



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
VEGETAL Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis  
Universidad de Sevilla - CSIC



# **Estudio de la función de tiorredoxinas atípicas cloroplastídicas en *Arabidopsis thaliana***

TRABAJO FIN DE GRADO 2022/2023

Alumno: María Alguacil López

Tutor: Juan Manuel Pérez Ruiz

# ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVO	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1. Material vegetal	7
4.2. Extracción de ADN genómico y genotipado por PCR	8
4.3. Extracción de proteínas y western blot	9
4.4. Determinación del estado redox de enzimas metabólicas	10
4.5. Análisis de parámetros fotosintéticos	10
5. RESULTADOS	11
5.1. Genotipado por PCR de la línea <i>acht3</i> mutante	11
5.2. Estudio de líneas transgénicas ACHT3	11
- Estudio en plántulas	11
- Estudio en plantas adultas	14
5.3. Determinación de parámetros fotosintéticos	15
5.4. Estudio de la función de ACHT3 en el estado redox y en los niveles de enzimas del cloroplasto	18
- Determinación del estado redox en enzimas FBPasa cloroplastídica, RCA y ATPC	18
- Determinación del estado redox en la enzima 2-Cys Prx	21
6. DISCUSIÓN	23
6.1. Alteraciones en los niveles de ACHT3 no afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas	23
6.2. ACHT3 participa en la oxidación de RCA y FBP-asa	26
7. CONCLUSIÓN	28
8. BIBLIOGRAFÍA	28

## 1. RESUMEN

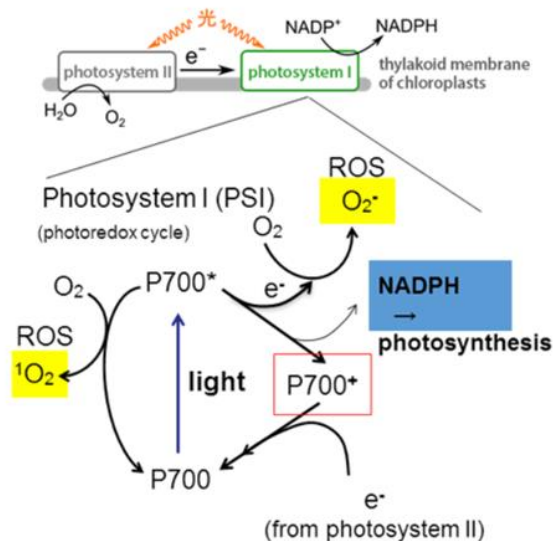
La regulación redox de proteínas del cloroplasto es un proceso esencial y necesario para el correcto desarrollo y crecimiento de las plantas. En este trabajo se ha utilizado la planta modelo *Arabidopsis thaliana* para estudiar el papel que desempeña la proteína ACHT3, una tiorredoxina atípica, en el control redox de enzimas cloroplastídicas relacionadas con la fotosíntesis. Para ello, se han utilizado líneas mutantes deficientes en ACHT3 y líneas transgénicas que sobreexpresan esta proteína. Para llevar a cabo este estudio, se han realizado análisis por western blot, genotipados por PCR y mediciones a través del fluorímetro IMAGING-PAM. Los resultados muestran que alteraciones en los niveles de la proteína ACHT3 no afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas; no obstante, ACHT3 participa en la oxidación de determinadas enzimas metabólicas como la rubisco activasa y la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Es por ello que ACHT3 puede considerarse diana de ciertas enzimas cloroplastídicas, aunque su ausencia en plantas no tiene ningún efecto sobre estas, sugiriéndose la probabilidad de la existencia de otras tiorredoxinas atípicas redundantes en el cloroplasto.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos fotosintéticos que emplean la luz y el agua como fuente de energía y de poder reductor respectivamente con el fin de producir biomasa. Gracias a la fotosíntesis, consistente en la asimilación de carbono en forma de CO<sub>2</sub> a través de la energía procedente del sol, estos organismos fueron de los primeros en enriquecer la atmósfera con oxígeno. La investigación de plantas y el estudio de la fotosíntesis tiene mucho interés para el ser humano, ya que esta puede contribuir a mejorar el rendimiento de los cultivos. En la actualidad, el uso de dichos organismos ha crecido exponencialmente y ha aumentado el interés por su estudio a diferentes niveles, tanto molecular como genómico, con el fin de potenciar sus características intrínsecas para obtener de ellas productos útiles e interesantes para el día a día. Uno de los organismos más usados en investigación a día de hoy, y la primera planta modelo establecida en todo el mundo, es *Arabidopsis thaliana*, debido a la gran cantidad de herramientas y recursos genéticos y moleculares que proporciona (Wienkoop et al., 2010). De entre todos ellos, el uso de plantas transgénicas por transformación mediante el vector *Agrobacterium tumefaciens* es el más utilizado, al ser una medida poderosa para insertar genes de interés en la planta huésped. *A. tumefaciens* es una bacteria capaz de infectar a las células vegetales insertando un segmento de DNA (T-DNA) en su genoma de manera estable o bien a través de una transformación transitoria, sin necesidad de que el ADN exógeno se inserte en el

genoma pero aun así pueda ser transcrito (Hwang et al., 2017). Esta técnica transformante ha permitido generar colecciones de mutantes muy útiles para investigación (Krenek et al., 2015).

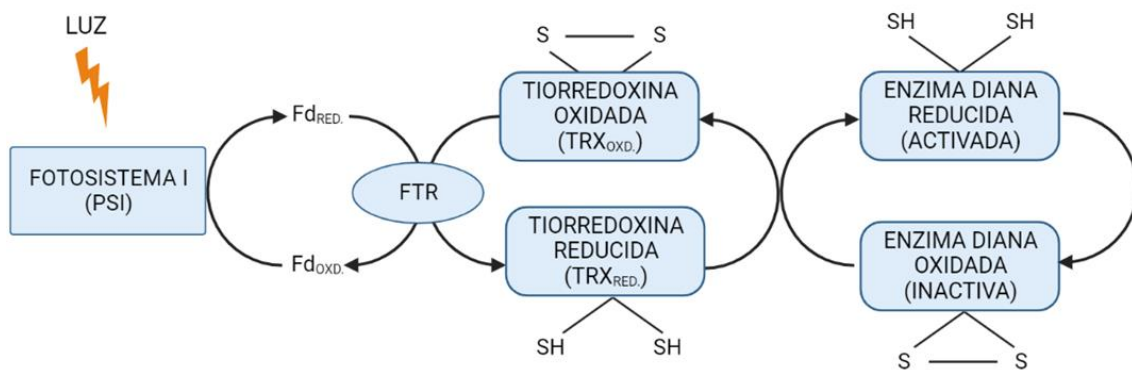
Uno de los orgánulos más característicos de las plantas son los cloroplastos, donde tiene lugar la fotosíntesis. En ella transcurre un proceso químico dividido en dos fases: en la primera se transforma la energía lumínica en energía química (ATP y poder reductor en forma de NADPH), generando oxígeno a través de la fotólisis del agua, mientras que en la segunda se utiliza dicha energía química para fijar CO<sub>2</sub> y generar materia orgánica (glucosa). Durante la fase fotoquímica de la fotosíntesis (**Figura 1**), se producen reacciones de óxido-reducción en las que los electrones se mueven de un donante a un receptor, por lo que la posibilidad de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) aumenta considerablemente (Foyer, 2018); además, también es elevada la formación de ROS durante el transporte de electrones a través de la cadena de transporte de electrones del aparato fotosintético (**Figura 1**). En



**Figura 1: Producción de especies reactivas de oxígeno.** Esquema que representan posibles vías de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la fase fotoquímica de la fotosíntesis. (Imagen adaptada de Kobe University).

concentraciones bajas, las ROS actúan como moléculas señalizadoras frente a distintos tipos de estrés, influyendo en el desarrollo y en el crecimiento de las plantas; no obstante, una elevada cantidad de especies reactivas de oxígeno en los cloroplastos puede causar graves problemas de toxicidad y afectar a componentes fotosintéticos esenciales (Foyer et al., 2011). Es por ello que los cloroplastos presentan sistemas de defensa ante concentraciones elevadas de ROS, como son los sistemas antioxidantes no enzimáticos, a través de los cuales actúan el glutatión reducido, el ácido ascórbico, los carotenoides y compuestos fenólicos (Isabel et al., 2017).

