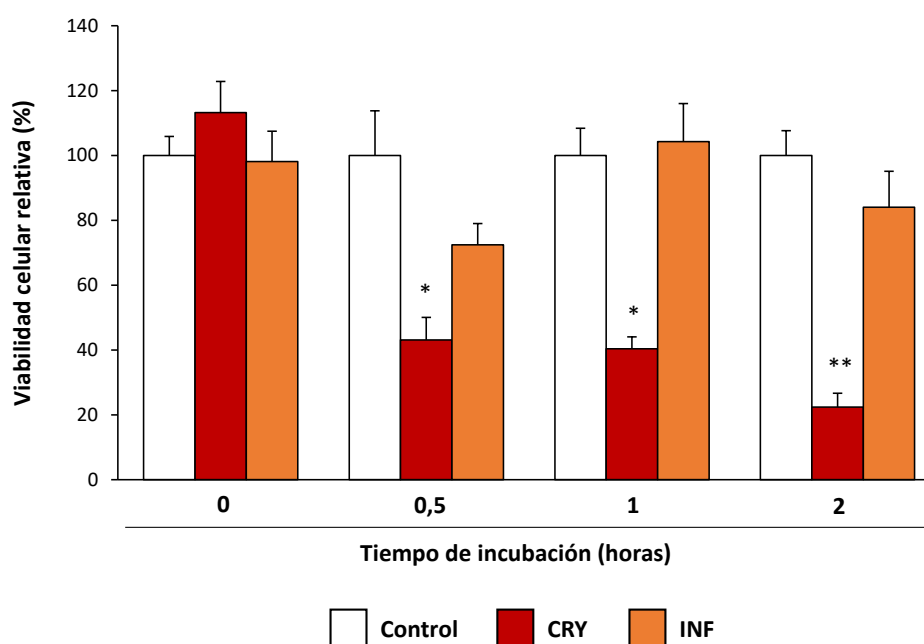


Figura 73. Viabilidad de los cultivos celulares de tabaco tras el tratamiento con 50 nM de CRY e INF durante 2 horas. La muestra a tiempo 0 se recogió inmediatamente después de añadir cada elicina. Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a un $p < 0,05$ (*) y un $p < 0,001$ (**).

En cambio, en lo que a los niveles de ROS se refiere, ambas elicinas provocaron la elevación de sus niveles de forma casi inmediata, aunque con pequeñas diferencias. La CRY desencadenó un efecto más acusado, a los 30 minutos de incubación se obtuvo la mayor producción de ROS y a partir de ahí descendió paulatinamente. En el caso de la INF, se detectaron los mayores niveles de ROS a los pocos segundos tras el tratamiento y, a partir de ahí, se produjo un descenso muy rápido hasta llegar a concentraciones indetectables tras una hora de incubación (**Fig. 74**).

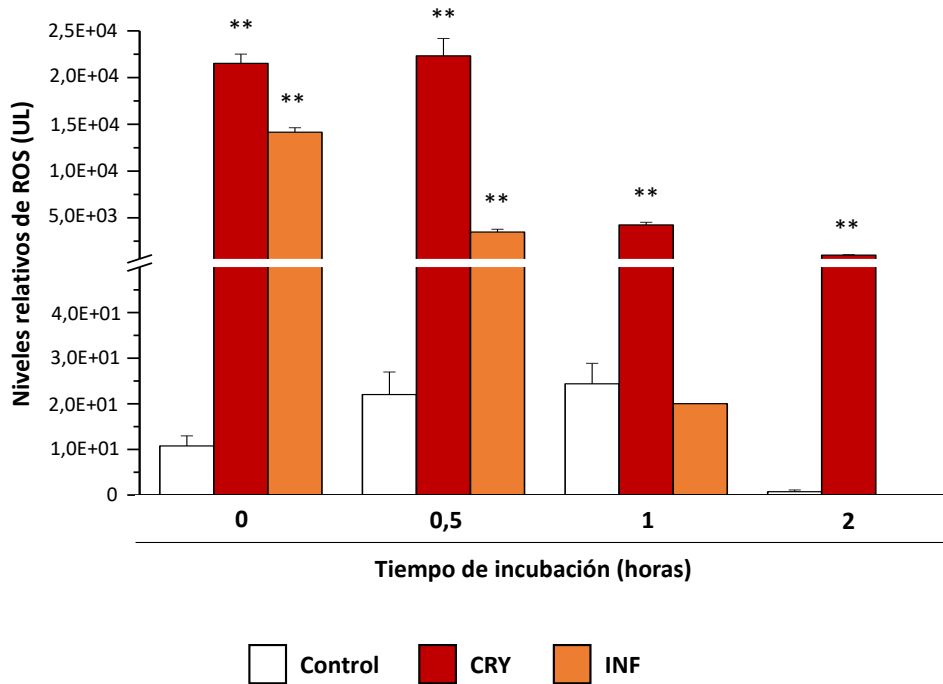


Figura 74. Niveles de especies reactivas de oxígeno tras la incubación de las células de tabaco con 50 nM CRY y INF durante 2 horas. La muestra a tiempo 0 se recogió inmediatamente después de añadir cada elicitor. Las diferencias con respecto a los valores de control fueron significativas a un $p < 0,001$ (**). UL: unidades de luminiscencia.

A continuación, se analizó el efecto de los NO₂-FAs en esta situación de estrés biótico. Para ello, se adicionó al medio de cultivo de las células de tabaco una concentración de 100 μM de NO₂-OA, NO₂-LA o NO₂-Ln y se incubó durante 30 minutos en agitación. Los experimentos se normalizaron utilizando 1 gramo de células en cada caso. Los resultados obtenidos demostraron que la presencia de los NO₂-FA en el medio celular activaba la síntesis de ROS extracelular, destacando la producción de ROS en el caso del NO₂-LA (**Fig. 75: Panel B**). Sin embargo, este aumento en la ROS no fue suficiente para ocasionar la muerte celular (**Fig. 75: Panel A**). Se diseñaron varios controles negativos, que consistieron en la incubación de las células con metanol (disolvente de los NO₂-FAs) y con las formas no nitradas de cada uno de los NO₂-FAs [ácido oleico (OA), ácido linoleico (LA) y ácido linolénico (Ln)]. El análisis de estos controles permitió corroborar que la respuesta observada era consecuencia del tratamiento con los nitrolípidos pues no se detectaron efectos significativos ni en la producción de ROS ni en la viabilidad celular con respecto a lo observado en la situación control (**Fig. 75: Paneles A y B**).

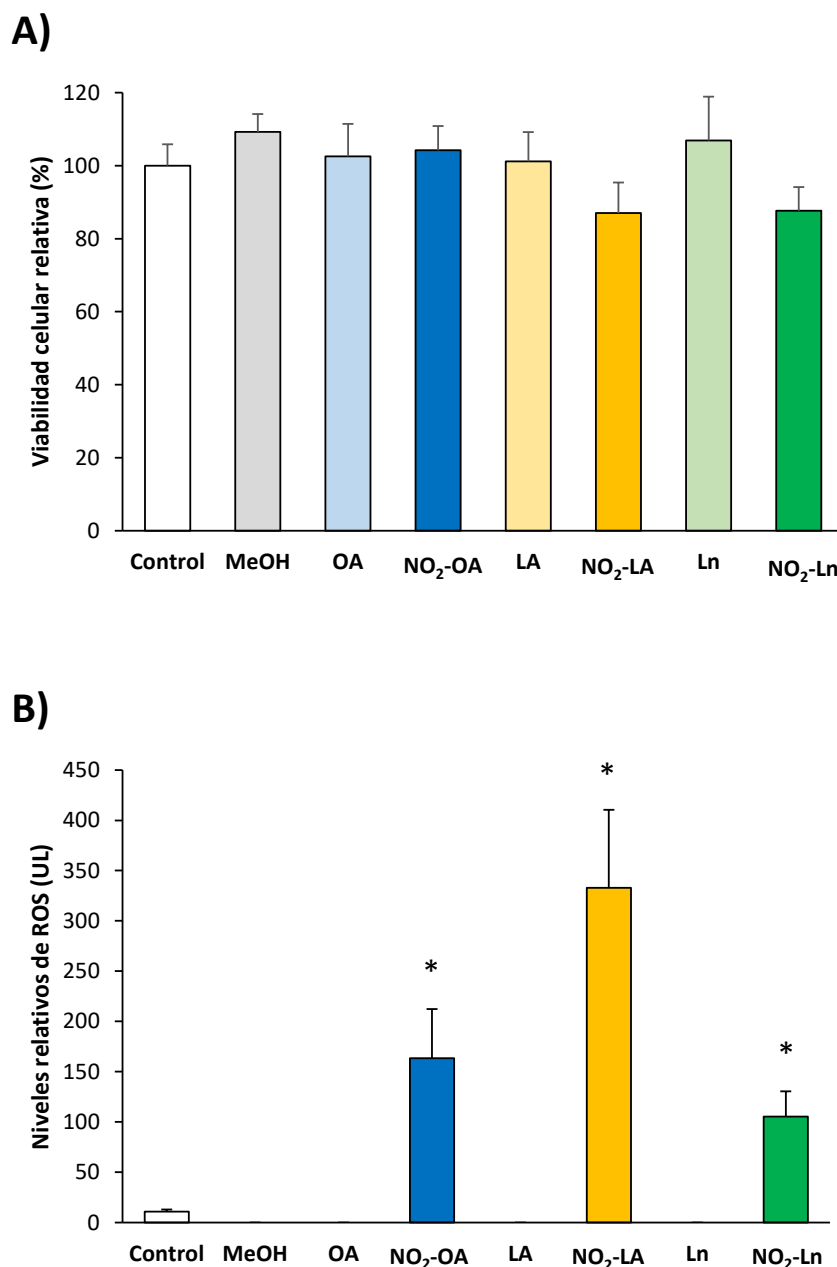


Figura 75. Caracterización de la respuesta de los cultivos celulares de tabaco al tratamiento con NO₂-FAs. 2 g de células de tabaco se trató con 100 μ M de NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln durante 30 minutos y agitación. Como controles negativos se utilizaron metanol (disolvente de los NO₂-FAs) y las formas no nitradas de los 3 nitrolípidos (ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico). Para cada uno de estos tratamientos se determinaron la viabilidad celular (A) y los niveles de ROS extracelulares (B). Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a un $p < 0,05$ (*).

Tras verificar que el tratamiento con los NO₂-FAs no afectaba a la viabilidad celular, las células se trataron de manera combinada con 50 nM de elicinas y 100 μ M de cada NO₂-FA y se monitorizaron los niveles de ROS extracelulares y la viabilidad del cultivo durante 2 horas. El tratamiento con infectina no perjudicó, en líneas generales, la viabilidad celular (**Fig. 76**) con la salvedad del tratamiento con

NO₂-LA y su forma no nitrada (LA), los cuales, tras dos horas de incubación, sí redujeron de manera significativa la supervivencia de las células.

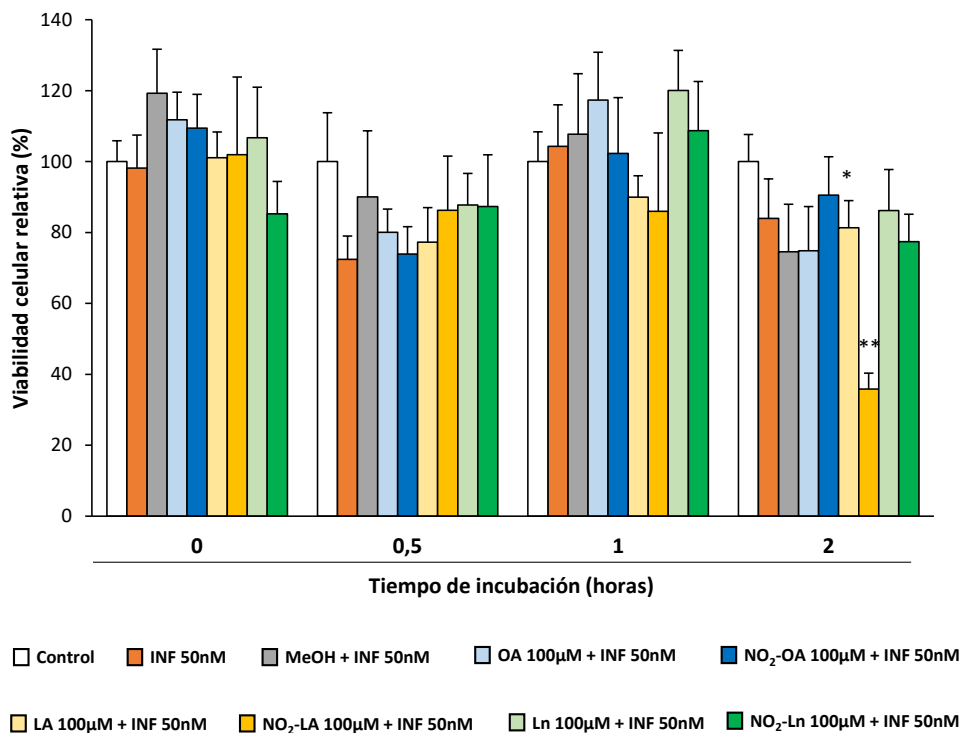


Figura 76. Viabilidad de los cultivos celulares de tabaco pretratados con 100 µM de NO₂-FAs e incubados posteriormente con infectina. En la figura se muestra la viabilidad de las células de tabaco que habían sido incubadas previamente durante 30 minutos con metanol (disolvente de los NO₂-FAs), con las formas no nitradas de los NO₂-FAs (ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolenico) o con los tres NO₂-FAs (NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln). A continuación, se añadió infectina (50 nM) y se monitorizó la viabilidad celular durante 2 horas. Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a un p<0,05 (*) o un p<0,001 (**).

Por el contrario, los niveles de ROS extracelulares sí mostraron comportamientos diferenciales dependiendo del tratamiento. A continuación, se explica el análisis detallado de lo ocurrido en cada intervalo de tiempo. A tiempo 0, es decir, inmediatamente después de añadir la INF, todos los tratamientos provocaron una disminución en los niveles de ROS extracelulares si se comparan con los niveles tan elevados que generaba la INF. En el caso de las células pretratadas con los diferentes NO₂-FAs, se cuantificó un incremento significativo en la producción de ROS con respecto al control, sin embargo, estos niveles fueron unas 15.000 veces inferiores a los provocados por la INF. Tras 30 minutos de incubación con infectina, los niveles de ROS en las células pretratadas con los NO₂-FAs continuaron siendo menores que los de la muestra tratada con infectina. Sin embargo, en tiempos más prolongados de incubación, la muestra tratada con infectina alcanzó niveles de ROS similares a los del control, mientras que las células pretratadas con los NO₂-FAs presentaron niveles levemente superiores (**Fig. 77**).

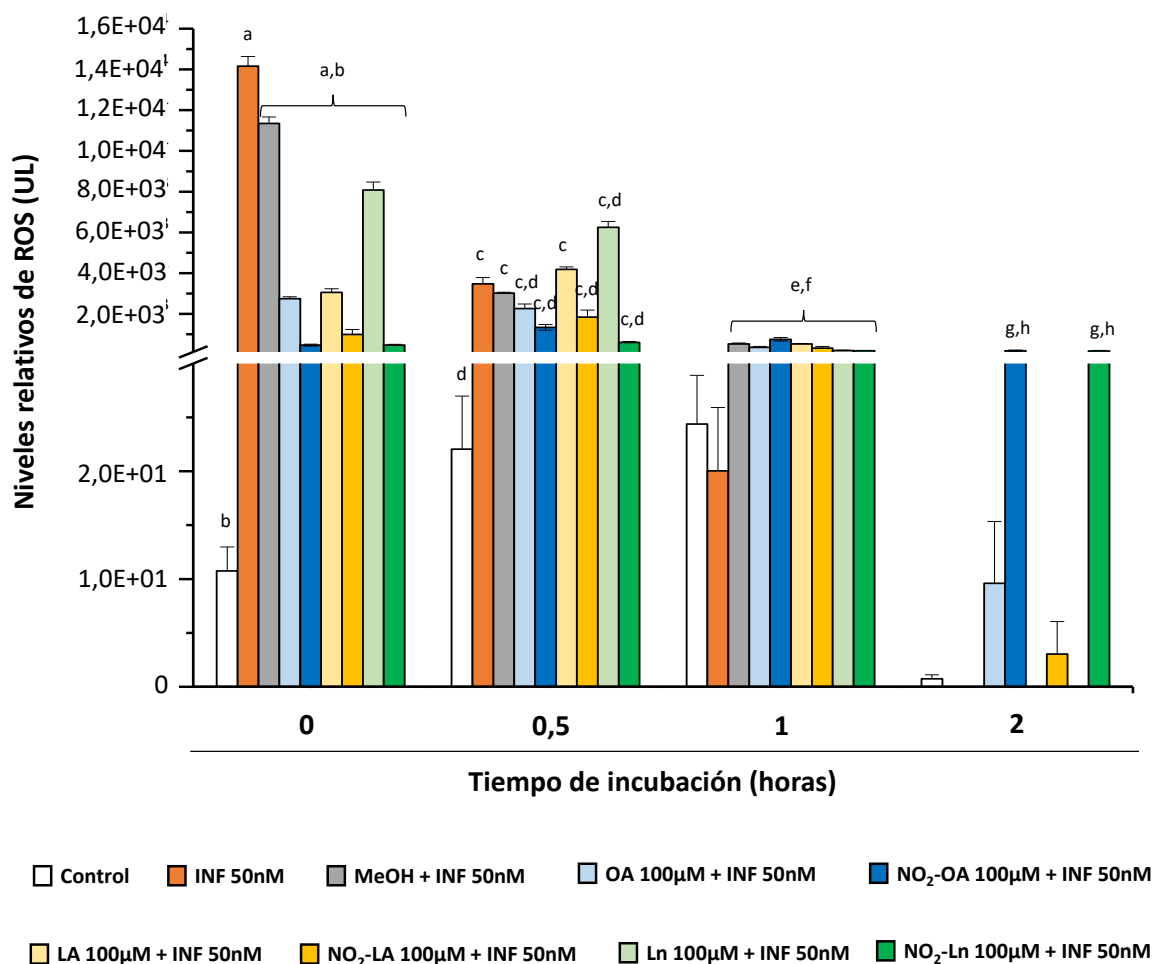


Figura 77. Niveles de especies reactivas de oxígeno de los cultivos celulares de tabaco pretratados con 100 µM de NO₂-FAs e incubados posteriormente con infectina. En la figura se muestra la producción de ROS en células de tabaco que habían sido incubadas previamente durante 30 minutos con metanol (disolvente de los NO₂-FAs), con las formas no nitradas de los NO₂-FAs (ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolenico) o con los tres NO₂-FAs (NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln). A continuación, se añadió infectina (50 nM) y se monitorizaron los niveles de ROS extracelulares. Las letras a, c, e, y g indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control de cada tiempo de incubación; las letras b, d, f y h indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tratamiento con INF de las células de cada tiempo de incubación.

En la **figura 78**, se representa la viabilidad de las células de tabaco pretratadas con los diferentes NO₂-FAs e incubadas posteriormente con la otra elicitorina ensayada, la criptogenina (50 nM). En este caso, se realizaron los mismos controles negativos que en el ensayo de la INF, es decir, antes de añadir la CRY, las células se pretrataron con metanol o con las formas no nitradas de los NO₂-FAs durante 30 minutos. La CRY tuvo efectos nefastos sobre la viabilidad celular, ocasionando una muerte celular de aproximadamente el 50% a los 30 minutos de incubación. La misma respuesta se observó en las células que habían sido pretratadas con los controles negativos. En cambio, la preincubación de las células con 100 µM de los 3 NO₂-FAs resultó en la ausencia de muerte celular, con la excepción del pretratamiento con NO₂-LA, que supuso una disminución de la viabilidad tras una hora de incubación con CRY (**Fig. 78**).

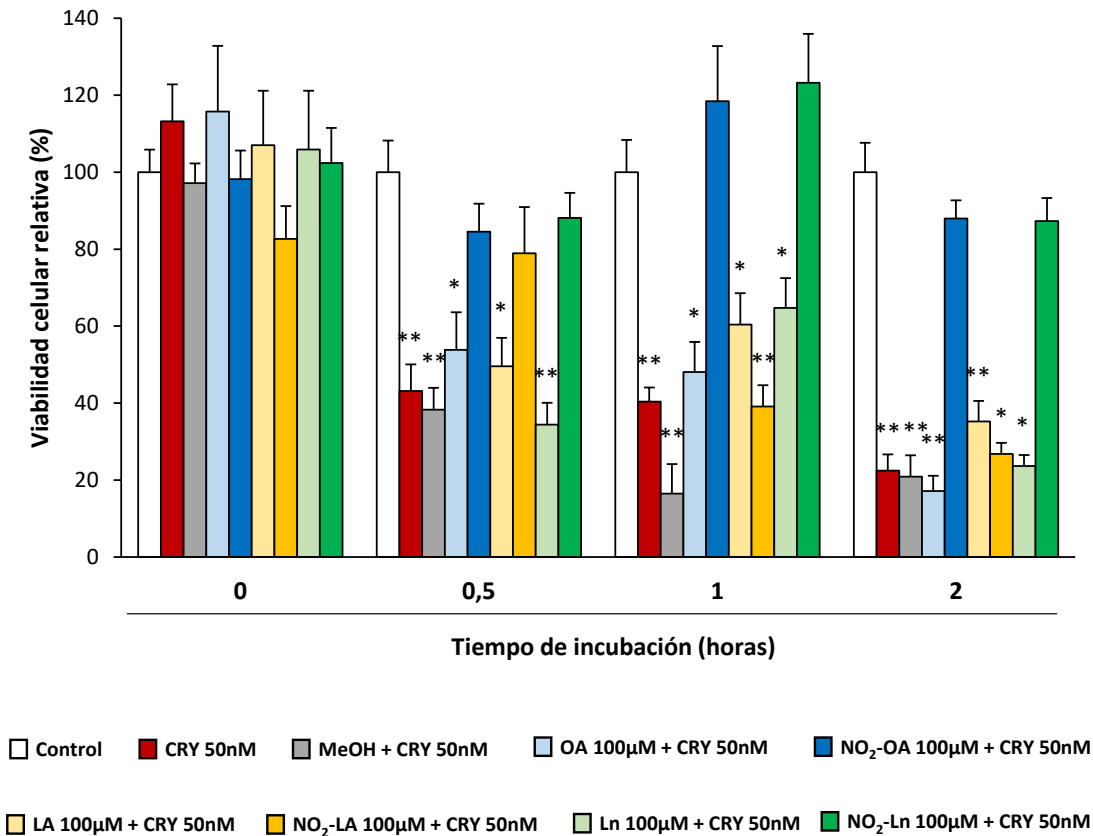


Figura 78. Viabilidad de los cultivos celulares de tabaco pretratados con 100 µM de NO₂-FAs e incubados posteriormente con criptogenina. En la figura se muestra la viabilidad de las células de tabaco que habían sido incubadas previamente durante 30 minutos con metanol (disolvente de los NO₂-FAs), con las formas no nitradas de los NO₂-FAs (ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolenico) o con los tres NO₂-FAs (NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln). A continuación, se añadió criptogenina (50 nM) y se monitorizó la viabilidad celular durante 2 horas. Las diferencias con respecto a los valores control fueron significativas a un p<0,05 (*) o un p<0,001 (**).

Otro efecto negativo de la CRY en las células de tabaco fue la elevada síntesis de ROS que desencadenó durante los primeros 30 minutos de incubación, aunque después, esos niveles fueron disminuyendo. Este comportamiento se replicó en las células pretratadas con metanol y con las formas no nitradas. En cambio, las células que habían sido preincubadas con NO₂-FAs, mostraron unos niveles de ROS mayores que los de las células control, pero 23000 veces menores que los de las células tratadas con CRY durante 30 minutos. En los siguientes tiempos de tratamiento, la preincubación con los NO₂-FAs no proporcionó ningún efecto protector frente a la CRY (**Fig. 79**).

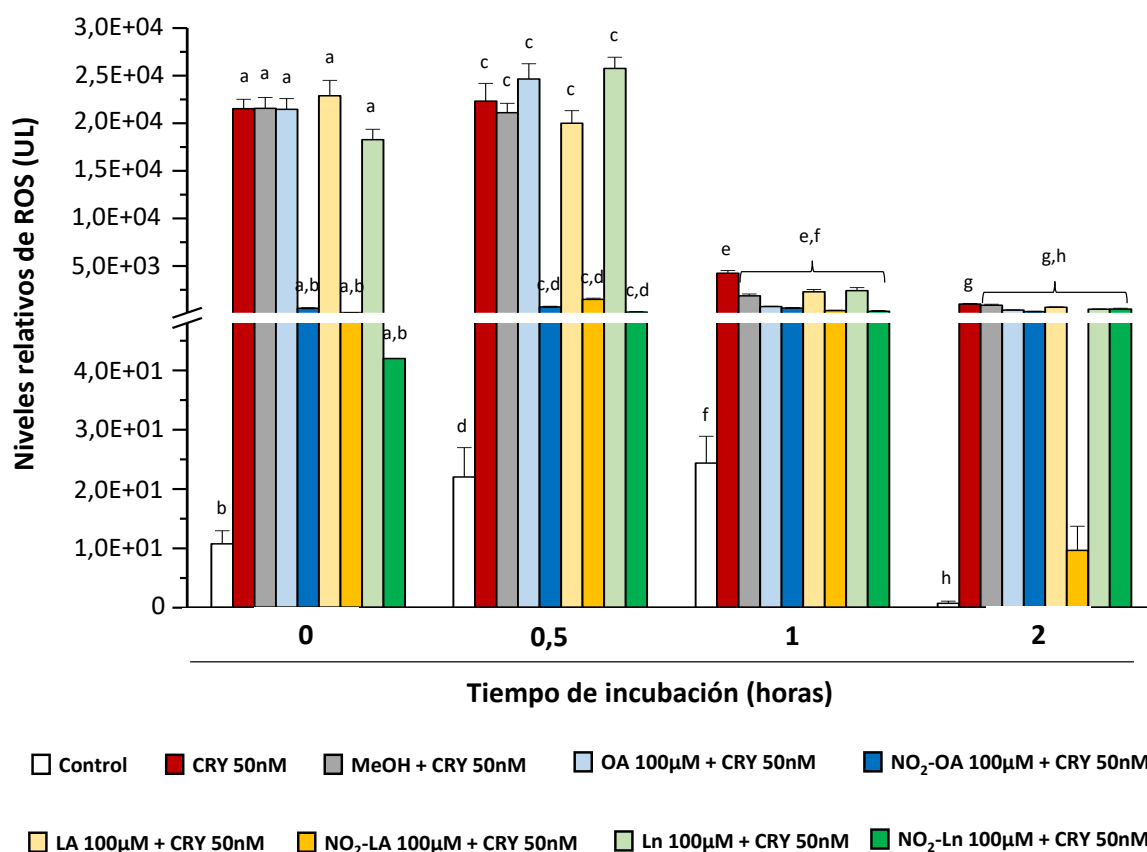


Figura 79. Niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los cultivos celulares de tabaco pretratados con 100 μM de NO_2 -FAs e incubados posteriormente con criptogenina. En la figura se muestra la producción de ROS en células de tabaco que habían sido incubadas previamente durante 30 minutos con metanol (disolvente de los NO_2 -FAs), con las formas no nitradas de los NO_2 -FAs [ácido oleico (OA), ácido linoleico (LA) y ácido linolenico (Ln)] o con los tres NO_2 -FAs (NO_2 -OA, NO_2 -LA y NO_2 -Ln). A continuación, se añadió criptogenina (50 nM) y se monitorizaron los niveles de ROS extracelulares. Las letras a, c, e, y g indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control de cada tiempo de incubación; las letras b, d, f y h indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tratamiento con CRY de las células de cada tiempo de incubación.

29. Papel señalizador de la nitroalquilación por NO_2 -OA de la proteína antioxidante Tsa1 en *Saccharomyces cerevisiae*

Hasta la fecha, sólo se había establecido la presencia de los NO_2 -FAs en animales y en plantas. En esta Tesis Doctoral se ha identificado por primera vez la presencia de NO_2 -OA en células de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, se ha hecho un análisis profundo del papel que desempeña el NO_2 -OA en la respuesta antioxidante de estos organismos a través de la nitroalquilación de la Tsa1. Para llevar a cabo estos trabajos, se han abordado estudios *in vitro* mediante el uso de una proteína recombinante y se han realizado estudios *in vivo* sometiendo las levaduras a un estrés por choque térmico.

29.1. Caracterización de la actividad enzimática de Tsa1 en el estrés por choque térmico

Para abordar este objetivo, en primer lugar, se estudió si la situación de estrés modificaba el estado oxidativo de las células, por este motivo se analizaron los niveles de un marcador típico de estrés oxidativo, el peróxido de hidrógeno. Estos resultados mostraron un aumento en los niveles de H_2O_2 de hasta 10 veces en la situación de estrés con respecto al control (**Fig. 80: Panel A**). Por otra parte, se ensayó la actividad enzimática de la peroxirredoxina Tsa1 a nivel espectrofotométrico. Nuestros resultados mostraron un aumento en la actividad de la Tsa1 de aproximadamente un 30% en la situación de estrés. No obstante, mediante pruebas de inmunoblot, se descartó que ese aumento fuera consecuencia de la estimulación de la transcripción proteica, pues no afectaba al contenido en proteína (**Fig. 80: Panel B**). Por tanto, el estrés por choque térmico generaba un aumento de la actividad de la Tsa1 que no estaba asociado a un incremento en la expresión de la proteína, por lo que podría ser debido a una modificación post-traducciona.

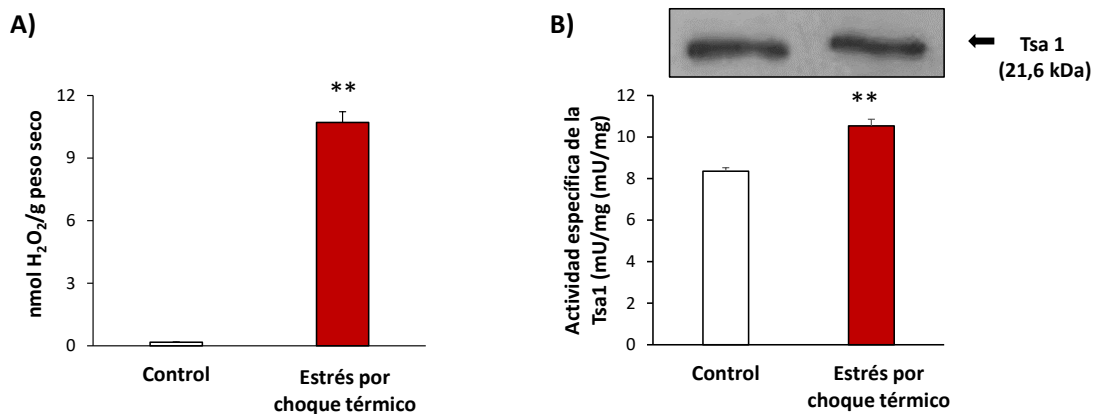


Figura 80. Caracterización del estrés por choque térmico a 37°C durante 1 hora en cultivos de levadura en fase exponencial de crecimiento (DO=0,6). A) Contenido en H_2O_2 . B) Actividad específica de la Tsa 1 e inmunoblot de la Tsa1. Se sometieron 20 μ g de proteína a SDS-PAGE, posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF que se incubaron con un anticuerpo frente a la Tsa 1 (1:500). Las diferencias fueron significativas cuando $p < 0,001$ (**).

29.2. Detección y cuantificación de los niveles de NO_2 -OA endógeno y en la situación de estrés

Los NO_2 -FAs están estrechamente relacionados con el estrés por choque térmico, ya que tanto en animales como en plantas se han identificado como inductores de genes relacionados con la respuesta al choque térmico (Kansanen et al. 2009a; Mata-Pérez et al. 2016d). Por esta razón, en esta Tesis Doctoral, se abordó la identificación de la presencia endógena de NO_2 -OA en levaduras. Para ello, se realizó una extracción de lípidos en las muestras (control y estrés) que se analizaron mediante LC-MS/MS monitorizando la transición MRM 326/46 (m/z) correspondiente al NO_2 -OA. En este sentido, cabe señalar que las muestras de levadura presentaron un pico cromatográfico con la transición MRM anteriormente indicada que, además, compartía tiempo de retención con el patrón de NO_2 -OA utilizado (**Fig. 81**).

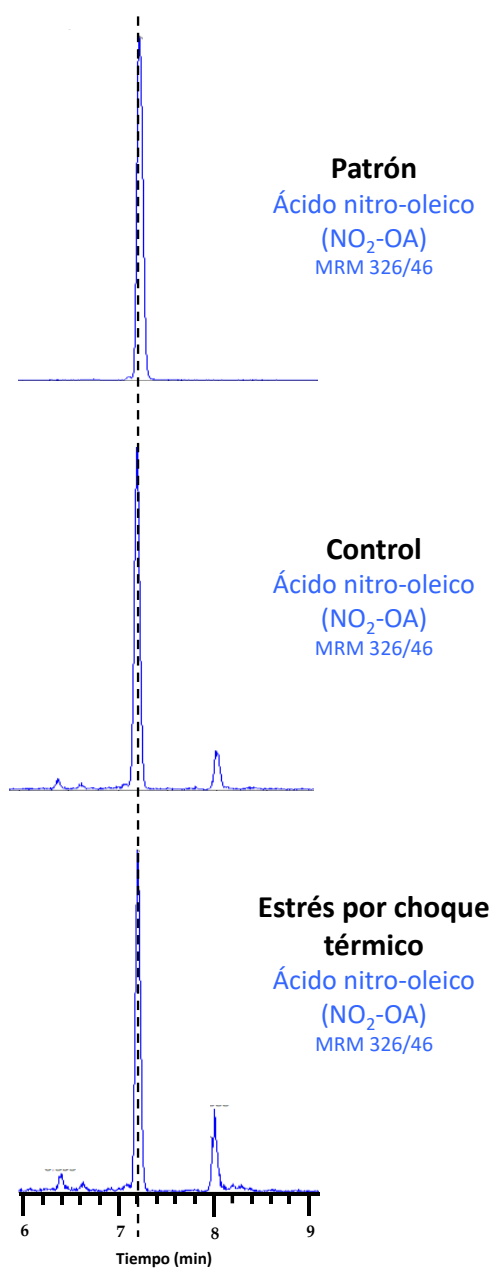


Figura 81. Picos cromatográficos correspondientes al patrón de NO₂-OA y su detección endógena en las muestras control y de estrés por choque térmico de levadura. La línea vertical punteada indica picos con el mismo tiempo de retención.

Tras demostrar la presencia del NO₂-OA, se cuantificaron sus niveles en las muestras control y de estrés mediante LC-MS/MS. La situación de estrés por choque térmico provocó un aumento significativo (aproximadamente un 35%) en los niveles de NO₂-OA, con respecto a la situación control (**Fig. 82**).

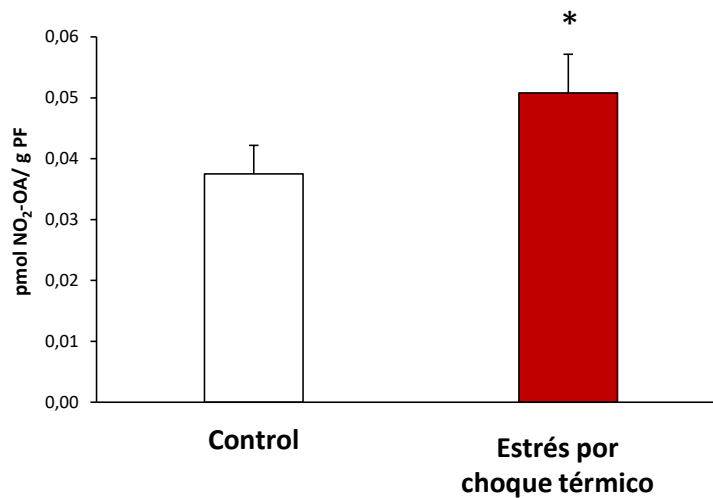


Figura 82. Niveles endógenos de NO₂-OA detectados por LC-MS/MS en muestras control y de estrés por choque térmico de levaduras. Los valores de NO₂-OA son la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Las diferencias fueron significativas cuando $p < 0,05$ (*).

29.3. Efecto del NO₂-OA sobre la actividad enzimática de la Tsa1

Los NO₂-FAs pueden modular la actividad de las enzimas mediante una modificación postraduccional denominada nitroalquilación que consiste en la aducción de la molécula lipídica nitrada con residuos de cisteína, lisina o histidina. Adicionalmente, los NO₂-FAs pueden actuar como donadores de NO, el cual, a su vez, puede S-nitrosilar las proteínas (Geisler and Rudolph 2012b; Mata-Pérez et al. 2016b). Con el objeto de dilucidar el efecto que tenía el NO₂-OA sobre la actividad enzimática de la Tsa1, se incubó su proteína recombinante con NO₂-OA a un ratio de concentración proteína:NO₂-OA de 1:10. Los controles negativos consistieron en el tratamiento de la proteína con metanol, como disolvente del NO₂-OA, y con ácido oleico, como forma no nitrada.

El tratamiento de la Tsa1 recombinante con NO₂-OA generó una disminución de aproximadamente un 70% en la actividad enzimática de la proteína. En cambio, en los tratamientos con metanol y OA no originaron cambios significativos con respecto al control. Para discriminar si esta disminución en la actividad enzimática era consecuencia de la S-nitrosilación de la proteína por el NO liberado por el NO₂-OA, la Tsa1 recombinante se trató con un secuestrador de NO (cPTIO) y NO₂-OA. La ausencia de cambios significativos con respecto al tratamiento exclusivo con NO₂-OA, confirmó que la Tsa1 recombinante no estaba sufriendo S-nitrosilación (**Fig. 83**).

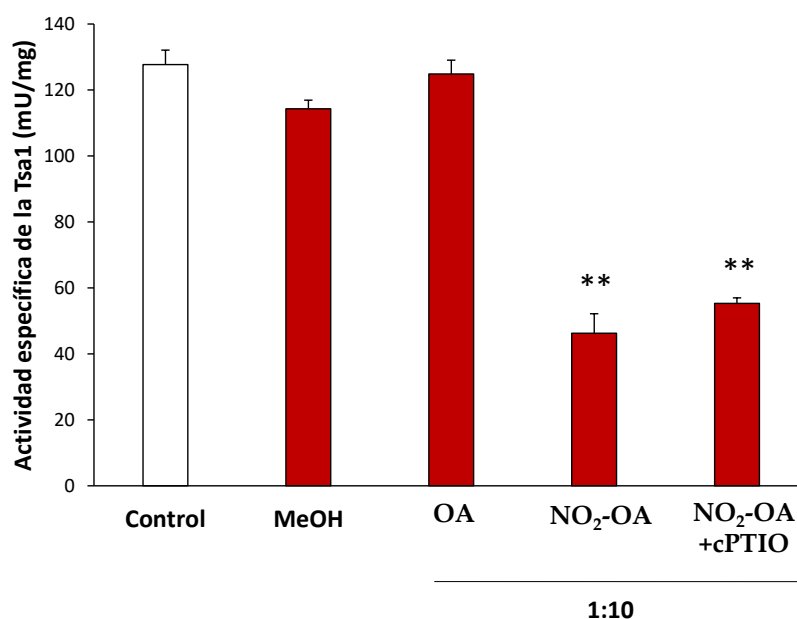


Figura 83. Efecto del tratamiento con NO₂-OA sobre la actividad enzimática de la peroxirredoxina Tsa 1. En el gráfico se muestra la actividad enzimática de la Tsa1 tras el tratamiento con metanol (MeOH, solvente del NO₂-OA); con ácido oleico (OA, forma no nitrada del NO₂-OA) y con NO₂-OA. Los dos últimos tratamientos se realizaron a una relación de concentración (proteína: NO₂-OA u OA) de 1:10. También se muestra el efecto de la incubación de la proteína con cPTIO (secuestrador de NO) antes de adicionar el NO₂-OA (proporción 1:10). El doble asterisco (**) indica diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al control.