Durante la fotofosforilación acíclica, se produce la reducción de la ferredoxina ( $Fd_{RED}$ ), que es utilizada por la enzima ferredoxina-NADP(H) oxidorreductasa (FNR) para transferir los electrones de la fotosíntesis hasta la molécula de NADP con el fin de obtener poder reductor en forma de NADPH; sin embargo, hay otra enzima, la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR), que utiliza la ferredoxina reducida para transferir el poder reductor a las tiorredoxinas (Trx) a través de reacciones de intercambio tiol-disulfuro (**Figura 2**). Este sistema es el que une la fotosíntesis con la regulación redox que tiene lugar en el cloroplasto y que es conocido como sistema  $Fd_{RED}$ -FTR-TRX (Kozuleva et al., 2016).



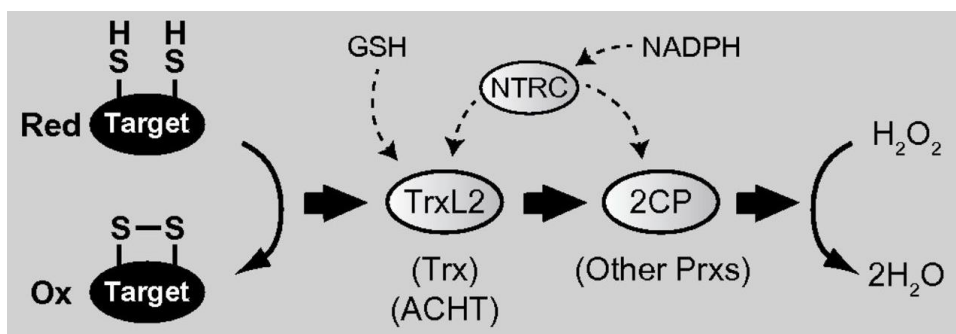
**Figura 2: Regulación redox de la actividad enzimática.** Esquema en el que se representa el sistema  $Fd_{RED}$ -FTR-TRX, donde  $Fd_{RED}$  es ferredoxina en estado reducido, FTR es ferredoxina-tiorredoxina reductasa, TRX es tiorredoxina, S-S representa existencia de puente disulfuro (estado oxidado) mientras que -SH indica la ausencia de puente disulfuro (estado reducido). A través de este sistema se enlaza la fotosíntesis con la regulación redox gracias a los intercambios tiol-sulfuro que se llevan a cabo a través de tiorredoxinas para regular la actividad de enzimas diana. (Imagen adaptada de Schürmann et al. 2008).

Dicho mecanismo tiene la capacidad de regular la actividad de múltiples enzimas cloroplásticas a través de reacciones redox de intercambio tiol-sulfuro. Esta regulación redox constituye una modificación post-traducciona rápida y efectiva, que afecta a la conformación y actividad de las proteínas. Inicialmente, este mecanismo regulador se descubrió en los cloroplastos, cuando se identificó que las enzimas del ciclo de Calvin-Benson (CBC) se reducen y, por tanto, se activan durante el día, mientras que por la noche se oxidan y se inactivan rápidamente (Cejudo et al., 2019).

Las tiorredoxinas son pequeños polipéptidos que se caracterizan por tener, al menos, un dominio Trx; por lo general presentan actividad oxidorreductasa, son partícipes en reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Pedone et al., 2010), actúan como reductasas en el control redox, protegen frente a agregación e inactivación oxidativa, contribuyen a la defensa celular contra múltiples tipos de estrés, como el causado por las especies reactivas de oxígeno, regulan la muerte celular programada y actúan como chaperonas para el plegamiento de proteínas, entre

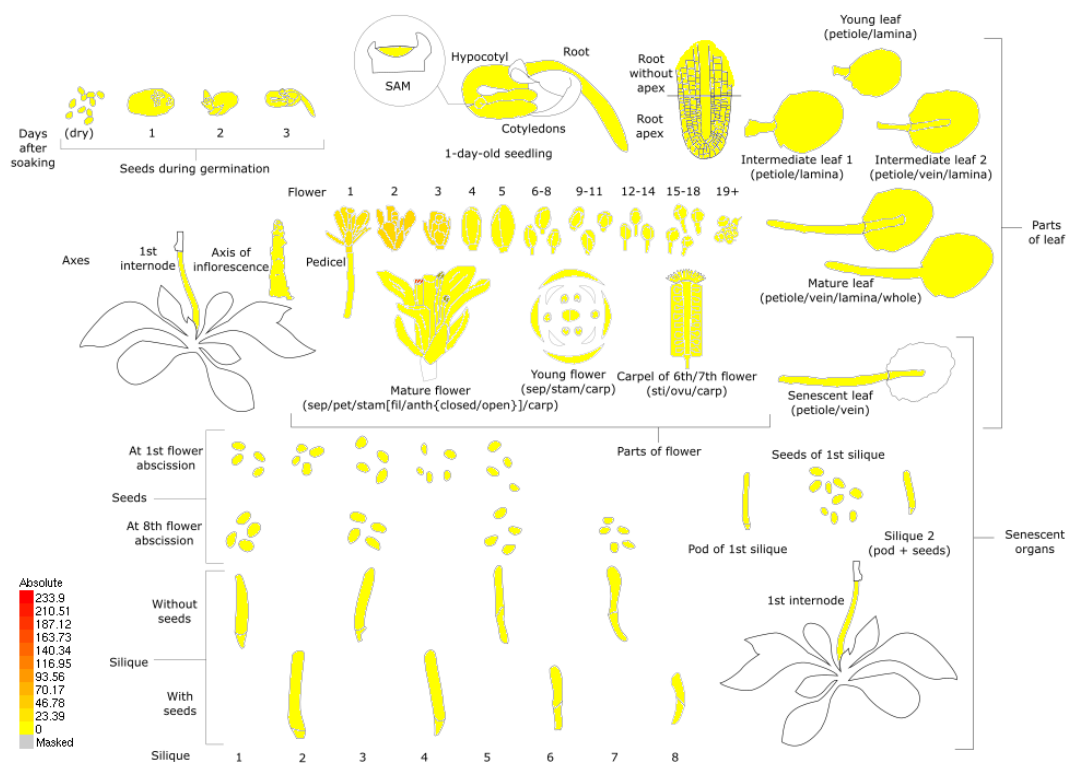
otras funciones (Collet & Messens, 2010;). Los cloroplastos albergan cinco subtipos de tiorredoxinas típicas: *f*, *m*, *x*, *y*, y *z*. que poseen distintas características moleculares, como el potencial redox y la carga superficial de la proteína (Yoshida et al., 2018). Estas tiorredoxinas clásicas o típicas se caracterizan por poseer una secuencia muy conservada en su centro activo (-WCGPC-) cuyas cisteínas pueden presentarse en estado oxidado o reducido; por otro lado, el cloroplasto contiene otras tiorredoxinas denominadas atípicas, como las de la clase TrxL o ACHT (Atypical Cysteine Histidine-rich Thiorredoxin), que se diferencian de las primeras en que poseen centros activos atípicos (con motivos conservados como -WCRKC-), múltiples dominios Trx o bien motivos Trx asociados (Calderón Pérez, 2017), pero con estructura similar a las tiorredoxinas típicas y, por tanto, con capacidad para catalizar reacciones redox de intercambio tiol-disulfuro (Yoshida et al., 2019).

Además de la vía  $Fd_{RED}$ -FTR-TRX, los plástidos vegetales albergan una NTR con un dominio Trx conjunto (NTRC), que utiliza NADPH con el fin de reducir la 2-cys-peroxirredoxina (2CP), enzima que elimina el peróxido de hidrógeno transformándolo en agua (**Figura 3**) (Cejudo et al., 2020). La proteína 2CP es una peroxirredoxina antioxidante muy caracterizada, fundamental para mantener el estado redox de las enzimas fotosintéticas que son reguladas por tiorredoxinas y ejerciendo un papel central en el control redox de dichas enzimas durante el día y la noche (Ojeda et al., 2018) (**Figura 3**). Por tanto, gracia a la interacción NTRC-2CP, se mantiene el balance redox de dicho sistema por el NADPH producido por FNR durante el día o por el poder reductor generado por la ruta de las pentosas fosfato en oscuridad. Es durante la presencia de luz cuando el sistema FTR/Trx reduce a las enzimas fotosintéticas mientras que en oscuridad la oxidación se produce por transferencia de poder reductor a la 2CP a través de tiorredoxinas (**Figura 3**) (Ojeda et al., 2018).



**Figura 3: Simplificación de la regulación redox en oscuridad en el cloroplasto.** Las proteínas con regulación redox se oxidan a través de tiorredoxinas atípicas como TrxL o ACHT, que pasan el poder reductor hasta 2CP, que detoxifica el peróxido de hidrógeno hasta agua. Otros factores también pueden estar involucrados de manera directa o indirecta en este proceso (Imagen modificada de Yoshida et al. 2018).

No obstante, a pesar de la importancia que tiene el proceso de oxidación, aún no se ha llegado a una conclusión definitiva sobre las proteínas involucradas en él. Recientemente, las proteínas atípicas como TrxL2 y ACHT, se han sugerido como factores de oxidación, basándose en resultados de experimentos *in vitro* que muestran que las tiorredoxinas atípicas transfieren el poder reductor de las proteínas cloroplásticas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de 2CP. Sin embargo, las funciones de estas proteínas *in vivo* no se conocen muy bien (Yokochi et al., 2021). *In vitro*, se ha demostrado la oxidación de 2CP por dos isoformas de ACHT1 y ACHT2, las cuales se conservan ampliamente en organismos fotosintéticos (incluidas algas verdes, musgos y plantas con semillas); su secuencia de aminoácidos y propiedades bioquímicas son similares y ambas se originan a partir del mismo gen ancestral (Yokochi et al., 2019). Además, se ha demostrado que un tipo de tiorredoxina f, TrxL2.1, ACHT1 y ACHT2 parecen estar involucradas en la oxidación de enzimas relacionadas con la fotosíntesis, como la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa), la rubisco activasa (RCA) y la subunidad gamma de la ATP sintasa (ATPC) (Yokochi et al., 2021). Sin embargo, se cuenta con un conocimiento bastante limitado sobre el resto de isoformas de la ACHT, más concretamente sobre la ACHT3, cuya expresión es bastante baja durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (**Figura 4**). Es por ello que, conocer su funcionalidad y caracterizarla podría resultar útil para aumentar la eficiencia de procesos como la fotosíntesis.



**Figura 4:** Expresión de ACHT3 en diferentes partes y etapas del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*. Esquema de colores donde se muestra la expresión de ACHT3. Se observa que la expresión de dicha

proteína es baja prácticamente en todas sus partes y desarrollo, excepto cuando la flor está madura, que alcanza su mayor expresión. (Imagen tomada de Klepikova et al. 2016).

### 3. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es estudiar *in vivo* el papel que desempeña la tiorredoxina atípica ACHT3 en el estado redox de proteínas cloroplastídicas relacionadas con la fotosíntesis, y la eficacia que presenta en dicho proceso. Para ello, se han caracterizado mutantes knock-out (KO) para ACHT3 (*acht3*) y plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *ACHT3*.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Material vegetal

Para la realización de este trabajo se ha empleado la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Se han utilizado plantas silvestres (WT) y diferentes líneas mutantes transgénicas transformadas previamente con T-DNA con el fin de sobreexpresar el gen nuclear *ACHT3* que codifica para la proteína cloroplastídica ACHT3. Las líneas transformantes se han creado bajo un fondo WT y, mientras una de ellas presenta un promotor constitutivo y la proteína de interés se detecta a partir de la etiqueta FLAG (WT/35S-*ACHT3*-FLAG), la otra línea presenta un promotor inducible por dexametasona (DEX) y la etiqueta HA para la detección proteica (WT/P<sub>DEX</sub>-*ACHT3*-HA). También se han utilizado plantas mutantes knock-out para los genes *2CPA* y *2CPB* (*2cpab*), y para el gen *ACHT3* (*acht3*). Todos los mutantes fueron generados previamente en el laboratorio a partir de construcciones genéticas utilizando como vector *Agrobacterium tumefaciens* y eliminando aquellas plantas que no habían adquirido T-DNA a través de pulverizaciones con el herbicida BASTA<sup>®</sup>, puesto que las plantas transgénicas presentan un gen marcador que confiere resistencia a dicho herbicida.

Las semillas de todas las líneas han sido cultivadas en placa previamente, dos de ellas con medio MS (línea WT/35S-*ACHT3*-FLAG) para un total de 10 líneas transgénicas independientes, y otras dos con medio MS-DEX (línea WT/P<sub>DEX</sub>-*ACHT3*-HA) para un total de 8 líneas transgénicas independientes. Este último medio presenta dexametasona, sustancia que induce la expresión del gen de interés al actuar esta como inductor del promotor de la línea inducible. Cada placa se dividió en 6 pequeñas zonas, cada cual albergaba semillas de una planta independiente de cada una de las dos líneas principales a estudiar. Una vez sembradas, las placas se mantuvieron en oscuridad en la cámara frigorífica durante dos días y posteriormente se dejaron crecer en luz hasta que se recogieron las muestras (entre 5 y 7 días) para seleccionar las líneas que expresan la proteína de interés. Por otra parte, se germinaron las



semillas correspondientes a las plantas con presencia de ACHT3 en semilleros de tierra en dos condiciones: en ciclo de día largo (LD: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) y en ciclo de día corto (SD: 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad) con intensidad de luz de 160  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ .

#### **4.2. Extracción de ADN genómico y genotipado por PCR**

Para confirmar el genotipo del mutante *acht3*, se realiza una PCR para amplificar dicho gen. En primer lugar, se extrae el ADN genómico (ADNg) de las líneas en estudio y para ello se siguió un método basado en el uso de un detergente catiónico (CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio) con capacidad de formar micelas con los lípidos de la membrana celular y provocar la ruptura de la célula con la consecuente liberación de los componentes que se encuentran en su interior (Núñez. C, L. 2016). La muestra es recogida y guardada en un tubo Eppendorf en el congelador junto con 500  $\mu\text{l}$  de CTAB hasta el momento de su uso. Una vez se va a realizar el procedimiento, se añaden 500  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se centrifuga a 4°C durante 5 minutos (12000 rpm). Tras este proceso, se observa en el tubo dos fases resultantes, una acuosa y otra orgánica, tomándose exclusivamente la fase acuosa, puesto que es la que contiene el ADN, en un nuevo Eppendorf. A continuación, se precipita el ADN con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 96 % y se vuelve a centrifugar a 4°C durante 5 minutos a 12000 rpm, descartando el sobrenadante. Seguidamente, se realiza un nuevo lavado con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70 %, centrifugando nuevamente tras ello en las condiciones mencionadas anteriormente y retirando el sobrenadante. Se seca bien el tubo colocando la muestra en el termobloque a 70°C hasta que se haya evaporado por completo todo el etanol restante. Por último, se resuspende el pellet, que es donde se encuentra el ADN, en 100  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O miliQ.

Una vez se ha obtenido el ADNg de cada línea, se amplifica el gen *ACHT3* mediante PCR. Para ello, se han utilizado oligonucleótidos específicos (ACHT3-LP: SALK\_062853 con secuencia 5'- CTCTTCATCCCAAGGTAAGCC - 3' y ACHT3-RP: SALK\_062853 con secuencia 5'- CCCAAATGAACCTGCATTTAC - 3') y se ha seguido el siguiente programa para la PCR:

- I. 95°C durante 2 minutos
- II. 32 ciclos con tres fases:
  - a. 95°C durante 30 segundos
  - b. 55°C durante 30 segundos
  - c. 72°C durante 60 segundos
- III. 72°C durante 10 minutos

Los resultados obtenidos tras la PCR se observaron tras realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

#### 4.3. Extracción de proteínas y western blot

Para determinar los niveles de proteínas en plántulas y plantas de cada una de las líneas, se realizó un ensayo de western blot. Se determinaron los niveles de las siguientes proteínas, incubando las membranas sus correspondientes anticuerpos primarios (**Tabla 1**).