29.4. Caracterización de la nitroalquilación de la Tsa 1 recombinante de levadura

Después de demostrar que la modulación negativa de la actividad de la Tsa1 no se debía a una modificación por S-nitrosilación, se exploró si la PTM por nitroalquilación podía ser la causante. Casualmente, en base a su estructura primaria, la Tsa1 podría ser una diana de nitroalquilación, dada la presencia en su secuencia de aminoácidos como cisteína, histidina y lisina, que son residuos nucleofílicos susceptibles de aductarse con NO₂-OA. El análisis por nanoLC-MS/MS de los péptidos generados tras la tripsinación de la Tsa1 recombinante tratada con NO₂-OA permitió detectar la Tsa1 con una cobertura del 100 %. En el caso específico del péptido TFVCPTEIIAF los espectros de MS/MS de la secuencia no modificada (MH⁺: 1240,6293) coincidieron estrechamente con el patrón de fragmentación de MS/MS del péptido nitroalquilado (MH⁺: 1567,8674). Sin embargo, el péptido nitroalquilado presentó un incremento de masa en el ión fragmentado b₄ (778.4395 Da), que no apareció en el mismo ión (451.2006 Da) del péptido no modificado. El incremento se correspondía con el peso molecular del NO₂-OA (327 Da) y confirmaba la unión del ácido graso nitrado al residuo de cisteína. La aducción del NO₂-OA al péptido nitroalquilado incrementó su apolaridad, por lo que su tiempo de retención (RT) aumentó a 104,57 min mientras que el tiempo cromatográfico del péptido no modificado fue de 66,49 min (**Fig: 1, Anexo II**).

El comportamiento descrito anteriormente también se detectó para otros péptidos que aparecen en la **Tabla 16**. De esta forma, las cisteínas 48 y 171 y las histidinas 105 y 136 se identificaron como dianas susceptibles a la nitroalquilación por NO₂-OA.

Tabla 16. Detección por nanoLC-MS/MS de los péptidos nitroalquilados de la Tsa1 recombinante tratada con NO₂-OA e identificación de los residuos diana de la aducción con NO₂-OA. La posición de la diana de nitroalquilación se destaca en rojo y minúscula.

Péptidos nitroalquilados de la Tsa1	Diana de nitroalquilación
TFVcPTEIIAF	Cys 48
AFIPLAFTFVcPTEIIAF	
AFTFVcPTEIIAF	
TDKNGTVLPCNW	Cys 171
TDKNGTVLPCNWTPGAATIKPTVEDSKEY	
QWTDKNGTVLPCNW	
LADTNhSLSRDY	His 105
ADTNhSLSRDY	
LADTNhSL	
IIDPKGVIrhITINDLPVGRNVDEAL	His 136

29.5. Cuantificación relativa de las dianas de nitroalquilación de la Tsa1 recombinante

Después de identificar las dianas de nitroalquilación tras el tratamiento de la Tsa1 recombinante con NO₂-OA, se llevó a cabo la cuantificación relativa de los residuos nitroalquilados en función del PSM detectadas después de realizar una búsqueda dirigida en el espectrómetro de masas de los péptidos nitroalquilados y no modificados que contenían las dianas de interés. La cisteína 171 y la histidina 105 fueron las dianas preferenciales, seguidas de la cisteína 48 y, por último, de la histidina 136, cuya nitroalquilación fue minoritaria (**Fig. 84**).

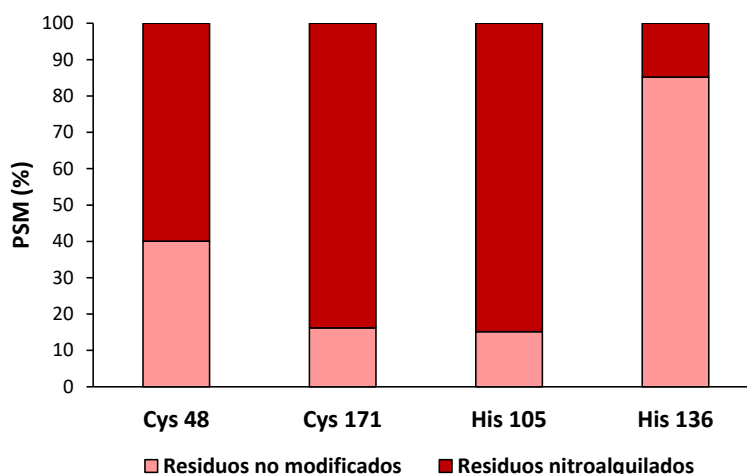


Figura 84. Cuantificación relativa de los residuos nitroalquilados de la Tsa1 tras el tratamiento con NO₂-OA. Esta figura muestra el porcentaje de PSM identificados para los residuos de Cys 48 y 171 y de His 105 y 136 en sus formas nitroalquilada y no modificada después de realizar una búsqueda dirigida por LC-MS/MS de los péptidos que contenían estos residuos.

29.6. Detección de la nitroalquilación *in vivo* de la Tsa1

La detección del efecto negativo de la nitroalquilación por NO₂-OA sobre la actividad enzimática de la Tsa1 recombinante junto con la detección, por primera vez en levaduras, de la presencia endógena de NO₂-OA, nos llevó a explorar la existencia de una modulación post-traducciona *in vivo* de la Tsa1 por nitroalquilación y el papel de dicha PTM durante el estrés por choque térmico.

Para ello, se buscaron en la situación *in vivo* las dianas de nitroalquilación que se han identificado y caracterizado previamente en el tratamiento *in vitro* de la Tsa1 recombinante con NO₂-OA. Desde un punto de vista espectrométrico, los péptidos que contenían las dianas de nitroalquilación mostraron parámetros específicos como el tiempo de retención cromatográfico (RT) y la m/z de su ión precursor. Utilizando esta información característica de los péptidos nitroalquilados, se realizó una búsqueda bioinformática dirigida de los espectros de los iones precursores (MS1) que aparecían a lo largo de la cromatografía de las situaciones control y de estrés (**Tabla 13**). De esta forma se determinó la presencia o ausencia de los péptidos nitroalquilados en las diferentes situaciones experimentales.

Tras realizar la búsqueda bioinformática de los péptidos nitroalquilados que se recogen en la **tabla 13**, únicamente se registró un péptido nitroalquilado en la muestra control y ninguno en la muestra de estrés. El péptido localizado fue el siguiente: AFIPLAFTFVcPTEIIAF, el cual contenía la cisteína 48 nitroalquilada. Ninguno de los demás péptidos nitroalquilados que se habían identificado en el tratamiento *in vitro* de la Tsa1 con NO₂-OA se encontraron en las situaciones *in vivo*. Además, el péptido tenía una intensidad (1,58E4) superior a la señal ruido (1,0E3) que presentaba la muestra (**Tabla 17**).

Tabla 17. Identificación *in vivo* de las dianas de nitroalquilación de la Tsa1. Se muestran los parámetros m/z y tiempo de retención del péptido que contiene a la Cys 48 nitroalquilada tanto en la muestra *in vitro* (Tsa1 recombinante tratada con NO₂-OA) como en las muestras de control y estrés por choque térmico.

Diana de nitroalquilación	Patrón de nitroalquilación: Tsa1 recombinante tratada con el NO ₂ -OA			Nitroalquilación endógena en el control			Nitroalquilación endógena en el estrés por choque térmico		
	Péptido nitroalquilado	m/z	RT	m/z	RT	Intensidad	m/z	RT	Intensidad
Cys 48	AFIPLAFTFVcPTEIIAF	1164,65	117,63	1164,62	117,7	1,58E4	ND		

Discusión

30. Caracterización e identificación de los NO₂-FAs endógenos en *Arabidopsis thaliana*

Las moléculas de señalización generadas por la interacción entre especies reactivas de nitrógeno y ácidos grasos insaturados, conocidas como ácidos grasos nitrados, se han convertido en los últimos 5 años en una importante y emergente área de conocimiento. En sistemas animales, se ha identificado la presencia endógena de NO₂-OA, NO₂-LA, NO₂-CLA y NO₂-AA (Balazy and Poff 2004; Baker et al. 2004; Tsikas et al. 2011). En sistemas vegetales, los primeros indicios de la existencia de estas moléculas se obtuvieron en el fruto del olivo y en el aceite de oliva virgen extra, donde concretamente se identificó la presencia de NO₂-OA y NO₂-CLA aductados con cisteínas (Fazzari et al. 2014). Actualmente, se conoce que los NO₂-FAs en el reino vegetal tienen una distribución amplia y ubicua, ya que se ha identificado la presencia endógena del NO₂-Ln en diferentes especies vegetales como *Arabidopsis thaliana* (Mata-Pérez et al. 2016d), *Pisum sativum*, *Oryza sativa* (Mata-Pérez et al. 2017) y de NO₂-OA en *Solanum lycopersicum* (Di Palma et al. 2020) y *Brassica napus* (Vollár et al. 2020a).

La detección de estas moléculas ha constituido y sigue siendo un desafío muy importante en ciencia ya que, debido a su baja abundancia, se requieren tecnologías de muy alta sensibilidad. En este sentido y, gracias al avance de la tecnología de espectrometría de masas, se ha podido detectar en esta Tesis Doctoral, por primera vez, la presencia endógena de NO₂-OA y NO₂-LA en *Arabidopsis thaliana*. Además, se ha corroborado la presencia de NO₂-Ln ya descrita anteriormente por este grupo de investigación (**Fig. 36**).

La cuantificación de los niveles de los tres NO₂-FAs identificados en *Arabidopsis* permitió destacar al NO₂-Ln como el más abundante, mientras que los NO₂-LA y NO₂-OA estaban en menor concentración y se encontraban en niveles similares (**Fig. 37**). Estos resultados coinciden con la disponibilidad de los correspondientes ácidos grasos insaturados precursores presentes en *Arabidopsis*, los cuales pueden ser susceptibles de nitrarse y formar los NO₂-FAs. Así, en el perfil lipídico de esta especie vegetal, el ácido linolénico es el mayoritario en las hojas y representa casi un 50 % del total de ácidos grasos presentes. El segundo en abundancia es el Ln y, finalmente, el OA (Bonaventure et al. 2003; Tjellström et al. 2012).

31. Principales depósitos celulares de los NO₂-FAs

La adición del grupo nitro a los ácidos grasos insaturados, convierte a los NO₂-FAs en potentes moléculas electrofílicas que pueden aductarse con proteínas. Además, los NO₂-FAs, al igual que sus formas no nitradas, también se encuentran esterificados con lípidos más complejos. Por tanto, las proteínas y los lípidos complejos pueden considerarse depósitos de NO₂-FAs (Schopfer et al. 2011; Grippo et al. 2021).

En sistemas animales, se ha identificado un conjunto de proteínas susceptibles de unirse a los NO₂-FAs (**Tabla 5**) y, además, se ha señalado a los triacilglicéridos como su principal almacén lipídico (Fazzari et al. 2017).

Sin embargo, en sistemas vegetales la identificación de los almacenes de los NO₂-FAs es un área de conocimiento completamente desconocida. En esta tesis Doctoral, los análisis de MS/MS llevados a cabo en plántulas de *Arabidopsis* de 14 días, nos han permitido identificar los depósitos celulares de NO₂-FAs en esta especie vegetal. De esta manera, se ha identificado la presencia de NO₂-OA, NO₂-LA y

NO₂-Ln unidos a proteínas y a lípidos complejos como los ésteres de fitoesteroles, triacilglicéridos y fosfolípidos (**Fig. 40**).

Entre la variedad de depósitos que presentan los NO₂-FAs, los fosfolípidos destacan como reservorio principal de los tres NO₂-FAs, en especial de NO₂-Ln (**Fig. 40**). Los fosfolípidos están compuestos por una molécula de alcohol a la que unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato, lo que los convierte en moléculas anfipáticas capaces de generar bicapas lipídicas. Por este motivo, son componentes esenciales de las membranas biológicas y predominan concretamente en las membranas extraplásticas como son las membranas plasmáticas y mitocondriales. En cambio, la presencia de fosfolípidos es más escasa en las membranas fotosintéticas (Nakamura 2017; Joyard et al. 1998).

Atendiendo a la molécula que se une al grupo fosfato, es posible establecer familias de fosfolípidos como: la fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI). En base a nuestros resultados, los NO₂-FAs estaban presentes en todas las clases de fosfolípidos anteriormente mencionadas, aunque mostraron diferentes abundancias. Generalmente, la fosfatidilserina despuntó como el principal almacén de los 3 NO₂-FAs, esta afirmación es especialmente aplicable al NO₂-Ln, cuyos niveles de esterificación detectados en PS fueron muy elevados. En el caso de los demás fosfolípidos, se encontraron niveles más bajos que los detectados en la fosfatidilserina y similares para los tres NO₂-FAs (**Fig. 38**). La abundancia de los NO₂-FAs en cada clase de fosfolípido no se corresponde con la representación de cada uno de ellos en las membranas celulares. En este sentido, la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina son los principales fosfolípidos de las membranas vegetales, mientras que la fosfatidilserina representa entre un 10 y un 20% de total de fosfolípidos y el fosfatidilinositol, menos del 10% (Platre et al. 2019; Reszcyńska and Hanaka 2020).

Otros depósitos menos representativos de los NO₂-FAs en las plántulas de 14 días fueron los triacilglicéridos (TAG) y los mono y diacilglicéridos (DAG) (**Fig. 38**). Los TAGs son el resultado de la unión de tres ácidos grasos con una molécula de glicerol y actúan principalmente como reserva energética de apoyo para el crecimiento de las plántulas jóvenes, en especial durante las primeras etapas de la germinación (Xu and Shanklin 2016). Además, los mono y los diacilglicéridos más concretamente, son los precursores comunes de los triacilglicéridos y de los lípidos de membrana (fosfolípidos). En las hojas, la mayoría de los DAG participan en la síntesis de lípidos de membrana que se utilizarán para el crecimiento y la proliferación celular y para mantenimiento de las membranas (Bates and Browse 2011).

Los ésteres de fitoesteroles (SE) constituyeron el almacén lipídico más residual de NO₂-FAs en las plántulas de 14 días (**Fig. 38**). Los SE se forman por unión de un ácido graso a un fitoesterol a través de un enlace éster. Entre los fitoesteroles mayoritarios de *Arabidopsis* se encuentran el β -sitosterol, el estigmasterol y el campesterol (Moreau et al. 2018). Estas moléculas se localizan en las membranas plasmáticas y cuya función es mantener la homeostasis de fitoesteroles en la membrana, ya que estas moléculas, junto a los fosfolípidos y los esfingolípidos, son los componentes esenciales de la membrana plasmática vegetal (Hartmann 2004).

Además de almacenarse en lípidos, los NO₂-FAs también se aductan con proteínas, siendo éstas una fuente importante de NO₂-FAs, ya que en ellas se han detectado niveles similares a los cuantificados en los TAG de las plántulas de *Arabidopsis* de 14 días (**Fig. 38**).

En definitiva, los NO₂-FAs se localizan principalmente en las biomembranas, donde se encuentran esterificados en fosfolípidos y en ésteres de fitoesteroles. La presencia de los NO₂-FAs en las biomembranas puede modular las propiedades físicas de las mismas e incluso influir indirectamente

en las proteínas transmembrana. En un estudio reciente se evaluó el efecto de la presencia de NO₂-FAs en las biomembranas y para ello se trató una membrana modelo con NO₂-OA. Los investigadores comprobaron que los NO₂-FAs alteraban la organización de los lípidos de la membrana como consecuencia de la formación de agrupaciones en la interfase membrana-agua. Esta reorganización de la bicapa lipídica también modulaba la estructura y función de las proteínas que se encontraban asociadas a la membrana (Franz et al. 2017).

32. Biodistribución de los almacenes lipídicos y proteicos de los NO₂-FAs durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

Tras analizar y cuantificar los niveles de NO₂-FAs en los diferentes reservorios lipídicos y en los depósitos proteicos, se estudió cómo se modulaban dichos almacenes durante el desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis*. Para ello, se utilizó material vegetal en diferentes estadios de desarrollo que abarcaron desde semillas hasta plántulas de 5 y 14 días, para caracterizar el crecimiento temprano, hojas y raíces de plántulas obtenidas en condiciones de cultivo hidropónico, para estudiar los eventos de desarrollo de la hoja y la flor y, finalmente, plántulas en fase de maduración de las silicuas y en senescencia.

El desarrollo de las plantas comienza en la semilla. Este material vegetal contiene más de un 60% de contenido lipídico, aunque además contiene hidratos de carbono y proteínas (Bewley and Black 2013). Los lípidos más abundantes en semilla son los triacilglicéridos y los ésteres de fitoesteroles. Ambos almacenes se movilizan durante la germinación para facilitar el crecimiento de las plántulas en sus primeras etapas (Harker et al. 2003). Nuestros resultados demostraron que la participación de los NO₂-FAs en las semillas es amplia y ubicua, ya que están presentes en todos los tipos de almacenes tanto lipídicos como proteicos descritos en el anterior apartado. El NO₂-Ln es mayoritario en casi todos los almacenes, en especial en los ésteres de fitoesteroles y en la fosfatidilcolina, donde representan más del 90% del total de los NO₂-FAs. Sin embargo, en otros almacenes, como la fosfatidilcolina y las proteínas, tanto el NO₂-LA como el NO₂-Ln tuvieron una misma representación y en los triacilglicéridos, el NO₂-LA fue ligeramente mayoritario. Por el contrario, el NO₂-OA no presentó una preponderancia clara en ninguno de los depósitos (**Fig. 41**) (**Tabla 14**). Anteriormente, se ha descrito la participación de cada NO₂-FA en los almacenes de las semillas, pero si se analiza cuál o cuáles son los almacenes donde se localiza una mayor concentración de NO₂-FAs, cabe mencionar que en las semillas los almacenes de TAG, SE y PS son los que contenían la mayoría de NO₂-FA. Concretamente, el 50% del NO₂-OA, el 35% del NO₂-LA y el 60% del NO₂-Ln se encontraban esterificados con los SE, siendo este el principal almacén de NO₂-FAs en las semillas. También es destacable el contenido de NO₂-OA y NO₂-LA en los TAG y del NO₂-Ln en la fosfatidilserina (**Fig. 43**) (**Tabla 14**).

La siguiente etapa de crecimiento a estudiar comprende plántulas de 5 días constituidas por una radícula, un hipocótilo y dos cotiledones completamente abiertos. Durante la germinación de la semilla, la planta obtiene la energía necesaria para desarrollar sus estructuras fotosintéticas mediante la degradación de los TAG, a través de los cuales se sintetizan carbohidratos por el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis (Graham 2008). También, se ha descrito una movilización de los SE que van a participar en el desarrollo de las membranas (Harker et al. 2003). En esta etapa de crecimiento se detectó la ausencia del NO₂-LA en fosfatidilcolina y en fosfatidiletanolamina, en cambio, en los demás almacenes se encontró el mismo patrón de dominancia descrito en semillas (**Fig. 41**) (**Tabla 14**). Sin embargo, sí que se pueden señalar cambios si se analiza el contenido en NO₂-FAs de los diferentes almacenes. En el caso del NO₂-OA y el NO₂-LA, las proteínas emergieron como el almacén preferencial, mientras que la fosfatidilserina lo fue para el NO₂-Ln (**Fig. 43**) (**Tabla 14**).

Las plántulas de 14 días se caracterizan por la aparición de las primeras hojas, que se disponen en forma de roseta. Los diacilglicéridos (DAG) son moléculas precursoras tanto de los TAG como de los fosfolípidos. Durante esta etapa de crecimiento vegetativo, la mayor parte de los DAG son utilizados para el ensamblaje de lípidos de membrana en aras de la biogénesis celular, la expansión y el mantenimiento de la membrana (Bates and Browse 2012). En consecuencia, los TAG no se acumulan en cantidades significativas (Xu and Shanklin 2016). La distribución de los NO₂-FAs en las plántulas de 14 días fue muy similar a la observada en las de 5 días, aunque con algunas diferencias como es la presencia de NO₂-LA en la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. Es importante resaltar que, por primera vez, el NO₂-OA tuvo una presencia mayoritaria en la fosfatidilcolina y el fosfatidilinositol (**Fig. 41**) (**Tabla 14**). La fosfatidilserina continuó siendo el almacén donde se encontraba la mayor cantidad de NO₂-Ln, pero, además, este almacén junto con las proteínas fueron los principales reservorios del NO₂-LA. Sin embargo, el NO₂-OA presentó una distribución homogénea entre los diferentes depósitos (**Fig. 43**) (**Tabla 14**).

En la siguiente etapa de crecimiento, las plántulas presentaron un crecimiento vegetativo más avanzado con una roseta completa constituida por su número máximo de hojas. El material vegetal utilizado para estos estudios fueron las hojas de plántulas de 24 días crecidas en cultivos hidropónicos. El NO₂-OA fue predominante en todos los fosfolípidos con excepción de la fosfatidilserina. Este almacén, junto con los SE, los TAG y los MAG-DAG presentaron una mayor participación del NO₂-Ln. En cambio, en la fracción proteica, el NO₂-LA fue predominante (**Fig. 41**) (**Tabla 14**). Si analizamos cuál de los almacenes presentó una mayor concentración de NO₂-FAs, encontramos que en el caso del NO₂-OA continuaba existiendo una distribución homogénea, la fosfatidilserina concentraba la mayoría del NO₂-Ln mientras que el NO₂-LA se encontraba esterificado abundantemente en proteínas (**Fig. 43**) (**Tabla 14**).

La etapa de floración (34 días) en Arabidopsis implica el desarrollo de las estructuras de reproducción sexual. Estos procesos modulan principalmente el almacén proteico, donde existe un reparto igualitario entre los 3 NO₂-FAs, también suponen un cambio brusco en la fosfatidilcolina donde el NO₂-OA pasa a ser el minoritario con respecto a los demás NO₂-FAs (**Fig. 41**) (**Tabla 14**). Las proteínas son los reservorios donde encontramos una mayor concentración de NO₂-OA y NO₂-LA, en cambio, el NO₂-Ln continúa almacenándose en la fosfatidilserina (**Fig. 43**) (**Tabla 14**).

Tras la etapa de floración, la planta rápidamente inicia la formación del fruto que en Arabidopsis se llama silicua. Este fruto es una vaina alargada que alberga las semillas. El material vegetal utilizado para estos estudios fueron las hojas de plántulas de 36 días crecidas en cultivos hidropónicos. Estas muestras presentaron un dominio casi completo del NO₂-OA en la fosfatidiletanolamina, también se detectó en otros almacenes, como los TAG, los MAG-DAG y la PC, aunque no de forma tan prominente. En cambio, el NO₂-LA tuvo una representación principal en los SE y en las proteínas y el NO₂-Ln en la PS (**Fig. 41**) (**Tabla 14**). Por otra parte, cuando se analizaron los almacenes con mayor contenido en cada NO₂-FA, se comprobó que el NO₂-OA se repartía entre los diferentes almacenes lipídicos y proteicos, el NO₂-LA se acumulaba en proteínas, PS y PI y el NO₂-Ln estaba casi completamente esterificado con la PS (**Fig. 43**) (**Tabla 14**).

La última etapa de estudio y del desarrollo vegetal fue la senescencia, que supone la entrada de la planta en un estado de muerte celular programada. El material vegetal utilizado en este caso fueron las hojas de plántulas de 53 días crecidas en cultivos hidropónicos. Estas hojas presentaron un patrón de dominancia de los NO₂-FAs en los diferentes almacenes similar al descrito en la etapa anterior (**Fig. 41**) (**Tabla 14**). La mayor concentración de NO₂-Ln volvió a aparecer en la PS, mientras que para el NO₂-OA y el NO₂-LA, las proteínas fueron el reservorio mayoritario (**Fig. 43**) (**Tabla 14**). Es importante

resaltar que en las plantas senescentes los SE están altamente representados, sin embargo, no se observó un incremento significativo de los NO₂-FAs en este depósito (Harker et al. 2003).

En las raíces de las plantas de 24, 34, 36 y 53 días, el NO₂-Ln es el NO₂-FA mayoritario que vamos a encontrar. Este NO₂-Ln se almacena principalmente en la PS, mientras que los demás NO₂-FAs en las proteínas (**Fig. 42 y 43**) (**Tabla 14**).

En general, la distribución de los NO₂-FAs en los diferentes almacenes lipídicos y proteicos es amplia y ubicua, ya que está presente en la mayoría de los depósitos lipídicos y proteicos existentes en las células. Es importante destacar la fuerte preferencia del NO₂-Ln por esterificarse con la PS en la mayoría de las etapas de crecimiento con excepción de la semilla. La fosfatidilserina y el fosfatidilinositol son fosfolípidos aniónicos que, aunque son poco abundantes en las membranas, actúan como moléculas clave en rutas de señalización de gran variedad de procesos biológicos. Entre sus funciones biológicas, cabe mencionar su participación en el desarrollo post-embrionario a través del desarrollo de órganos y del meristemo de la inflorescencia de *Arabidopsis*. De hecho, se ha comprobado que en plantas mutantes en las que se interrumpía la expresión de un gen relacionado con la síntesis de PS, en concreto, el gen codificante de la fosfatidilserina sintasa 1 (PSS1), presentaban enanismo severo, órganos laterales más pequeños y un tamaño reducido del meristemo de la inflorescencia (Liu et al. 2013).

Además, la presencia de PS en la membrana controla de forma eficaz la localización y la actividad de las Rab GTPasas (Kulakowski et al. 2018) que son una clase de proteínas conservadas responsables del tráfico de vesículas en eucariotas a través de la generación de endomembranas, gemación de vesículas, transporte, anclaje y fusión de membranas (Bhuin and Roy 2014). Varios miembros de las Rab GTPasas vegetales participan en el crecimiento y el desarrollo, así como en las respuestas al estrés biótico y abiótico a través de vías de tráfico de endomembranas mediadas por vesículas (Yin et al. 2017; Uemura and Ueda 2014).

En *Arabidopsis*, PS está relativamente presente en raíces, donde se requiere para la citocinesis de la raíz, posiblemente porque ayuda a mediar el tráfico vesicular de carga requerido para la formación de la placa celular (Yamaoka et al. 2021).

En definitiva, los fosfolípidos aniónicos son capaces de modular las propiedades físicas de las membranas, como las cargas superficiales, la curvatura o la agrupación de proteínas. Además, al mediar las interacciones con numerosas proteínas asociadas a la membrana, son componentes clave en el establecimiento de la identidad y la dinámica de los orgánulos. Finalmente, los lípidos aniónicos también actúan como moléculas señalizadoras, ya que son los principales reguladores de muchos procesos celulares fundamentales, como la señalización y la división celular, el tráfico de membranas, el crecimiento celular y la expresión génica (Noack and Jaillais 2020).

Por tanto, la presencia del NO₂-Ln principalmente en la PS puede tener relación con su implicación en procesos de señalización de proteínas y de modulación de la estructura de la membrana. En cambio, los otros NO₂-FAs, el NO₂-OA y el NO₂-LA, se encontraron principalmente aductados con proteínas pudiendo modificar su estructura y afectar a su funcionalidad como en el caso de la actividad catalítica de los enzimas.

Anteriormente se ha definido el almacén preferencial para cada NO₂-FA en cada etapa de desarrollo, pero si se analizan los niveles totales de todos los NO₂-FAs en los depósitos lipídicos, cabe destacar una mayor abundancia de NO₂-Ln, mientras que los niveles de NO₂-OA y NO₂-LA fueron minoritarios y similares entre ambos. En términos generales, durante el desarrollo, los niveles de NO₂-

FAs esterificados con lípidos van disminuyendo, aunque existen algunas fluctuaciones que coinciden con etapas de desarrollo vegetativo, en concreto, en plántulas de 5 y 24 días. Este comportamiento que sucedía en hojas, se repitió en raíz (**Fig. 44**).

Por contra, los niveles totales de NO₂-FAs detectados en la fracción proteica fueron levemente más bajos, pero del mismo rango que los que presentaron el NO₂-OA y el NO₂-LA en los almacenes lipídicos. En las fases iniciales del desarrollo (semilla), se observaron niveles bajos, pero estos se incrementaron en la etapa de plántulas de 5 días y se mantuvieron hasta la floración. Después, los niveles disminuyeron, hasta alcanzar en plantas senescentes, abundancias similares a las descritos en semillas. En cambio, en raíces se detectaron niveles minoritarios y similares en las diferentes etapas de crecimiento (24, 34, 36 y 53 días) (**Fig. 44**).

Finalmente, si se consideran conjuntamente los niveles totales de NO₂-FAs procedentes de los almacenes proteicos y lipídicos, se observa el mismo comportamiento comentado anteriormente para los almacenes lipídicos (**Fig: 23**). En semillas, se encontraron niveles elevados de NO₂-FAs esterificados con lípidos más complejos, pero apenas hubo aducción con proteínas, lo cual podría resultar esperable, ya que la semilla es un material vegetal muy rico en lípidos y carbohidratos necesarios para sustentar la germinación y el desarrollo del embrión. Esto justifica que encontráramos los NO₂-FAs esterificados principalmente en lípidos de almacenamiento como los TAG y los SE. Durante el crecimiento vegetativo de la planta, que abarcaría el desarrollo y apertura de los cotiledones (plantas de 5 días), el desarrollo de las primeras hojas de la roseta (plántulas de 14 días), la formación completa de la roseta (hojas de 24 días) y la floración de la planta (hojas de 34 días), las proteínas y los fosfolípidos, en especial, la fosfatidilserina, pasaron a ser los principales almacenes de los NO₂-FAs. En estos casos, los NO₂-FAs pasaron a almacenarse en depósitos con una implicación funcional y de señalización, ya que su unión a proteínas puede modular la función de las mismas. Esta justificación también es aplicable a la unión de los NO₂-FAs a la fosfatidilserina, por tratarse de un fosfolípido señalizador que participa en la modulación de la membrana y que tiene capacidad de interactuar con proteínas. Tras la floración, los niveles de NO₂-FAs, tanto en los depósitos proteicos como lipídicos, disminuyeron como consecuencia del inicio de la senescencia. En esta etapa se reduce la capacidad fotosintética dado que las membranas tilacoidales del cloroplasto se degradan. Estas membranas pasan a estar formadas por glicolípidos y los ácidos grasos liberados por su degradación van a ocasionar una acumulación de TAG en las hojas senescentes (Kaup et al. 2002; Lin and Oliver 2008). Los fosfolípidos y los esteroides que vamos a encontrarlos en las membranas extraplásticas como la membrana plasmática, el tonoplasto y el retículo endoplásmico también disminuyen durante la senescencia. En el caso, de los fosfolípidos se produce un aumento de la actividad de las fosfolipasas que conducen a la degradación de las membranas, y en el caso de los esteroides la senescencia genera una acumulación de los ésteres de fitoesteroides (Wewer et al. 2011; Li et al. 2016). En síntesis, en la senescencia se produce una pérdida de la capacidad fotosintética de la planta, dado que se degradan las membranas tilacoidales del cloroplasto y disminuyen los niveles de clorofila. También se degradan las membranas extraplásticas, lo que reduce la fluidez de la membrana. Todo ello, conduce a una removilización de los nutrientes de la hoja a través de la acumulación de lípidos de almacenamiento como TAG y SE en las semillas (Li et al. 2016; Troncoso-Ponce et al. 2013). Estos procesos de removilización de lípidos desde la hoja hasta las semillas explicaría los niveles tan elevados de NO₂-FAs identificados en las semillas.

En resumen, los niveles de NO₂-FAs de los depósitos proteicos y lipídicos de *Arabidopsis* se vieron fuertemente influenciados por los acontecimientos que tenían lugar durante las diferentes etapas de desarrollo.

33. Identificación y caracterización de proteínas nitroalquiladas en *Arabidopsis thaliana*

La aducción de los NO₂-FAs con proteínas da lugar a una modificación post-traducciona conocida como nitroalquilación. Esta PTM representa el mecanismo primario por el cual los NO₂-FAs ejercen sus funciones biológicas. La presencia del grupo nitro en estas moléculas les confiere un marcado carácter electrofílico que les permite reaccionar con aminoácidos nucleofílicos, como la cisteína preferencialmente y, en ocasiones, con histidinas y lisinas proteicas, estableciendo aductos de Michael (Baker et al. 2007a). La unión del NO₂-FA a la proteína puede generar cambios en su estabilidad, en su estructura o en su función (Melo et al. 2019; Turell et al. 2018). Es importante resaltar que la reversibilidad de esta PTM le permite actuar como una vía de señalización selectiva, ya que las condiciones nitrooxidativas pueden afectar a la estabilidad de la nitroalquilación, provocando la oxidación del aducto de Michael. Este proceso resulta en la liberación del NO₂-FA y permite que la proteína recupere su estado inicial (Batthyany et al. 2006; Rudolph and Freeman 2009; Padilla et al. 2017a).

En sistemas animales, se ha caracterizado el efecto de la nitroalquilación sobre proteínas individualizadas, pero ha sido recientemente cuando se ha realizado un estudio de quimioproteómica en el que se trataron células vivas con NO₂-OA con la finalidad de caracterizar el proteoma susceptible a nitroalquilarse y así, poder conocer los modos de acción y las funciones celulares de los NO₂-FAs. Proteínas transmembrana, fundamentalmente localizadas en el retículo endoplásmico y en membranas nucleares, aparecieron nitroalquiladas junto con proteínas con gran implicación en el metabolismo de los lípidos y proteínas de transporte (Fang et al. 2021).

Sin embargo, en sistemas vegetales la detección de proteínas nitroalquiladas es un área de conocimiento no explorada y, hasta la fecha, no se ha descrito ninguna proteína nitroalquilada de origen vegetal ni en sistemas *in vitro* ni en condiciones *in vivo*.

La presencia de una PTM en un proteoma es bastante baja (menos del 1%) al tener una función señalizadora. Todo esto añadido a la ausencia de un método que permitiera la detección de la nitroalquilación *in vivo* ha dificultado el estudio del perfil de proteínas susceptibles a nitroalquilarse en plantas. Por este motivo, durante la realización de esta Tesis Doctoral se desarrolló un método de identificación de proteínas nitroalquiladas por espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS). La aducción de un nitrolípido a una proteína genera una serie de cambios estructurales y funcionales, entre los que destaca un incremento en la masa molecular de 322 Da si se une el NO₂-OA, de 324 Da si se une el NO₂-LA y de 327 Da si se une el NO₂-Ln. Además, la unión de un NO₂-FA, dado su carácter apolar, puede incrementar la hidrofobicidad de la molécula a la que se une, si bien es cierto que, en el caso de una proteína completa, apenas se modifica su hidrofobicidad debido a su mayor tamaño molecular con respecto al ácido graso nitrado. No obstante, está bien establecido que el análisis de las proteínas por espectrometría requiere la digestión proteolítica con el objeto de fragmentarla en sus péptidos constituyentes. En esta situación, se ha observado que la presencia del NO₂-FA unido al péptido proteico sí aumenta su hidrofobicidad con respecto al mismo péptido no nitroalquilado (Batthyany et al. 2006; Padilla et al. 2017a). Para corroborar este comportamiento y poner a punto un método de enriquecimiento que facilitara la detección de proteínas nitroalquiladas, se utilizaron extractos proteicos de cultivos celulares de *Arabidopsis* de 9 días tratados con 100 μM y 10 mM de NO₂-Ln. Como resultados de estos tratamientos, se identificaron en los extractos proteicos un total de 677 proteínas

susceptibles a nitroalquilarse con NO₂-Ln. La mayoría de las proteínas nitroalquiladas se localizaron en el citoplasma, el núcleo y el cloroplasto, donde participaban principalmente en procesos de respuesta al estrés, procesos biosintéticos, metabolismo de los ácidos nucleicos y desarrollo del organismo (**Fig. 45**).

A continuación, se identificó el perfil endógeno de proteínas nitroalquiladas por los tres NO₂-FAs en los cultivos celulares de Arabidopsis de 9 días, donde se evidenció que los tres NO₂-FAs presentaban el mismo perfil de nitroalquilación, ya que principalmente se modificaban proteínas relacionadas con procesos biosintéticos, de respuesta al estrés y procesos metabólicos relacionados con los ácidos nucleicos. Estas proteínas se localizaban mayoritariamente en el núcleo, el citoplasma y el cloroplasto (**Fig. 46**).

Dada la gran representación de proteínas nitroalquiladas en los procesos biológicos de respuesta al estrés y en los procesos biosintéticos, se analizó la modulación por nitroalquilación de algunas de ellas por medio de la utilización de sus correspondientes proteínas recombinantes. La fosfoglicerato quinasa (PGK), la triosa fosfato isomerasa (TPI), el enzima málico dependiente de NADP (EM-NADP) y la isocitrato deshidrogenasa (ICDH) fueron seleccionadas como representativas de los procesos biosintéticos. El tratamiento con los diferentes NO₂-FAs afectó negativamente la actividad enzimática de todas ellas (**Fig. 47-50**).

Por tanto, se puede afirmar que la nitroalquilación participa en la modulación de importantes procesos biosintéticos relacionados con la glucólisis o gluconeogénesis y con el ciclo de Calvin a través de la modificación de la PGK (Rosa-Téllez et al. 2018) y la TPI (Shih 1994). Esta PTM también influye en la fotosíntesis y en el contenido en poder reductor (NADPH) como consecuencia de la aducción con el EM-NADP (Drincovich et al. 2001) y la NADP-ICDH (Chen 1998). En el caso de la ICDH, se realizó un análisis más profundo con el objeto de esclarecer los mecanismos moleculares responsables del efecto negativo del tratamiento con NO₂-Ln sobre su actividad enzimática. Los análisis de MS/MS mostraron una serie de dianas susceptibles a nitroalquilarse que podrían ser las responsables de la pérdida de función de la enzima. El modelo *in silico* de la estructura cuaternaria de la ICDH, mostró que la unión del NO₂-FA a los residuos de cisteína 131 y a la histidina 135, podría ocasionar impedimentos estéricos perjudicando la unión del sustrato a los residuos de arginina 111 y 134 (residuos catalíticos) (**Fig: 29**).

En los procesos de respuesta al estrés juegan un papel muy importante las proteínas antioxidantes como responsables del control de los niveles de ROS, manteniendo así el equilibrio redox. El tratamiento con los NO₂-FAs moduló negativamente la actividad de las enzimas antioxidantes glutatión S-transferasa (GST), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX) (**Fig. 51-53**).