PROTEÍNAS LÍNEA	ANTICUERPO PRIMARIO
WT/35S- <i>ACHT3</i> -FLAG	
<i>ACHT3</i> - FLAG	Anti-FLAG
2CP	Anti-2CP
NTRC	Anti-NTRC
AGPasa	Anti-AGPasa
PROTEÍNAS LÍNEA	ANTICUERPO PRIMARIO
WT/P <sub>DEX</sub> - <i>ACHT3</i> -HA	
<i>ACHT3</i> - HA	Anti-HA
2CP	Anti-2CP

**Tabla 1: Proteínas estudiadas mediante análisis de western blot con su respectivo anticuerpo.** Tabla que recoge las proteínas que se han detectado en el análisis por western blot para cada línea analizada (WT/35S-*ACHT3*-FLAG y WT/P<sub>DEX</sub>-*ACHT3*-HA) con su respectivo anticuerpo primario que permite la detección y visualización de la proteína de interés en el revelado.

Para llevar a cabo el ensayo, se tritura la muestra en un mortero con nitrógeno líquido y el homogeneizado se resuspende en tampón de extracción (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40 (v:v)) con inhibidores de proteasas. Posteriormente, se calcula la concentración de proteínas a través del método de Bradford y se carga 15 µg de muestra en cada uno de los pocillos de un gel de electroforesis al 12 % de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y reductoras. Las proteínas ya separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante la noche y, al día siguiente, con anticuerpo secundario.

#### 4.4. Determinación del estado redox de enzimas metabólicas

Se determinó el estado redox de proteínas cloroplastídicas como la RCA, la ATPC y la FBPasa. Una vez obtenidas las muestras, se realiza la extracción de proteínas empleando un buffer de alquilación (IAA 60 mM, 2 % SDS, 100mM Tris-HCl pH 7.8, 5 % glicerol, urea 8M), el cual presenta como agente alquilante la iodoacetamida (IAA) con capacidad para bloquear los grupos -SH e impedir que estos se oxiden (Joliot & Alric, 2013). La separación de las proteínas se realizó en geles de acrilamida al 9.5 % (a excepción del utilizado para la membrana incubada con anti-2CP, para el cual se utilizó un gel de acrilamida al 12 %), en condiciones no reductoras para no inferir en el ensayo, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas detectadas en el ensayo y sus correspondientes anticuerpos primarios se recogen en la **Tabla 2**.

PROTEÍNAS WESTERN BLOT	ANTICUERPOS PRIMARIOS
ALQUILACIÓN LÍNEA	
WT/35S-ACHT3-FLAG	
2CP	Anti-2CP
RCA	Anti-RCA
ATPC	Anti-ATPC
FBPasa cloroplastídica	Anti-FBPasa cloroplastídica
FBPasa citosólica	Anti-FBPasa citosólica

**Tabla 2: Proteínas utilizadas para el estudio de su regulación redox.** Tabla que recoge las proteínas que se analizan para estudiar el efecto de ACHT3 sobre ellas en relación a su regulación redox. Se muestran las enzimas con sus correspondientes anticuerpos, utilizados en el ensayo de western blot de alquilación.

#### 4.5. Análisis de parámetros fotosintéticos

La determinación de los parámetros fotosintéticos se realizó a través del fluorímetro IMAGING-PAM, el cual permite medir la fluorescencia de la clorofila modulada por amplitud de pulso (Stock et al., 2019). Previo a someter las plantas a los pulsos de luz, estas permanecieron en condiciones de oscuridad durante 20 minutos. Tras este tiempo, se colocaron las plantas WT, *acht3*, *2cpab* y tres plantas de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG crecidas en condiciones de día corto, midiéndolas de tres en tres en el fluorímetro, para determinar distintos parámetros fotosintéticos: valor del rendimiento cuántico del fotosistema II (Y(II)), rendimiento cuántico de la disipación de energía en forma de calor (Y(NPQ)), rendimiento de la disipación de energía no regulada (Y(NO)) y la tasa de transporte de electrones a través del fotosistema II (ETR(II)) (Stock et al., 2019). Como resultado, se obtuvieron valores cuantitativos e imágenes con código de colores para cada una de las plantas medidas.

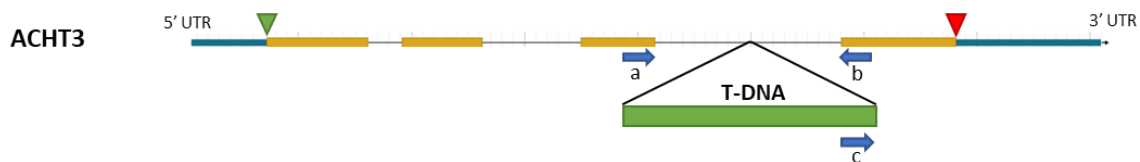
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Genotipado por PCR de la línea *acht3* mutante

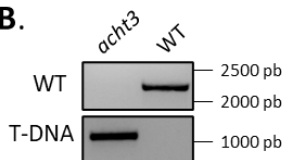
Para realizar el genotipado, se ha amplificado por PCR el ADN genómico extraído de plantas silvestres y de la línea *acht3*, que contienen el alelo silvestre para *ACHT3* y la inserción de T-DNA (*Figura 5A*).

El resultado de la PCR muestra una banda para el WT cuando se utilizaron los oligos a y b que hibridan en el exón 3 y 4 del gen *ACHT3*, y una banda para el T-DNA (*acht3*) utilizando los oligos b y c (*Figura 5A*), que hibridan con el gen *ACHT3* y el T-DNA. De esta manera y con los resultados obtenidos (*Figura 5B*), podemos concluir que la línea estudiada (*acht3*) es mutante homocigoto para el gen *ACHT3* y, por tanto, no expresaría la proteína correspondiente.

A.



B.



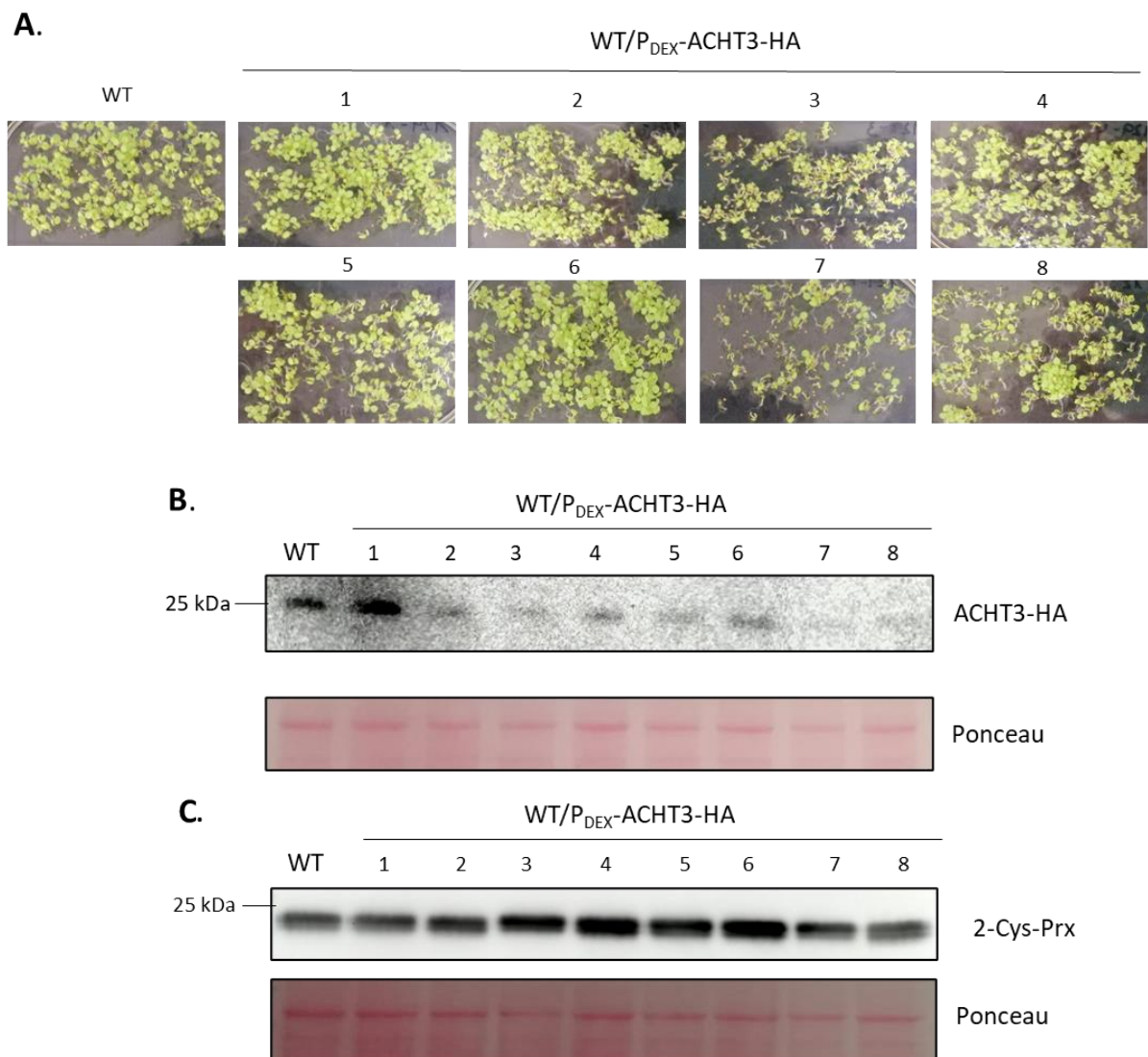
**Figura 5. Inserción del T-DNA en el gen *ACHT3* y genotipado por PCR de *acht3*.** [A] El gen *ACHT3* contiene 1308 pares de bases (pb), y está compuesto por 4 exones (bloques en amarillo) y 3 intrones (líneas grises), ocurriendo la inserción de T-DNA (bloque verde) en el tercer intrón. La flecha verde indica el codón de inicio, mientras que la flecha roja indica el codón de stop. Los cebadores empleados en la amplificación por PCR aparecen indicados con letras en el lugar donde se produce la hibridación; a: *ACHT3*-LP:SALK\_062853, b: *ACHT3*-RP:SALK\_062853, c: LB 1.3. [B] Imagen del resultado del genotipado por PCR de la línea *acht3*. Estos resultados se observan tras la realización de una electroforesis en gel de agarosa. El tamaño de los fragmentos de DNA resultantes se expresan en pb.

### 5.2. Estudio de líneas transgénicas *ACHT3*

#### - Estudio en plántulas

Se sembraron semillas de las líneas WT/35S-*ACHT3*-FLAG y WT/P<sub>DEX</sub>-*ACHT3*-HA con el fin de determinar qué plantas habían adquirido la construcción con el gen *ACHT3*. En primer lugar, se observó que fenotípicamente las plántulas eran muy similares en ambas líneas transgénicas de estudio (*Figura 6A, 7A*). Con el objetivo de determinar los niveles de proteínas *ACHT3* en las plantas transformadas de las dos líneas generales en estudio, se realizó un análisis

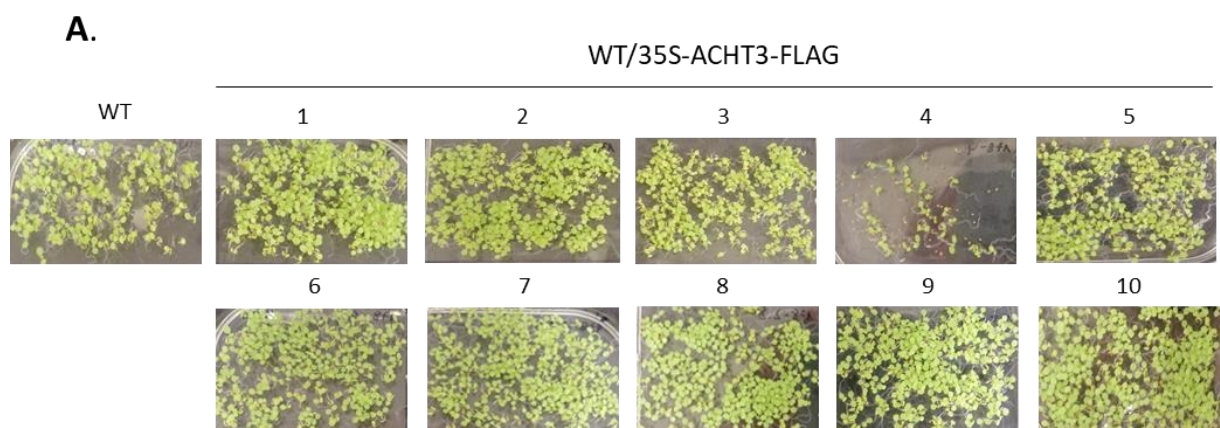
por western blot. Para las plántulas de las 8 líneas WT/P<sub>DEX</sub>-ACHT3-HA, donde la proteína se detecta a través de la etiqueta HA, se observa una banda muy leve en algunas de las muestras, incluyendo el WT, a la altura de 25 kDa (**Figura 6B**). No podemos concluir que se trate de la proteína ACHT3, debido a que también podemos observar banda contra ACHT3-HA en el WT; por tanto, línea WT/P<sub>DEX</sub>-ACHT3-HA no sobreexpresa la proteína de interés ACHT3 y se descarta para los siguientes experimentos. Para esta misma línea, se incubaron las membranas con anti-2CP, detectándose una banda entre los 20 y los 25 kDa en todas las plántulas en estudio (1 WT y 8 WT/P<sub>DEX</sub>-ACHT3-HA), la cual se corresponde con el tamaño que presenta la proteína 2CP, 22 kDa (**Figura 6C**). Esto indica que para la planta transformante de la línea WT/P<sub>DEX</sub>-ACHT3-HA sí expresa la proteína 2CP, tal y como se esperaba.