La glutatión S-transferasa es una enzima citoplasmática involucrada en la desintoxicación de sustancias por su conjugación con el glutatión, atenuando así el estrés oxidativo. Por tanto, es una enzima que se induce en respuesta a una amplia gama de condiciones de estrés, incluido el estrés biótico, ya que la inducción de la GST se correlaciona con la activación de la respuesta de resistencia sistémica en las infecciones por patógenos (Gullner et al. 2018). La aducción de esta proteína con NO₂-OA y con NO₂-LA disminuyó significativamente su actividad enzimática, mientras que el NO₂-Ln no generó cambios en su actividad (**Fig. 51**).

Otra importante enzima antioxidante detoxificante de H₂O₂ (Li et al. 2015) es la catalasa. Esta proteína también disminuyó su actividad al nitroalquilarse. Los análisis de MS/MS de la catalasa recombinante tratada con NO₂-Ln desvelaron la modificación de un conjunto de histidinas que podrían ser la causa principal de la disminución en la actividad enzimática, siendo la histidina 108 la más susceptible a nitroalquilarse. Sin embargo, el modelo *in silico* de esta proteína mostró que ninguno de

los residuos diana de nitroalquilación tenía implicación en la catálisis enzimática y tampoco estaban próximos a residuos catalíticos. La mayoría de los residuos nitroalquilados se localizaban en la periferia de la proteína pudiendo afectar a su conformación tridimensional (**Fig. 52**).

En la detoxificación del H₂O₂ celular, además de la catalasa, también participa la ascorbato peroxidasa. En concreto, la afinidad (K_m) de la APX por el H₂O₂ está en el rango de 100 μM, mientras que en las catalasas la K_m está en torno a 600 mM, lo que sugiere que la APX constituye la primera línea de defensa en la célula vegetal, no obstante, cuando los niveles de H₂O₂ se elevan, es la catalasa la que adquiere la función detoxificadora las ROS (Chelikani et al. 2004; Asada 1992). Nuevamente, la nitroalquilación mediada por el NO₂-Ln ocasionó la reducción de la actividad enzimática de la APX. Los residuos de histidina 43 y 163 fueron las principales dianas de nitroalquilación y su implicación directa en la catálisis justifica la afectación de la actividad enzimática ya que la histidina 43 se sitúa en el centro activo y la histidina 163 constituye un sitio de unión al metal requerido en la catálisis (**Fig. 53**).

En definitiva, la nitroalquilación mediada por los NO₂-FAs es una modificación post-traducional muy extendida que afecta mayoritariamente a proteínas presentes en el núcleo, el citoplasma y el cloroplasto y que jercen funciones catalíticas y de chaperona y que participan en procesos biosintéticos y de respuesta al estrés. En concreto, la unión de los NO₂-FAs afecta negativamente a la actividad enzimática de importantes proteínas enmarcadas en procesos biosintéticos y antioxidantes.

34. Perfil de proteínas nitroalquiladas durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

En el apartado 32 se determinó la modulación de los depósitos proteicos y lipídicos de los NO₂-FAs durante el desarrollo de *Arabidopsis*. A continuación, se van a establecer las implicaciones biológicas de las proteínas que se detectaron aductadas con los NO₂-FAs en cada una de las etapas de desarrollo.

En la semilla se identificó un número reducido de proteínas nitroalquiladas que se localizaban en el núcleo y participaban en procesos biosintéticos y de desarrollo (**Fig. 54 y 55**). Tal y como se ha mencionado anteriormente, la semilla es un material rico en lípidos y carbohidratos principalmente, es por ello que los niveles de NO₂-FAs aductados con proteínas han sido minoritarios en ellas. Este hecho se corrobora con una menor identificación de proteínas nitroalquiladas en estas muestras (**Fig. 43**).

En las etapas de crecimiento vegetativo de la planta, proceso que engloba la apertura de los cotiledones, el inicio de la roseta y la roseta completa se detectó un incremento en el número de proteínas nitroalquiladas con respecto a las semillas, incremento que también se observó en los niveles de NO₂-FAs procedentes de proteínas (**Fig. 43**). Estos niveles más elevados se mantuvieron en las diferentes etapas de desarrollo de la hoja (**Fig. 54**). Las proteínas nitroalquiladas identificadas durante estas etapas que engloban el desarrollo de las hojas están relacionadas fundamentalmente con procesos de respuesta al estrés, biosintéticos y de desarrollo, desempeñan funciones catalíticas y de chaperona y se localizan en el núcleo, el citoplasma y los cloroplastos, mayoritariamente (**Fig. 56-58**).

Tras el desarrollo de las hojas, la planta entra en el estado reproductivo a través de la formación de las flores. En esta etapa, las hojas de las plántulas de 34 días presentaron niveles elevados de NO₂-FAs procedentes de proteínas similares a los descritos en las etapas anteriores del desarrollo de las hojas (**Fig. 43**). Este incremento se tradujo en un número elevado de proteínas nitroalquiladas (**Fig. 54**) que se destinaban mayoritariamente a procesos relacionados con el desarrollo del organismo y la reproducción, mientras que los procesos de respuesta al estrés y biosintéticos, altamente representados en las etapas anteriores, pasaban a ser minoritarios. Sin embargo, aunque existió un

cambio en la función biológica de las proteínas, las funciones moleculares principales continuaron siendo las actividades catalíticas y de chaperona y el núcleo la localización subcelular mayoritaria de las proteínas nitroalquiladas (**Fig. 59**).

Finalmente, en las plántulas de 36 días y 53 días, que representan el estado de senescencia, se detectó un número minoritario de proteínas nitroalquiladas que estaba en consonancia con los niveles de NO₂-FAs detectados en proteínas (**Fig. 43 y 54**). Estas proteínas minoritarias estaban implicadas en procesos biosintéticos y en el desarrollo de la estructura celular y se localizaban mayoritariamente en el núcleo (**Fig. 60 y 61**).

El número de proteínas nitroalquiladas en raíces fue muy minoritario y similar al descrito en semillas. En lo referente a los niveles de NO₂-FAs aductados con proteínas, el comportamiento fue equivalente (**Fig. 43**) (**Tabla 15**).

En resumen, las proteínas nitroalquiladas detectadas estaban siempre relacionadas con los acontecimientos específicos de cada etapa de crecimiento de la planta. Así, en semillas, el número de proteínas nitroalquiladas fue minoritario debido a la escasez de proteínas y a la mayor abundancia en este material de lípidos y carbohidratos como fuente de energía para el desarrollo del embrión. En las etapas de crecimiento vegetativo, existió una mayor participación de las proteínas nitroalquiladas, que estaban implicadas sobre todo en procesos de biosíntesis y de respuesta al estrés. La nitroalquilación de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés, como son las proteínas antioxidantes, provocaba la inhibición de su actividad, tal y como han evidenciado los tratamientos con NO₂-FAs de las proteínas recombinantes realizados en este trabajo. Este efecto inhibitorio de la actividad enzimática por efecto de los NO₂-FAs también se observó en las proteínas biosintéticas. Por tanto, en estas etapas en las que se producía principalmente el desarrollo de las hojas, existía un conjunto de proteínas antioxidantes y biosintéticas inhibidas por la nitroalquilación. Cuando la planta entraba en la etapa de floración, las proteínas nitroalquiladas estaban destinadas fundamentalmente a procesos de reproducción y de desarrollo del organismo, en cambio, las proteínas nitroalquiladas relacionadas con procesos biosintéticos y de respuesta al estrés pasaron a estar menos representadas. En el momento en que la planta florecía, se iniciaba el proceso de senescencia, que conllevaba una serie de cambios entre los que destacó el aumento en la producción de ROS, y por ende, la activación de las proteínas antioxidantes encargadas de neutralizarlas (Li et al. 2016). Tal y como se ha mencionado anteriormente, la nitroalquilación es una modificación postraducciona reversible, ya que las condiciones de estrés nitrosativo generan la oxidación del aducto de Michael, lo que se traduce en la liberación de los NO₂-FAs y la restauración de la función de la proteína (Padilla et al. 2017a). Esto justifica que, en la floración y en las etapas siguientes, los niveles de proteínas nitroalquiladas fueran menores y que no estuvieran implicadas en los procesos de respuesta al estrés, ya que el incremento del estado oxidativo podía provocar la oxidación de los aductos de las proteínas antioxidantes, permitiéndose así que estas recuperasen su actividad detoxificante. Además, durante la senescencia de la planta, se induce la ruta de la β -oxidación de los lípidos, aumenta la degradación de proteínas celulares y se produce una removilización de los lípidos desde la hoja hacia las semillas recién generadas. Por ello, la liberación de los NO₂-FAs aductados en las proteínas no se tradujo en un aumento de los NO₂-FAs libres ni de los presentes en los depósitos lipídicos de las hojas (Li et al. 2016; Troncoso-Ponce et al. 2013).

35. Modulación de los depósitos de NO₂-FAs en el estrés abiótico

Las situaciones de estrés desencadenan una alteración de la homeostasis redox debido a la rápida explosión de ROS y de RNS, las cuales actúan como señales moleculares que activan los mecanismos de defensa de la planta (Valderrama et al. 2019; Chaki et al. 2021). Dado que los NO₂-FAs son donadores de NO y son capaces de modular la actividad enzimática de las proteínas por nitroalquilación, estas moléculas deben considerarse como potentes señalizadoras en respuesta al estrés (Geisler and Rudolph 2012a; Begara-Morales et al. 2021b). Además, en diferentes situaciones de estrés abiótico analizadas en esta Memoria de Tesis, como la salinidad, el cadmio, la baja temperatura y el daño mecánico, se generó un incremento significativo en los niveles de NO₂-Ln. Este resultado está en consonancia con un análisis transcriptómico previo por tecnología RNA-seq donde se estableció un claro papel señalizador para el NO₂-Ln puesto que demostraba su implicación en la respuesta de defensa de las plantas frente a diferentes condiciones de estrés abiótico como consecuencia de su capacidad de inducción de proteínas de choque térmico. Además, el mismo trabajo apuntaba hacia la existencia de un mecanismo de acción conservado en los procesos de defensa tanto animal como vegetal (Mata-Pérez et al. 2016d).

Todos estos antecedentes han llevado a estudiar la modulación de los almacenes de los NO₂-FAs durante el estrés abiótico, concretamente se ha analizado el estrés por salinidad, metales pesados (cadmio), baja temperatura, luz continua y oscuridad en plántulas de *Arabidopsis* de 14 días.

En primer lugar, se analizó el estado oxidativo en cada una de las situaciones de estrés abiótico a través de la detección de marcadores de la homeostasis redox como son el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el malondialdehído (MDA), siendo este último un indicador de la peroxidación lipídica. En la mayoría de los estreses analizados se generó un incremento de H₂O₂ o de MDA, con excepción de los estreses por cadmio y baja temperatura donde incrementaron ambos marcadores (**Fig. 62**). Tras evidenciar la existencia de estrés oxidativo, se analizó la modulación de los niveles de NO₂-FAs en cada uno de los estreses abióticos.

En este sentido, los estreses por salinidad y baja temperatura generaron un incremento en los niveles totales de NO₂-LA y NO₂-Ln procedentes de los depósitos proteicos y lipídicos con respecto a las plantas control. En cambio, los niveles totales de NO₂-OA no cambiaron. El estrés por cadmio dio lugar a un incremento generalizado en los niveles totales de NO₂-OA, NO₂-LA y NO₂-Ln. En cambio, en el estrés por luz continua se observó un comportamiento diferente para cada uno de los NO₂-FAs. Así, el contenido en NO₂-OA disminuyó, los niveles de NO₂-LA fueron similares a los del control y, en el caso del NO₂-Ln, se produjo un incremento significativo. En el estrés por oscuridad solo se produjo un incremento en los niveles de NO₂-OA y NO₂-LA, mientras que los niveles de NO₂-Ln permanecieron invariables (**Fig. 63**).

Si se analiza separadamente la modulación de los depósitos proteicos y los lipídicos, se pueden destacar algunas diferencias.

En términos generales, los niveles de NO₂-FAs aductados con proteínas en las situaciones de estrés abiótico fueron menores que los detectados en el control, salvo algunas excepciones, como es el caso del NO₂-OA y el NO₂-Ln en el estrés por salinidad donde sus niveles fueron invariables con respecto al control (**Fig. 64**).

Sin embargo, si se analizan los niveles de NO₂-FAs procedentes de los almacenes lipídicos, se observa que, en la mayoría de los estreses abióticos, se producía un aumento significativo con respecto

a la situación control. No obstante, en los estreses por salinidad y oscuridad no se produjeron cambios en los niveles de NO₂-OA y NO₂-Ln, respectivamente. Además, el estrés por luz continua generó una disminución en los niveles de NO₂-OA con respecto al control (**Fig. 65**).

La disminución observada en los niveles de NO₂-FAs aductados con proteínas puede justificarse por la oxidación de los aductos de Michael como consecuencia del estrés nitrooxidativo que se generaba en las diferentes situaciones de estrés abiótico. Esta oxidación del aducto provocaba la liberación del NO₂-FA y la restauración de la estructura y función de la proteína a la que estaba unido (Padilla et al. 2017a). Los NO₂-FAs liberados podían: 1) inducir la expresión de genes relacionados con chaperonas y sistemas antioxidantes (Mata-Pérez et al. 2016d); 2) actuar como donadores de NO y, por tanto, participar en procesos de señalización mediados por el NO (Mata-Pérez et al. 2016c; Mata-Pérez et al. 2020) o, 3) esterificarse en lípidos más complejos (Grippio et al. 2021). En cambio, el incremento observado en los niveles de NO₂-FAs esterificados con lípidos más complejos, podían provenir del conjunto de NO₂-FAs liberado del almacén proteico o podrían ser de nueva síntesis, dado que la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) en las situaciones de estrés puede reaccionar con los ácidos grasos insaturados de los lípidos complejos formando nuevos NO₂-FAs (Schopfer et al. 2011; Buchan et al. 2018a; Schopfer and Khoo 2019b; Franz et al. 2017).

En definitiva, las situaciones de estrés generan una disminución en los niveles de nitroalquilación pero provocan un incremento en los niveles de NO₂-FAs que se encuentran almacenados en lípidos más complejos. A continuación, se van a establecer cuál o cuáles son los depósitos lipídicos responsables de los cambios observados en el estrés con respecto a la situación control. Dado que este comportamiento no es igual en los diferentes estreses, estos resultados se discutirán por separado.

- **Estrés por salinidad**

El estrés por salinidad genera una acumulación excesiva de iones Na⁺ y Cl⁻ en la planta, lo que conduce a la limitación de la absorción de agua y nutrientes, a la alteración de las actividades metabólica y fotosintética y al aumento de la peroxidación lipídica (Liang et al. 2018; Deinlein et al. 2014). En respuesta a este tipo de estrés también se remodela el metabolismo de los lípidos, en concreto de los lípidos de membrana (Yu et al. 2018). Esta remodelación va a afectar a la integridad, permeabilidad, fluidez y actividad H⁺-ATPasa de la membrana (Mansour et al. 2015). Uno de los principales cambios que se producen en el metabolismo de los lípidos es el incremento de la presencia de ácidos grasos insaturados debido a su papel esencial en la mediación al estrés salino. En varios estudios se ha demostrado que el ácido linoleico estimula la actividad H⁺-ATPasa de la membrana plasmática y mantiene la homeostasis de K⁺/Na⁺ en las raíces de cebada (Bing et al. 1999). En *Arabidopsis*, la producción del ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido linolénico desencadenada por estrés salino, contribuye también a la activación de la actividad H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (Han et al. 2017).

En términos generales, nuestros resultados mostraron que se producía un aumento de los niveles de NO₂-FAs como consecuencia de este tipo de estrés. Estos ácidos grasos nitrados, junto con sus formas no nitradas, podrían estar participando en la estimulación de la actividad de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática. Además, la mayoría de los incrementos de NO₂-FAs se asociaron con lípidos complejos que forman parte de la membrana plasmática como la PC y el PI (**Fig. 66**). El aumento de los NO₂-FAs esterificados con lípidos de membrana podría alterar la organización de los lípidos por la formación de grupos en la interfase membrana-agua. Estas interacciones podrían alterar a su vez a las proteínas integrales de membrana (Franz et al. 2017).

- **Estrés por cadmio**

En nuestro caso, el crecimiento de las plántulas de *Arabidopsis* en presencia de cadmio ocasionó una inhibición significativa del crecimiento de la raíz y una clorosis en las hojas. Estudios previos han asociado el acortamiento de la raíz con el trastorno de nutrientes minerales inducido por el Cd. La clorosis de las hojas se ha relacionado con un deterioro del PSII y el daño oxidativo al aparato fotoquímico generado por el Cd (Lux et al. 2011; Perfus-Barbeoch et al. 2002; Faller et al. 2005; Dias et al. 2019). En general, una amplia gama de actividades celulares de las plantas, como la fotosíntesis, la respiración, la nutrición mineral, la estructura y propiedades de la membrana y la expresión génica, se ven afectadas en el estrés por cadmio (Perreault et al. 2014; Devi and Prasad 1999; Peixoto et al. 2001). Muchos de estos efectos se pueden relacionar con la alteración en las proporciones relativas de las diferentes clases de lípidos. Así, en el estrés por cadmio, se produce una reducción en los lípidos de membrana y un aumento en los lípidos neutros (TAG) en raíces, los cuales son la fuente de energía más común en condiciones estresantes con lo que mejora la absorción de nutrientes, la desintoxicación de ROS y la homeostasis de la planta (Choudhury et al. 2017; Osanai et al. 2017; Chaffai and Cherif 2020). En hojas, también se produce un deterioro de los lípidos de membrana, en especial se afectan las membranas de los cloroplastos, ocasionado por la peroxidación lipídica de las mismas debido a la producción descontrolada de ROS y al incremento en la actividad de la lipooxigenasa (Guo et al. 2007; Djebali et al. 2005). Este deterioro está relacionado con cambios en los niveles de OA, LA y Ln debido a alteraciones en la actividad de las enzimas desaturasas. De hecho, se ha descrito en la bibliografía que el estrés por cadmio inhibe a la linoleil Δ -15-desaturasa, que cataliza la conversión del LA a Ln y, en cambio, mejora la actividad de la oleil desaturasa, que transforma el OA a LA (Nouairi et al. 2006; Verdoni et al. 2001).

En el análisis de la distribución de los NO₂-FAs entre las diferentes clases de lípidos, es importante resaltar que los niveles de NO₂-LA en el estrés por cadmio fueron los que experimentaron un mayor incremento (aproximadamente 3 veces más que el control) (**Fig. 65**), además, dicho incremento se produjo en los almacenes de lípidos de membrana, es decir, en la PC, PE, PS y PI (**Fig. 66**). Esto podía ser consecuencia de la modulación de las desaturasas mencionado anteriormente que conduciría a un incremento en los niveles de LA que podría ser nitrado debido al estrés nitrooxidativo generado por el estrés por Cd. En cambio, los niveles de NO₂-OA y NO₂-Ln no disminuyeron como consecuencia de una menor disponibilidad de las formas no nitradas, lo que implica que la presencia de estos en los almacenes lipídicos de la membrana puede tener algún papel señalizador o modulador de la estructura de la membrana que ayude a paliar el daño generado por este tipo de estrés (Franz et al. 2017).

- **Estrés por baja temperatura**

Los principales eventos que genera el estrés por frío en las células vegetales son el aumento de la permeabilidad de la membrana, la alteración de la estabilidad de las proteínas o complejos de proteínas, la reducción de las actividades de enzimas antioxidantes y la alteración en la expresión génica y la síntesis de proteínas. Todo ello, da como resultado una fotoinhibición y una fotosíntesis alterada así como un daño considerable en la membrana (Örvar et al. 2000; Siddiqui and Cavicchioli 2006; Ruelland et al. 2009). Uno de los principales daños causados al sistema de biomembranas es la peroxidación lipídica mediada por las ROS que genera la oxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana (Grant et al. 2014). La composición de las membranas juega un papel muy importante en el estrés por frío, ya que un aumento en el contenido de fosfolípidos se correlaciona positivamente con la tolerancia al frío, mientras que, el bloqueo de la ruta de síntesis de los fosfolípidos disminuye la tolerancia al frío (Saita et al. 2016). Además, las plantas modulan la estabilidad y fluidez de la membrana aumentando la actividad de las desaturasas, lo que se traduce en un aumento de la

presencia de ácidos grasos insaturados en las membranas y una disminución, por tanto, de la presencia de los ácidos grasos saturados, lo que permite a las plantas tolerar el frío (Karabudak et al. 2014; NejadSadeghi et al. 2015; lanutsevich et al. 2016; Tang 2011).

Los análisis de MS/MS en las plántulas sometidas a estrés por frío revelaron un incremento en los niveles de NO₂-FAs, siendo estos el resultado de la interacción de las RNS con los ácidos grasos insaturados. Este incremento se acentuó en lípidos de membrana como PC y PS (**Fig. 66**), demostrándose así su participación en el aumento de la fluidez de la membrana con el objeto de paliar el daño causado por el frío (Franz et al. 2017). También es relevante, el incremento detectado en los ésteres de fitoesteroles sobre todo de NO₂-LA y el NO₂-Ln, los cuales podrían participar en el refuerzo de las interacciones de van der Waals con las cadenas alquílicas de los esfingolípidos y fosfolípidos de las membranas, lo que conduce a una mayor cohesión de la membrana y una menor sensibilidad a la temperatura (Dufourc 2008; Rogowska and Szakiel 2020).

- **Estrés por luz continua**

El estrés por luz continua provoca la saturación en la asimilación del CO₂ y una producción excesiva de energía de excitación que desemboca en la acumulación de ROS y en la inducción de un estrés fotooxidativo en células fotosintéticas (Velez-Ramirez et al. 2011; Haghjou et al. 2009).

Este tipo de estrés no afecta de manera demasiado pronunciada la composición lipídica de las membranas, tampoco provoca diferencias con el control en lo referente a la proporción de ácidos grasos saturados/insaturados (Schumann et al. 2017). Sin embargo, la detección de NO₂-FAs esterificados en las diferentes clases de lípidos mostró que las plantas que habían sido sometidas al estrés por luz continua presentaban, en general, una disminución de los niveles de NO₂-FAs, con excepción del incremento observado en los niveles de NO₂-LA y NO₂-Ln de la PS (**Fig. 66**). El papel señalizador de la PS podría implicar a los NO₂-FAs en la mediación de la señalización que permitiría a la planta paliar el daño ocasionado por este tipo de estrés.

- **Estrés por oscuridad**

Durante el día, la energía de la luz se utiliza para impulsar la asimilación del carbono fotosintético y así producir compuestos orgánicos (fundamentalmente azúcares y almidón) necesarios para el desarrollo de la planta. Por la noche, cuando la fotosíntesis no es posible, el almidón acumulado durante el día, se hidroliza para asegurar el suministro de energía (Smith and Stitt 2007; Stitt and Zeeman 2012). Sin embargo, cuando la planta se somete a un estrés por oscuridad, las reservas de energía procedentes del almidón se agotan, quedando las células carentes de una fuente de carbono que les aporte energía. Estos acontecimientos desencadenan una situación de estrés oxidativo y la inducción de genes relacionados con la β-oxidación, como consecuencia de la búsqueda de sustratos energéticos alternativos (Usadel et al. 2008; Araújo et al. 2010; Noctor et al. 2014). El metabolismo de los TAG es un aspecto clave en la homeostasis intracelular y en el equilibrio energético y juega un papel vital en la supervivencia celular bajo condiciones de oscuridad. Esto se debe a que el estrés por oscuridad produce la inhibición de la triacilglicerol lipasa (SDP1), lo que bloquea la hidrólisis de los TAG pero incrementa la degradación de los lípidos de membrana. Los ácidos grasos liberados se utilizan para el ensamblaje de nuevos TAG. La acumulación de TAG durante el estrés por oscuridad protege a las células de la muerte celular, ya que secuestran intermediarios lipídicos tóxicos como los ácidos grasos libres y el ácido fosfatídico. Los TAG también protegen frente al estrés oxidativo generado por las ROS (Fan et al. 2017).

Los análisis de MS/MS mostraron un incremento en los niveles de NO₂-FAs que se encontraban esterificados en los TAG de plántulas sometidas a estrés, pudiendo ser el resultado de la existencia de una mayor cantidad de TAG en el estrés por oscuridad y de una mayor disponibilidad de ácidos grasos insaturados susceptibles a nitrarse como consecuencia del estado nitrooxidativo en el que se encontraban las células. Sin embargo, en la situación de estrés también se encontraron mayores niveles de NO₂-FAs en los lípidos de membrana en comparación con las plántulas control (**Fig. 66**).

36. Perfil de proteínas nitroalquiladas durante las situaciones de estrés abiótico

Tal y como se ha mencionado anteriormente, las diferentes situaciones de estrés abiótico generaron una disminución en los niveles de NO₂-FAs que se encuentran esterificados con proteínas. Estos niveles coincidieron con una identificación minoritaria de proteínas nitroalquiladas en las diferentes situaciones de estrés abiótico con respecto al control (**Fig. 67**).

En las plántulas control, las proteínas nitroalquiladas se enmarcaban en procesos de respuesta al estrés, biosintéticos y de desarrollo del organismo. La caracterización del efecto de la nitroalquilación en proteínas recombinantes implicadas en procesos de respuesta al estrés o en procesos biosintéticos mostró una regulación negativa de las mismas, ya que el tratamiento con los diferentes NO₂-FAs generaba una disminución en sus niveles de actividad enzimática. En cambio, en las diferentes situaciones de estrés, apenas se han identificado proteínas nitroalquiladas relacionadas con la respuesta al estrés (**Fig. 68-72**).

En síntesis, en la situación control existe un conjunto de moléculas proteicas relacionadas con la respuesta al estrés que se encuentran nitroalquiladas. La unión de los NO₂-FAs a estas moléculas provoca la inhibición de su actividad, es decir, las inactiva. Cuando la planta se somete a condiciones adversas, se genera una rápida explosión de moléculas redox, especialmente especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) (Valderrama et al. 2019; Chaki et al. 2021). Estas ROS y RNS provocarían la oxidación del aducto de Michael de las proteínas nitroalquiladas relacionadas con la respuesta al estrés que se identificaron en el control. Esta oxidación conduciría a la liberación del NO₂-FA y a la restauración de la actividad enzimática. De esta manera, se conseguiría una respuesta más rápida que si tuviera que activarse la síntesis proteica por inducción de la transcripción de genes. Estas proteínas antioxidantes neutralizarían los niveles elevados de ROS y RNS, evitándose así daños o incluso la muerte celular (Padilla et al. 2017a). Además, los NO₂-FAs liberados podrían inducir la expresión de genes relacionados con el estrés abiótico. Un experimento relativamente reciente de RNA-seq reveló la capacidad de señalización del NO₂-Ln tras su adición a cultivos celulares de Arabidopsis. En ese trabajo, el NO₂-Ln inducía la expresión de genes relacionados principalmente con la respuesta al estrés abiótico por alta intensidad lumínica, temperatura y estrés oxidativo, con una ontología génica mayoritaria en el H₂O₂, las ROS y las respuestas de compuestos que contienen oxígeno (Mata-Pérez et al. 2016d).

37. Efecto protector de los NO₂-FAs en el estrés biótico

Una enorme variedad de patógenos microbianos desafían continuamente a las plantas, sin embargo, éstas han desarrollado resistencia a la mayoría de ellos debido a complejos y eficientes sistemas de inmunidad vegetal desarrollados durante las interacciones evolutivas de los mundos vegetal y microbiano (Hacquard et al. 2017; Yu et al. 2017). El primer nivel de inmunidad de las plantas está representado por la inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a microbios (MTI), que se activan mediante la unión de patrones moleculares asociados a microbios (MAMP) a

receptores de reconocimiento de patrones localizados en la superficie de las células vegetales (Jones and Dangl 2006). Las elicinas, son activadores proteicos secretados principalmente por oomicetos de *Phytophthora spp.* que actúan como moléculas señalizadoras cuando existe peligro, es decir, estas moléculas se unen a proteínas receptoras ubicadas en las membranas celulares de las plantas generando una respuesta de defensa frente a diferentes patógenos (Meng et al. 2014). Existen dos tipos de elicinas, α (ácidas) y β (básicas), las cuales difieren en su actividad biológica (Derevnina et al. 2016; Janků et al. 2019).

El tratamiento de los cultivos celulares de tabaco con una β -elicina, la criptogenina desencadenó una producción muy elevada de ROS tras pocos segundos de infección, alcanzándose una producción máxima tras 30 minutos de incubación. Esta producción descontrolada de ROS derivó en muerte celular (aproximadamente del 60%). En cambio, el tratamiento con una α -elicina, la infectina, aunque también desencadenó unos niveles elevados de ROS a los pocos segundos de ser añadida, éstos fueron menores que los inducidos por la criptogenina. Además, la infectina no provocó muerte celular (**Fig. 73 y 74**).

En general, las β -elicinas básicas (criptogenina) muestran características necróticas mucho más potentes que las α -elicinas ácidas (infectina). Además, las primeras brindan una mayor protección a las plantas contra cualquier ataque posterior de patógenos (Janků et al. 2019).

Los eventos de señalización que desencadenan las elicinas tras su reconocimiento por la célula incluyen una respuesta inmunitaria típica caracterizada por cambios en los flujos de iones que conducen a la despolarización de la membrana (Lecourieux-Ouaked et al. 2000; Wendehenne et al. 2002), la acidificación del citoplasma y la alcalinización del espacio extracelular (Pugin et al. 1997), una elevada producción de ROS y la activación de una vía de señalización para la inmunidad de la planta relacionada con la respuesta hipersensible (HR) acompaña por muerte celular (MEK2-SIPK/WIPK) (Xu et al. 2014; Starý et al. 2019). En tabaco, la NADPH oxidasa (RBOH) de la membrana plasmática tiene un papel fundamental en la producción de ROS inducida por la elicina, desempeñando así un importante papel en la regulación de la HR (Noirot et al. 2014).

En un estudio reciente, el tratamiento de cultivos celulares de tomate con NO_2 -OA provocaba la inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno de una manera dosis dependiente a través de la activación de NADPH oxidasas (Di Palma et al. 2020). En esta Tesis, el tratamiento de los cultivos celulares de tabaco con los tres NO_2 -FAs, desencadenó un comportamiento similar al observado en células de tomate, es decir, se observó una sobreproducción de ROS seguramente derivada de la activación de la NADPH oxidasa, sin embargo, no se afectó la viabilidad celular (**Fig. 75**).

Dado que, aunque el tratamiento con los NO_2 -FAs generaba una producción de ROS en las células de tabaco, no se ponía en peligro su supervivencia, las células pretratadas con NO_2 -FAs se incubaron separadamente con las dos elicinas y se analizaron los niveles de ROS y la viabilidad celular.

El tratamiento con infectina que, tal y como se ha comentado anteriormente, no perjudicaba la viabilidad celular cuando se adicionaba a los cultivos de tabaco de manera aislada, tampoco afectaba a las células cuando se preincubaban con NO_2 -FAs (**Fig. 76**). En cambio, en los niveles de ROS extracelulares se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, especialmente al inicio de la infección con la elicina. En el caso de las células que habían sido tratadas previamente con los diferentes NO_2 -FAs, se cuantificó un incremento significativo en la producción de ROS con respecto al control, sin embargo, esos niveles fueron unas 15.000 veces menores que los generados por las células tratadas únicamente con INF (**Fig. 77**).

Por otra parte, en las células pretratadas con NO₂-FAs, el tratamiento con criptogenina no produjo muerte celular como ocurrió en las células tratadas únicamente con criptogenina, que provocó un 60% de muerte celular (**Fig. 78**). Además, la CRY ocasionó una elevada producción de ROS en las células de tabaco con respecto a las células no tratadas. Este efecto también se observó en las células incubadas previamente con NO₂-FAs, si bien, los niveles detectados en este caso fueron unas 23000 veces menores a los que provocaba la CRY de manera aislada (**Fig. 79**).

Estos resultados sugieren un efecto protector de los NO₂-FAs ante la infección por patógenos que podría estar mediada por una menor producción de ROS procedentes de la activación de la NADPH oxidasa de la membrana plasmática, inhibiendo o modulando la señalización mediada por la HR de la planta que conduce a una muerte celular. También cabe mencionar que, dado que el NO₂-FA es un donador de NO, el residuo de Cys 890 de la NADPH oxidasa es susceptible de S-nitrosilarse, provocando dicha modificación post-traduccional una disminución de su actividad enzimática (Mata-Pérez et al. 2016c; Yun et al. 2011).

38. Papel señalizador del NO₂-OA por nitroalquilación de la proteína antioxidante Tsa1 en *Sacharomyces cerevisiae*

Uno de los estreses más comunes que pueden experimentar las células de levadura es un cambio en la temperatura de crecimiento. Específicamente, las levaduras presentan un crecimiento óptimo a 30°C, sin embargo, si la temperatura ascendiera a 37°C generaría una situación de estrés (Trott and Morano 2003). En esta Memoria de Tesis se ha evidenciado que una de las consecuencias del estrés por choque térmico en levaduras es la alta producción de ROS, fundamentalmente de H₂O₂ (**Fig. 80**), lo que conduce a una situación de estrés oxidativo (Morano et al. 2012; Duina et al. 1996; Davidson and Schiestl 2001).

En respuesta a la elevación de los niveles de H₂O₂, se detectó un incremento en la actividad de la peroxirredoxina Tsa1 citosólica (**Fig. 80**). La Tsa 1 es una proteína antioxidante responsable de la detoxificación de ROS con el fin de restaurar el estado redox intracelular (Jang et al. 2004; Rand and Grant 2006). El aumento significativo observado en la actividad de Tsa1 no se correspondía con una elevación en los niveles de expresión de la proteína, ya que el contenido en proteína no varió en respuesta al estrés por choque térmico (**Fig. 80**). Estos resultados nos llevaron a pensar que la Tsa1 podría estar modificándose post-traduccionalmente.

Un mecanismo adicional de defensa de las células frente a los efectos negativos causados por este tipo de estrés es la activación de la respuesta de choque térmico (HSR). Específicamente, HSR induce la expresión de proteínas de choque térmico (HSP), la mayoría de las cuales son chaperonas moleculares que ayudan a prevenir o revertir el plegamiento incorrecto de las proteínas (Weibezahn et al. 2005; Polier et al. 2008).

Recientemente, la respuesta de choque térmico (HSR) se ha relacionado con los NO₂-FAs. Concretamente, el NO₂-OA actúa como un potente inductor de HSR en células endoteliales, este mismo efecto se ha descrito para el NO₂-Ln en *Arabidopsis* (Mata-Pérez et al. 2016d). Los NO₂-FAs son moléculas señalizadoras pleiotrópicas con poderosas propiedades antioxidantes que se generan por la interacción de RNS como el NO y el ONOO⁻, entre otros, con ácidos grasos insaturados (Freeman et al. 2008; Khoo and Schopfer 2019). Hasta la fecha, se ha detectado la presencia endógena en plantas de NO₂-OA, el NO₂-LA y el NO₂-Ln (Mata-Pérez et al. 2016d; Vollár et al. 2020a) y de NO₂-OA, el NO₂-LA, el NO₂-cLA y NO₂-AA en organismos animales (Balazy and Poff 2004; Baker et al. 2004; Tsikas et al.

2011). Sin embargo, en *Saccharomyces cerevisiae* aún no se había detectado la existencia de estas moléculas. En esta Tesis Doctoral, se ha identificado por primera vez la presencia del NO₂-OA (**Fig. 81**). En las levaduras, solo están presentes los ácidos grasos monoinsaturados OA (18:1) y plamitoleico (PA, 16:1), ya que solo existe la enzima $\Delta 9$ desaturasa. Esta enzima cataliza la inserción de un doble enlace en la posición 9-cis de los ácidos grasos saturados para formar su derivado monoinsaturado (Martin et al. 2007). Por lo tanto, en la levadura solo estaría disponible el ácido oleico o palmitoleico para reaccionar con las RNS y generar NO₂-FAs. Aunque el ácido palmitoleico está presente en mayor abundancia que el oleico, se llevó a cabo la búsqueda del ácido oleico nitrado, ya que esta molécula había sido detectada en otras especies y ya se habían descrito sus implicaciones en los procesos de señalización celular (Tehlivets et al. 2007; Zhao et al. 2021; Pereckova et al. 2021; Manni et al. 2021; Braumann et al. 2021).

Los niveles de NO₂-OA detectados en *S. cerevisiae* en la situación control tuvieron un valor de 0,038 pmoles/g FW (**Fig. 82**). Este valor, en el rango de pmoles, es similar al que presentan otras moléculas señalizadoras.

Como ya se ha indicado en apartados anteriores, los NO₂-FAs ejercen principalmente su función de señalización a través de la modificación postraduccional de proteínas por nitroalquilación, ya que son capaces de aductarse con residuos de cisteína, histidina y lisina. Dado que el estrés por choque térmico generaba un aumento en la actividad enzimática de la Tsa1 que no era consecuencia de un aumento en los niveles de expresión de la proteína y, además, se había identificado la presencia del NO₂-OA en levaduras, se caracterizó el efecto del NO₂-OA sobre la actividad de la Tsa1 utilizando una proteína recombinante. El tratamiento de la Tsa1 con NO₂-OA afectó negativamente a la actividad enzimática (**Fig. 83**). La disminución de la actividad de la Tsa1 recombinante podía ser consecuencia de la nitroalquilación, aunque también podía deberse a su S-sitrosilación, dada la capacidad de los NO₂-FA de actuar como donadores de NO (Grippio et al. 2021; Mata-Pérez et al. 2016b). Sin embargo, el tratamiento de la Tsa1 recombinante con un secuestrador de NO, no causó la recuperación de la actividad enzimática después del tratamiento con el NO₂-OA, por lo tanto, la proteína no estaba siendo S-nitrosilada (**Fig. 83**). Además, en el análisis por nanoLC-MS/MS de la Tsa1 recombinante tratada con NO₂-OA, se identificaron una serie de péptidos cuya masa molecular se incrementaba en 327 Da, masa que correspondía al NO₂-OA. Específicamente, se identificaron nitroalquilados los residuos de cisteína 48 y 171 y las histidinas 105 y 136 (**Tabla 16**). Entre ellos, debido a su implicación catalítica, cabía destacar la nitroalquilación de las cisteínas 48 y 171. En concreto, el residuo 48 actuaba como cisteína peroxidática y el residuo 171 era la cisteína resolutive (Biteau et al. 2003). Adicionalmente, los residuos de cisteína, junto con la His 105, fueron los residuos más susceptibles a nitroalquilarse (**Fig. 63**). La unión del NO₂-OA a la cisteína peroxidática impedía la unión del peróxido, mientras que su unión a la cisteína resolutive, evitaba su interacción con la cisteína peroxidática de otra proteína Tsa1. Por tanto, la nitroalquilación de la Tsa1 a nivel de los dos residuos de cisteína, peroxidática y resolutive, no afectaría a una única molécula de Tsa1, sino a dos, ya que la cisteína resolutive ejerce su acción sobre la cisteína peroxidática de otra proteína Tsa1. Es importante señalar que la cisteína peroxidática es un residuo que se conserva dentro de la familia de las peroxirredoxinas, por lo tanto, es posible establecer que la familia de las peroxirredoxinas puede ser susceptible a la nitroalquilación (Wood et al. 2003).