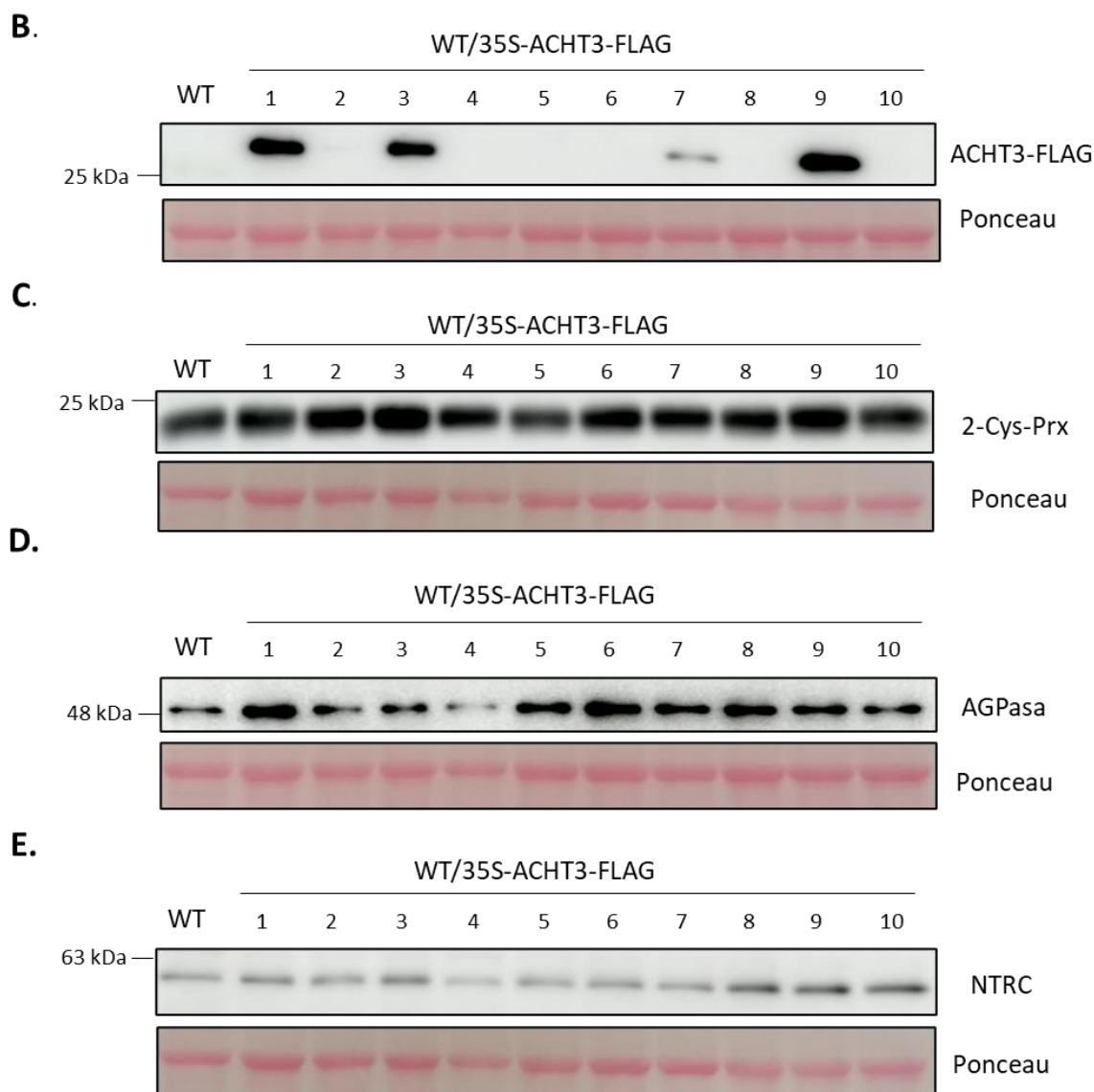


**Figura 6: Análisis de la presencia de ACHT3 en plántulas transgénicas de la línea WT/P<sub>DEX</sub>-ACHT3-HA. [A] Fotografía de las plántulas en placa tras 6 días de las líneas indicadas. [B] Resultados del análisis por western blot para la detección de proteína ACHT3 con la etiqueta HA en las líneas de**

estudio indicadas. [C] Resultados del análisis por western blot para la detección de proteína 2-Cys-Prx en las líneas de estudio indicadas.

Para las muestras de las 10 líneas WT/35S-ACHT3-FLAG, se usó el anticuerpo anti-FLAG y se observaron bandas correspondientes con la proteína ACHT3 (con un tamaño esperado en torno a 27 kDa). Sin embargo, esto solo ocurre para algunas de las líneas, más concretamente para las líneas WT/35S-ACHT3-FLAG-1, 3, 9 y 7 (**Figura 7B**), siendo la banda un poco más débil en esta última. Por tanto, podemos decir que en dichas líneas, la proteína ACHT3 se encuentra sobreexpresada o en mayor cantidad que en el mutante *acht3* y la muestra WT. Para esta misma línea se reincubó la membrana con anti-2CP como control, observándose una banda del tamaño de esta proteína (sobre los 22 kDa) en todas las plántulas analizadas, junto con el WT (**Figura 7C**). Es por ello que podemos concluir que la sobreexpresión de ACHT3 no afecta los niveles de la proteína 2CP. Adicionalmente en esta línea, se reincubaron las membranas con anti-NTRC y anti-AGPasa con el fin de observar si hay cambios en los niveles de proteínas NTRC y AGPasa en las plantas transformantes. NTRC es una proteína cuya principal función es reducir a la peroxirredoxina 2CP en condiciones de luz y de oscuridad; AGPasa hace referencia a la ADP glucosa pirofosforilasa, la cual participa en estadios iniciales de la síntesis de almidón (Cortés et al., 2014). Esta última es de interés para la familia ACHT, ya que existen isoformas con la capacidad para oxidar específicamente la subunidad pequeña de dicha enzima, la cual se regula por control redox (Yoshida et al., 2019). Los resultados indican que la sobreexpresión de ACHT3 no afecta a los niveles de estas proteínas (**Figuras 7D y 7E**).



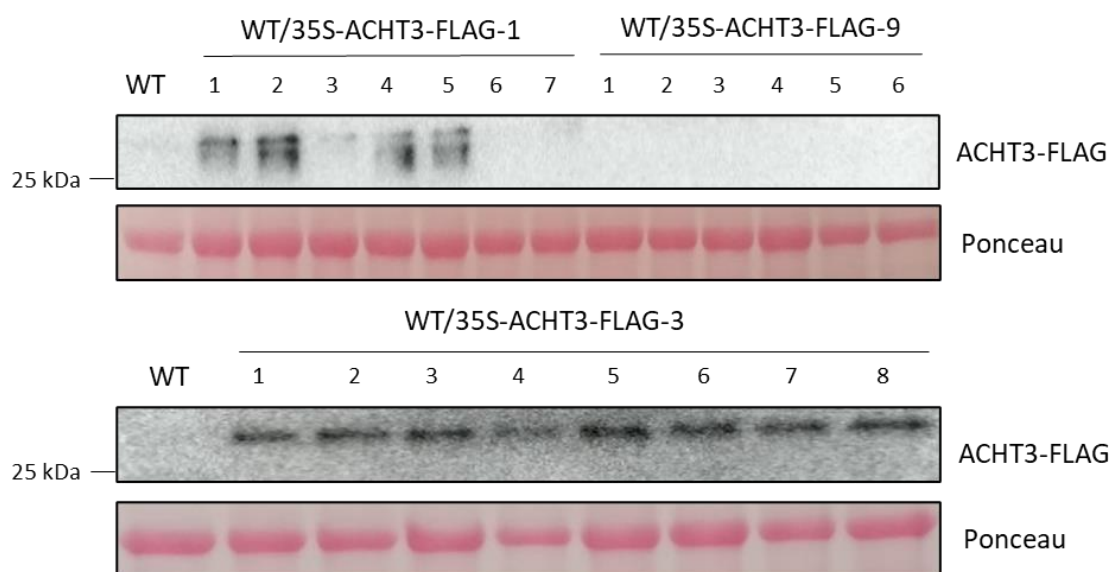


**Figura 7: Detección de ACHT3 en plántulas transgénicas de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG.** [A] Fotografía de las plántulas en placa tras 6 días de las líneas indicadas. Resultados del análisis por western blot para la detección de proteína ACHT3 con la etiqueta FLAG [B], 2-Cys-Prx [C], AGPasa [D] y NTRC [E] en las líneas de estudio indicadas, todas ellas acompañadas con su correspondiente imagen de la membrana teñida en rojo Ponceau, utilizándose la proteína RuBisCO como control de carga.

- **Estudio en plantas adultas**

A partir de los resultados obtenidos, se sembraron las semillas correspondientes a las líneas WT/35S-ACHT3-FLAG-1, -3 y -9, que expresan la proteína ACHT3-FLAG. Se hizo en tierra, en semilleros individuales, de modo que se obtuvieron 8 plantas para cada línea positiva en sobreexpresión de ACHT3. También se sembraron semillas de las líneas WT, *2cpab* y *acht3*. Esta siembra se realizó por duplicado, ya que una bandeja se destinaría a estudiar parámetros fotosintéticos cuando la planta crece en condiciones de día corto, y otra para estudiar cambios redox en enzimas fotosintéticas en día largo.

Tras 27 días desde la siembra, se recogieron muestras de la bandeja que estaba creciendo en día largo y se realizó un western blot con el fin de observar si en estado adulto también existía sobreexpresión de la proteína ACHT3. Este se realizó para un total de 7 plantas de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-1, 6 plantas de la WT/35S-ACHT3-FLAG-9 y 8 plantas de la WT/35S-ACHT3-FLAG-3. Se observan bandas a la altura esperada en 4 de las plantas (1, 2, 4 y 5) de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-1. También se detecta la proteína ACHT3 con la etiqueta FLAG en todas las plantas de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-3 (**Figura 8**). Sin embargo, no se detectó sobreexpresión en la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-9, a pesar de descender de una planta que sí sobreexpresaba la proteína de interés. La detección de la proteína en estudio para el caso de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-3 se obtuvo a tiempos de exposición más largos (por ello la imagen obtenida se encuentra muy saturada), detectándose una banda de intensidad baja, indicando bajos niveles de sobreexpresión de la proteína de interés. En consecuencia, el trabajo posterior se realiza con la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-1.



**Figura 8: Análisis en plantas transgénicas de la presencia de ACHT3 para las líneas 1, 3 y 9 WT/35S-ACHT3-FLAG.** Resultados obtenidos tras el análisis por western blot de las líneas en estudio indicadas. Se acompaña cada membrana con una imagen de esta teñida con rojo Ponceau, utilizando la RuBisCO como control de carga.