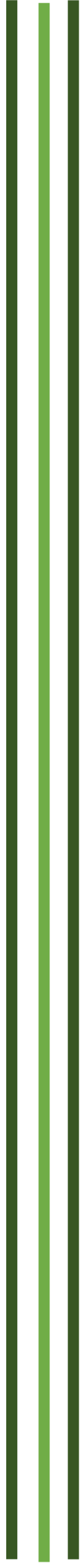
Tras caracterizar que el tratamiento con el NO₂-OA de la Tsa1 recombinante generaba un efecto negativo sobre su actividad enzimática como consecuencia de la nitroalquilación de las cisteínas peroxidática y resolutive, se inició una búsqueda dirigida de la nitroalquilación *in vivo* de la Tsa1 por nano-LC-MS/MS tanto en muestras control como en muestras procedentes de células de levadura que habían sido expuestas a estrés por choque térmico. En la situación control se detectó la

nitroalquilación de la cisteína 48, que correspondía a la cisteína peroxidática, mientras que la búsqueda dirigida de péptidos nitroalquilados en el estrés no permitió identificar ningún péptido nitroalquilado (**Tabla 17**). Además, es importante mencionar que en la situación de estrés por choque térmico se había observado un aumento de los niveles de NO₂-OA con respecto al control (**Fig. 82**). Por otra parte, está bien establecido que la nitroalquilación es una modificación postraduccional reversible, por lo que puede actuar como una vía de señalización selectiva en entornos estresantes. Por lo tanto, en situaciones que cursan con un aumento en los niveles de ROS y RNS se puede afectar la estabilidad de la nitroalquilación, ya que podría ocurrir la oxidación y, por tanto, la escisión del enlace entre los residuos de azufre de la Cys y el carbono de los NO₂-FAs (aducto de Michael). Este proceso da como resultado la liberación del nitroalqueno y permite que la proteína recupere su estado inicial (Khoo and Schopfer 2019; Padilla et al. 2017a; Fang et al. 2021).

En resumen, en la situación control existiría un conjunto de proteínas Tsa1 que estarían inactivadas por la nitroalquilación, mediada por el NO₂-OA, de la cisteína peroxidática. Por el contrario, en las muestras sometidas a estrés por choque térmico se generaba un estrés oxidativo, provocado por un aumento en los niveles de ROS. Para contrarrestar los efectos negativos, en esas células se activaban genes de respuesta de choque térmico (HSR), pero también se aumentaba la actividad de proteínas antioxidantes como la Tsa1 con el fin de detoxificar el entorno celular. Sin embargo, el aumento de la actividad de Tsa1 no provenía de un aumento en sus niveles de expresión, sino de la activación del conjunto de proteínas que previamente se encontraban nitroalquiladas y, por tanto, inactivas en la situación control. La justificación a estos acontecimientos radica en que los niveles elevados de ROS causaban la escisión del aducto de Michael que enlazaba el grupo sulfuro de cisteína con el NO₂-OA, lo que provoca la liberación del NO₂-OA y la restauración de la actividad de la Tsa1. Este mecanismo de respuesta es más rápido que la inducción de genes y la síntesis de nuevas proteínas. En la situación de estrés por choque térmico también se detectó un aumento de los niveles de NO₂-OA con respecto al control. Este nitroalqueno libre, procedente principalmente de la ruptura de la aducción con la proteína Tsa1, participará a su vez como un inductor de genes de respuesta al choque térmico.

Conclusiones

Conclusions



- ✔ Identificación de la presencia del NO₂-OA y el NO₂-LA en *Arabidopsis thaliana*, además de corroborar la presencia del NO₂-Ln, siendo este último NO₂-FA el mayoritario en *Arabidopsis*.
- ✔ Los NO₂-FAs presentan una ubicua y amplia biodistribución en los diferentes almacenes lipídicos y proteicos, resaltando mayoritariamente, el NO₂-Ln en la fosfatidilserina y el NO₂-OA y el NO₂-LA en las proteínas.
- ✔ En el desarrollo de la planta de *Arabidopsis*, la modulación de la distribución de los almacenes de los NO₂-FAs está fuertemente influenciada por los acontecimientos que se están desarrollando en la etapa de crecimiento.
- ✔ Las proteínas nitroalquiladas están presentes mayoritariamente en procesos de respuesta al estrés, biosintéticos y de desarrollo del organismo durante las etapas de crecimiento vegetativo de la planta, mientras que en la etapa de floración resalta la presencia de proteínas nitroalquiladas relacionadas con la reproducción.
- ✔ Los niveles de NO₂-FAs en los almacenes lipídicos incrementan en respuesta al estrés abiótico, sobre todo en los lípidos de membrana, participando así en la modulación de la estructura de la membrana plasmática para paliar el daño provocado por el estrés.
- ✔ Los niveles elevados de ROS y RNS en las situaciones de estrés abiótico, generan la liberación del NO₂-FA que se encontraba aductado con la proteína, y por ende, la restauración de la actividad de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés. Por ello, los niveles de NO₂-FAs detectados en las proteínas es menor en los estreses.
- ✔ Efecto señalizador-protector de los NO₂-FAs en el estrés biótico inducido por elicinas por la activación temprana de la NADPH oxidasa por los NO₂-FAs, que reduce la explosión de ROS generada por las elicinas.
- ✔ Identificación de la presencia del NO₂-OA en *Saccharomyces cerevisiae*, el cual modula la actividad enzimática de la proteína antioxidante Tsa1 en respuesta al estrés por choque térmico, ya que, la nitroalquilación del residuo catalítico de la Tsa1 tiene un efecto negativo sobre la actividad de la misma. Bajo condiciones oxidantes generadas bajo un estrés, se produce la oxidación del aducto de Michael, permitiéndose así la restauración detoxificante de la Tsa1.

- ✔ Identification of the presence of NO₂-OA and NO₂-LA in *Arabidopsis thaliana*, in addition to corroborating the presence of NO₂-Ln, the latter being NO₂-FA the majority in Arabidopsis.
- ✔ The NO₂-FAs present a ubiquitous and wide biodistribution in the different lipid and protein storages, mainly highlighting NO₂-Ln in phosphatidylserine and the NO₂-OA and NO₂-LA in proteins.
- ✔ In the development of the Arabidopsis plant, the modulation of the distribution of the storages of NO₂-FAs is strongly influenced by the events that are taking place in the growth stage.
- ✔ Nitroalkylated proteins are overrepresented in processes of response to stress, biosynthetics and development of the organism during the vegetative growth stages of the plant, while in the flowering stage the presence of nitroalkylated proteins related to reproduction stands out.
- ✔ The levels of NO₂-FAs in lipid storages increase in response to abiotic stress, especially in membrane lipids, thus participating in the modulation of the structure of the plasma membrane to alleviate the damage caused by stress.
- ✔ The high levels of ROS and RNS in situations of abiotic stress, generate the release of NO₂-FA that was adducted with the protein, and therefore, the restoration of the activity of proteins related to the response to stress. Therefore, the levels of NO₂-FAs detected in proteins are lower in stress.
- ✔ Signaling-protective effect of NO₂-FAs on biotic stress induced by elicitors due to early activation of NADPH oxidase by NO₂-FAs, which reduces the ROS explosion generated by elicitors.
- ✔ Identification of the presence of NO₂-OA in *Saccharomyces cerevisiae*, which modulates the enzymatic activity of the antioxidant protein Tsa1 in response to heat shock stress, since the nitroalkylation of the catalytic residue of Tsa1 has a negative effect on the activity of the same. Under oxidative conditions generated by stress, the oxidation of the Michael adduct occurs, thus allowing the detoxifying restoration of Tsa1.

Bibliografía

- Abat JK, Deswal R (2009) Differential modulation of S-nitrosoproteome of Brassica juncea by low temperature: change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* 9 (18):4368-4380
- Abat JK, Mattoo AK, Deswal R (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant Kalanchoe pinnata—ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. *The FEBS journal* 275 (11):2862-2872
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126. doi:10.1016/s0076-6879(84)05016-3
- Agarwal P, Agarwal PK, Gohil D (2018) Transcription factor-based genetic engineering for salinity tolerance in crops. In: *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, Volume 1. Springer, pp 185-211
- Ageeva-Kieferle A, Georgii E, Winkler B, Ghirardo A, Albert A, Hüther P, Mengel A, Becker C, Schnitzler J-P, Durner J (2021) Nitric oxide coordinates growth, development, and stress response via histone modification and gene expression. *Plant Physiology*
- Ahmad P, Ahanger MA, Alyemeni MN, Wijaya L, Alam P (2018) Exogenous application of nitric oxide modulates osmolyte metabolism, antioxidants, enzymes of ascorbate-glutathione cycle and promotes growth under cadmium stress in tomato. *Protoplasma* 255 (1):79-93
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30 (3):161-175. doi:10.3109/07388550903524243
- Airaki M, Sánchez-Moreno L, Letierrier M, Barroso JB, Palma JM, Corpas FJ (2011) Detection and quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant and Cell Physiology* 52 (11):2006-2015
- Akinyemi AJ, Faboya OL, Olayide I, Faboya OA, Ijabadeniyi T (2017) Effect of cadmium stress on non-enzymatic antioxidant and nitric oxide levels in two varieties of maize (*Zea mays*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 98 (6):845-849
- Alamri SA, Siddiqui MH, Al-Khaishany MY, Khan MN, Ali HM, Alakeel KA (2019) Nitric oxide-mediated cross-talk of proline and heat shock proteins induce thermotolerance in *Vicia faba* L. *Environmental and Experimental Botany* 161:290-302
- Albertos P, Romero-Puertas MC, Tatematsu K, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Nambara E, Lorenzo O (2015) S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nature communications* 6 (1):1-10
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical journal* 357 (3):593-615
- Alemayehu A, Zelinová V, Bočová B, Huttová J, Mistrík I, Tamás L (2015) Enhanced nitric oxide generation in root transition zone during the early stage of cadmium stress is required for maintaining root growth in barley. *Plant and Soil* 390 (1):213-222
- Alexander RL, Bates DJ, Wright MW, King SB, Morrow CS (2006) Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitrolinoleic acid-induced, PPARgamma-dependent transcription activation. *Biochemistry* 45 (25):7889-7896. doi:10.1021/bi0605639
- Anderson L, Mansfield T (1979) The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental Pollution* (1970) 20 (2):113-121
- Andryka-Dudek P, Ciacka K, Wiśniewska A, Bogatek R, Gniazdowska A (2019) Nitric oxide-induced dormancy removal of apple embryos is linked to alterations in expression of genes encoding ABA and JA biosynthetic or transduction pathways and RNA nitration. *International journal of molecular sciences* 20 (5):1007

- Aranda-Caño L, Sánchez-Calvo B, Begara-Morales JC, Chaki M, Mata-Pérez C, Padilla MN, Valderrama R, Barroso JB (2019) Post-translational modification of proteins mediated by nitro-fatty acids in plants: nitroalkylation. *Plants* 8 (4):82
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J (2011) Understanding the fate of peroxyxynitrite in plant cells—from physiology to pathophysiology. *Phytochemistry* 72 (8):681-688
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J (2019) A physiological perspective on targets of nitration in NO-based signaling networks in plants. *Journal of experimental botany* 70 (17):4379-4389
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Deckert J, Rucińska-Sobkowiak R, Gzyl J, Pawlak-Sprada S, Abramowski D, Jelonek T, Gwóźdź EA (2012) Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 58:124-134
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Izbiańska K, Gzyl J, Jelonek T (2016) Implication of peroxyxynitrite in defence responses of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 65 (5):754-766
- Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant science* 172 (5):876-887
- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, Witt S, Obata T, Schauer N, Graham IA, Leaver CJ, Fernie AR (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of *Arabidopsis* mitochondria. *Plant Cell* 22 (5):1549-1563. doi:10.1105/tpc.110.075630
- Arfan M, Zhang D-W, Zou L-J, Luo S-S, Tan W-R, Zhu T, Lin H-H (2019) Hydrogen peroxide and nitric oxide crosstalk mediates brassinosteroids induced cold stress tolerance in *Medicago truncatula*. *International journal of molecular sciences* 20 (1):144
- Aro E-M, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1143 (2):113-134
- Arruebarrena Di Palma A, Di Fino LM, Salvatore SR, D'Ambrosio JM, García-Mata C, Schopfer FJ, Laxalt AM (2020) Nitro-oleic acid triggers ROS production via NADPH oxidase activation in plants: A pharmacological approach. *J Plant Physiol* 246-247:153128. doi:10.1016/j.jplph.2020.153128
- Artim DE, Bazely F, Daugherty S, Sculptoreanu A, Koronowski K, Schopfer F, Woodcock S, Freeman B, de Groat W (2011) Nitro-oleic acid targets transient receptor potential (TRP) channels in capsaicin sensitive afferent nerves of rat urinary bladder. *Experimental neurology* 232 (1):90-99
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85 (2):235-241
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology* 141 (2):391-396
- Astier J, Lindermayr C (2012) Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *International journal of molecular sciences* 13 (11):15193-15208
- Astier J, Mounier A, Santolini J, Jeandroz S, Wendehenne D (2019) The evolution of nitric oxide signalling diverges between animal and green lineages. *Journal of Experimental Botany* 70 (17):4355-4364
- Aveldaño MI, Horrocks LA (1983) Quantitative release of fatty acids from lipids by a simple hydrolysis procedure. *J Lipid Res* 24 (8):1101-1105
- Awasthi R, Bhandari K, Nayyar H (2015) Temperature stress and redox homeostasis in agricultural crops. *Frontiers in Environmental Science* 3:11
- Axelos M, Curie C, Mazzolini L, Bardet C, Lescure B (1992) A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant physiology and biochemistry (Paris)* 30 (1):123-128

- Babbar R, Karpinska B, Grover A, Foyer CH (2021) Heat-induced oxidation of the nuclei and cytosol. *Frontiers in plant science* 11:2184
- Bai X, Yang L, Yang Y, Ahmad P, Yang Y, Hu X (2011) Deciphering the protective role of nitric oxide against salt stress at the physiological and proteomic levels in maize. *Journal of proteome research* 10 (10):4349-4364
- Baker LM, Baker PR, Golin-Bisello F, Schopfer FJ, Fink M, Woodcock SR, Branchaud BP, Radi R, Freeman BA (2007a) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J Biol Chem* 282 (42):31085-31093. doi:10.1074/jbc.M704085200
- Baker LM, Baker PR, Golin-Bisello F, Schopfer FJ, Fink M, Woodcock SR, Branchaud BP, Radi R, Freeman BA (2007b) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine: kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *Journal of Biological Chemistry* 282 (42):31085-31093
- Baker PR, Lin Y, Schopfer FJ, Woodcock SR, Groeger AL, Batthyany C, Sweeney S, Long MH, Iles KE, Baker LM, Branchaud BP, Chen YE, Freeman BA (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem* 280 (51):42464-42475. doi:10.1074/jbc.M504212200
- Baker PR, Schopfer FJ, O'Donnell VB, Freeman BA (2009) Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radical Biology and Medicine* 46 (8):989-1003
- Baker PR, Schopfer FJ, Sweeney S, Freeman BA (2004) Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (32):11577-11582. doi:10.1073/pnas.0402587101
- Balazy M, Poff CD (2004) Biological nitration of arachidonic acid. *Curr Vasc Pharmacol* 2 (1):81-93. doi:10.2174/1570161043476465
- Ballaré CL (2014) Light regulation of plant defense. *Annual review of plant biology* 65:335-363
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma J, Lupiáñez JA, del Río LA (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry* 274 (51):36729-36733
- Barroso JB, Peragon J, Contreras-Jurado C, Garcia-Salguero L, Corpas FJ, Esteban FJ, Peinado MA, De La Higuera M, Lupianez JA (1998) Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. *Am J Physiol* 274 (6):R1578-1587. doi:10.1152/ajpregu.1998.274.6.R1578
- Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, Valez V, Zhang H, Kalyanaraman B, Radi R (2007) Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. *Amino acids* 32 (4):501-515
- Bartesaghi S, Radi R (2018) Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox biology* 14:618-625
- Bartoli CG, Buet A, Gergoff Grozeff G, Galatro A, Simontacchi M (2017) Ascorbate-Glutathione Cycle and Abiotic Stress Tolerance in Plants. In: Hossain MA, Munné-Bosch S, Burritt DJ, Diaz-Vivancos P, Fujita M, Lorence A (eds) *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Springer International Publishing, Cham, pp 177-200. doi:10.1007/978-3-319-74057-7_7
- Bates PD, Browse J (2011) The pathway of triacylglycerol synthesis through phosphatidylcholine in *Arabidopsis* produces a bottleneck for the accumulation of unusual fatty acids in transgenic seeds. *Plant J* 68 (3):387-399. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04693.x
- Bates PD, Browse J (2012) The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Front Plant Sci* 3:147. doi:10.3389/fpls.2012.00147
- Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PR, Durán R, Baker LM, Huang Y, Cerveñansky C, Branchaud BP, Freeman BA (2006) Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 281 (29):20450-20463

- Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A (2006) Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Molecular plant-microbe Interactions* 19 (9):970-975
- Begara-Morales J, Loake G (2016) Protein denitrosylation in plant biology. In: *Gasotransmitters in plants*. Springer, pp 201-215
- Begara-Morales J, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, Corpas F, Barroso J (2016) Protein S-nitrosylation and S-glutathionylation as regulators of redox homeostasis during abiotic stress response. In: *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Springer, pp 365-386
- Begara-Morales JC, Chaki M, Sánchez-Calvo B, Mata-Pérez C, Leterrier M, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ (2013) Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *Journal of experimental botany* 64 (4):1121-1134
- Begara-Morales JC, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, Padilla MN, Barroso JB (2019) The function of S-nitrosothiols during abiotic stress in plants. *Journal of experimental botany* 70 (17):4429-4439
- Begara-Morales JC, Mata-Pérez C, Padilla MN, Chaki M, Valderrama R, Aranda-Caño L, Barroso JB (2021a) Role of electrophilic nitrated fatty acids during development and response to abiotic stress processes in plants. *Journal of Experimental Botany* 72 (3):917-927
- Begara-Morales JC, Mata-Pérez C, Padilla MN, Chaki M, Valderrama R, Aranda-Caño L, Barroso JB (2021b) Role of electrophilic nitrated fatty acids during development and response to abiotic stress processes in plants. *J Exp Bot* 72 (3):917-927. doi:10.1093/jxb/eraa517
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Mata-Pérez C, Valderrama R, Padilla MN, López-Jaramillo J, Luque F, Corpas FJ, Barroso JB (2015) Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of experimental botany* 66 (19):5983-5996
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, López-Jaramillo J, Padilla MN, Carreras A, Corpas FJ, Barroso JB (2014) Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* 65 (2):527-538
- Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176:192-201
- Beld J, Lee DJ, Burkart MD (2015) Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. *Mol Biosyst* 11 (1):38-59. doi:10.1039/c4mb00443d
- Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackener A, Inzé D, Delledonne M, Van Breusegem F (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* 282 (2):1352-1358
- Beligni M, Lamattina L (2001a) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment* 24 (3):267-278
- Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210 (2):215-221
- Beligni MV, Lamattina L (2001b) Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends in plant science* 6 (11):508-509
- Bellincampi D, Dipierro N, Salvi G, Cervone F, De Lorenzo G (2000) Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol* 122 (4):1379-1385. doi:10.1104/pp.122.4.1379
- Benamar A, Rolletschek H, Borisjuk L, Avelange-Macherel M-H, Curien G, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Macherel D (2008) Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1777 (10):1268-1275

- Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS (2008) Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* 320 (5879):1050-1054
- Bennett JH, Hill AC (1973) Inhibition of apparent photosynthesis by air pollutants. Wiley Online Library, Berger A, Boscari A, Frendo P, Brouquise R (2019) Nitric oxide signaling, metabolism and toxicity in nitrogen-fixing symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 70 (17):4505-4520
- Bernhard A (2010) The nitrogen cycle: processes, players, and human
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004a) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell* 16 (2):332-341
- Bethke PC, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (2004b) Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219 (5):847-855
- Bethke PC, Libourel IG, Reinöhl V, Jones RL (2006) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break Arabidopsis seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* 223 (4):805-812
- Bewley JD, Black M (2013) Seeds: physiology of development and germination. Springer Science & Business Media,
- Bhuin T, Roy JK (2014) Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp Cell Res* 328 (1):1-19. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.027
- Bing JY, Gong HM, Liu YL (1999) Effects of exogenous fatty acids on H⁺-ATPase activity and lipid composition of plasma membrane vesicles isolated from roots of barley seedlings under salt stress. *Journal of plant physiology* 155 (4-5):646-651
- Biteau B, Labarre J, Toledano MB (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425 (6961):980-984. doi:10.1038/nature02075
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37 (8):911-917
- Blokhina O, Fagerstedt KV (2010a) Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (5):359-373
- Blokhina O, Fagerstedt KV (2010b) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum* 138 (4):447-462
- Blume Y, Yemets A, Sulimenko V, Sulimenko T, Chan J, Lloyd C, Dráber P (2008) Tyrosine phosphorylation of plant tubulin. *Planta* 229 (1):143-150
- Bonacci G, Baker PR, Salvatore SR, Shores D, Khoo NK, Koenitzer JR, Vitturi DA, Woodcock SR, Golin-Bisello F, Cole MP, Watkins S, St Croix C, Batthyany CI, Freeman BA, Schopfer FJ (2012) Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J Biol Chem* 287 (53):44071-44082. doi:10.1074/jbc.M112.401356
- Bonacci G, Schopfer FJ, Batthyany CI, Rudolph TK, Rudolph V, Khoo NK, Kelley EE, Freeman BA (2011) Electrophilic fatty acids regulate matrix metalloproteinase activity and expression. *Journal of Biological Chemistry* 286 (18):16074-16081
- Bonaventure G, Salas JJ, Pollard MR, Ohlrogge JB (2003) Disruption of the FATB gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell* 15 (4):1020-1033. doi:10.1105/tpc.008946
- Bonilla L, O'Donnell VB, Clark SR, Rubbo H, Trostchansky A (2013) Regulation of protein kinase C by nitroarachidonic acid: impact on human platelet activation. *Archives of biochemistry and biophysics* 533 (1-2):55-61
- Boscari A, Del Giudice J, Ferrarini A, Venturini L, Zaffini A-L, Delledonne M, Puppo A (2013) Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide? *Plant physiology* 161 (1):425-439
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach Jr (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 13 (7):1499-1510
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999

- Braumann S, Schumacher W, Im NG, Nettersheim FS, Mehrkens D, Bokredenghel S, Hof A, Nies RJ, Adler C, Winkels H, Knöll R, Freeman BA, Rudolph V, Klinke A, Adam M, Baldus S, Mollenhauer M, Geißen S (2021) Nitro-Oleic Acid (NO(2)-OA) Improves Systolic Function in Dilated Cardiomyopathy by Attenuating Myocardial Fibrosis. *Int J Mol Sci* 22 (16). doi:10.3390/ijms22169052
- Bricchi I, Leitner M, Foti M, Mithöfer A, Boland W, Maffei ME (2010) Robotic mechanical wounding (MecWorm) versus herbivore-induced responses: early signaling and volatile emission in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Planta* 232 (3):719-729
- Broniowska KA, Hogg N (2012) The chemical biology of S-nitrosothiols. *Antioxidants & redox signaling* 17 (7):969-980
- Brügger B, Erben G, Sandhoff R, Wieland FT, Lehmann WD (1997) Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (6):2339-2344. doi:10.1073/pnas.94.6.2339
- Buchan GJ, Bonacci G, Fazzari M, Salvatore SR, Gelhaus Wendell S (2018a) Nitro-fatty acid formation and metabolism. *Nitric Oxide* 79:38-44. doi:10.1016/j.niox.2018.07.003
- Buchan GJ, Bonacci G, Fazzari M, Salvatore SR, Wendell SG (2018b) Nitro-fatty acid formation and metabolism. *Nitric Oxide* 79:38-44
- Bunkelmann JR, Trelease RN (1996) Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol* 110 (2):589-598. doi:10.1104/pp.110.2.589
- Bushart TJ, Roux SJ (2007) Conserved features of germination and polarized cell growth: a few insights from a pollen–fern spore comparison. *Annals of botany* 99 (1):9-17
- Calvo-Begueria L, Rubio MC, Martínez JI, Pérez-Rontomé C, Delgado MJ, Bedmar EJ, Becana M (2018) Redefining nitric oxide production in legume nodules through complementary insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy and specific fluorescent probes. *Journal of Experimental Botany* 69 (15):3703-3714
- Cam Y, Pierre O, Boncompagni E, Hérouart D, Meilhoc E, Bruand C (2012) Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytologist* 196 (2):548-560
- Camejo D, del Carmen Romero-Puertas M, Rodríguez-Serrano M, Sandalio LM, Lázaro JJ, Jiménez A, Sevilla F (2013) Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *Journal of Proteomics* 79:87-99
- Camejo D, Guzmán-Cedeño Á, Moreno A (2016) Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiol Biochem* 103:10-23. doi:10.1016/j.plaphy.2016.02.035
- Cantrel C, Vazquez T, Puyaubert J, Rezé N, Lesch M, Kaiser WM, Dutilleul C, Guillas I, Zachowski A, Baudouin E (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 189 (2):415-427
- Caporn S, Mansfield T, Hand D (1991) Low temperature-enhanced inhibition of photosynthesis by oxides of nitrogen in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *New phytologist* 118 (2):309-313
- Castillo M-C, Lozano-Juste J, González-Guzmán M, Rodríguez L, Rodríguez PL, León J (2015) Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Science Signaling* 8 (392):ra89-ra89
- Chaffai R, Cherif A (2020) The cadmium-induced changes in the polar and neutral lipid compositions suggest the involvement of triacylglycerol in the defense response in maize. *Physiol Mol Biol Plants* 26 (1):15-23. doi:10.1007/s12298-019-00734-9
- Chaki M, Alvarez de Morales P, Ruiz C, Begara-Morales JC, Barroso JB, Corpas FJ, Palma JM (2015a) Ripening of pepper (*Capsicum annuum*) fruit is characterized by an enhancement of protein tyrosine nitration. *Annals of Botany* 116 (4):637-647
- Chaki M, Begara-Morales JC, Valderrama R, Aranda-Caño L, Barroso JB (2021) New Insights into the Functional Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Plant Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. In: Gupta DK, Palma JM (eds) *Plant Growth and Stress Physiology*. Springer International Publishing, Cham, pp 215-235. doi:10.1007/978-3-030-78420-1_10

- Chaki M, Shekariesfahlan A, Ageeva A, Mengel A, von Toerne C, Durner J, Lindermayr C (2015b) Identification of nuclear target proteins for S-nitrosylation in pathogen-treated *Arabidopsis thaliana* cell cultures. *Plant Science* 238:115-126
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, Pedrajas JR, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Luque F, Letierrier M (2011) Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of experimental botany* 62 (6):1803-1813
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, Carreras A, López-Jaramillo J, Luque F, Palma JM, Pedrajas JR, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B (2009) Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of experimental botany* 60 (15):4221-4234
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas Á, Ocaña-Calahorra F, Mariscal V, Carreras A, Barroso JB, Galván A, Fernández E (2016) A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Environ* 39 (10):2097-2107. doi:10.1111/pce.12739
- Chandler MT, Marsac NTd, Kouchkovsky Yd (1972) Photosynthetic growth of tobacco cells in liquid suspension. *Canadian Journal of Botany* 50 (11):2265-2270
- Chaudhary S, Devi P, Bhardwaj A, Jha UC, Sharma KD, Prasad PVV, Siddique KHM, Bindumadhava H, Kumar S, Nayyar H (2020) Identification and Characterization of Contrasting Genotypes/Cultivars for Developing Heat Tolerance in Agricultural Crops: Current Status and Prospects. *Front Plant Sci* 11:587264. doi:10.3389/fpls.2020.587264
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci* 61 (2):192-208. doi:10.1007/s00018-003-3206-5
- Chen J, Vandelle E, Bellin D, Delledonne M (2014) Detection and function of nitric oxide during the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: where there's a will there's a way. *Nitric Oxide* 43:81-88
- Chen M, Chory J, Fankhauser C (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* 38:87-117
- Chen R (1998) Plant NADP-dependent isocitrate dehydrogenases are predominantly localized in the cytosol. *Planta* 207 (2):280-285. doi:10.1007/s004250050484
- Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal* 90 (5):856-867
- Chun HJ, Park HC, Koo SC, Lee JH, Park CY, Choi MS, Kang CH, Baek D, Cheong YH, Yun D-J (2012) Constitutive expression of mammalian nitric oxide synthase in tobacco plants triggers disease resistance to pathogens. *Molecules and Cells* 34 (5):463-471
- Cooney RV, Harwood PJ, Custer LJ, Franke AA (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental health perspectives* 102 (5):460-462
- Corpas FJ (2016) Reactive nitrogen species (RNS) in plants under physiological and adverse environmental conditions: current view. *Progress in Botany Vol* 78:97-119
- Corpas FJ, Barroso JB (2014a) NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Frontiers in Environmental Science* 2:55
- Corpas FJ, Barroso JB (2014b) Peroxynitrite (ONOO⁻) is endogenously produced in *Arabidopsis* peroxisomes and is overproduced under cadmium stress. *Annals of Botany* 113 (1):87-96
- Corpas FJ, Barroso JB (2017) Nitric oxide synthase-like activity in higher plants. *Nitric Oxide* 68:5-6. doi:10.1016/j.niox.2016.10.009
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant physiology* 136 (1):2722-2733

- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, Del Río LA (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 224 (2):246-254
- Corpas FJ, Chaki M, Fernandez-Ocana A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Río LA, Barroso JB (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and cell physiology* 49 (11):1711-1722
- Corpas FJ, Del Río LA, Palma JM (2019a) Plant peroxisomes at the crossroad of NO and H₂O₂ metabolism. *Journal of integrative plant biology* 61 (7):803-816
- Corpas FJ, González-Gordo S, Cañas A, Palma JM (2019b) Nitric oxide and hydrogen sulfide in plants: which comes first? *Journal of Experimental Botany* 70 (17):4391-4404
- Corpas FJ, Palma JM, Del Río LA, Barroso JB (2009) Evidence supporting the existence of l-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist* 184 (1):9-14
- Corpas FJ, Palma JM, Del Río LA, Barroso JB (2013) Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 4:29
- Correa-Aragunde N, Cejudo FJ, Lamattina L (2015) Nitric oxide is required for the auxin-induced activation of NADPH-dependent thioredoxin reductase and protein denitrosylation during root growth responses in arabidopsis. *Annals of botany* 116 (4):695-702
- Costa-Broseta Á, Perea-Resca C, Castillo M-C, Ruíz MF, Salinas J, León J (2019) Nitric oxide deficiency decreases C-repeat binding factor-dependent and-independent induction of cold acclimation. *Journal of experimental botany* 70 (12):3283-3296
- Couto N, Wood J, Barber J (2016) The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free radical biology and medicine* 95:27-42
- Crane BR, Sudhamsu J, Patel BA (2010) Bacterial nitric oxide synthases. *Annual review of biochemistry* 79:445-470
- Creighton TE (1993) *Proteins: structures and molecular properties*. Macmillan,
- Cueto M, Hernández-Perera O, Martín R, Bentura ML, Rodrigo J, Lamas S, Golvano MP (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS letters* 398 (2-3):159-164
- Cui B, Pan Q, Clarke D, Villarreal MO, Umbreen S, Yuan B, Shan W, Jiang J, Loake GJ (2018) S-nitrosylation of the zinc finger protein SRG1 regulates plant immunity. *Nature Communications* 9 (1):1-12
- Cui T, Schopfer FJ, Zhang J, Chen K, Ichikawa T, Baker PR, Batthyany C, Chacko BK, Feng X, Patel RP, Agarwal A, Freeman BA, Chen YE (2006) Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem* 281 (47):35686-35698. doi:10.1074/jbc.M603357200
- David A, Yadav S, Baluška F, Bhatla SC (2015) Nitric oxide accumulation and protein tyrosine nitration as a rapid and long distance signalling response to salt stress in sunflower seedlings. *Nitric Oxide* 50:28-37
- Davidson JF, Schiestl RH (2001) Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21 (24):8483-8489. doi:10.1128/mcb.21.24.8483-8489.2001
- De Michele R, Vurro E, Rigo C, Costa A, Elviri L, Di Valentin M, Careri M, Zottini M, Sanita di Toppi L, Lo Schiavo F (2009) Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. *Plant Physiology* 150 (1):217-228
- Dean JV, Harper JE (1986) Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the in vivo nitrate reductase assay. *Plant Physiology* 82 (3):718-723
- Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI (2014) Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in plant science* 19 (6):371-379
- Del Castello F, Nejamkin A, Cassia R, Correa-Aragunde N, Fernández B, Foresi N, Lombardo C, Ramirez L, Lamattina L (2019) The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up loose ends. *Nitric Oxide* 85:17-27

- Del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscari A (2011) Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytologist* 191 (2):405-417
- del Rio LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65 (7):783-792
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (23):13454-13459
- Delmastro-Greenwood M, Freeman BA, Wendell SG (2014) Redox-dependent anti-inflammatory signaling actions of unsaturated fatty acids. *Annual review of physiology* 76:79-105
- Derevnina L, Dagdas YF, De la Concepcion JC, Bialas A, Kellner R, Petre B, Domazakis E, Du J, Wu CH, Lin X, Aguilera-Galvez C, Cruz-Mireles N, Vleeshouwers VG, Kamoun S (2016) Nine things to know about elicitors. *New Phytol* 212 (4):888-895. doi:10.1111/nph.14137
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (25):16314-16318
- Devi SR, Prasad M (1999) Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: *Heavy metal stress in plants*. Springer, pp 99-116
- Di Ferdinando M, Brunetti C, Fini A, Tattini M (2012) Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds) *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. Springer New York, New York, NY, pp 159-179. doi:10.1007/978-1-4614-0634-1_9
- Di Fino LM, Cerrudo I, Salvatore SR, Schopfer FJ, García-Mata C, Laxalt AM (2020) Exogenous Nitro-Oleic Acid Treatment Inhibits Primary Root Growth by Reducing the Mitosis in the Meristem in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 11:1059. doi:10.3389/fpls.2020.01059
- Di Palma AA, Di Fino LM, Salvatore SR, D'Ambrosio JM, García-Mata C, Schopfer FJ, Laxalt AM (2020) Nitro-oleic acid triggers ROS production via NADPH oxidase activation in plants: A pharmacological approach. *Journal of plant physiology* 246:153128
- Dias MC, Santos C, Pinto G, Silva AMS, Silva S (2019) Titanium dioxide nanoparticles impaired both photochemical and non-photochemical phases of photosynthesis in wheat. *Protoplasma* 256 (1):69-78. doi:10.1007/s00709-018-1281-6
- Diaz-Amarilla P, Miquel E, Trostchansky A, Trias E, Ferreira AM, Freeman BA, Cassina P, Barbeito L, Vargas MR, Rubbo H (2016) Electrophilic nitro-fatty acids prevent astrocyte-mediated toxicity to motor neurons in a cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis via nuclear factor erythroid 2-related factor activation. *Free Radic Biol Med* 95:112-120. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.013
- Ding Y, Shi Y, Yang S (2019) Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. *New Phytologist* 222 (4):1690-1704
- Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (18):11908-11913. doi:10.1073/pnas.172398899
- Distéfano AM, Scuffi D, García-Mata C, Lamattina L, Laxalt AM (2012) Phospholipase D δ is involved in nitric oxide-induced stomatal closure. *Planta* 236 (6):1899-1907
- Djebali W, Zarrouk M, Brouquisse R, El Kahoui S, Limam F, Ghorbel MH, Chaïbi W (2005) Ultrastructure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplast membranes. *Plant Biol (Stuttg)* 7 (4):358-368. doi:10.1055/s-2005-837696
- Dong N, Li Y, Qi J, Chen Y, Hao Y (2018) Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production enhances chilling tolerance of walnut shoots in vitro via involvement chlorophyll fluorescence and other physiological parameter levels. *Scientia Horticulturae* 230:68-77

- Dowgert MF, Steponkus PL (1984) Behavior of the plasma membrane of isolated protoplasts during a freeze-thaw cycle. *Plant physiology* 75 (4):1139-1151
- Drincovich MF, Casati P, Andreo CS (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Lett* 490 (1-2):1-6. doi:10.1016/s0014-5793(00)02331-0
- Dufourc EJ (2008) The role of phytosterols in plant adaptation to temperature. *Plant Signal Behav* 3 (2):133-134. doi:10.4161/psb.3.2.5051
- Duina AA, Chang HC, Marsh JA, Lindquist S, Gaber RF (1996) A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science* 274 (5293):1713-1715. doi:10.1126/science.274.5293.1713
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (17):10328-10333
- Dyas L, Goad LJ (1993) Steryl fatty acyl esters in plants. *Phytochemistry* 34 (1):17-29
- Ederli L, Reale L, Madeo L, Ferranti F, Gehring C, Fornaciari M, Romano B, Pasqualini S (2009) NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (1):42-48
- Egan MJ, Wang Z-Y, Jones MA, Smirnov N, Talbot NJ (2007) Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (28):11772-11777
- Elizabeth C, Koshland D (1992) NO news is good news. *Science* 258 (5090):1862-1865
- Espinoza C, Liang Y, Stacey G (2017) Chitin receptor CERK 1 links salt stress and chitin-triggered innate immunity in Arabidopsis. *The Plant Journal* 89 (5):984-995
- Espunya MC, De Michele R, Gómez-Cadenas A, Martínez MC (2012) S-Nitrosoglutathione is a component of wound-and salicylic acid-induced systemic responses in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* 63 (8):3219-3227
- Faller P, Kienzler K, Krieger-Liszka A (2005) Mechanism of Cd²⁺ toxicity: Cd²⁺ inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca²⁺ site. *Biochim Biophys Acta* 1706 (1-2):158-164. doi:10.1016/j.bbabi.2004.10.005
- Fan H, Guo S, Jiao Y, Zhang R, Li J (2007) Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Frontiers of Agriculture in China* 1 (3):308-314
- Fan J, Chen K, Amombo E, Hu Z, Chen L, Fu J (2015) Physiological and molecular mechanism of nitric oxide (NO) involved in bermudagrass response to cold stress. *PLoS One* 10 (7):e0132991
- Fan J, Yu L, Xu C (2017) A Central Role for Triacylglycerol in Membrane Lipid Breakdown, Fatty Acid β -Oxidation, and Plant Survival under Extended Darkness. *Plant Physiol* 174 (3):1517-1530. doi:10.1104/pp.17.00653
- Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* 40 (4):462-472
- Fang MY, Huang KH, Tu WJ, Chen YT, Pan PY, Hsiao WC, Ke YY, Tsou LK, Zhang MM (2021) Chemoproteomic profiling reveals cellular targets of nitro-fatty acids. *Redox Biol* 46:102126. doi:10.1016/j.redox.2021.102126
- Fares A, Rossignol M, Peltier J-B (2011) Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis. *Biochemical and biophysical research communications* 416 (3-4):331-336
- Fazzari M, Khoo N, Woodcock SR, Li L, Freeman BA, Schopfer FJ (2015) Generation and esterification of electrophilic fatty acid nitroalkenes in triacylglycerides. *Free Radical Biology and Medicine* 87:113-124
- Fazzari M, Khoo NK, Woodcock SR, Jorkasky DK, Li L, Schopfer FJ, Freeman BA (2017) Nitro-fatty acid pharmacokinetics in the adipose tissue compartment. *J Lipid Res* 58 (2):375-385. doi:10.1194/jlr.M072058

- Fazzari M, Trostchansky A, Schopfer FJ, Salvatore SR, Sánchez-Calvo B, Vitturi D, Valderrama R, Barroso JB, Radi R, Freeman BA (2014) Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. *PloS one* 9 (1):e84884
- Fazzari M, Vitturi DA, Woodcock SR, Salvatore SR, Freeman BA, Schopfer FJ (2019) Electrophilic fatty acid nitroalkenes are systemically transported and distributed upon esterification to complex lipids [S]. *Journal of lipid research* 60 (2):388-399
- Feechan A, Kwon E, Yun B-W, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (22):8054-8059
- Feigl G, Kolbert Z, Lehotai N, Molnár Á, Ördög A, Bordé Á, Laskay G, Erdei L (2016) Different zinc sensitivity of Brassica organs is accompanied by distinct responses in protein nitration level and pattern. *Ecotoxicology and environmental safety* 125:141-152
- Feigl G, Lehotai N, Molnár Á, Ördög A, Rodríguez-Ruiz M, Palma JM, Corpas FJ, Erdei L, Kolbert Z (2015) Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress. *Annals of botany* 116 (4):613-625
- Feijó JA, Costa SS, Prado AM, Becker JD, Certal AC (2004) Signalling by tips. *Current opinion in plant biology* 7 (5):589-598
- Feng J, Wang C, Chen Q, Chen H, Ren B, Li X, Zuo J (2013) S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nature communications* 4 (1):1-9
- Ferrari A, De Stefano M, Baudouin E, Pucciariello C, Polverari A, Puppo A, Delledonne M (2008) Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Molecular plant-microbe interactions* 21 (6):781-790
- Ferreira LA, Mooradally AW, Zaslavsky B, Uversky VN, Graether SP (2018) Effect of an intrinsically disordered plant stress protein on the properties of water. *Biophysical journal* 115 (9):1696-1706
- Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, Bartesaghi S, Carballal Sn, Romero N, Alvarez B, Radi R (2018) Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chemical reviews* 118 (3):1338-1408
- Flores T, Todd CD, Tovar-Mendez A, Dhanoa PK, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, Polacco JC (2008) Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant physiology* 147 (4):1936-1946
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G, Lamattina L (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The Plant Cell* 22 (11):3816-3830
- Foresi N, Mayta ML, Lodeyro AF, Scuffi D, Correa-Aragunde N, García-Mata C, Casalagué C, Carrillo N, Lamattina L (2015) Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 82 (5):806-821
- Franz J, Bereau T, Pannwitt S, Anbazhagan V, Lehr A, Nubbemeyer U, Dietz U, Bonn M, Weidner T, Schneider D (2017) Nitrated fatty acids modulate the physical properties of model membranes and the structure of transmembrane proteins. *Chemistry—A European Journal* 23 (40):9690-9697
- Freeman BA, Baker PR, Schopfer FJ, Woodcock SR, Napolitano A, d'Ischia M (2008) Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem* 283 (23):15515-15519. doi:10.1074/jbc.R800004200
- Freschi L, Rodrigues MA, Domingues DS, Purgatto E, Van Sluys M-A, Magalhaes JR, Kaiser WM, Mercier H (2010) Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant physiology* 152 (4):1971-1985
- Fukudome M, Calvo-Begueria L, Kado T, Osuki K-i, Rubio MC, Murakami E-i, Nagata M, Kucho K-i, Sandal N, Stougaard J (2016) Hemoglobin LjGlb1-1 is involved in nodulation and regulates the level of nitric oxide in the *Lotus japonicus*–*Mesorhizobium loti* symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 67 (17):5275-5283

- Fukudome M, Watanabe E, Osuki K-I, Imaizumi R, Aoki T, Becana M, Uchiumi T (2019) Stably transformed *Lotus japonicus* plants overexpressing phytoalbumin LjGlb1-1 show decreased nitric oxide levels in roots and nodules as well as delayed nodule senescence. *Plant and Cell Physiology* 60 (4):816-825
- Furchgott R (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of artery smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:377-376
- Furchgott RF (1993) Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 Suppl 7:S1-2
- Gabaldón C, Gómez Ros LV, Pedreño MA, Ros Barceló A (2005) Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytologist* 165 (1):121-130
- Galetskiy D, Lohscheider JN, Kononikhin AS, Popov IA, Nikolaev EN, Adamska I (2011) Mass spectrometric characterization of photooxidative protein modifications in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membranes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25 (1):184-190
- Gall JE, Boyd RS, Rajakaruna N (2015) Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental monitoring and assessment* 187 (4):1-21
- Gallego SM, Benavides MP (2019) Cadmium-induced oxidative and nitrosative stress in plants. In: *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants*. Elsevier, pp 233-274
- García-Mata C, Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant physiology* 128 (3):790-792
- Gaupels F, Furch AC, Zimmermann MR, Chen F, Kaever V, Buhtz A, Kehr J, Sarioglu H, Kogel K-H, Durner J (2016) Systemic induction of NO-, redox-, and cGMP signaling in the pumpkin extrafascicular phloem upon local leaf wounding. *Frontiers in Plant Science* 7:154
- Gayatri G, Agurla S, Raghavendra AS (2013) Nitric oxide in guard cells as an important secondary messenger during stomatal closure. *Frontiers in Plant Science* 4:425
- Geisler AC, Rudolph TK (2012a) Nitroalkylation—a redox sensitive signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1820 (6):777-784. doi:10.1016/j.bbagen.2011.06.014
- Geisler AC, Rudolph TK (2012b) Nitroalkylation—a redox sensitive signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1820 (6):777-784
- Gil M, Graña M, Schopfer FJ, Wagner T, Denicola A, Freeman BA, Alzari PM, Batthyány C, Durán R (2013) Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* PknG by non-catalytic rubredoxin domain specific modification: reaction of an electrophilic nitro-fatty acid with the Fe-S center. *Free Radical Biology and Medicine* 65:150-161
- Gill SS, Anjum NA, Gill R, Yadav S, Hasanuzzaman M, Fujita M, Mishra P, Sabat SC, Tuteja N (2015) Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (14):10375-10394. doi:10.1007/s11356-015-4532-5
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48 (12):909-930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R (2000) Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* 275 (11):7757-7763
- Gonugunta VK, Srivastava N, Puli MR, Raghavendra AS (2008) Nitric oxide production occurs after cytosolic alkalization during stomatal closure induced by abscisic acid. *Plant, cell & environment* 31 (11):1717-1724
- González-Perilli L, Álvarez MN, Prolo C, Radi R, Rubbo H, Trostchansky A (2013) Nitroarachidonic acid prevents NADPH oxidase assembly and superoxide radical production in activated macrophages. *Free Radical Biology and Medicine* 58:126-133
- González-Perilli L, Mastrogianni M, de Castro Fernandes D, Rubbo H, Laurindo F, Trostchansky A (2017) Nitroarachidonic acid (NO2AA) inhibits protein disulfide isomerase (PDI) through reversible covalent adduct formation with critical cysteines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1861 (5):1131-1139
- Gouvea C, Souza J, Magalhaes A, Martins I (1997) NO—releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* 21 (3):183-187

- Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol* 59:115-142. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092938
- Grant OM, Brennan DP, Mellisho Salas CD, Dix PJ (2014) Impact of enhanced capacity to scavenge reactive oxygen species on cold tolerance of tobacco. *International Journal of Plant Sciences* 175 (5):544-554
- Greco TM, Hodara R, Parastatidis I, Heijnen HF, Dennehy MK, Liebler DC, Ischiropoulos H (2006) Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (19):7420-7425
- Grippo V, Mojovic M, Pavicevic A, Kabelac M, Hubatka F, Turanek J, Zatloukalova M, Freeman BA, Vacek J (2021) Electrophilic characteristics and aqueous behavior of fatty acid nitroalkenes. *Redox Biology* 38:101756
- Gullner G, Komives T, Király L, Schröder P (2018) Glutathione S-Transferase Enzymes in Plant-Pathogen Interactions. *Front Plant Sci* 9:1836. doi:10.3389/fpls.2018.01836
- Guo SJ, Zhou HY, Zhang XS, Li XG, Meng QW (2007) Overexpression of CaHSP26 in transgenic tobacco alleviates photoinhibition of PSII and PSI during chilling stress under low irradiance. *J Plant Physiol* 164 (2):126-136. doi:10.1016/j.jplph.2006.01.004
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends in plant science* 16 (3):160-168
- Gupta KJ, Igamberdiev AU (2011) The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion* 11 (4):537-543
- Gupta KJ, Kaiser WM (2010) Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria. *Plant and Cell Physiology* 51 (4):576-584
- Gupta KJ, Kaladhar VC, Fitzpatrick TB, Fernie AR, Møller IM, Loake GJ (2022) Nitric oxide regulation of plant metabolism. *Mol Plant* 15 (2):228-242. doi:10.1016/j.molp.2021.12.012
- Gupta KJ, Kolbert Z, Durner J, Lindermayr C, Corpas FJ, Brouquisse R, Barroso JB, Umbreen S, Palma JM, Hancock JT (2020) Regulating the regulator: nitric oxide control of post-translational modifications. *New Phytologist* 227 (5):1319-1325
- Gupta KJ, Lee CP, Ratcliffe RG (2017) Nitrite protects mitochondrial structure and function under hypoxia. *Plant and Cell Physiology* 58 (1):175-183
- Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *Journal of Experimental Botany* 56 (420):2601-2609
- Gutbrod K, Peisker H, Dörmann P (2021) Direct Infusion Mass Spectrometry for Complex Lipid Analysis. *Methods Mol Biol* 2295:101-115. doi:10.1007/978-1-0716-1362-7_7
- Gzyl J, Izbiańska K, Floryszak-Wieczorek J, Jelonek T, Arasimowicz-Jelonek M (2016) Cadmium affects peroxynitrite generation and tyrosine nitration in seedling roots of soybean (*Glycine max* L.). *Environmental and Experimental Botany* 131:155-163
- Hacquard S, Spaepen S, Garrido-Oter R, Schulze-Lefert P (2017) Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. *Annu Rev Phytopathol* 55:565-589. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035623
- Hageman R (1990) Historical perspectives of the enzymes of nitrate assimilation by crop plants and potential for biotechnological application. In: *Inorganic Nitrogen in Plants and Microorganisms*. Springer, pp 3-11
- Haghjou MM, Shariati M, Smirnoff N (2009) The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate-glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiol Plant* 135 (3):272-280. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01193.x
- Han X, Yang Y, Wu Y, Liu X, Lei X, Guo Y (2017) A bioassay-guided fractionation system to identify endogenous small molecules that activate plasma membrane H⁺-ATPase activity in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 68 (11):2951-2962

- Hancock JT, Neill SJ (2019) Nitric oxide: its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plants* 8 (2):41
- Hao GP, Xing Y, Zhang JH (2008) Role of nitric oxide dependence on nitric oxide synthase-like activity in the water stress signaling of maize seedling. *Journal of integrative plant biology* 50 (4):435-442
- Harker M, Hellyer A, Clayton JC, Duvoix A, Lanot A, Safford R (2003) Co-ordinate regulation of sterol biosynthesis enzyme activity during accumulation of sterols in developing rape and tobacco seed. *Planta* 216 (4):707-715. doi:10.1007/s00425-002-0913-3
- Harper JE (1981) Evolution of nitrogen oxide (s) during in vivo nitrate reductase assay of soybean leaves. *Plant Physiology* 68 (6):1488-1493
- Hartmann M-A (2004) 5 Sterol metabolism and functions in higher plants. In: *Lipid metabolism and membrane biogenesis*. Springer, pp 183-211
- Hasanuzzaman M, Bhuyan M, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fujita M, Fotopoulos V (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9 (8):681
- Hasanuzzaman M, Fotopoulos V, Nahar K, Fujita M (2019) *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*. John Wiley & Sons,
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Fujita M (2012) Exogenous nitric oxide alleviates high temperature induced oxidative stress in wheat ('Triticum aestivum'L.) seedlings by modulating the antioxidant defense and glyoxalase system. *Australian Journal of Crop Science* 6 (8):1314-1323
- Hayat S, Yadav S, Wani AS, Irfan M, Ahmad A (2011) Nitric oxide effects on photosynthetic rate, growth, and antioxidant activity in tomato. *International journal of vegetable science* 17 (4):333-348
- He Y, Tang R-H, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F (2004) Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* 305 (5692):1968-1971
- Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews Molecular cell biology* 6 (2):150-166
- Hichri I, Boscari A, Castella C, Rovere M, Puppo A, Brouquisse R (2015) Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. *Journal of experimental botany* 66 (10):2877-2887
- Hichri I, Boscari A, Meilhoc E, Catalá M, Barreno E, Bruand C, Lanfranco L, Brouquisse R (2016) Nitric oxide: a multitask player in plant–microorganism symbioses. *Gasotransmitters in Plants*:239-268
- Hill AC, Bennett J (1970) Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmospheric Environment* (1967) 4 (4):341-348
- Hoernes TP, Erlacher MD (2017) Translating the epitranscriptome. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 8 (1):e1375
- Hogg N (2002) The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42 (1):585-600
- Holtgreffe S, Gohlke J, Starmann J, Druce S, Klocke S, Altmann B, Wojtera J, Lindermayr C, Scheibe R (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiologia plantarum* 133 (2):211-228
- Horchani F, Prévot M, Boscari A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A (2011) Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiology* 155 (2):1023-1036
- Howlett R (1998) Nobel award stirs up debate on nitric oxide breakthrough. *Nature* 395 (6703):625-626
- Hu J, Huang X, Chen L, Sun X, Lu C, Zhang L, Wang Y, Zuo J (2015) Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 167 (4):1731-1746

- Hu J, Yang H, Mu J, Lu T, Peng J, Deng X, Kong Z, Bao S, Cao X, Zuo J (2017) Nitric oxide regulates protein methylation during stress responses in plants. *Molecular Cell* 67 (4):702-710. e704
- Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* 137 (2):663-670
- Hu Y, Lu L, Tian S, Li S, Liu X, Gao X, Zhou W, Lin X (2019) Cadmium-induced nitric oxide burst enhances Cd tolerance at early stage in roots of a hyperaccumulator *Sedum alfredii* partially by altering glutathione metabolism. *Science of The Total Environment* 650:2761-2770
- Hughes MN (1999) Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1411 (2-3):263-272
- Hussain J, Chen J, Locato V, Sabetta W, Behera S, Cimini S, Griggio F, Martínez-Jaime S, Graf A, Bouneb M (2016) Constitutive cyclic GMP accumulation in *Arabidopsis thaliana* compromises systemic acquired resistance induced by an avirulent pathogen by modulating local signals. *Scientific reports* 6 (1):1-18
- Ianutsevich E, Danilova O, Groza N, Tereshina V (2016) Membrane lipids and cytosol carbohydrates in *Aspergillus niger* under osmotic, oxidative, and cold impact. *Microbiology* 85 (3):302-310
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in plant science* 7 (7):301-308
- Igamberdiev AU, Bykova NV, Shah JK, Hill RD (2010) Anoxic nitric oxide cycling in plants: participating reactions and possible mechanisms. *Physiologia Plantarum* 138 (4):393-404
- Igamberdiev AU, Hill RD (2009) Plant mitochondrial function during anaerobiosis. *Annals of botany* 103 (2):259-268
- Iglesias MJ, Terrile MC, Correa-Aragunde N, Colman SL, Izquierdo-Álvarez A, Fiol DF, París R, Sánchez-López N, Marina A, Villalobos LIAC (2018) Regulation of SCFTIR1/AFBs E3 ligase assembly by S-nitrosylation of *Arabidopsis* SKP1-like1 impacts on auxin signaling. *Redox biology* 18:200-210
- Ihara H, Sawa T, Nakabeppu Y, Akaike T (2010) Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 48 (1):33-39
- Iqbal N, Umar S, Khan NA, Corpas FJ (2021) Crosstalk between abscisic acid and nitric oxide under heat stress: exploring new vantage points. *Plant Cell Reports*:1-22
- Islam MM, Hossain MA, Jannat R, Munemasa S, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2010) Cytosolic alkalization and cytosolic calcium oscillation in *Arabidopsis* guard cells response to ABA and MeJA. *Plant and Cell Physiology* 51 (10):1721-1730
- Izbiańska K, Floryszak-Wieczorek J, Gajewska J, Meller B, Kuźnicki D, Arasimowicz-Jelonek M (2018) RNA and mRNA nitration as a novel metabolic link in potato immune response to *Phytophthora infestans*. *Frontiers in plant science* 9:672
- Jaffrey SR, Snyder SH (2001) The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Science's STKE* 2001 (86):pl1-pl1
- Jain P, von Toerne C, Lindermayr C, Bhatla SC (2018) S-nitrosylation/denitrosylation as a regulatory mechanism of salt stress sensing in sunflower seedlings. *Physiologia Plantarum* 162 (1):49-72
- Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117 (5):625-635. doi:10.1016/j.cell.2004.05.002
- Janků M, Činčalová L, Luhová L, Lochman J, Petřivalský M (2019) Biological effects of oomycetes elicitors. *Plant Protection Science* 56 (1):1-8
- Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S (2006) Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology* 142 (3):1246-1255
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GK-S, Wendehenne D (2016) Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling* 9 (417):re2-re2

- Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X (2013) The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Molecular plant* 6 (2):275-286
- Jobbagy S, Vitturi DA, Salvatore SR, Turell L, Pires MF, Kansanen E, Batthyany C, Lancaster Jr JR, Freeman BA, Schopfer FJ (2019) Electrophiles modulate glutathione reductase activity via alkylation and upregulation of glutathione biosynthesis. *Redox biology* 21:101050
- Jones AM, Assmann SM (2004) Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO reports* 5 (6):572-578
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *nature* 444 (7117):323-329
- Jouanneau J (1967) Growth and synthesis of proteins in cell suspensions of a kinetin dependent tobacco. *Physiol Plant* 20:834-850
- Joudoi T, Shichiri Y, Kamizono N, Akaike T, Sawa T, Yoshitake J, Yamada N, Iwai S (2013) Nitrated cyclic GMP modulates guard cell signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25 (2):558-571
- Jovanović AM, Durst S, Nick P (2010) Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *Journal of Experimental Botany* 61 (3):901-909
- Jovanović SV, Kukavica B, Vidović M, Morina F, Menckhoff L (2018) Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In: *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. Springer, pp 269-300
- Joyard J, Maréchal E, Miège C, Block MA, Dorne A-J, Douce R (1998) Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher plant chloroplasts. In: *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*. Springer, pp 21-52
- Kaiser WM, Brendle-Behnisch E (1995) Acid-base-modulation of nitrate reductase in leaf tissues. *Planta* 196 (1):1-6
- Kaiser WM, Huber SC (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J Exp Bot* 52 (363):1981-1989. doi:10.1093/jexbot/52.363.1981
- Kaleem F, Shabir G, Aslam K, Rasul S, Manzoor H, Shah SM, Khan AR (2018) An overview of the genetics of plant response to salt stress: present status and the way forward. *Applied biochemistry and biotechnology* 186 (2):306-334
- Kansanen E, Bonacci G, Schopfer FJ, Kuosmanen SM, Tong KI, Leinonen H, Woodcock SR, Yamamoto M, Carlberg C, Ylä-Herttuala S, Freeman BA, Levonen AL (2011) Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem* 286 (16):14019-14027. doi:10.1074/jbc.M110.190710
- Kansanen E, Jyrkkänen H-K, Volger OL, Leinonen H, Kivelä AM, Häkkinen S-K, Woodcock SR, Schopfer FJ, Horrevoets AJ, Ylä-Herttuala S (2009a) Nrf2-dependent and-independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 284 (48):33233-33241
- Kansanen E, Jyrkkänen HK, Volger OL, Leinonen H, Kivelä AM, Häkkinen SK, Woodcock SR, Schopfer FJ, Horrevoets AJ, Ylä-Herttuala S, Freeman BA, Levonen AL (2009b) Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J Biol Chem* 284 (48):33233-33241. doi:10.1074/jbc.M109.064873
- Karabudak T, Bor M, Özdemir F, Türkan İ (2014) Glycine betaine protects tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase7 and lipoxygenase gene expression. *Mol Biol Rep* 41 (3):1401-1410. doi:10.1007/s11033-013-2984-6
- Karakuzu O, Cruz MR, Liu Y, Garsin DA (2019) Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans*. *Bio Protoc* 9 (21). doi:10.21769/BioProtoc.3409
- Kato H, Takemoto D, Kawakita K (2013) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in potato plant. *Physiologia Plantarum* 148 (3):371-386
- Kaup MT, Froese CD, Thompson JE (2002) A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol* 129 (4):1616-1626. doi:10.1104/pp.003087

- Kaur S, Prakash P, Bak D-H, Hong SH, Cho C, Chung M-S, Kim J-H, Lee S, Bai H-W, Lee SY (2021) Regulation of dual activity of ascorbate peroxidase 1 From *Arabidopsis thaliana* by conformational changes and posttranslational modifications. *Frontiers in plant science* 12
- Kawabe H, Ohtani M, Kurata T, Sakamoto T, Demura T (2018) Protein S-nitrosylation regulates xylem vessel cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 59 (1):17-29
- Kelley EE, Batthyany CI, Hundley NJ, Woodcock SR, Bonacci G, Del Rio JM, Schopfer FJ, Lancaster JR, Freeman BA, Tarpey MM (2008) Nitro-oleic acid, a novel and irreversible inhibitor of xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* 283 (52):36176-36184
- Keszler A, Zhang Y, Hogg N (2010) Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: How are S-nitrosothiols formed? *Free Radical Biology and Medicine* 48 (1):55-64
- Khan MN, Siddiqui MH, Mohammad F, Naeem M (2012) Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* 27 (4):210-218. doi:10.1016/j.niox.2012.07.005
- Kharitonov VG, Sundquist AR, Sharma VS (1995) Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 270 (47):28158-28164
- Khoo NK, Schopfer FJ (2019) Nitrated fatty acids: from diet to disease. *Current opinion in physiology* 9:67-72
- Klepper L (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment* (1967) 13 (4):537-542
- Kneeshaw S, Gelineau S, Tada Y, Loake GJ, Spoel SH (2014) Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular cell* 56 (1):153-162
- Kolbert Z, Barroso JB, Brouquisse R, Corpas FJ, Gupta KJ, Lindermayr C, Loake GJ, Palma JM, Petřivalský M, Wendehenne D (2019) A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide* 93:53-70
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of plant physiology* 165 (9):967-975
- Kolbert Z, Feigl G, Bordé Á, Molnár Á, Erdei L (2017) Protein tyrosine nitration in plants: present knowledge, computational prediction and future perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry* 113:56-63
- Kolbert Z, Lindermayr C (2021) Computational prediction of NO-dependent posttranslational modifications in plants: Current status and perspectives. *Plant Physiology and Biochemistry* 167:851-861
- Kolbert Z, Ortega L, Erdei L (2010) Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. *Journal of Plant Physiology* 167 (1):77-80
- Koutoulogenis GS, Kokotos G (2021) Nitro Fatty Acids (NO₂-FAs): An Emerging Class of Bioactive Fatty Acids. *Molecules* 26 (24):7536
- Kovacs I, Holzmeister C, Wirtz M, Geerloff A, Fröhlich T, Römling G, Kuruthukulangarakoola GT, Linster E, Hell R, Arnold GJ (2016) ROS-mediated inhibition of S-nitrosoglutathione reductase contributes to the activation of anti-oxidative mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 7:1669
- Kovacs I, Lindermayr C (2013) Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in plant science* 4:137
- Krasuska U, Ciacka K, Orzechowski S, Fettke J, Bogatek R, Gniazdowska A (2016) Modification of the endogenous NO level influences apple embryos dormancy by alterations of nitrated and biotinylated protein patterns. *Planta* 244 (4):877-891
- Krause GH, Winter K, Matsubara S, Krause B, Jahns P, Virgo A, Aranda J, García M (2012) Photosynthesis, photoprotection, and growth of shade-tolerant tropical tree seedlings under full sunlight. *Photosynthesis research* 113 (1):273-285
- Kubienová L, Tichá T, Jahnová J, Luhová L, Mieslerová B, Petřivalský M (2014) Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* 239 (1):139-146

- Kulakowski G, Bousquet H, Manneville JB, Bassereau P, Goud B, Oesterlin LK (2018) Lipid packing defects and membrane charge control RAB GTPase recruitment. *Traffic* 19 (7):536-545. doi:10.1111/tra.12568
- Kulik A, Wawer I, Krzywińska E, Bucholc M, Dobrowolska G (2011) SnRK2 protein kinases—key regulators of plant response to abiotic stresses. *Omics: a journal of integrative biology* 15 (12):859-872
- Kumar K, Kumar M, Kim S-R, Ryu H, Cho Y-G (2013) Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice* 6 (1):1-15
- Kumar K, Saddhe AA (2018) Targeting aquaporins for conferring salinity tolerance in crops. In: *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, Volume 1. Springer, pp 65-84
- Kumar RS, Shen C-H, Wu P-Y, Kumar SS, Hua MS, Yeh K-W (2016) Nitric oxide participates in plant flowering repression by ascorbate. *Scientific reports* 6 (1):1-13
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
- Lamattina L, Polacco JC (2007) Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology, vol 6. Springer Science & Business Media,
- Lamotte O, Bertoldo JB, Besson-Bard A, Rosnoblet C, Aimé S, Hichami S, Terenzi H, Wendehenne D (2015) Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. *Frontiers in Chemistry* 2:114
- Lancashire PD, Bleiholder H, Boom Tvd, Langelüddeke P, Stauss R, Weber E, Witzemberger A (1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. *Annals of applied Biology* 119 (3):561-601
- Lapiente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quirós PM, Calvo E, Rodríguez-Hernández MA, Navas P, Cruz R, Carracedo Á, López-Otín C, Pérez-Martos A, Fernández-Silva P, Fernández-Vizarra E, Enríquez JA (2013) Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340 (6140):1567-1570. doi:10.1126/science.1230381
- Lea US, Ten Hoopen F, Provan F, Kaiser WM, Meyer C, Lillo C (2004) Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta* 219 (1):59-65
- Leach J, Keyster M, Du Plessis M, Ludidi N (2010) Nitric oxide synthase activity is required for development of functional nodules in soybean. *Journal of plant physiology* 167 (18):1584-1591
- Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, Lebrun-Garcia A (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 13 (8):821-829. doi:10.1094/mpmi.2000.13.8.821
- Lecourieux D, Kappel C, Claverol S, Pieri P, Feil R, Lunn JE, Bonneau M, Wang L, Gomès E, Delrot S (2020) Proteomic and metabolomic profiling underlines the stage- and time-dependent effects of high temperature on grape berry metabolism. *Journal of integrative plant biology* 62 (8):1132-1158
- Lehotai N, Lyubenova L, Schröder P, Feigl G, Ördög A, Szilágyi K, Erdei L, Kolbert Z (2016) Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (*Pisum sativum* L). *Plant and Soil* 400 (1-2):107-122
- León J, Castillo MC, Coego A, Lozano-Juste J, Mir R (2014) Diverse functional interactions between nitric oxide and abscisic acid in plant development and responses to stress. *Journal of Experimental Botany* 65 (4):907-921
- Li J-H, Liu Y-Q, Lu P, Lin H-F, Bai Y, Wang X-C, Chen Y-L (2009) A signaling pathway linking nitric oxide production to heterotrimeric G protein and hydrogen peroxide regulates extracellular calmodulin induction of stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 150 (1):114-124
- Li J, Liu J, Wang G, Cha JY, Li G, Chen S, Li Z, Guo J, Zhang C, Yang Y, Kim WY, Yun DJ, Schumaker KS, Chen Z, Guo Y (2015) A chaperone function of NO CATALASE ACTIVITY1 is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27 (3):908-925. doi:10.1105/tpc.114.135095

- Li L, Zhao J, Zhao Y, Lu X, Zhou Z, Zhao C, Xu G (2016) Comprehensive investigation of tobacco leaves during natural early senescence via multi-platform metabolomics analyses. *Sci Rep* 6:37976. doi:10.1038/srep37976
- Li Q, Huang W, Xiong C, Zhao J (2018) Transcriptome analysis reveals the role of nitric oxide in *Pleurotus eryngii* responses to Cd²⁺ stress. *Chemosphere* 201:294-302
- Liang W, Ma X, Wan P, Liu L (2018) Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and biophysical research communications* 495 (1):286-291
- Liaudet L, Vassalli G, Pacher P (2009) Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library* 14:4809
- Libourel I, Van Bodegom P, Fricker M, Ratcliffe R (2006) Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. *Plant physiology* 142 (4):1710-1717
- Lillo C, Meyer C, Lea US, Provan F, Oltedal S (2004) Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of experimental botany* 55 (401):1275-1282
- Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* 58:115-136
- Lima ÉS, Bonini MG, Augusto O, Barbeiro HV, Souza HP, Abdalla DS (2005) Nitrated lipids decompose to nitric oxide and lipid radicals and cause vasorelaxation. *Free Radical Biology and Medicine* 39 (4):532-539
- Lin C-C, Jih P-J, Lin H-H, Lin J-S, Chang L-L, Shen Y-H, Jeng S-T (2011) Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding. *Plant molecular biology* 77 (3):235-249
- Lin W, Oliver DJ (2008) Role of triacylglycerols in leaves. *Plant Science* 175 (3):233-237
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner Jr (2006) Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* 281 (7):4285-4291
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner Jr (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant physiology* 137 (3):921-930
- Lindermayr C, Sell S, Müller B, Leister D, Durner J (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of Arabidopsis thaliana by nitric oxide. *The Plant Cell* 22 (8):2894-2907
- Liu C, Yin H, Gao P, Hu X, Yang J, Liu Z, Fu X, Luo D (2013) Phosphatidylserine synthase 1 is required for inflorescence meristem and organ development in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol* 55 (8):682-695. doi:10.1111/jipb.12045
- Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410 (6827):490-494
- Liu S, Yang R, Pan Y, Ma M, Pan J, Zhao Y, Cheng Q, Wu M, Wang M, Zhang L (2015) Nitric oxide contributes to minerals absorption, proton pumps and hormone equilibrium under cadmium excess in *Trifolium repens* L. plants. *Ecotoxicology and environmental safety* 119:35-46
- Liu X, Shi W, Zhang S, Lou C (2005) Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. *Chinese Science Bulletin* 50 (6):520-525
- Lombardo MC, Lamattina L (2012) Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in Arabidopsis root hair growth. *Journal of experimental botany* 63 (13):4875-4885
- Lopes-Oliveira PJ, Oliveira HC, Kolbert Z, Freschi L (2021) The light and dark sides of nitric oxide: multifaceted roles of nitric oxide in plant responses to light. *Journal of Experimental Botany* 72 (3):885-903
- Lozano-Juste J, Colom-Moreno R, León J (2011) In vivo protein tyrosine nitration in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* 62 (10):3501-3517
- Lu H, Sun J, Liang W, Zhang J, Rom O, Garcia-Barrio MT, Li S, Villacorta L, Schopfer FJ, Freeman BA, Chen YE, Fan Y (2019) Novel gene regulatory networks identified in response to nitro-conjugated linoleic acid in human endothelial cells. *Physiol Genomics* 51 (6):224-233. doi:10.1152/physiolgenomics.00127.2018
- Ludidi N, Gehring C (2003) Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry* 278 (8):6490-6494

- Lum H-K, Lee C-H, Butt YK-C, Lo SC-L (2005) Sodium nitroprusside affects the level of photosynthetic enzymes and glucose metabolism in *Phaseolus aureus* (mung bean). *Nitric Oxide* 12 (4):220-230
- Luo BF, Du ST, Lu KX, Liu WJ, Lin XY, Jin CW (2012) Iron uptake system mediates nitrate-facilitated cadmium accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of Experimental Botany* 63 (8):3127-3136
- Luschin-Ebengreuth N, Zechmann B (2016) Compartment-specific investigations of antioxidants and hydrogen peroxide in leaves of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced senescence. *Acta Physiol Plant* 38:133. doi:10.1007/s11738-016-2150-6
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J Exp Bot* 62 (1):21-37. doi:10.1093/jxb/erq281
- Lv X, Ge S, Jalal Ahammed G, Xiang X, Guo Z, Yu J, Zhou Y (2017) Crosstalk between nitric oxide and MPK1/2 mediates cold acclimation-induced chilling tolerance in tomato. *Plant and Cell Physiology* 58 (11):1963-1975
- Ma W, Xu W, Xu H, Chen Y, He Z, Ma M (2010) Nitric oxide modulates cadmium influx during cadmium-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *Planta* 232 (2):325-335
- Macioszek J, Anderson JB, Anderson LE (1990) Isolation of chloroplastic phosphoglycerate kinase: kinetics of the two-enzyme phosphoglycerate kinase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase couple. *Plant Physiology* 94 (1):291-296
- Manafi H, Baninasab B, Gholami M, Talebi M (2021) Nitric oxide induced thermotolerance in strawberry plants by activation of antioxidant systems and transcriptional regulation of heat shock proteins. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*:1-14
- Manai J, Gouia H, Corpas FJ (2014) Redox and nitric oxide homeostasis are affected in tomato (*Solanum lycopersicum*) roots under salinity-induced oxidative stress. *Journal of Plant Physiology* 171 (12):1028-1035
- Manni ML, Heinrich VA, Buchan GJ, O'Brien JP, Uvalle C, Cechova V, Koudelka A, Ukani D, Rawas-Qalaji M, Oury TD, Hart R, Ellgass M, Mullett SJ, Fajt ML, Wenzel SE, Holguin F, Freeman BA, Wendell SG (2021) Nitroalkene fatty acids modulate bile acid metabolism and lung function in obese asthma. *Sci Rep* 11 (1):17788. doi:10.1038/s41598-021-96471-9
- Mansour MMF, Salama KH, Allam HY (2015) Role of the plasma membrane in saline conditions: lipids and proteins. *The Botanical Review* 81 (4):416-451
- Marino SM, Gladyshev VN (2010) Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *Journal of molecular biology* 395 (4):844-859
- Martin CE, Oh CS, Jiang Y (2007) Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771 (3):271-285. doi:10.1016/j.bbalip.2006.06.010
- Martinez V, Mestre TC, Rubio F, Girones-Vilaplana A, Moreno DA, Mittler R, Rivero RM (2016) Accumulation of Flavonols over Hydroxycinnamic Acids Favors Oxidative Damage Protection under Abiotic Stress. *Front Plant Sci* 7:838. doi:10.3389/fpls.2016.00838
- Mata-Pérez C, Begara-Morales JC, Chaki M, Sánchez-Calvo B, Valderrama R, Padilla MN, Corpas FJ, Barroso JB (2016a) Protein Tyrosine Nitration during Development and Abiotic Stress Response in Plants. *Front Plant Sci* 7:1699. doi:10.3389/fpls.2016.01699
- Mata-Pérez C, Padilla MN, Sánchez-Calvo B, Begara-Morales JC, Valderrama R, Chaki M, Aranda-Cañó L, Moreno-González D, Molina-Díaz A, Barroso JB (2020) Endogenous Biosynthesis of S-Nitrosoglutathione From Nitro-Fatty Acids in Plants. *Front Plant Sci* 11:962. doi:10.3389/fpls.2020.00962
- Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Begara-Morales JC, Carreras A, Padilla MN, Melguizo M, Valderrama R, Corpas FJ, Barroso JB (2016b) Nitro-linolenic acid is a nitric oxide donor. *Nitric Oxide* 57:57-63

- Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Begara-Morales JC, Padilla MN, Valderrama R, Corpas FJ, Barroso JB (2016c) Nitric oxide release from nitro-fatty acids in *Arabidopsis* roots. *Plant signaling & behavior* 11 (3):e1154255
- Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Padilla MN, Begara-Morales JC, Luque F, Melguizo M, Jiménez-Ruiz J, Fierro-Risco J, Peñas-Sanjuán A, Valderrama R, Corpas FJ, Barroso JB (2016d) Nitro-Fatty Acids in Plant Signaling: Nitro-Linolenic Acid Induces the Molecular Chaperone Network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 170 (2):686-701. doi:10.1104/pp.15.01671
- Mata-Pérez C, Sánchez-Calvo B, Padilla MN, Begara-Morales JC, Valderrama R, Corpas FJ, Barroso JB (2017) Nitro-fatty acids in plant signaling: new key mediators of nitric oxide metabolism. *Redox Biology* 11:554-561
- Mata-Pérez C, Spoel SH (2019) Thioredoxin-mediated redox signalling in plant immunity. *Plant science* 279:27-33
- McInnis SM, Costa LM, Gutiérrez-Marcos JF, Henderson CA, Hiscock SJ (2005) Isolation and characterization of a polymorphic stigma-specific class III peroxidase gene from *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Plant molecular biology* 57 (5):659-677
- McInnis SM, Emery DC, Porter R, Desikan R, Hancock JT, Hiscock SJ (2006) The role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidase (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *Journal of Experimental Botany* 57 (8):1835-1846
- Mehla N, Sindhi V, Josula D, Bisht P, Wani SH (2017) An Introduction to Antioxidants and Their Roles in Plant Stress Tolerance. In: Khan MIR, Khan NA (eds) *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. Springer Singapore, Singapore, pp 1-23. doi:10.1007/978-981-10-5254-5_1
- Meilhoc E, Cam Y, Skapski A, Bruand C (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23 (6):748-759
- Melo T, Montero-Bullón JF, Domingues P, Domingues MR (2019) Discovery of bioactive nitrated lipids and nitro-lipid-protein adducts using mass spectrometry-based approaches. *Redox Biol* 23:101106. doi:10.1016/j.redox.2019.101106
- Meng Y, Zhang Q, Ding W, Shan W (2014) *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology* 5 (2):43-51. doi:10.1080/21501203.2014.917734
- Mengel A, Ageeva A, Georgii E, Bernhardt J, Wu K, Durner J, Lindermayr C (2017) Nitric oxide modulates histone acetylation at stress genes by inhibition of histone deacetylases. *Plant Physiology* 173 (2):1434-1452
- Meyer C, Stöhr C (2002) Soluble and plasma membrane-bound enzymes involved in nitrate and nitrite metabolism. In: *Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism*. Springer, pp 49-62
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61 (15):4197-4220. doi:10.1093/jxb/erq282
- Moche M, Stremlau S, Hecht L, Göbel C, Feussner I, Stöhr C (2010) Effect of nitrate supply and mycorrhizal inoculation on characteristics of tobacco root plasma membrane vesicles. *Planta* 231 (2):425-436
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant physiology* 130 (3):1288-1297
- Molassiotis A, Fotopoulos V (2011) Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree? *Plant Signal Behav* 6 (2):210-214. doi:10.4161/psb.6.2.14878
- Mollenhauer M, Mehrkens D, Rudolph V (2018) Nitrated fatty acids in cardiovascular diseases. *Nitric Oxide* 78:146-153
- Moncada S (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev* 43:109-142