### 5.3. Determinación de parámetros fotosintéticos

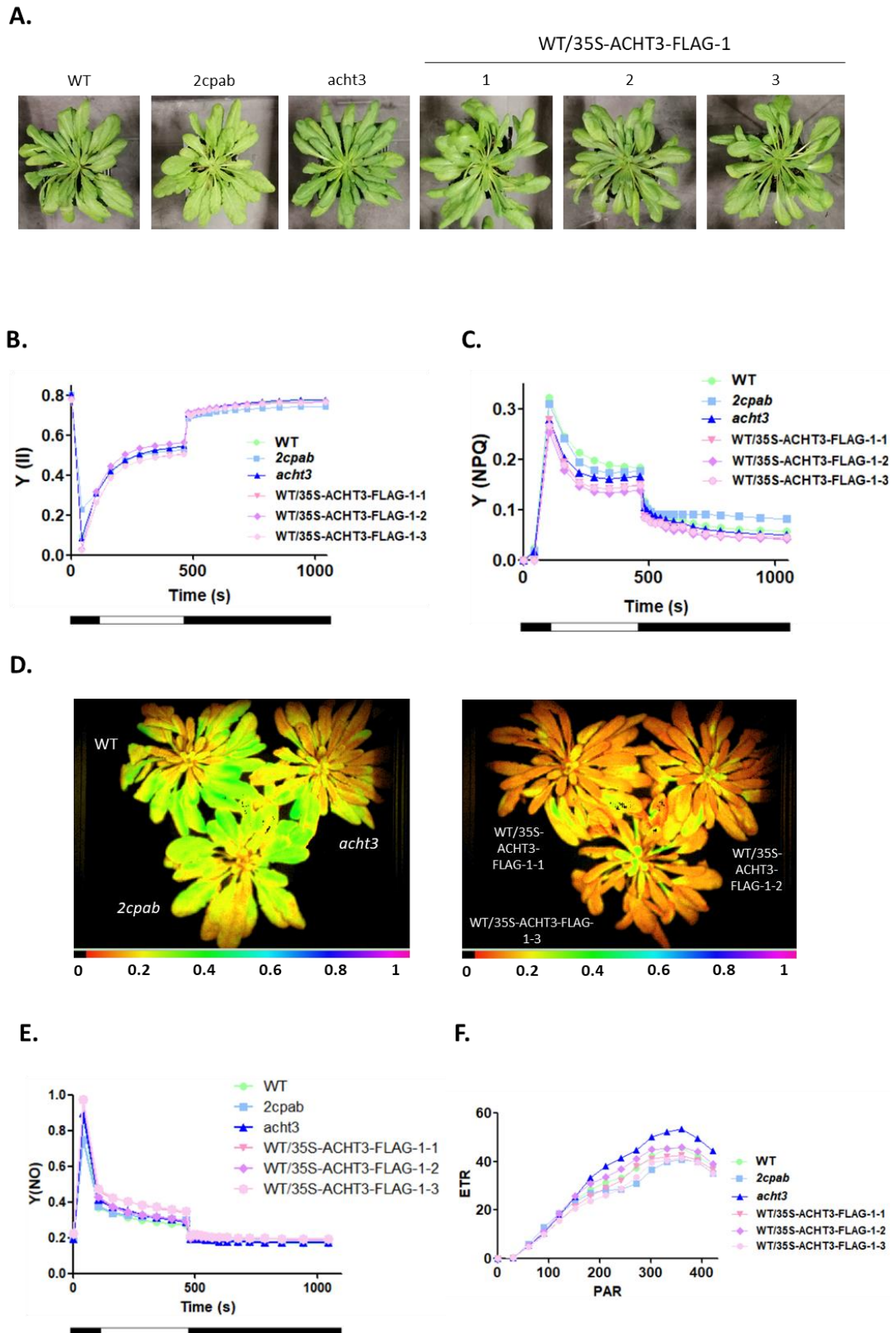
A continuación, se determinó la actividad fotosintética en plantas de las diferentes líneas en estudio, con el fin de comprobar si las líneas transgénicas presentaban algún comportamiento distinto en algunos procesos de la fotosíntesis frente a la línea WT. A través del fluorímetro IMAGING-PAM se determinaron cuatro parámetros fotosintéticos medibles a través de la



fluorescencia emitida por la clorofila: Y(II), Y(NPQ), Y(NO) y ETR. Estas mediciones se tomaron para las plantas WT, *2cpab*, *acht3* y 3 plantas de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-1 (1, 2 y 3) en condiciones de día corto (**Figura 9A**).

En primer lugar, se tomaron medidas para analizar el parámetro Y(II) y el parámetro Y(NPQ) obteniendo la curva de recuperación por inducción de luz. Como ya se ha mencionado en el apartado de materiales y métodos, el parámetro Y(II) mide la proporción de fotones que absorbe el fotosistema II y que son destinados en su totalidad a procesos fotoquímicos, mientras que el parámetro Y(NPQ) se relaciona con la cantidad de energía que este fotosistema disipa en forma de calor. Posteriormente, se analizó el parámetro ETR (tasa relativa de transporte de electrones por el fotosistema II), el cual nos devuelve el tratamiento de luz a una muestra a través de una curva de luz.

Para el parámetro Y(II), los valores medidos para cada planta son muy similares (**Figura 9B**) aunque en el periodo de oscuridad que aparece a partir de los 500 segundos, los valores se estabilizan en torno a 0.7 para todas las muestras. En el caso del parámetro Y(NPQ), el cual es inversamente proporcional al parámetro Y(II), se muestran diferencias bastante significativas (**Figura 9C**), puesto que las tres plantas transgénicas presentan valores más pequeños que la muestra silvestre y los mutantes, sobre todo en presencia de luz; no obstante, los valores que se han obtenido no concuerdan con la relación existente entre los parámetros Y(II) e Y(NPQ), puesto que el primero de ellos cambia pero el segundo no lo hace de forma inversamente proporcional. Gracias a la imagen obtenida en escala de color (**Figura 9D**), podemos distinguir valores de Y(NPQ) mayores de 0.2 (color verdáceo) para las muestras WT, *2cpab*, y *acht3*, mientras que las transgénicas presentan valores menores a 0.2 (color anaranjado) para el valor estudiado. Debido a los resultados desconcertantes obtenidos para Y(II) y para Y(NPQ), se ha decidido estudiar el parámetro Y(NO), el cual indica la disipación de energía no regulada (**Figura 9E**), ya que la suma de estos tres parámetros debe dar 1 y por tanto, estos deben fluctuar cumpliendo siempre que la suma debe dar la unidad. Cuando se vuelve a condiciones de oscuridad, los valores se estabilizan. Para la última medida (ETR) (**Figura 9F**), el comportamiento de todas las muestras es similar, ya que conforme aumenta la radiación fotosintéticamente activa (PAR), aumentan los valores de ETR para todas ellas hasta alcanzar un máximo entorno a los 350 PAR, valor a partir del cual comienza el descenso. La muestra *acht3* presenta, a partir de los 200 PAR, valores más elevados que el resto de muestras.



**Figura 9: Determinación de parámetros fotosintéticos en plantas transgénicas WT/35S-ACHT3-FLAG-1 y plantas mutantes acht3. [A]** Imagen de las plantas en estudio crecidas en condiciones de día corto durante 70 días a las cuales se les tomaron las medidas de los diferentes parámetros fotosintéticos. **[B]** Gráfico que muestra los valores del parámetro Y(II) para cada una de las muestras

de estudio representadas a lo largo del tiempo (s). [C] Gráfico que muestra los valores del parámetro  $Y(NPQ)$  para cada muestra de estudio a lo largo del tiempo (s). [D] Imagen de las plantas de estudio con un código de colores asociado que indica de forma visual los valores del parámetro  $Y(NPQ)$ . [E] Gráfico que muestra los valores del parámetro  $Y(NO)$  para cada una de las muestras a lo largo del tiempo. [F] Gráfico que representa los valores del parámetro ETR en relación a la radiación fotosintéticamente activa (PAR). En las gráficas [B], [C] y [E] la barra representa periodos de oscuridad (negro) y luz (blanco).