- Monjil MS, Shibata Y, Takemoto D, Kawakita K (2013) Bis-aryl methanone compound is a candidate of nitric oxide producing elicitor and induces resistance in *Nicotiana benthamiana* against *Phytophthora infestans*. *Nitric Oxide* 29:34-45
- Monreal JA, Arias-Baldrich C, Tossi V, Feria AB, Rubio-Casal A, García-Mata C, Lamattina L, García-Mauriño S (2013) Nitric oxide regulation of leaf phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase activity: implication in sorghum responses to salinity. *Planta* 238 (5):859-869
- Morano KA, Grant CM, Moyer-Rowley WS (2012) The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190 (4):1157-1195. doi:10.1534/genetics.111.128033
- Moreau RA, Nyström L, Whitaker BD, Winkler-Moser JK, Baer DJ, Gebauer SK, Hicks KB (2018) Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 70:35-61. doi:10.1016/j.plipres.2018.04.001
- Morgan S, Lee J, Ashenden T (1992) Effects of nitrogen oxides on nitrate assimilation in bryophytes. *New Phytologist* 120 (1):89-97
- Morot-Gaudry-Talarmain Y, Rockel P, Moureaux T, Quillere I, Leydecker M, Kaiser W, Morot-Gaudry J (2002) Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* 215 (5):708-715
- Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJ, Hebelstrup KH, Gupta KJ (2013a) Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants* 5
- Mur LA, Prats E, Pierre S, Hall MA, Hebelstrup KH (2013b) Integrating nitric oxide into salicylic acid and jasmonic acid/ethylene plant defense pathways. *Frontiers in Plant Science* 4:215
- Nadtochiy SM, Zhu QM, Urciuoli W, Rafikov R, Black SM, Brookes PS (2015) Nitroalkenes confer acute cardioprotection via adenine nucleotide translocase 1. *Journal of Biological Chemistry* 290 (51):30267-30267
- Nagata M, Murakami E-i, Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K-i, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T (2008) Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (9):1175-1183
- Nahar K, Hasanuzzaman M, Alam MM, Rahman A, Suzuki T, Fujita M (2016) Polyamine and nitric oxide crosstalk: antagonistic effects on cadmium toxicity in mung bean plants through upregulating the metal detoxification, antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Ecotoxicology and environmental safety* 126:245-255
- Nakamura Y (2017) Plant Phospholipid Diversity: Emerging Functions in Metabolism and Protein-Lipid Interactions. *Trends Plant Sci* 22 (12):1027-1040. doi:10.1016/j.tplants.2017.09.002
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of experimental botany* 59 (2):165-176
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant physiology* 128 (1):13-16
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* 159 (1):11-35
- Nejadsadeghi L, Maali-Amiri R, Zeinali H, Ramezanzpour S, Sadeghzade B (2015) Membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in tetraploid and hexaploid wheats. *Mol Biol Rep* 42 (2):363-372. doi:10.1007/s11033-014-3776-3
- Nishimura A, Kawahara N, Takagi H (2013) The flavoprotein Tah18-dependent NO synthesis confers high-temperature stress tolerance on yeast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430 (1):137-143. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.023
- Niu L, Yu J, Liao W, Yu J, Zhang M, Dawuda MM (2017) Calcium and calmodulin are involved in nitric oxide-induced adventitious rooting of cucumber under simulated osmotic stress. *Frontiers in plant science* 8:1684
- Noack LC, Jaillais Y (2020) Functions of Anionic Lipids in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 71:71-102. doi:10.1146/annurev-arplant-081519-035910

- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH (2014) The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant physiology* 164 (4):1636-1648
- Noiro E, Der C, Lherminier J, Robert F, Moricova P, Kiêu K, Leborgne-Castel N, Simon-Plas F, Bouhidel K (2014) Dynamic changes in the subcellular distribution of the tobacco ROS-producing enzyme RBOHD in response to the oomycete elicitor cryptogein. *J Exp Bot* 65 (17):5011-5022. doi:10.1093/jxb/eru265
- Nouairi I, Ghnaya T, Ben Youssef N, Zarrouk M, Habib Ghorbel M (2006) Changes in content and fatty acid profiles of total lipids of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum* under cadmium stress. *J Plant Physiol* 163 (11):1198-1202. doi:10.1016/j.jplph.2005.08.020
- Ohama N, Sato H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2017) Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in plant science* 22 (1):53-65
- Ortega-Galisteo AP, Rodríguez-Serrano M, Pazmiño DM, Gupta DK, Sandalio LM, Romero-Puertas MC (2012) S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of experimental botany* 63 (5):2089-2103
- Örvar BL, Sangwan V, Omann F, Dhindsa RS (2000) Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* 23 (6):785-794
- Osanai T, Park YI, Nakamura Y (2017) Editorial: Biotechnology of Microalgae, Based on Molecular Biology and Biochemistry of Eukaryotic Algae and Cyanobacteria. *Front Microbiol* 8:118. doi:10.3389/fmicb.2017.00118
- Padilla MN, Mata-Pérez C, Melguizo M, Barroso JB (2017a) In vitro nitro-fatty acid release from Cys-NO₂-fatty acid adducts under nitro-oxidative conditions. *Nitric Oxide* 68:14-22
- Padilla MN, Mata-Pérez C, Melguizo M, Barroso JB (2017b) In vitro nitro-fatty acid release from Cys-NO₂-fatty acid adducts under nitro-oxidative conditions. *Nitric Oxide* 68:14-22. doi:10.1016/j.niox.2016.12.009
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* 132 (3):1241-1248
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology* 135 (1):279-286
- Palmer RM, Ferrige A, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 (6122):524-526
- Pearce RS (2001) Plant freezing and damage. *Annals of botany* 87 (4):417-424
- Pedrajas JR, McDonagh B, Hernández-Torres F, Miranda-Vizueté A, González-Ojeda R, Martínez-Galisteo E, Padilla CA, Bárcena JA (2016) Glutathione Is the Resolving Thiol for Thioredoxin Peroxidase Activity of 1-Cys Peroxiredoxin Without Being Consumed During the Catalytic Cycle. *Antioxid Redox Signal* 24 (3):115-128. doi:10.1089/ars.2015.6366
- Peixoto P, Cambraia J, Sant'Anna R, Mosquim P, Moreira M (2001) Aluminum effects on fatty acid composition and lipid peroxidation of a purified plasma membrane fraction of root apices of two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 24 (7):1061-1070
- Peleg-Grossman S, Melamed-Book N, Cohen G, Levine A (2010) Cytoplasmic H₂O₂ prevents translocation of NPR1 to the nucleus and inhibits the induction of PR genes in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 5 (11):1401-1406
- Per TS, Masood A, Khan NA (2017) Nitric oxide improves S-assimilation and GSH production to prevent inhibitory effects of cadmium stress on photosynthesis in mustard (*Brassica juncea* L.). *Nitric oxide* 68:111-124
- Pereckova J, Pekarova M, Szamecova N, Hoferova Z, Kamarytova K, Falk M, Perecko T (2021) Nitro-Oleic Acid Inhibits Stemness Maintenance and Enhances Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells via STAT3 Signaling. *Int J Mol Sci* 22 (18). doi:10.3390/ijms22189981

- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J* 32 (4):539-548. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01442.x
- Perreault F, Samadani M, Dewez D (2014) Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L. *Nanotoxicology* 8 (4):374-382. doi:10.3109/17435390.2013.789936
- Pietsch A, Lorenz RL (1993) Rapid separation of the major phospholipid classes on a single aminopropyl cartridge. *Lipids* 28 (10):945-947
- Planchet E, Jagadis Gupta K, Sonoda M, Kaiser WM (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal* 41 (5):732-743
- Platre MP, Bayle V, Armengot L, Bareille J, Marquès-Bueno MDM, Creff A, Maneta-Peyret L, Fiche JB, Nollmann M, Miège C, Moreau P, Martinière A, Jaillais Y (2019) Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science* 364 (6435):57-62. doi:10.1126/science.aav9959
- Pokora W, Aksmann A, Baścik-Remisiewicz A, Dettlaff-Pokora A, Rykaczewski M, Gappa M, Tukaj Z (2017) Changes in nitric oxide/hydrogen peroxide content and cell cycle progression: Study with synchronized cultures of green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of plant physiology* 208:84-93
- Polier S, Dragovic Z, Hartl FU, Bracher A (2008) Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell* 133 (6):1068-1079. doi:10.1016/j.cell.2008.05.022
- Poór P, Czékus Z, Ördög A (2019) Role of Nitric Oxide in Physiological and Stress Responses of Plants Under Darkness. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants: Production, Metabolism, Signaling and Defense Mechanisms*:515-531
- Prado AM, Colaço R, Moreno N, Silva AC, Feijó JA (2008) Targeting of pollen tubes to ovules is dependent on nitric oxide (NO) signaling. *Molecular plant* 1 (4):703-714
- Prado AM, Porterfield DM, Feijó JA (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes.
- Prats E, Carver TL, Mur LA (2008) Pathogen-derived nitric oxide influences formation of the appressorium infection structure in the phytopathogenic fungus *Blumeria graminis*. *Research in Microbiology* 159 (6):476-480
- Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bigny R, Gout E, Douce R, Guern J (1997) Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* 9 (11):2077-2091. doi:10.1105/tpc.9.11.2077
- Puyaubert J, Fares A, Rézé N, Peltier J-B, Baudouin E (2014) Identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* plantlets: effect of cold stress on cysteine nitrosylation level. *Plant Science* 215:150-156
- Rand JD, Grant CM (2006) The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol Biol Cell* 17 (1):387-401. doi:10.1091/mbc.e05-06-0520
- Rasul S, DUBREUIL-MAURIZI C, Lamotte O, Koen E, Poinssot B, Alcaraz G, Wendehenne D, Jeandroz S (2012) Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 35 (8):1483-1499
- Reichler SA, Torres J, Rivera AL, Cintolesi VA, Clark G, Roux SJ (2009) Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. *Journal of experimental botany* 60 (7):2129-2138
- Reszczyńska E, Hanaka A (2020) Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochem Biophys* 78 (4):401-414. doi:10.1007/s12013-020-00947-w
- Ribeiro Jr EA, Cunha FQ, Tamashiro WM, Martins IS (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS letters* 445 (2-3):283-286

- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of experimental botany* 53 (366):103-110
- Rodríguez-Serrano M, ROMERO-PUERTAS MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell & Environment* 29 (8):1532-1544
- Rogowska A, Szakiel A (2020) The role of sterols in plant response to abiotic stress. *Phytochemistry Reviews* 19 (6):1525-1538
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz K-J, Delledonne M (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell* 19 (12):4120-4130
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Mattè A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M (2008) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* 8 (7):1459-1469
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M (2004) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellular microbiology* 6 (9):795-803
- Rosa-Téllez S, Anoman AD, Flores-Tornero M, Toujani W, Alseek S, Fernie AR, Nebauer SG, Muñoz-Bertomeu J, Segura J, Ros R (2018) Phosphoglycerate Kinases Are Co-Regulated to Adjust Metabolism and to Optimize Growth. *Plant Physiol* 176 (2):1182-1198. doi:10.1104/pp.17.01227
- Rudolph TK, Freeman BA (2009) Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Science signaling* 2 (90):re7-re7
- Rudolph TK, Rudolph V, Edreira MM, Cole MP, Bonacci G, Schopfer FJ, Woodcock SR, Franek A, Pekarova M, Khoo NK (2010) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (5):938-945
- Ruelland E, Vaultier M-N, Zachowski A, Hurry V (2009) Cold signalling and cold acclimation in plants. *Advances in botanical research* 49:35-150
- Rümer S, Gupta KJ, Kaiser WM (2009) Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *Journal of Experimental Botany* 60 (7):2065-2072
- Russwurm M, Koesling D (2004) NO activation of guanylyl cyclase. *The EMBO journal* 23 (22):4443-4450
- Sabadashka M, Nagalievskaya M, Sybirna N (2021) Tyrosine nitration as a key event of signal transduction that regulates functional state of the cell. *Cell biology international* 45 (3):481-497
- Sachdev S, Ansari SA, Ansari MI, Fujita M, Hasanuzzaman M (2021) Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. *Antioxidants (Basel)* 10 (2). doi:10.3390/antiox10020277
- Saddhe AA, Malvankar MR, Karle SB, Kumar K (2019) Reactive nitrogen species: paradigms of cellular signaling and regulation of salt stress in plants. *Environmental and Experimental Botany* 161:86-97
- Saha J, Brauer EK, Sengupta A, Popescu SC, Gupta K, Gupta B (2015) Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 3:21
- Sainz M, Calvo-Begueria L, Pérez-Rontomé C, Wienkoop S, Abián J, Staudinger C, Bartesaghi S, Radi R, Becana M (2015) Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism. *The Plant Journal* 81 (5):723-735
- Saita E, Albanesi D, de Mendoza D (2016) Sensing membrane thickness: Lessons learned from cold stress. *Biochim Biophys Acta* 1861 (8 Pt B):837-846. doi:10.1016/j.bbali.2016.01.003
- Saito N, Yoshimasa N, Mori IC, Murata Y (2009) Nitric oxide functions in both methyl jasmonate signaling and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Plant signaling & behavior* 4 (2):119-120

- Samalova M, Johnson J, Illes M, Kelly S, Fricker M, Gurr S (2013) Nitric oxide generated by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* drives plant infection. *New Phytologist* 197 (1):207-222
- Sami F, Faizan M, Faraz A, Siddiqui H, Yusuf M, Hayat S (2018) Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxide* 73:22-38
- Sánchez-Vicente I, Lorenzo O (2021) Nitric oxide regulation of temperature acclimation: a molecular genetic perspective. *Journal of Experimental Botany*
- Sánchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ (2010) Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Molecular plant-microbe interactions* 23 (5):702-711
- Sang J, Jiang M, Lin F, Xu S, Zhang A, Tan M (2008) Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 50 (2):231-243
- Santolini J (2019) What does “NO-Synthase” stand for. *Front Biosci (Landmark Ed)* 24:133-171
- Santolini J, André F, Jeandroz S, Wendehenne D (2017) Nitric oxide synthase in plants: where do we stand? *Nitric Oxide* 63:30-38
- Sasano Y, Haitani Y, Hashida K, Ohtsu I, Shima J, Takagi H (2012) Enhancement of the proline and nitric oxide synthetic pathway improves fermentation ability under multiple baking-associated stress conditions in industrial baker's yeast. *Microb Cell Fact* 11:40. doi:10.1186/1475-2859-11-40
- Savvides SN, Scheiwein M, Böhme CC, Arteel GE, Karplus PA, Becker K, Schirmer RH (2002) Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite. *Journal of Biological Chemistry* 277 (4):2779-2784
- Scheler C, Durner J, Astier J (2013) Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Current opinion in plant biology* 16 (4):534-539
- Schopfer FJ, Baker PR, Giles G, Chumley P, Batthyany C, Crawford J, Patel RP, Hogg N, Branchaud BP, Lancaster JR (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. *Journal of Biological Chemistry* 280 (19):19289-19297
- Schopfer FJ, Cipollina C, Freeman BA (2011) Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chemical reviews* 111 (10):5997-6021
- Schopfer FJ, Cole MP, Groeger AL, Chen CS, Khoo NK, Woodcock SR, Golin-Bisello F, Motanya UN, Li Y, Zhang J, Garcia-Barrío MT, Rudolph TK, Rudolph V, Bonacci G, Baker PR, Xu HE, Batthyany CI, Chen YE, Hallis TM, Freeman BA (2010) Covalent peroxisome proliferator-activated receptor gamma adduction by nitro-fatty acids: selective ligand activity and anti-diabetic signaling actions. *J Biol Chem* 285 (16):12321-12333. doi:10.1074/jbc.M109.091512
- Schopfer FJ, Khoo NK (2019a) Nitro-fatty acid logistics: formation, biodistribution, signaling, and pharmacology. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 30 (8):505-519
- Schopfer FJ, Khoo NK (2019b) Nitro-Fatty Acid Logistics: Formation, Biodistribution, Signaling, and Pharmacology. *Trends Endocrinol Metab* 30 (8):505-519. doi:10.1016/j.tem.2019.04.009
- Schumann T, Paul S, Melzer M, Dörmann P, Jahns P (2017) Plant Growth under Natural Light Conditions Provides Highly Flexible Short-Term Acclimation Properties toward High Light Stress. *Front Plant Sci* 8:681. doi:10.3389/fpls.2017.00681
- Sculptoreanu A, Kullmann FA, Artim DE, Bazley FA, Schopfer F, Woodcock S, Freeman BA, De Groat W (2010) Nitro-oleic acid inhibits firing and activates TRPV1-and TRPA1-mediated inward currents in dorsal root ganglion neurons from adult male rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 333 (3):883-895
- Sehrawat A, Sougrakpam Y, Deswal R (2019) Cold modulated nuclear S-nitrosoproteome analysis indicates redox modulation of novel Brassicaceae specific, myrosinase and napin in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany* 161:312-333

- Seligman K, Saviani E, Oliveira H, Pinto-Maglio C, Salgado I (2008) Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant and Cell Physiology* 49 (7):1112-1121
- Serpa V, Vernal J, Lamattina L, Grotewold E, Cassia R, Terenzi H (2007) Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochemical and biophysical research communications* 361 (4):1048-1053
- Serrano I, Romero-Puertas MC, Sandalio LM, Olmedilla A (2015) The role of reactive oxygen species and nitric oxide in programmed cell death associated with self-incompatibility. *Journal of experimental botany* 66 (10):2869-2876
- Sevilla F, Jiménez A, Lázaro J (2015) What do the plant mitochondrial antioxidant and redox systems have to say under salinity, drought, and extreme temperature? In: *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress*. Springer, pp 23-55
- Shapiro AD (2005) Nitric oxide signaling in plants. *Vitamins & Hormones* 72:339-398
- Shi F-M, Li Y-Z (2008) *Verticillium dahliae* toxins-induced nitric oxide production in *Arabidopsis* is major dependent on nitrate reductase. *BMB reports* 41 (1):79-85
- Shi H-T, Li R-J, Cai W, Liu W, Wang C-L, Lu Y-T (2012) Increasing nitric oxide content in *Arabidopsis thaliana* by expressing rat neuronal nitric oxide synthase resulted in enhanced stress tolerance. *Plant and Cell Physiology* 53 (2):344-357
- Shih MC (1994) Cloning and sequencing of a cDNA clone encoding the cytosolic triose-phosphate isomerase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 104 (3):1103-1104. doi:10.1104/pp.104.3.1103
- Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho Ki, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T (2009) Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* 57 (2):254-263
- Siddiqui KS, Cavicchioli R (2006) Cold-adapted enzymes. *Annu Rev Biochem* 75:403-433
- Siddiqui M, Alamri SA, Mutahhar Y, Al-Khaishany M, Al-Qutami H, Nasir Khan M (2017) Nitric Oxide and calcium induced physiobiochemical changes in tomato (*Solanum Lycopersicum*) plant under heat stress. *Fresen Environ Bull* 26 (2a):1663-1672
- Signorelli S, Considine MJ (2018) Corrigendum: Nitric Oxide Enables Germination by a Four-Pronged Attack on ABA-Induced Seed Dormancy. *Front Plant Sci* 9:654. doi:10.3389/fpls.2018.00654
- Signorelli S, Möller MN, Coitiño EL, Denicola A (2011) Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* 512 (2):190-196
- Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE, Lamattina L (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant cell reports* 32 (6):853-866
- Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science* 167 (4):839-847
- Šírová J, Sedlářová M, Piterková J, Luhová L, Petřivalský M (2011) The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science* 181 (5):560-572
- Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, cell & environment* 30 (9):1126-1149
- Smith BC, Marletta MA (2012) Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Current opinion in chemical biology* 16 (5-6):498-506
- Souza JM, Peluffo G, Radi R (2008) Protein tyrosine nitration—functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine* 45 (4):357-366
- Srivastava N, Gonugunta VK, Puli MR, Raghavendra AS (2009) Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* 229 (4):757-765
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106 (6):675-683

- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258 (5090):1898-1902
- Starý T, Satková P, Piterková J, Mieslerová B, Luhová L, Mikulík J, Kašparovský T, Petřivalský M, Lochman J (2019) The elicitor β -cryptogein's activity in tomato is mediated by jasmonic acid and ethylene signalling pathways independently of elicitor-sterol interactions. *Planta* 249 (3):739-749. doi:10.1007/s00425-018-3036-1
- Stitt M, Zeeman SC (2012) Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr Opin Plant Biol* 15 (3):282-292. doi:10.1016/j.pbi.2012.03.016
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212 (5):835-841
- Stoimenova M, Igamberdiev AU, Gupta KJ, Hill RD (2007) Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta* 226 (2):465-474
- Stone JR, Marletta MA (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 33 (18):5636-5640
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R (2011) Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion in plant biology* 14 (6):691-699
- Szalai G, KelmQs T, Galiba G, Kocsy G (2008) Glutathione as an Antioxidant and Regulatory Molecule in Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* 28:66-80
- Szmidt-Jaworska A, Jaworski K, Tretyn A, Kopcewicz J (2004) The involvement of cyclic GMP in the photoperiodic flower induction of *Pharbitis nil*. *Journal of plant physiology* 161 (3):277-284
- Szuba A, Kasprowicz-Maluški A, Wojtaszek P (2015) Nitration of plant apoplastic proteins from cell suspension cultures. *Journal of proteomics* 120:158-168
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321 (5891):952-956
- Taguchi R, Houjou T, Nakanishi H, Yamazaki T, Ishida M, Imagawa M, Shimizu T (2005) Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 823 (1):26-36
- Takács Z, Poór P, Tari I (2016) Comparison of polyamine metabolism in tomato plants exposed to different concentrations of salicylic acid under light or dark conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 108:266-278
- Takahashi M, Shigeto J, Izumi S, Yoshizato K, Morikawa H (2016) Nitration is exclusive to defense-related PR-1, PR-3 and PR-5 proteins in tobacco leaves. *Plant signaling & behavior* 11 (7):e1197464
- Tamura M, Saito M, Yamamoto K, Takeuchi T, Ohtake K, Tateno H, Hirabayashi J, Kobayashi J, Arata Y (2015) S-nitrosylation of mouse galectin-2 prevents oxidative inactivation by hydrogen peroxide. *Biochemical and biophysical research communications* 457 (4):712-717
- Tang Y (2011) Screening of Peanut Genotypes for Low Temperature Tolerance and Identification of Low Temperature Responsive Genes. Qingdao: Ocean University of China
- Tanou G, Filippou P, Belghazi M, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V, Molassiotis A (2012) Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *The Plant Journal* 72 (4):585-599
- Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Molassiotis A, Job D (2009) Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *The Plant Journal* 60 (5):795-804
- Tanou G, Ziogas V, Belghazi M, Christou A, Filippou P, Job D, Fotopoulos V, Molassiotis A (2014) Polyamines reprogram oxidative and nitrosative status and the proteome of citrus plants exposed to salinity stress. *Plant, cell & environment* 37 (4):864-885
- Taylor O (1974) Air Pollutant Effects Influenced by Plant—Environmental Interaction. In. ACS Publications,

- Tehlivets O, Scheuringer K, Kohlwein SD (2007) Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1771 (3):255-270. doi:10.1016/j.bbalip.2006.07.004
- Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalengué CA (2012) Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *The Plant Journal* 70 (3):492-500
- Tian QY, Sun DH, Zhao MG, Zhang WH (2007) Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist* 174 (2):322-331
- Tischner R, Planchet E, Kaiser WM (2004) Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS letters* 576 (1-2):151-155
- Tjellström H, Yang Z, Allen DK, Ohlrogge JB (2012) Rapid kinetic labeling of Arabidopsis cell suspension cultures: implications for models of lipid export from plastids. *Plant Physiol* 158 (2):601-611. doi:10.1104/pp.111.186122
- Troncoso-Ponce MA, Cao X, Yang Z, Ohlrogge JB (2013) Lipid turnover during senescence. *Plant Science* 205:13-19
- Trostchansky A, Bonilla L, Thomas CP, O'Donnell VB, Marnett LJ, Radi R, Rubbo H (2011) Nitroarachidonic acid, a novel peroxidase inhibitor of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. *Journal of Biological Chemistry* 286 (15):12891-12900
- Trott A, Morano KA (2003) The yeast response to heat shock. In: *Yeast stress responses*. Springer, pp 71-119
- Tsikas D, Zoerner AA, Jordan J (2011) Oxidized and nitrated oleic acid in biological systems: analysis by GC-MS/MS and LC-MS/MS, and biological significance. *Biochim Biophys Acta* 1811 (11):694-705. doi:10.1016/j.bbalip.2011.06.015
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GF (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant and Cell Physiology* 47 (3):346-354
- Turell L, Steglich M, Alvarez B (2018) The chemical foundations of nitroalkene fatty acid signaling through addition reactions with thiols. *Nitric Oxide*. doi:10.1016/j.niox.2018.03.014
- Turell L, Vitturi DA, Coitiño EL, Lebrato L, Möller MN, Sagasti C, Salvatore SR, Woodcock SR, Alvarez B, Schopfer FJ (2017) The chemical basis of thiol addition to nitro-conjugated linoleic acid, a protective cell-signaling lipid. *Journal of Biological Chemistry* 292 (4):1145-1159
- Turrion-Gomez JL, Benito EP (2011) Flux of nitric oxide between the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* and the host plant. *Mol Plant Pathol* 12 (6):606-616. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00695.x
- Uemura T, Ueda T (2014) Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins. *Curr Opin Plant Biol* 22:116-121. doi:10.1016/j.pbi.2014.10.002
- Usadel B, Bläsing OE, Gibon Y, Retzlaff K, Höhne M, Günther M, Stitt M (2008) Global transcript levels respond to small changes of the carbon status during progressive exhaustion of carbohydrates in Arabidopsis rosettes. *Plant Physiol* 146 (4):1834-1861. doi:10.1104/pp.107.115592
- Valderrama R, Begara-Morales JC, Chaki M, Mata-Pérez C, Padilla MN, Barroso JB (2019) Hydrogen Peroxide (H₂O₂)- and Nitric Oxide (NO)-Derived Posttranslational Modifications. In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (eds) *Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide Signaling in Higher Plants*. Springer International Publishing, Cham, pp 37-67. doi:10.1007/978-3-030-11129-8_3
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varea P, Luis A, Barroso JB (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* 581 (3):453-461
- Valentovičová K, Halušková Lu, Huttová J, Mistrík I, Tamás L (2010) Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *Journal of plant physiology* 167 (1):10-14
- Vandelle E, Delledonne M (2011) Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* 181 (5):534-539

- Velez-Ramirez AI, van Ieperen W, Vreugdenhil D, Millenaar FF (2011) Plants under continuous light. *Trends Plant Sci* 16 (6):310-318. doi:10.1016/j.tplants.2011.02.003
- Verdoni N, Mench M, Cassagne C, Bessoule JJ (2001) Fatty acid composition of tomato leaves as biomarkers of metal-contaminated soils. *Environ Toxicol Chem* 20 (2):382-388
- Vihervaara A, Sistonen L (2014) HSF1 at a glance. *Journal of cell science* 127 (2):261-266
- Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Chen XL, Freeman BA, Chen YE, Cui T (2007) Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (1):H770-776. doi:10.1152/ajpheart.00261.2007
- Vitor SC, Duarte GT, Saviani EE, Vincentz MG, Oliveira HC, Salgado I (2013) Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal activity of nitric oxide during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. *Planta* 238 (3):475-486
- Vollár M, Feigl G, Oláh D, Horváth A, Molnár Á, Kúsz N, Ördög A, Csupor D, Kolbert Z (2020a) Nitro-Oleic Acid in Seeds and Differently Developed Seedlings of *Brassica napus* L. *Plants* 9 (3):406
- Vollár M, Feigl G, Oláh D, Horváth A, Molnár Á, Kúsz N, Ördög A, Csupor D, Kolbert Z (2020b) Nitro-Oleic Acid in Seeds and Differently Developed Seedlings of *Brassica napus* L. *Plants (Basel)* 9 (3). doi:10.3390/plants9030406
- Waldman S (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39:163-196
- Wang B, Tang X, Cheng L, Zhang A, Zhang W, Zhang F, Liu J, Cao Y, Allan D, Vance C (2010) Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytologist* 187 (4):1112-1123
- Wang C, Weerapana E, Blewett MM, Cravatt BF (2014) A chemoproteomic platform to quantitatively map targets of lipid-derived electrophiles. *Nature methods* 11 (1):79-85
- Wang D, Liu Y, Tan X, Liu H, Zeng G, Hu X, Jian H, Gu Y (2015a) Effect of exogenous nitric oxide on antioxidative system and S-nitrosylation in leaves of *Boehmeria nivea* (L.) Gaud under cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research* 22 (5):3489-3497
- Wang P, Du Y, Hou Y-J, Zhao Y, Hsu C-C, Yuan F, Zhu X, Tao WA, Song C-P, Zhu J-K (2015b) Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (2):613-618
- Wang P, Killeen ME, Sumpter TL, Ferris LK, Falo Jr LD, Freeman BA, Schopfer FJ, Mathers AR (2021) Electrophilic nitro-fatty acids suppress psoriasisform dermatitis: STAT3 inhibition as a contributory mechanism. *Redox biology* 43:101987
- Wang P, Zhu J-K, Lang Z (2015c) Nitric oxide suppresses the inhibitory effect of abscisic acid on seed germination by S-nitrosylation of SnRK2 proteins. *Plant signaling & behavior* 10 (6):e1031939
- Wang W, Li C, Yang T (2016) Protection of nitro-fatty acid against kidney diseases. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 310 (8):F697-F704
- Wang Y-Q, Feechan A, Yun B-W, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang F-Q, Xie Z-S, Pallas JA (2009a) S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *Journal of Biological Chemistry* 284 (4):2131-2137
- Wang Y, Chen T, Zhang C, Hao H, Liu P, Zheng M, Baluška F, Šamaj J, Lin J (2009b) Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca²⁺ and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. *New Phytologist* 182 (4):851-862
- Wany A, Foyer CH, Gupta KJ (2018) Nitrate, NO and ROS signaling in stem cell homeostasis. *Trends in plant science* 23 (12):1041-1044
- Wawer I, Bucholc M, Astier J, Anielska-Mazur A, Dahan J, Kulik A, Wysłouch-Cieszynska A, Zaręba-Kozioł M, Krzywinska E, Dadlez M (2010) Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochemical Journal* 429 (1):73-83
- Wedel B, Humbert P, Harteneck C, Foerster J, Malkewitz J, Böhme E, Schultz G, Koesling D (1994) Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (7):2592-2596

- Wei L, Zhang M, Wei S, Zhang J, Wang C, Liao W (2020) Roles of nitric oxide in heavy metal stress in plants: cross-talk with phytohormones and protein S-nitrosylation. *Environmental pollution* 259:113943
- Weibezahn J, Schlieker C, Tessarz P, Mogk A, Bukau B (2005) Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation. *Biol Chem* 386 (8):739-744. doi:10.1515/bc.2005.086
- Weisslocker-Schaetzel M, André F, Touazi N, Foresi N, Lembrouk M, Dorlet P, Frelet-Barrand A, Lamattina L, Santolini J (2017) The NOS-like protein from the microalgae *Ostreococcus tauri* is a genuine and ultrafast NO-producing enzyme. *Plant Science* 265:100-111
- Wellburn A, Majernik O, Wellburn FA (1972) Effects of SO₂ and NO₂ polluted air upon the ultrastructure of chloroplasts. *Environmental Pollution* (1970) 3 (1):37-49
- Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H, Pugin A (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14 (8):1937-1951. doi:10.1105/tpc.002295
- Wewer V, Dombrink I, vom Dorp K, Dörmann P (2011) Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Lipid Res* 52 (5):1039-1054. doi:10.1194/jlr.D013987
- Wilkins KA, Matthus E, Swarbreck SM, Davies JM (2016) Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. *Frontiers in plant science* 7:1296
- Wilkinson JQ, Crawford NM (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Molecular and General Genetics MGG* 239 (1):289-297
- Wimalasekera R, Tebartz F, Scherer GF (2011) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Science* 181 (5):593-603
- Wojtaszek P (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry* 54 (1):1-4
- Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28 (1):32-40. doi:10.1016/s0968-0004(02)00003-8
- Woodcock C-SC, Huang Y, Woodcock SR, Salvatore SR, Singh B, Golin-Bisello F, Davidson NE, Neumann CA, Freeman BA, Wendell SG (2018) Nitro-fatty acid inhibition of triple-negative breast cancer cell viability, migration, invasion, and tumor growth. *Journal of Biological Chemistry* 293 (4):1120-1137
- Wünsche H, Baldwin IT, Wu J (2011) S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Experimental Botany* 62 (13):4605-4616
- Xie Y, Mao Y, Lai D, Zhang W, Zheng T, Shen W (2013) Roles of NIA/NR/NOA1-dependent nitric oxide production and HY1 expression in the modulation of *Arabidopsis* salt tolerance. *Journal of experimental botany* 64 (10):3045-3060
- Xiong J, Lu H, Lu K, Duan Y, An L, Zhu C (2009) Cadmium decreases crown root number by decreasing endogenous nitric oxide, which is indispensable for crown root primordia initiation in rice seedlings. *Planta* 230 (4):599-610
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu J-K (2001) The *Arabidopsis* LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *The Plant Cell* 13 (9):2063-2083
- Xu C, Shanklin J (2016) Triacylglycerol Metabolism, Function, and Accumulation in Plant Vegetative Tissues. *Annu Rev Plant Biol* 67:179-206. doi:10.1146/annurev-arplant-043015-111641
- Xu J, Wang W, Yin H, Liu X, Sun H, Mi Q (2010) Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant and Soil* 326 (1):321-330

- Xu J, Yang KY, Yoo SJ, Liu Y, Ren D, Zhang S (2014) Reactive oxygen species in signalling the transcriptional activation of WIPK expression in tobacco. *Plant Cell Environ* 37 (7):1614-1625. doi:10.1111/pce.12271
- Xu Y, Fu J, Chu X, Sun Y, Zhou H, Hu T (2013) Nitric oxide mediates abscisic acid induced light-tolerance in leaves of tall fescue under high-light stress. *Scientia Horticulturae* 162:1-10
- Xuan Y, Zhou S, Wang L, Cheng Y, Zhao L (2010) Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiology* 153 (4):1895-1906
- Ya'Acov YL, Haramaty E (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology* 148 (3-4):258-263
- Yamamoto-Katou A, Katou S, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2006) Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant and cell physiology* 47 (6):726-735
- Yamaoka Y, Shin S, Lee Y, Ito M, Lee Y, Nishida I (2021) Phosphatidylserine Is Required for the Normal Progression of Cell Plate Formation in Arabidopsis Root Meristems. *Plant Cell Physiol* 62 (9):1396-1408. doi:10.1093/pcp/pcab086
- Yamasaki H (2000) Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 355 (1402):1477-1488
- Yamasaki H, Cohen MF (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in plant science* 11 (11):522-524
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in plant science* 4 (4):128-129
- Yang H, Mu J, Chen L, Feng J, Hu J, Li L, Zhou J-M, Zuo J (2015) S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology* 167 (4):1604-1615
- Yeo WS, Kim YJ, Kabir MH, Kang JW, Kim KP (2015) Mass spectrometric analysis of protein tyrosine nitration in aging and neurodegenerative diseases. *Mass spectrometry reviews* 34 (2):166-183
- Yin C, Karim S, Zhang H, Aronsson H (2017) Arabidopsis RabF1 (ARA6) Is Involved in Salt Stress and Dark-Induced Senescence (DIS). *Int J Mol Sci* 18 (2). doi:10.3390/ijms18020309
- Yoshikawa Y, Nasuno R, Kawahara N, Nishimura A, Watanabe D, Takagi H (2016) Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric Oxide* 57:85-91. doi:10.1016/j.niox.2016.04.003
- Yu X, Feng B, He P, Shan L (2017) From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annu Rev Phytopathol* 55:109-137. doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035649
- Yu Y, Wang A, Li X, Kou M, Wang W, Chen X, Xu T, Zhu M, Ma D, Li Z, Sun J (2018) Melatonin-Stimulated Triacylglycerol Breakdown and Energy Turnover under Salinity Stress Contributes to the Maintenance of Plasma Membrane H(+)-ATPase Activity and K(+)/Na(+) Homeostasis in Sweet Potato. *Front Plant Sci* 9:256. doi:10.3389/fpls.2018.00256
- Yuan HM, Huang X (2016) Inhibition of root meristem growth by cadmium involves nitric oxide-mediated repression of auxin accumulation and signalling in Arabidopsis. *Plant, cell & environment* 39 (1):120-135
- Yun B-W, Feechan A, Yin M, Saidi NB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang J-G, Kwon E, Spoel SH (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478 (7368):264-268
- Zafra A, Rodríguez-García MI, de Dios Alché J (2010) Cellular localization of ROS and NO in olive reproductive tissues during flower development. *BMC Plant Biology* 10 (1):1-14
- Zeevaart A (1976) Some effects of fumigating plants for short periods with NO₂. *Environmental Pollution* (1970) 11 (2):97-108

- Zeng H, Xu L, Singh A, Wang H, Du L, Poovaiah B (2015) Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Frontiers in plant science* 6:600
- Zhang J, Villacorta L, Chang L, Fan Z, Hamblin M, Zhu T, Chen CS, Cole MP, Schopfer FJ, Deng CX (2010) Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circulation research* 107 (4):540-548
- Zhang X, Liu Y, Liu Q, Zong B, Yuan X, Sun H, Wang J, Zang L, Ma Z, Liu H (2018) Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced photosynthesis and antioxidant system of tall fescue seedlings response to low-light stress. *Environmental and Experimental Botany* 155:226-238
- Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* 224 (3):545-555
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology* 134 (2):849-857
- Zhao M-G, Chen L, Zhang L-L, Zhang W-H (2009) Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 151 (2):755-767
- Zhao M-G, Tian Q-Y, Zhang W-H (2007) Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 144 (1):206-217
- Zhao Y, Chang Z, Zhao G, Lu H, Xiong W, Liang W, Wang H, Villacorta L, Garcia-Barrio MT, Zhu T, Guo Y, Fan Y, Chang L, Schopfer FJ, Freeman BA, Zhang J, Chen YE (2021) Suppression of Vascular Macrophage Activation by Nitro-Oleic Acid and its Implication for Abdominal Aortic Aneurysm Therapy. *Cardiovasc Drugs Ther* 35 (5):939-951. doi:10.1007/s10557-020-07031-8
- Zheng S, Su M, Wang L, Zhang T, Wang J, Xie H, Wu X, Haq SIU, Qiu Q-S (2021) Small signaling molecules in plant response to cold stress. *Journal of Plant Physiology* 266:153534
- Zhong L, Zhou W, Wang H, Ding S, Lu Q, Wen X, Peng L, Zhang L, Lu C (2013) Chloroplast small heat shock protein HSP21 interacts with plastid nucleoid protein pTAC5 and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis* under heat stress. *Plant Cell* 25 (8):2925-2943. doi:10.1105/tpc.113.111229
- Zhou K, Zhang J (2014) Nitric oxide in plants and its role in regulating flower development. *Yi Chuan= Hereditas* 36 (7):661-668
- Zhou S, Jia L, Chu H, Wu D, Peng X, Liu X, Zhang J, Zhao J, Chen K, Zhao L (2016) *Arabidopsis* CaM1 and CaM4 promote nitric oxide production and salt resistance by inhibiting S-nitrosoglutathione reductase via direct binding. *PLoS genetics* 12 (9):e1006255
- Ziogas V, Tanou G, Filippou P, Diamantidis G, Vasilakakis M, Fotopoulos V, Molassiotis A (2013) Nitrosative responses in citrus plants exposed to six abiotic stress conditions. *Plant physiology and biochemistry* 68:118-126
- Zou W (2011) Separation of lipids by solid phase extraction (SPE).

Anexo I

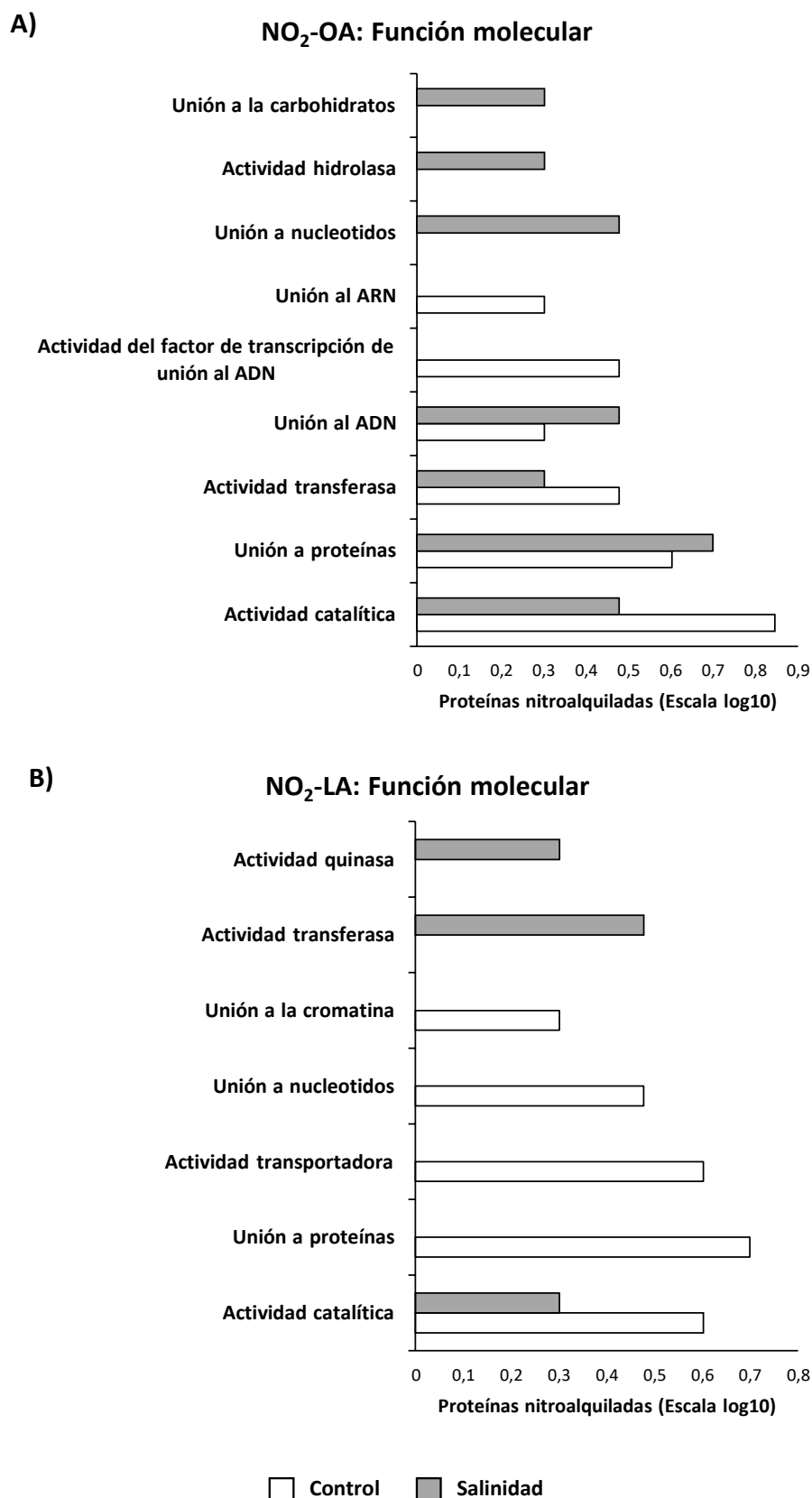


Figura 1. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) identificadas en el control y en el estrés por salinidad.

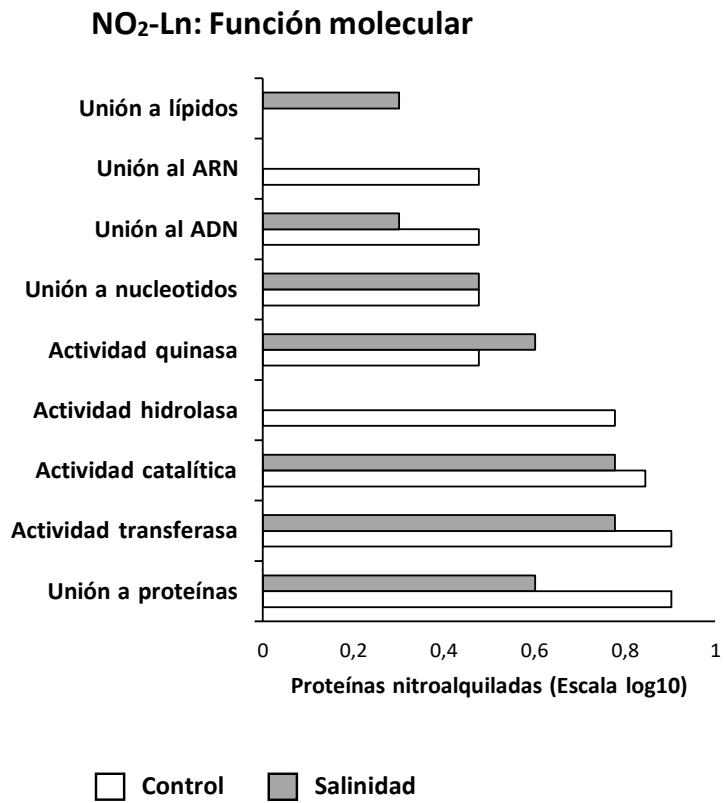


Figura 2. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-Ln identificadas en el control y en el estrés por salinidad.

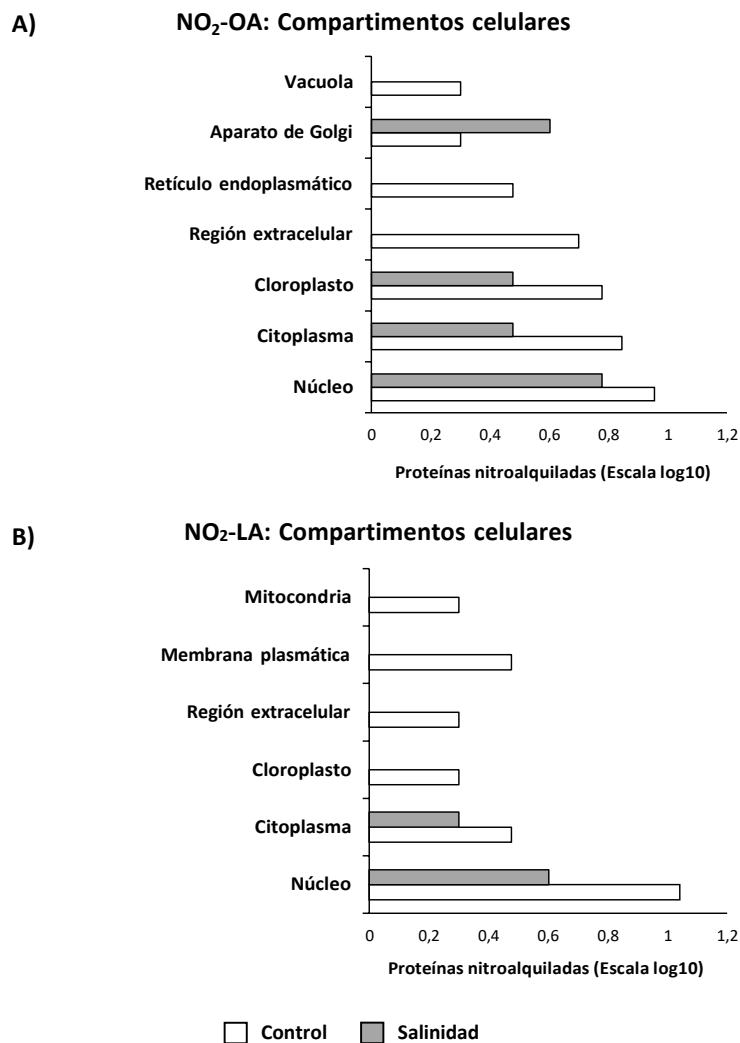


Figura 3. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) en las situaciones de control y estrés por salinidad.

NO₂-Ln: Compartimentos celulares

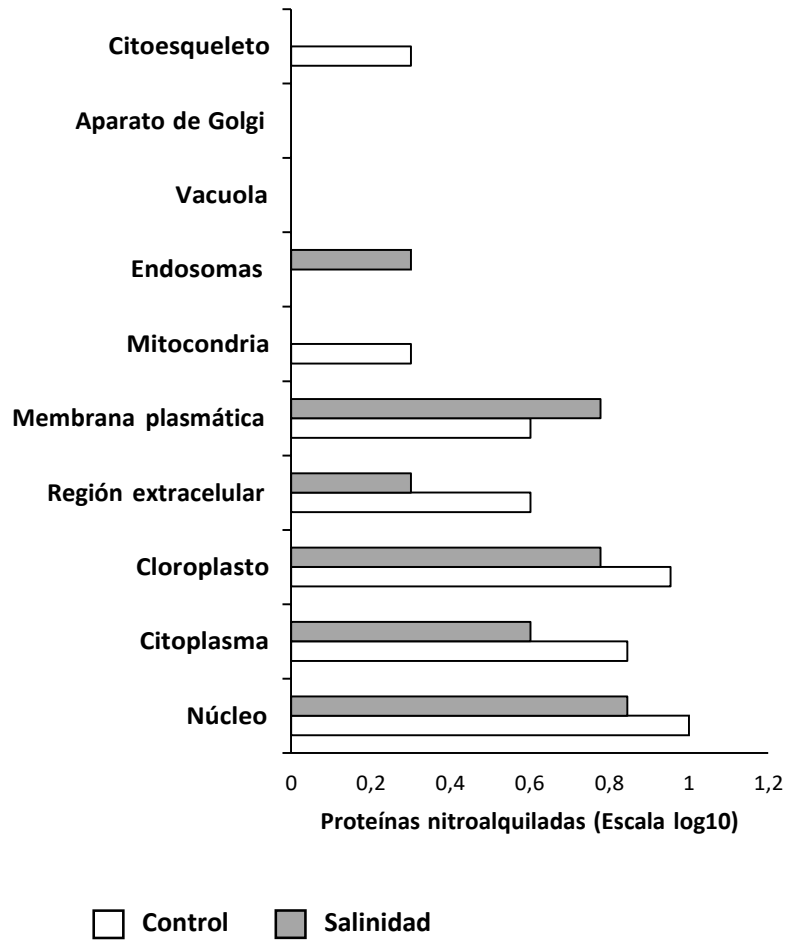


Figura 4. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-Ln en las situaciones de control y estrés por salinidad.

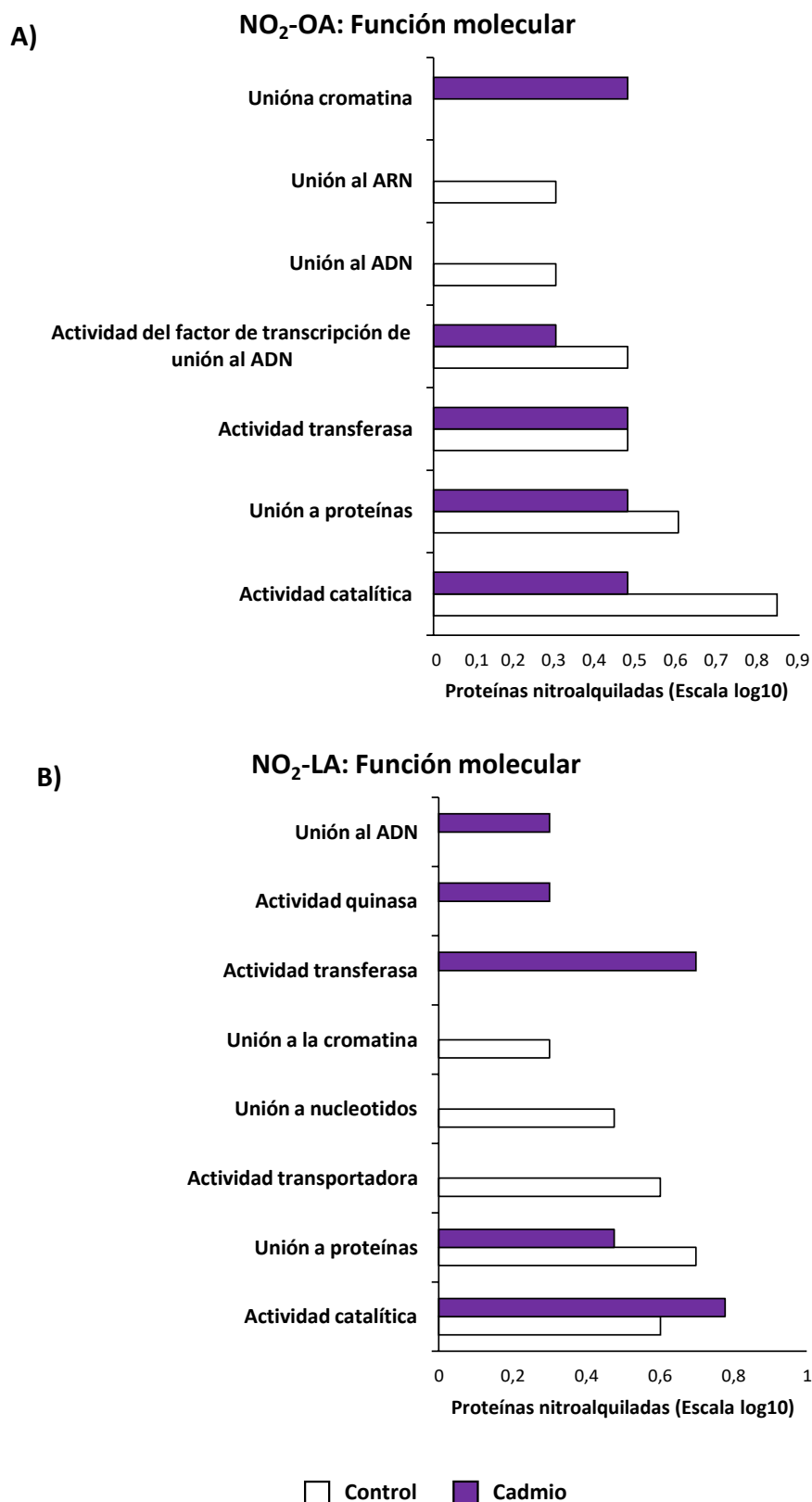


Figura 5. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) identificadas en el control y en el estrés por cadmio.

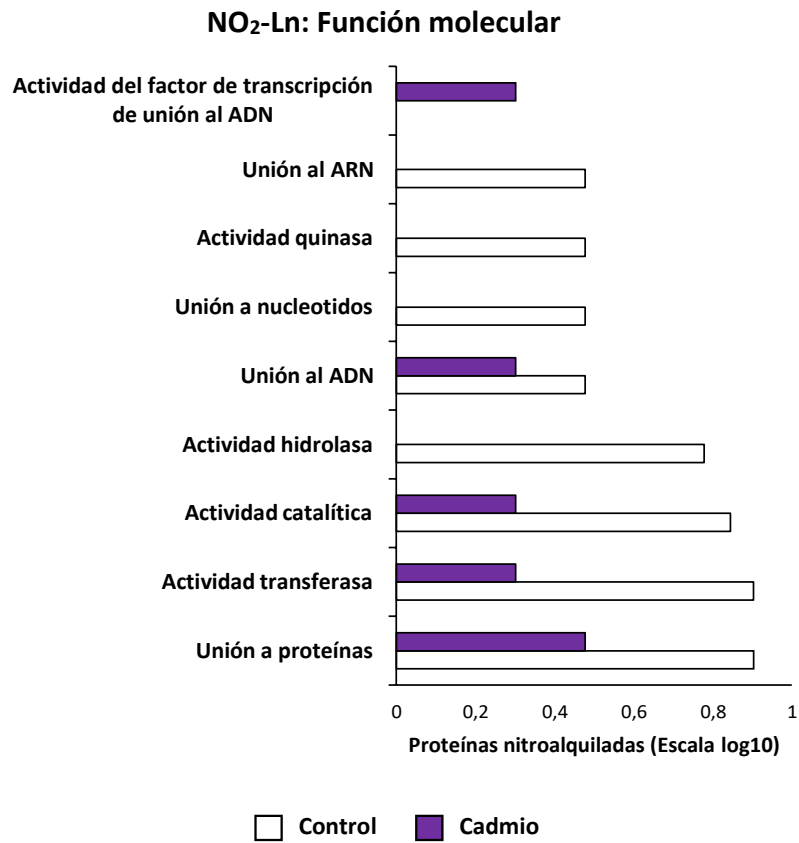


Figura 6. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-Ln identificadas en el control y en el estrés por cadmio.

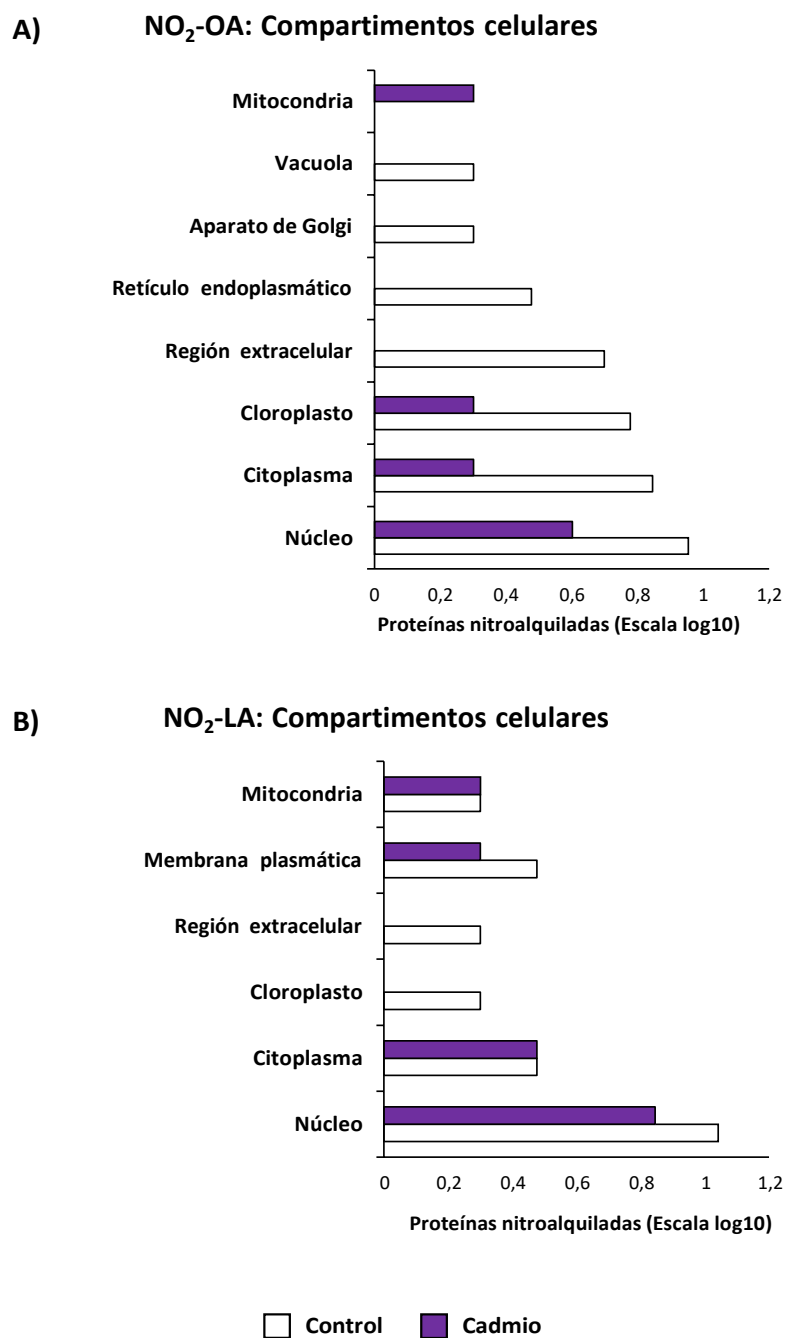


Figura 7. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) en las situaciones de control y estrés por cadmio.

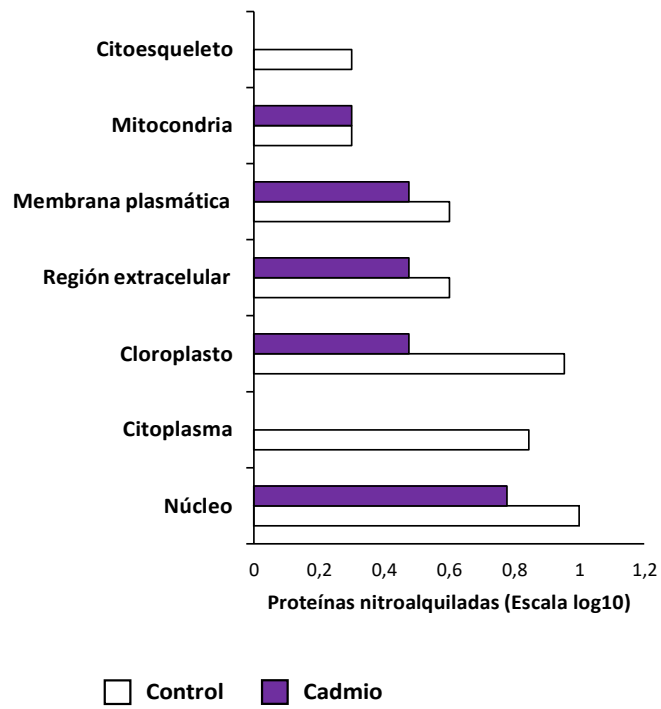
NO₂-Ln: Compartimentos celulares

Figura 8. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-Ln en las situaciones de control y estrés por cadmio.

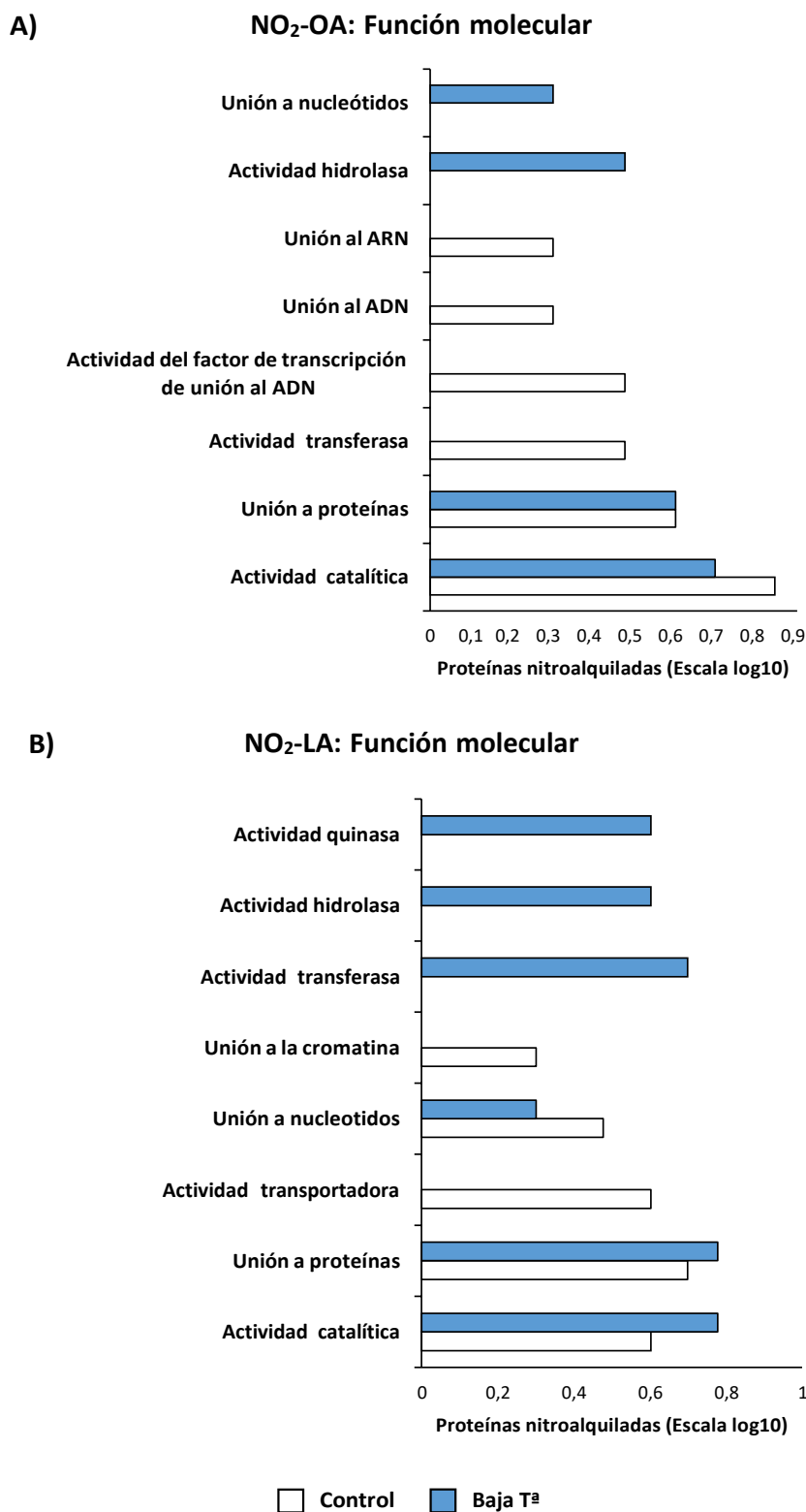


Figura 9. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) identificadas en el control y en el estrés por baja temperatura.

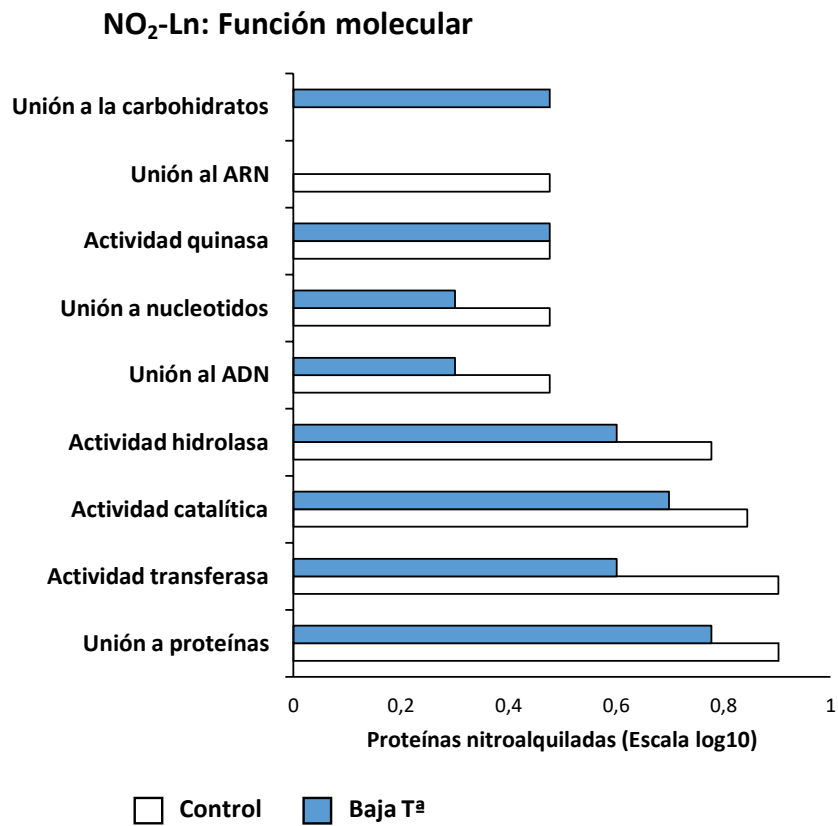


Figura 10. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-Ln identificadas en el control y en el estrés por baja temperatura.

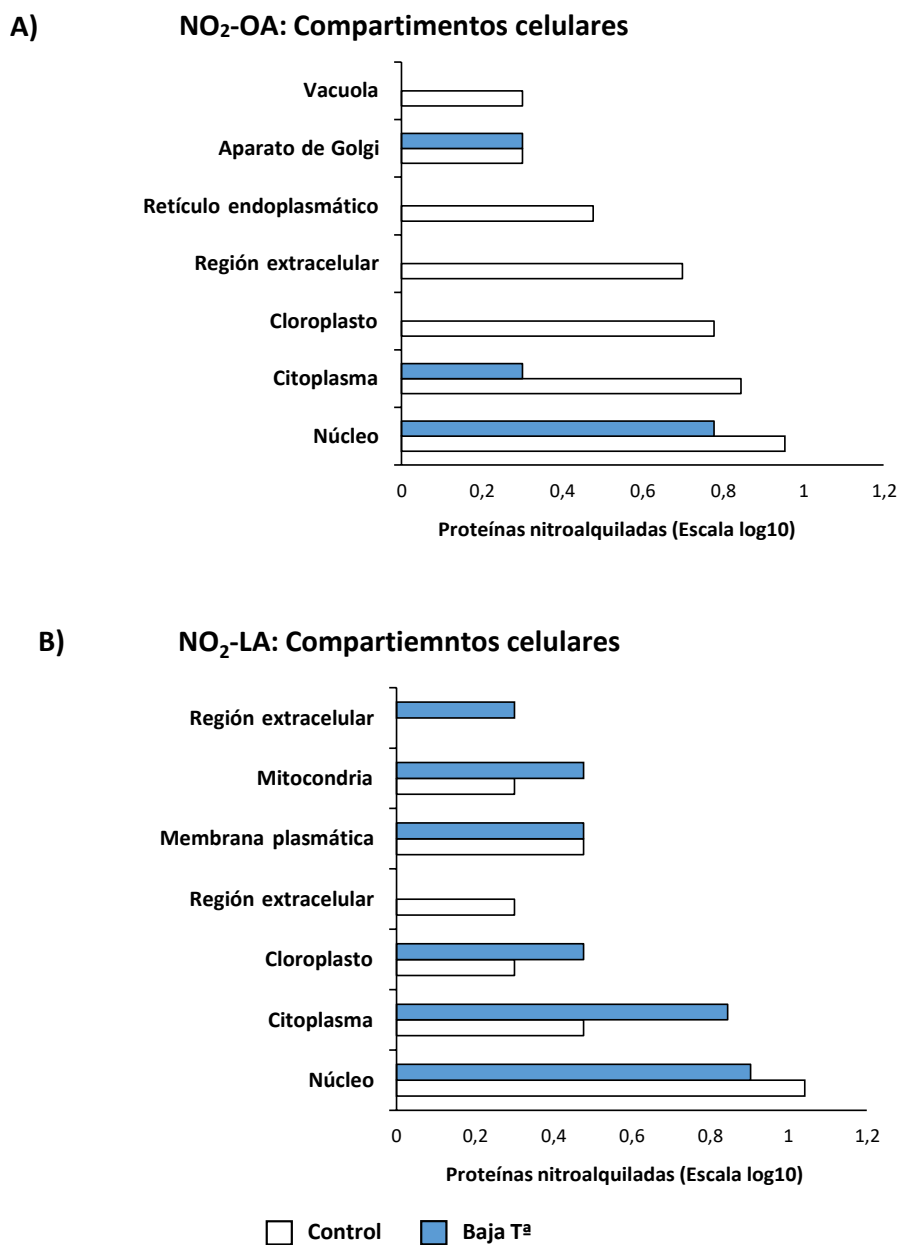


Figura 11. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) en las situaciones de control y estrés por baja temperatura.

NO₂-Ln: Compartimentos celulares

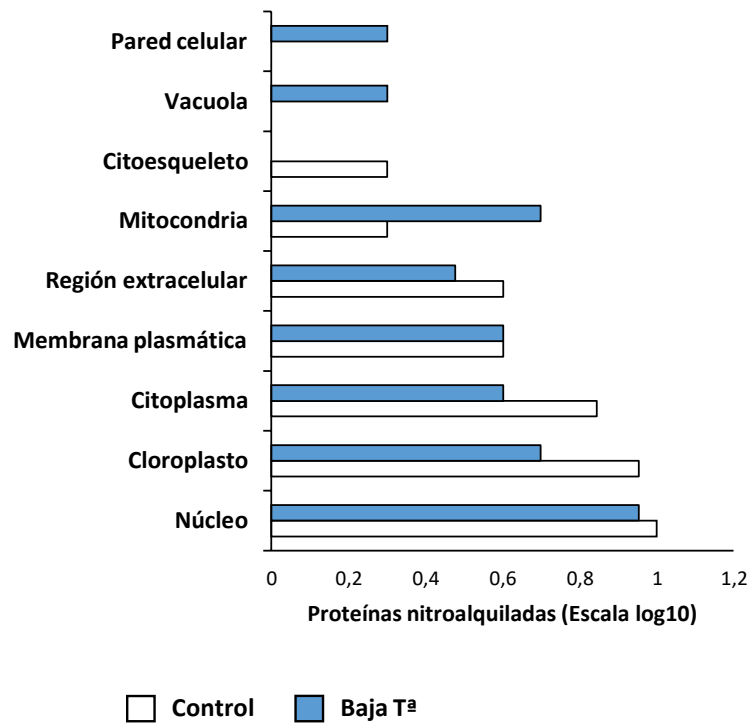


Figura 12. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-Ln en las situaciones de control y estrés por baja temperatura.

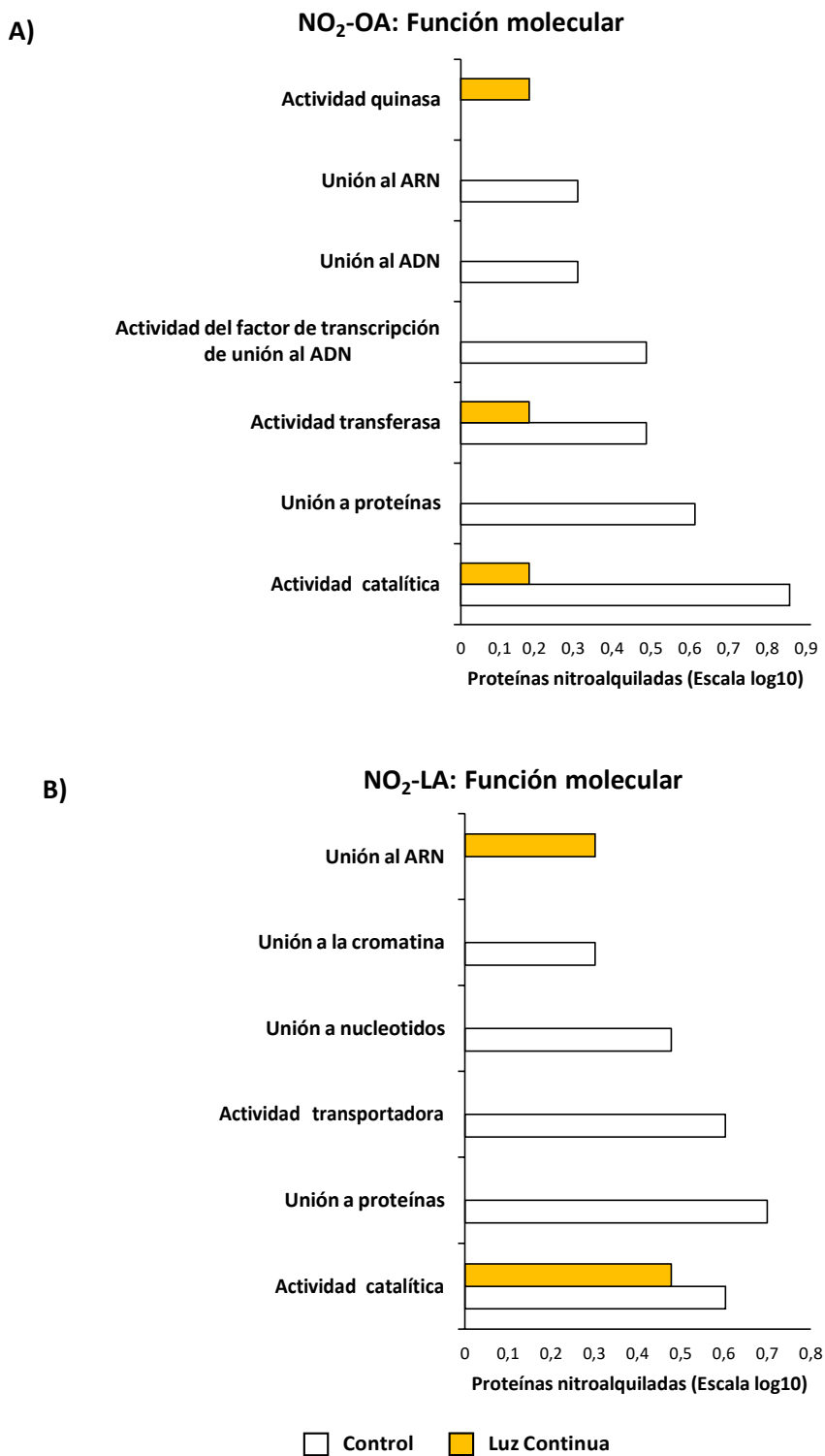


Figura 13. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) identificadas en el control y en el estrés por luz continua.

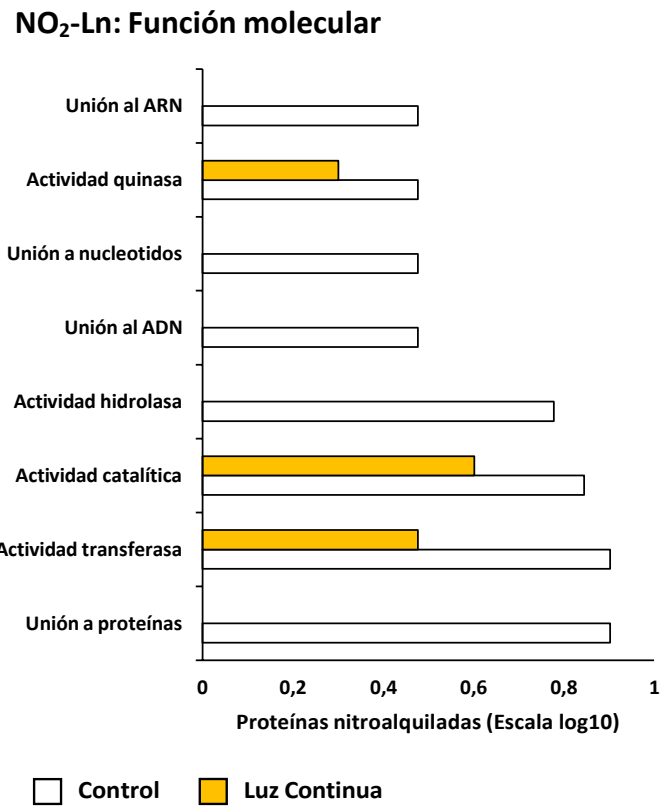


Figura 14. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-Ln identificadas en el control y en el estrés por luz continua.

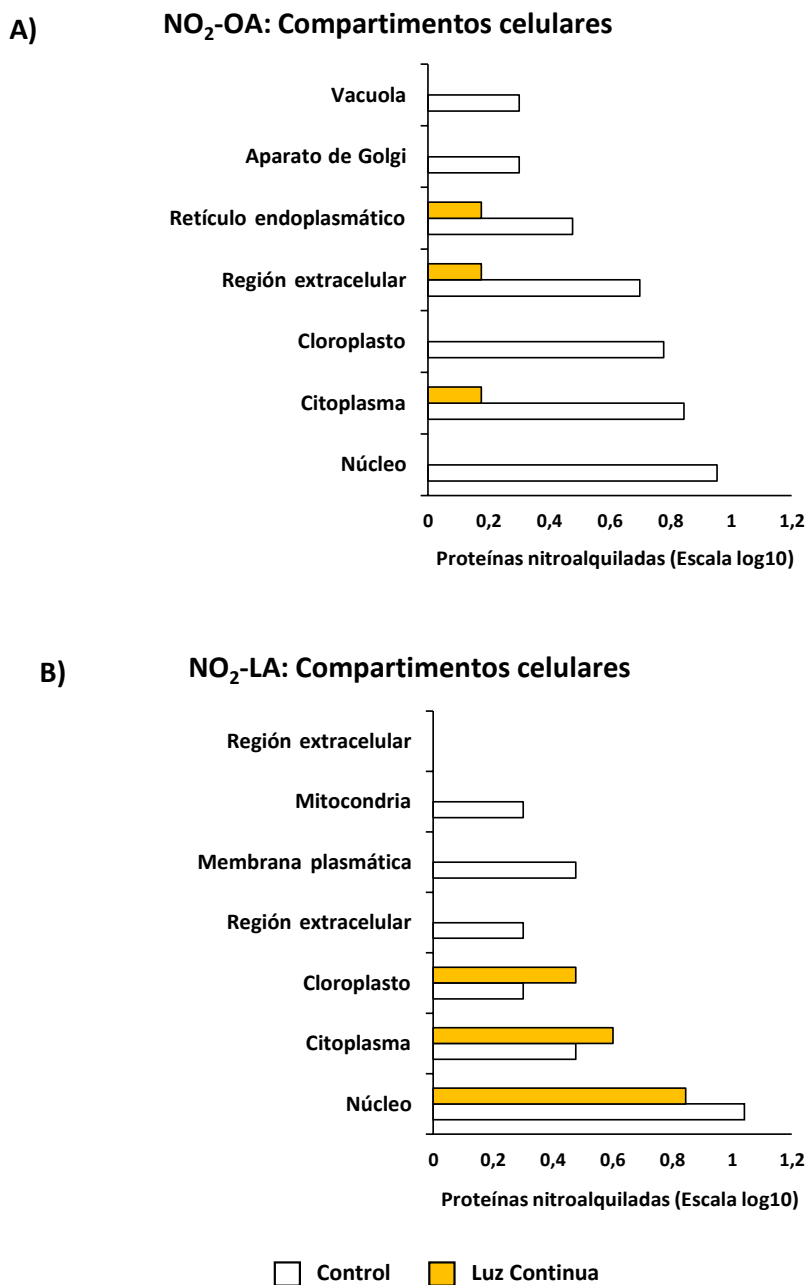


Figura 15. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) en las situaciones de control y estrés por luz continua.

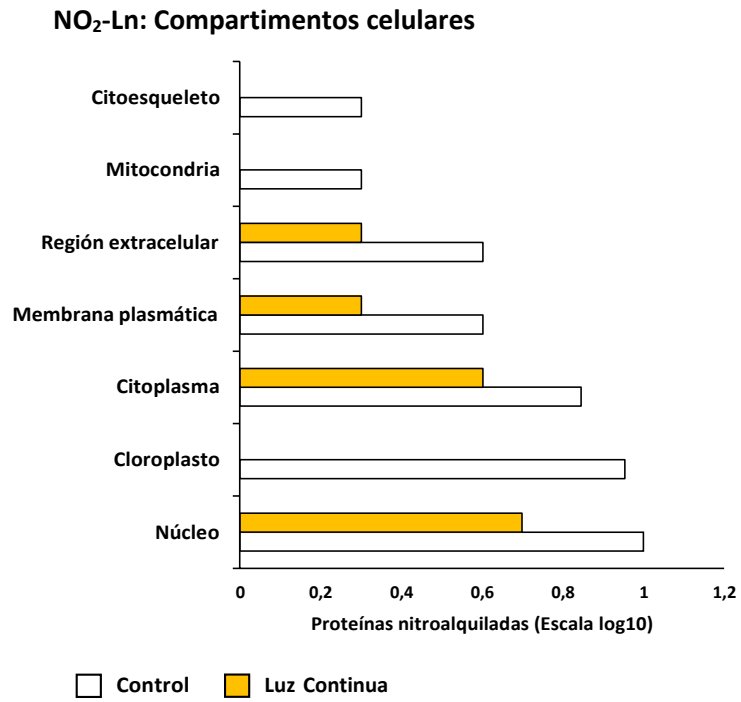
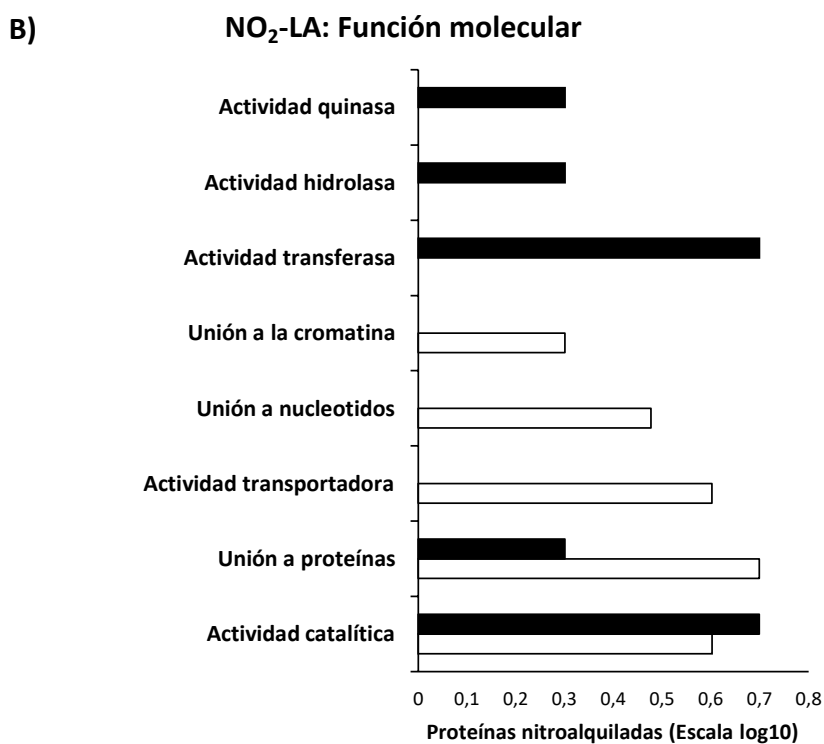
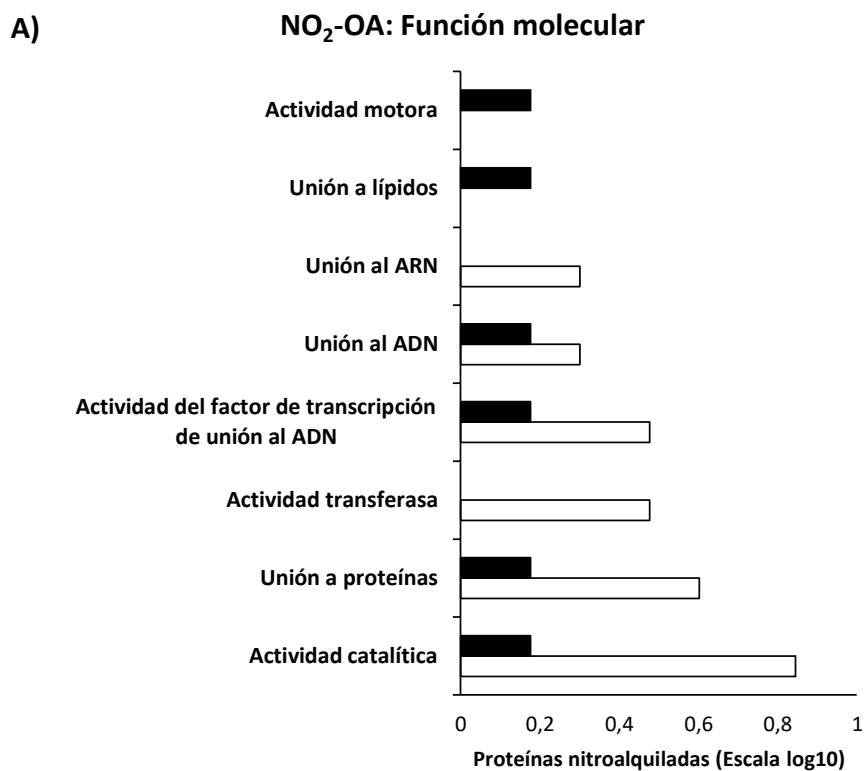


Figura 16. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-Ln en las situaciones de control y estrés por luz continua.



□ Control ■ Oscuridad

Figura 17. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) identificadas en el control y en oscuridad.

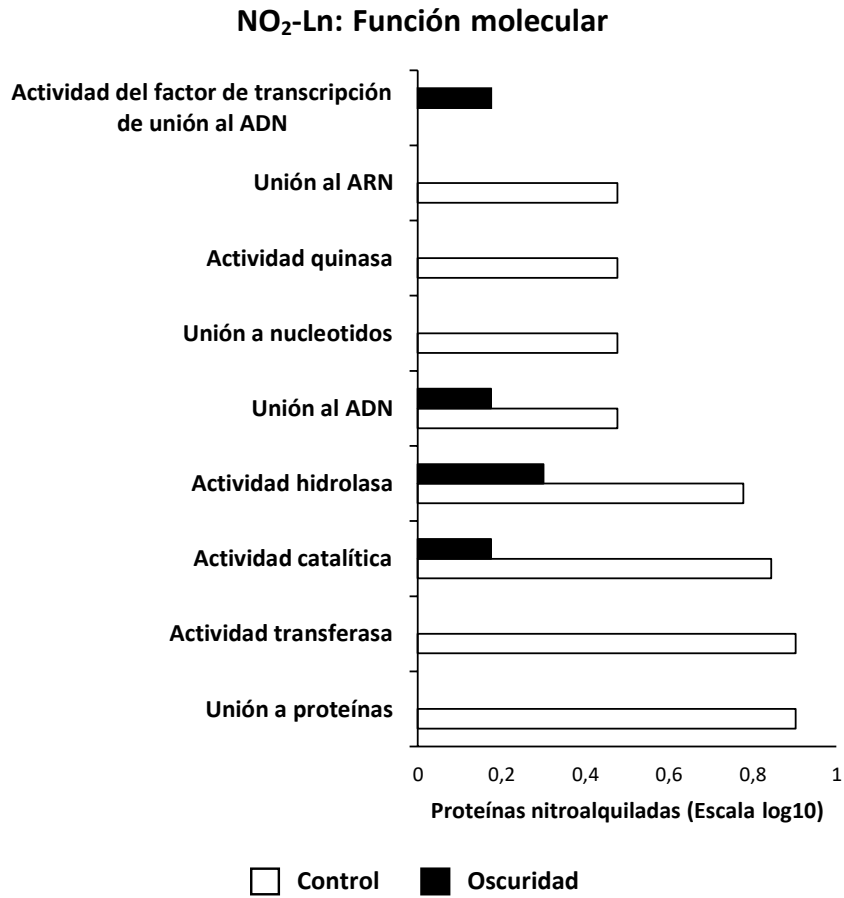


Figura 18. Funciones moleculares más características en las que participan las proteínas nitroalquiladas por el NO₂-Ln identificadas en el control y en oscuridad.

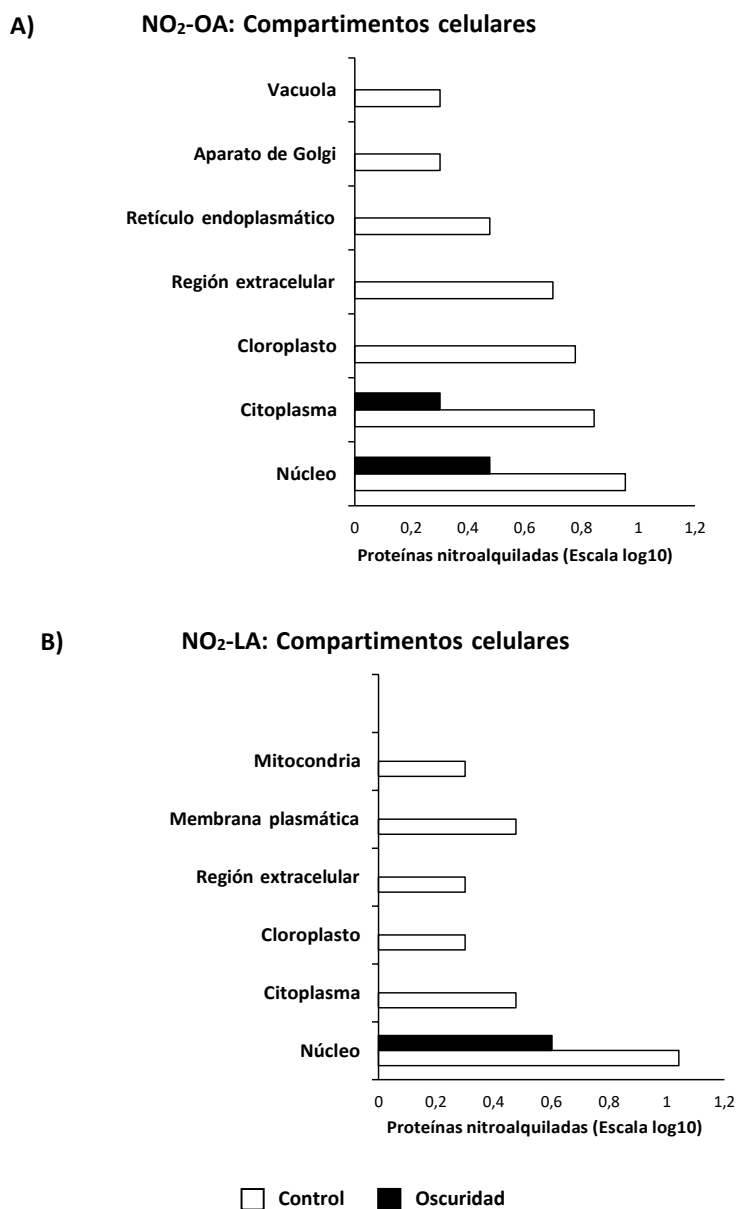


Figura 19. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-OA (A) y el NO₂-LA (B) en las situaciones de control y estrés por oscuridad.

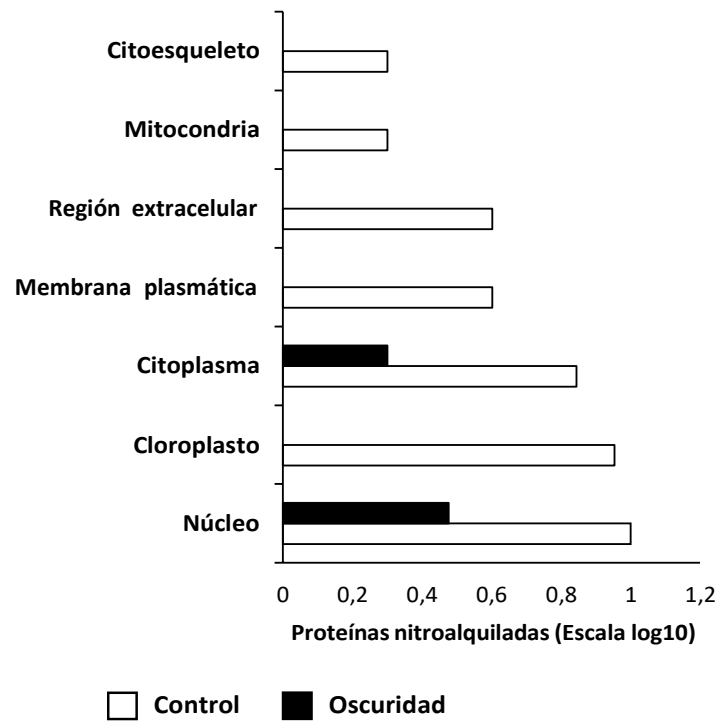
NO₂-Ln: Compartimentos celulares

Figura 20. Identificación de los componentes celulares más enriquecidos en proteínas nitroalquiladas con el NO₂-Ln en las situaciones de control y estrés por oscuridad.

Anexo II

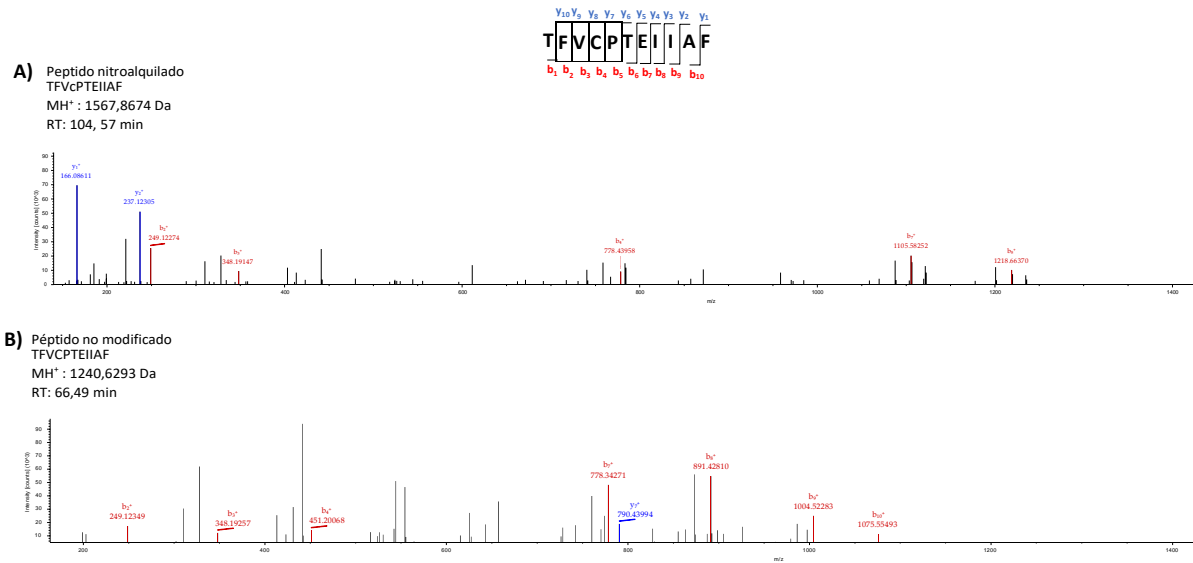


Figura 1. Comparación de los espectros MS/MS no modificado (A) y nitroalquilado (B) de uno de los péptidos identificados después de tratar la Tsa1 recombinante con el NO₂-OA. La fragmentación del ion precursor del péptido, TFVCPTEIIAF, genera una serie de fragmentos peptídicos que se denominan "b" si la carga se retiene en el extremo N o "y" si la carga permanece en el extremo C. El subíndice indica la carga del ion.

Currículum Vitae





Lorena Aranda Caño

Generado desde: Editor CVN de FECYT

Fecha del documento: 22/02/2022

v 1.4.3

fea1d060b2a2044d00402801e5fb7152

Lorena Aranda Caño

Apellidos: **Aranda Caño**

Nombre: **Lorena**

DNI: **77365931A**

Fecha de nacimiento: **10/01/1993**

Sexo: **Mujer**

Correo electrónico: **laranda@ujaen.es**

Situación profesional actual

Entidad empleadora: Universidad de Jaén **Tipo de entidad:** Universidad

Departamento: Departamento de Biología Experimental. Área de Bioquímica y Biología, Facultad de Ciencias Experimentales

Categoría profesional: Contrato predoctoral

Fecha de inicio: 01/11/2017

Modalidad de contrato: Becario/a (pre o posdoctoral, otros)

Régimen de dedicación: Tiempo completo

Cargos y actividades desempeñados con anterioridad

	Entidad empleadora	Categoría profesional	Fecha de inicio
1	Universidad de Jaén	Contrato de técnico	30/06/2017
2	Universidad de Jaén	Beca: Acción 14 Ayudas de iniciación a la investigación para estudiantes de Máster Oficial de la Universidad de Jaén	01/02/2016

1	Entidad empleadora: Universidad de Jaén Categoría profesional: Contrato de técnico	Tipo de entidad: Universidad
	Fecha de inicio-fin: 30/06/2017 - 31/08/2017	Duración: 3 meses
2	Entidad empleadora: Universidad de Jaén Categoría profesional: Beca: Acción 14 Ayudas de iniciación a la investigación para estudiantes de Máster Oficial de la Universidad de Jaén Fecha de inicio-fin: 01/02/2016 - 30/06/2016	Tipo de entidad: Departamento Universitario Duración: 5 meses

Formación académica recibida

Titulación universitaria

Estudios de 1º y 2º ciclo, y antiguos ciclos (Licenciados, Diplomados, Ingenieros Superiores, Ingenieros Técnicos, Arquitectos)

1 Titulación universitaria: **Titulado Superior**

Nombre del título: **Máster Universitario en Profesorado de Educación Secundaria Obligatoria y Bachillerato, Formación Profesional y Enseñanza de Idiomas**

Entidad de titulación: **Universidad de Jaén** Tipo de entidad: **Universidad**

Fecha de titulación: **01/07/2017**

2 Titulación universitaria: **Titulado Superior**

Nombre del título: **Máster Universitario en Biotecnología Experimental y Biomedicina** Entidad de titulación:

Universidad de Jaén Tipo de entidad: **Universidad** Fecha de titulación: **01/07/2016**

3 Titulación universitaria: **Titulado Superior**

Nombre del título: **Grado en Biología**

Entidad de titulación: **Universidad de Jaén** Tipo de entidad: **Universidad**

Fecha de titulación: **01/07/2015**

Conocimiento de idiomas

Idioma	Comprensión auditiva	Comprensión de lectura	Interacción oral	Expresión oral	Expresión escrita
Inglés	B2	B2	B2	B2	B2

Actividad docente

Dirección de tesis doctorales y/o proyectos fin de carrera

1 Título del trabajo: **Dieta Mediterránea: implicaciones bioquímicas en la salud cardiovascular** Entidad de realización: **Universidad de Jaén** Tipo de entidad: **Universidad** Alumno/a: **María Expósito Sequera**
Fecha de defensa: **01/07/2020**

2 Título del trabajo: **Uso terapéutico de los enzimas**

Entidad de realización: **Universidad de Jaén** Tipo de entidad: **Departamento Universitario**
Alumno/a: **Carmen Jiménez López**

Fecha de defensa: **01/07/2019**

Publicaciones docentes o de carácter pedagógico, libros, artículos, etc.

Innovación educativa por SSIBL para tratar la conservación de la biodiversidad, Innovación educativa por SSIBL para tratar la conservación de la biodiversidad. 61 - 978-84-9159-093-4, pp. 195 - 204. Innovación Docente 2017. Integración en las aulas ¿realidad aumentada?.

Nombre del material: Artículo de Innovación docente

Fecha de elaboración: 2018

Tipo de soporte: Artículo/s

Autor de correspondencia: Si

Actividades científicas y tecnológicas

Producción científica

Publicaciones, documentos científicos y técnicos

1 Juan C Begara-Morales; Capilla Mata-Pérez; María N Padilla; Mounira Chaki; Raquel Valderrama; Lorena Aranda-Caño; Juan B Barroso. Journal Experimental Botany. Role of electrophilic nitrated fatty acids during development and response to abiotic stress processes in plants. 3 - 72, pp. 917 - 927. Journal Experimental Botany, 11/02/2021.

Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista

Autor de correspondencia: **No**

2 Capilla Mata-Pérez; María N Padilla; Beatriz Sánchez-Calvo; Juan C Begara-Morales; Raquel Valderrama; Mounira Chaki; Lorena Aranda-Caño; David Moreno-González; Antonio Molina-Díaz; Juan B Barroso. Frontiers in Plant Science. Endogenous Biosynthesis of S-Nitrosoglutathione From Nitro-Fatty Acids in Plants. 30 - 11, pp. 962. Frontiers in Plant Science, 30/06/2020.

Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista

Autor de correspondencia: **No**

3 Lorena Aranda-Caño; Beatriz Sánchez-Calvo; Juan C Begara-Morales; Mounira Chaki; Capilla Mata-Pérez; María N Padilla; Raquel Valderrama; Juan B Barroso. Post-Translational Modification of Proteins Mediated by Nitro-Fatty Acids in Plants: Nitroalkylation. Plants (Basel). 8 - 4, pp. 82. Plants (Basel), 29/03/2019.

Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista

Autor de correspondencia: **No**

Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

1 **Título del trabajo:** Biosynthesis of S-nitrosoglutathione from nitro-fatty acids in plants

Nombre del congreso: 8th Plant Nitric Oxide Meeting.

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Szeged, Hungría

Fecha de celebración: **2021**

2 **Título del trabajo:** Endogenous nitroalkylation of proteins by different nitrated fatty acids in Arabidopsis thaliana cell cultures

Nombre del congreso: 8th Plant Nitric Oxide Meeting.

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Szeged, Hungría

Fecha de celebración: **2021**

3 Título del trabajo: Nitro-fatty acids modulate the antioxidant function of catalase and NADP-dehydrogenases.

Nombre del congreso: 8th Plant Nitric Oxide Meeting

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Szeged, Hungría

Fecha de celebración: **2021**

4 Título del trabajo: Nitro-linolenic acid regulates the antioxidant capacity of ascorbate peroxidase by nitroalkylation

Nombre del congreso: XV Meeting of Molecular Plant Biology

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Málaga, España

Fecha de celebración: **2020**

5 Título del trabajo: Nitroalkylation by nitrated fatty acids modulates catalase function during abiotic stress processes

Nombre del congreso: XV Meeting of Molecular Plant Biology

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Málaga, España

Fecha de celebración: **2020**

6 Título del trabajo: Proteomic identification of nitroalkylated proteins in Arabidopsis thaliana cell cultures treated with nitro-fatty acids.

Nombre del congreso: XV Meeting of Molecular Plant Biology.

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Málaga, España

Fecha de celebración: **2020**

7 Título del trabajo: Anti-inflammatory capacity of nitro-oleic acid (NO₂-OA) present in Extra Virgin Olive Oil (EVOO)

Nombre del congreso: National Congress: 41 Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Santander, España

Fecha de celebración: **2018**

8 Título del trabajo: Differential subcellular localization of GSNO-responsive genes

Nombre del congreso: 7th International Plant Nitric Oxide Meeting

Autor de correspondencia: No

Ciudad de celebración: Niza,

Francia **Fecha de celebración:** 2018

9 Título del trabajo: Functional modulation by nitroalkylation with nitrooleic acid (NO₂-OA) of the mitochondrial Peroxiredoxin 1 (Prx1p) of *Saccharomyces cerevisiae*

Nombre del congreso: National Congress: 41 Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Santander, España

Fecha de celebración: **2018**

10 Título del trabajo: Functional modulation of antioxidant systems by nitroalkylation with nitro-fatty acids

Nombre del congreso: 7th International Plant Nitric Oxide Meeting

Autor de correspondencia: No

Ciudad de celebración: Niza,
Francia **Fecha de celebración:** 2018

11 Título del trabajo: Modulation of S-nitrosothiol levels by nitro-fatty acids in Arabidopsis plants

Nombre del congreso: National Congress: XIV Meeting of Molecular Plant Biology

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Salamanca, España

Fecha de celebración: **2018**

"Modulation of S-nitrosothiol levels by nitro-fatty acids in Arabidopsis plants".

12 Título del trabajo: Post-translational modifications of proteins by nitrated fatty acids: nitroalkylation of antioxidant systems in plants.

Nombre del congreso: National Congress: XIV Meeting of Molecular Plant Biology

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Salamanca, España

Fecha de celebración: **2018**

13 Título del trabajo: BIODISTRIBUTION OF NITRO-FATTY ACIDS IN PLANT CELLS

Nombre del congreso: 8th Plant Nitric Oxide Meeting

Autor de correspondencia: **No**

Ciudad de celebración: Szeged, Hungría

Otros méritos

Estancias en centros de I+D+i públicos o privados

Entidad de realización: **University of Palacký** Tipo de entidad: **Universidad**

Ciudad entidad realización: **Olomouc, República Checa**

Fecha de inicio-fin: **26/07/2021 - 25/10/2021** Duración: **3 meses**

Objetivos de la estancia: **Doctorado/a**

Tareas contrastables: **Analysis of signaling functions of nitrated fatty acids un plant cells under biotic stress stimuli**

Publicaciones

Review

Post-Translational Modification of Proteins Mediated by Nitro-Fatty Acids in Plants: Nitroalkylation

Lorena Aranda-Caño, Beatriz Sánchez-Calvo, Juan C. Begara-Morales, Mounira Chaki, Capilla Mata-Pérez , María N. Padilla, Raquel Valderrama  and Juan B. Barroso * 

Group of Biochemistry and Cell Signaling in Nitric Oxide, Department of Experimental Biology, Center for Advanced Studies in Olive Grove and Olive Oils, Faculty of Experimental Sciences, University Campus Las Lagunillas, University of Jaén, E-23071 Jaén, Spain; laranda@ujaen.es (L.A.-C.); sanchezcalvobeatriz@gmail.com (B.S.-C.); jbegara@ujaen.es (J.C.B.-M.); mounira@ujaen.es (M.C.); mmata@ujaen.es (C.M.-P.); npadilla@ujaen.es (M.N.P.); ravalde@ujaen.es (R.V.)

* Correspondence: jbarroso@ujaen.es; Tel.: +34-953-212764

Received: 26 February 2019; Accepted: 26 March 2019; Published: 29 March 2019



Abstract: Nitrate fatty acids (NO₂-FAs) are considered reactive lipid species derived from the non-enzymatic oxidation of polyunsaturated fatty acids by nitric oxide (NO) and related species. Nitrate fatty acids are powerful biological electrophiles which can react with biological nucleophiles such as glutathione and certain protein–amino acid residues. The adduction of NO₂-FAs to protein targets generates a reversible post-translational modification called nitroalkylation. In different animal and human systems, NO₂-FAs, such as nitro-oleic acid (NO₂-OA) and conjugated nitro-linoleic acid (NO₂-cLA), have cytoprotective and anti-inflammatory influences in a broad spectrum of pathologies by modulating various intracellular pathways. However, little knowledge on these molecules in the plant kingdom exists. The presence of NO₂-OA and NO₂-cLA in olives and extra-virgin olive oil and nitro-linolenic acid (NO₂-Ln) in *Arabidopsis thaliana* has recently been detected. Specifically, NO₂-Ln acts as a signaling molecule during seed and plant progression and beneath abiotic stress events. It can also release NO and modulate the expression of genes associated with antioxidant responses. Nevertheless, the repercussions of nitroalkylation on plant proteins are still poorly known. In this review, we demonstrate the existence of endogenous nitroalkylation and its effect on the in vitro activity of the antioxidant protein ascorbate peroxidase.

Keywords: nitro-fatty acids; nitroalkenes; nitroalkylation; electrophile; nucleophile; signaling mechanism; post-translational modification; reactive lipid species; nitro-lipid-protein adducts

1. Introduction

Reactive lipid species (RLS), or so-called lipid-derived electrophiles (LDEs), are caused by polyunsaturated fatty acids (PUFAs) peroxidation [1–4]. Reactive lipid species have been identified in sanguine fluid, plasma, urine, human tissues, and animal models using array techniques. Recently, they have also been detected in plant systems with the aid of mass spectrometry. A rise in RLS abundance under pathological and stress circumstances has been broadly reported [4–10].

Polyunsaturated fatty acids are targets of peroxidation due to their unsaturated double bonds [4,11]. The main mechanisms of PUFA peroxidation are non-enzymatic autocatalytic oxidation reactions [1,12], while enzymatic oxidation reactions involving three heme-containing metallo-enzyme families (lipoxygenases (LOXs), cyclooxygenases (COXs) [1,13], and cytochromes P450 (CYPs) [1]), as well as NADP⁺-dependent dehydrogenases [1,14] which can also occur. Non-enzymatic mechanisms include PUFA nitration triggered by reactive nitrogen species (RNS) such as nitric oxide (NO) and its derived molecules [1,15,16]. A preferential target for lipid peroxidation is arachidonic acid, whose



Endogenous Biosynthesis of S-Nitrosoglutathione From Nitro-Fatty Acids in Plants

Capilla Mata-Pérez¹, María N. Padilla¹, Beatriz Sánchez-Calvo¹, Juan C. Begara-Morales¹, Raquel Valderrama¹, Mounira Chaki¹, Lorena Aranda-Caño¹, David Moreno-González², Antonio Molina-Díaz² and Juan B. Barroso^{1*}

¹ Group of Biochemistry and Cell Signalling in Nitric Oxide, Department of Experimental Biology, Center for Advanced Studies in Olive Grove and Olive Oils, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain, ² Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, Jaén, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Vasileios Fotopoulos,
Cyprus University of Technology,
Cyprus

Reviewed by:

Marcela Simontacchi,
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET),
Argentina
Caroline Gaucher,
Université de Lorraine, France

*Correspondence:

Juan B. Barroso
jbarroso@ujaen.es

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Abiotic Stress,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 18 April 2020

Accepted: 11 June 2020

Published: 30 June 2020

Citation:

Mata-Pérez C, Padilla MN, Sánchez-Calvo B, Begara-Morales JC, Valderrama R, Chaki M, Aranda-Caño L, Moreno-González D, Molina-Díaz A and Barroso JB (2020) Endogenous Biosynthesis of S-Nitrosoglutathione From Nitro-Fatty Acids in Plants. *Front. Plant Sci.* 11:962. doi: 10.3389/fpls.2020.00962

Nitro-fatty acids (NO₂-FAs) are novel molecules resulting from the interaction of unsaturated fatty acids and nitric oxide (NO) or NO-related molecules. In plants, it has recently been described that NO₂-FAs trigger an antioxidant and a defence response against stressful situations. Among the properties of NO₂-FAs highlight the ability to release NO therefore modulating specific protein targets through post-translational modifications (NO-PTMs). Thus, based on the capacity of NO₂-FAs to act as physiological NO donors and using high-accuracy mass-spectrometric approaches, herein, we show that endogenous nitro-linolenic acid (NO₂-Ln) can modulate S-nitrosoglutathione (GSNO) biosynthesis in *Arabidopsis*. The incubation of NO₂-Ln with GSH was analyzed by LC-MS/MS and the *in vitro* synthesis of GSNO was noted. The *in vivo* confirmation of this behavior was carried out by incubating *Arabidopsis* plants with ¹⁵N-labeled NO₂-Ln throughout the roots, and ¹⁵N-labeled GSNO (GS¹⁵NO) was detected in the leaves. With the aim to go in depth in the relation of NO₂-FA and GSNO in plants, *Arabidopsis* alkenal reductase mutants (*aer* mutants) which modulate NO₂-FAs levels were used. Our results constitute the first evidence of the modulation of a key NO biological reservoir in plants (GSNO) by these novel NO₂-FAs, increasing knowledge about S-nitrosothiols and GSNO-signaling pathways in plants.

Keywords: nitro-fatty acids, nitric oxide, S-nitrosoglutathione, S-nitrosothiols, NO-signaling, nitric oxide donor, *Arabidopsis*, alkenal reductase

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO), a small, gaseous, and highly reactive molecule able to cross cell membranes, has been described as an important biological messenger both in animal and plant systems (Stamler et al., 1992; Yu et al., 2014). In the last few years, diverse studies have described NO as a regulator involved in disease resistance, the response to different abiotic stresses, and as a key molecule in plant physiological processes such as stomatal closure, seed germination, iron homeostasis or several developmental processes (Delledonne et al., 1998; Garcia-Mata et al., 2003; Valderrama et al., 2007; Chaki et al., 2009; Begara-Morales et al., 2013).

REVIEW PAPER

Role of electrophilic nitrated fatty acids during development and response to abiotic stress processes in plants

Juan C. Begara-Morales¹, Capilla Mata-Pérez¹, María N. Padilla¹, Mounira Chaki¹, Raquel Valderrama¹, Lorena Aranda-Caño¹ and Juan B. Barroso^{1*}

Group of Biochemistry and Cell Signaling in Nitric Oxide, Department of Experimental Biology, Center for Advanced Studies in Olive Grove and Olive Oils, Faculty of Experimental Sciences, Campus Universitario 'Las Lagunillas' s/n, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

* Correspondence: jbarroso@ujaen.es

Received 15 June 2020; Editorial decision 16 October 2020; Accepted 3 November 2020

Editor: Christian Lindermayr, Helmholtz Zentrum München, Germany.

Abstract

Nitro-fatty acids are generated from the interaction of unsaturated fatty acids and nitric oxide (NO)-derived molecules. The endogenous occurrence and modulation throughout plant development of nitro-linolenic acid (NO₂-Ln) and nitro-oleic acid (NO₂-OA) suggest a key role for these molecules in initial development stages. In addition, NO₂-Ln content increases significantly in stress situations and induces the expression of genes mainly related to abiotic stress, such as genes encoding members of the heat shock response family and antioxidant enzymes. The promoter regions of NO₂-Ln-induced genes are also involved mainly in stress responses. These findings confirm that NO₂-Ln is involved in plant defense processes against abiotic stress conditions via induction of the chaperone network and antioxidant systems. NO₂-Ln signaling capacity lies mainly in its electrophilic nature and allows it to mediate a reversible post-translational modification called nitroalkylation, which is capable of modulating protein function. NO₂-Ln is a NO donor that may be involved in NO signaling events and is able to generate S-nitrosoglutathione, the major reservoir of NO in cells and a key player in NO-mediated abiotic stress responses. This review describes the current state of the art regarding the essential role of nitro-fatty acids as signaling mediators in development and abiotic stress processes.

Keywords: Abiotic stress, gene expression, nitroalkylation, nitro-fatty acids, post-translational modifications, signaling, S-nitrosoglutathione.

Introduction

Fatty acids and lipids are fundamental cellular components that perform essential functions, such as serving as energy reserves or providing structural integrity, and can also act as intracellular and extracellular signal transduction mediators (Hou *et al.*, 2016; Lim *et al.*, 2017). In this regard, the peroxidation

of polyunsaturated fatty acids generates oxidized lipid products called reactive lipid species that exhibit electrophilic capacity and can therefore react with nucleophiles and mediate cell signaling processes (Schopfer *et al.*, 2011; Higdon *et al.*, 2012; Beavers *et al.*, 2017). One particular kind of reactive