#### **5.4. Estudio de la función de ACHT3 en el estado redox y en los niveles de enzimas del cloroplasto**

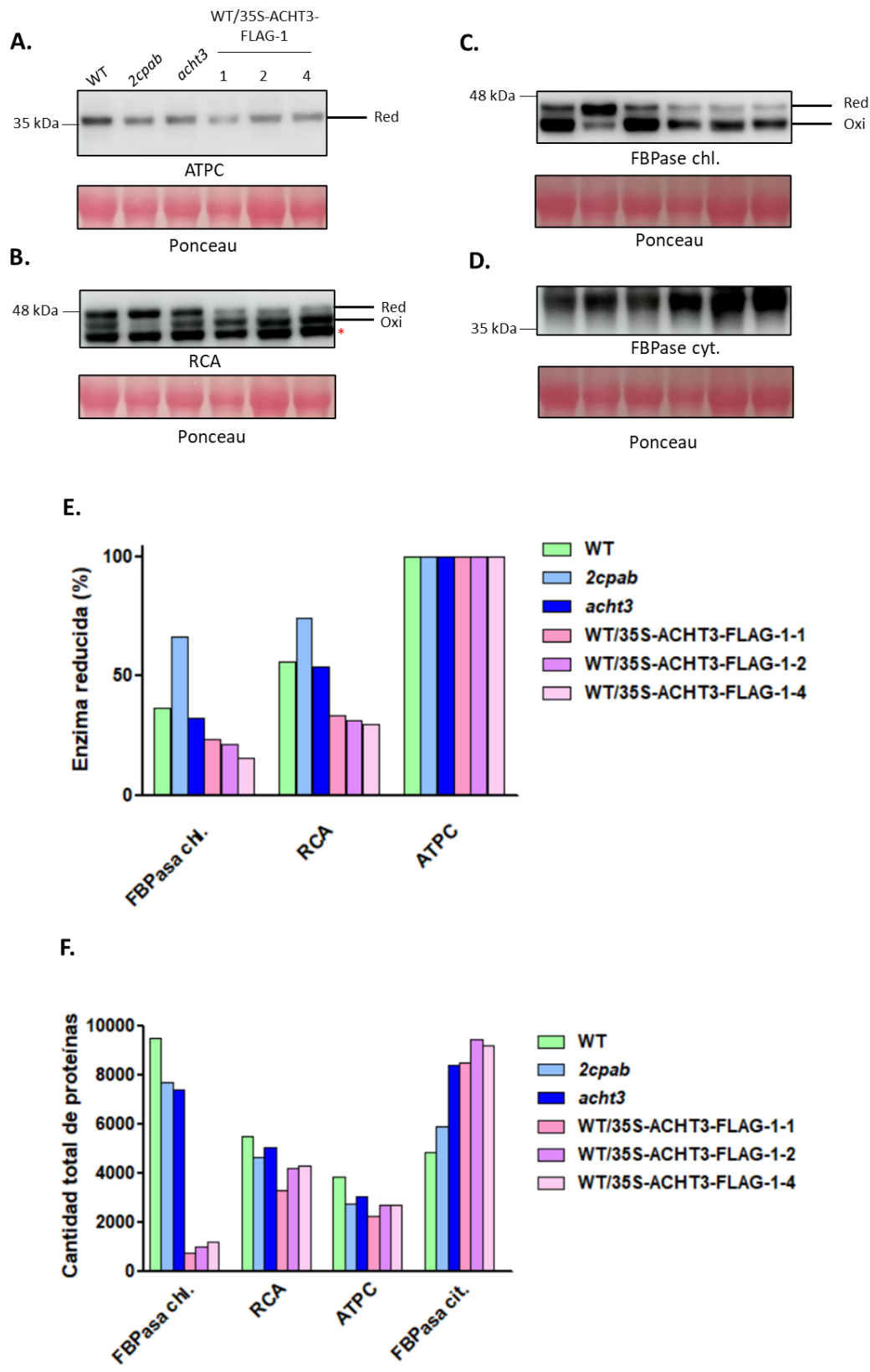
##### **- Determinación del estado redox en enzimas FBPasa cloroplastídica, RCA y ATPC**

La regulación redox constituye un mecanismo esencial que permite la rápida adaptación del metabolismo del cloroplasto a los cambios en la intensidad de la luz (Ojeda et al., 2018). Por tanto, es de gran interés conocer cómo contribuye la sobreexpresión de ACHT3 en las plantas transgénicas en estudio al estado de óxido-reducción de ciertas enzimas del cloroplasto, como son la FBPasa, RCA y ATPC. Como control, se decidió estudiar una proteína análoga del cloroplasto en el citosol (la isoforma citosólica de la FBPasa). Por tanto, las enzimas estudiadas son algunas de las participantes en el ciclo de Calvin-Benson (CBC), tales como la FBPasa, la cual presenta una actividad elevada en presencia de luz que se ve disminuida cuando las condiciones cambiaban a oscuridad (Michelet et al., 2013). También se estudiaron las enzimas RCA y ATPC, por su contribución a la activación de la RuBisCO y su participación en el complejo de la ATP sintasa, respectivamente. Por último, con el fin de observar posibles diferencias cuantitativas entre la FBPasa cloroplastídica y la FBPasa citosólica (FBpasa cit.), se reincubó la membrana con su anticuerpo correspondiente y se cuantificaron los niveles de proteínas.

Para determinar las formas reducida y oxidada para cada una de las enzimas anteriormente mencionadas, se realiza un ensayo de alquilación por western blot para las líneas WT, *2cpab*, *acht3* y 3 plantas de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-1 (-1, -2 y -4). Se han seleccionado dichas plantas porque en el análisis por western anteriormente realizado, se han detectado niveles de ACHT3 considerables; no obstante, se ha descartado la totalidad de las plantas de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-3 debido a que, a pesar de presentar niveles de proteína de interés, estos eran muy bajos. Las bandas que se obtienen para cada estado redox poseen diferente movilidad electroforética debido a la presencia (estado oxidado) o a la ausencia (estado reducido) de puentes disulfuro intramoleculares. La banda inferior se corresponde con la forma oxidada, ya que los puentes disulfuro que se establecen provoca que la proteína adquiera una conformación más empaquetada y, por tanto, mayor movilidad electroforética; la banda superior, por ende, se corresponde con la forma reducida que carece de los puentes

disulfuro mencionados y está menos empaquetada, lo que disminuye su movilidad electroforética.

Todas las determinaciones se han realizado en muestras obtenidas en presencia de luz. Por tanto, para la proteína ATPC, esta se encuentra totalmente reducida para todas y cada una de las muestras, con bandas de intensidades similares (**Figura 10A, 10E**). Para la enzima RCA, se observan tres bandas en cada calle, pero la banda más inferior corresponde con la isoforma de la enzima que no presenta regulación redox y no se va a tener en cuenta para este estudio. En la muestra WT, la enzima se comporta de manera similar ambas formas (55.9 % reducida); su comportamiento en el mutante *2cpab* es diferente, ya que se encuentra en un 74 % en su forma reducida; el mutante *acht3* tiene un comportamiento similar al observado en el WT (54.1 % reducida); para las muestras transgénicas, se observa una menor cantidad de enzima reducida, en torno al 30 %, por lo que en su mayoría, esta se encuentra oxidada, comportamiento contrario al que se da en el WT y en los mutantes *2cpab* y *acht3* (**Figura 10B, 10E**). En el caso de la FBPasa cloroplastídica, la muestra WT se encuentra oxidada en su gran mayoría (36.5 % reducido), comportamiento totalmente contrario al que tiene el mutante *2cpab*, el cual presenta esta proteína al 66 % en estado reducido. Sin embargo, el comportamiento para mutante *acht3* es parecido al que presenta el WT (un 32 % reducido); en el caso de las plantas transgénicas, el comportamiento es similar al que se observa en la muestra WT, donde la mayor parte de la enzimas están oxidadas (sobre 20 % en estado reducido) (**Figura 10C, 10E**), aunque las bandas tienen menor intensidad que en el resto, indicando una menor presencia en la cantidad total de enzima que se confirma con el gráfico donde se representa dicho parámetro (**Figura 10F**). La enzima FBPasa citosólica no presenta regulación redox, por lo que solo se observa una única banda en cada una de las muestras estudiadas (**Figura 10D**), con niveles similares en todas las líneas estudiadas (**Figura 10F**).



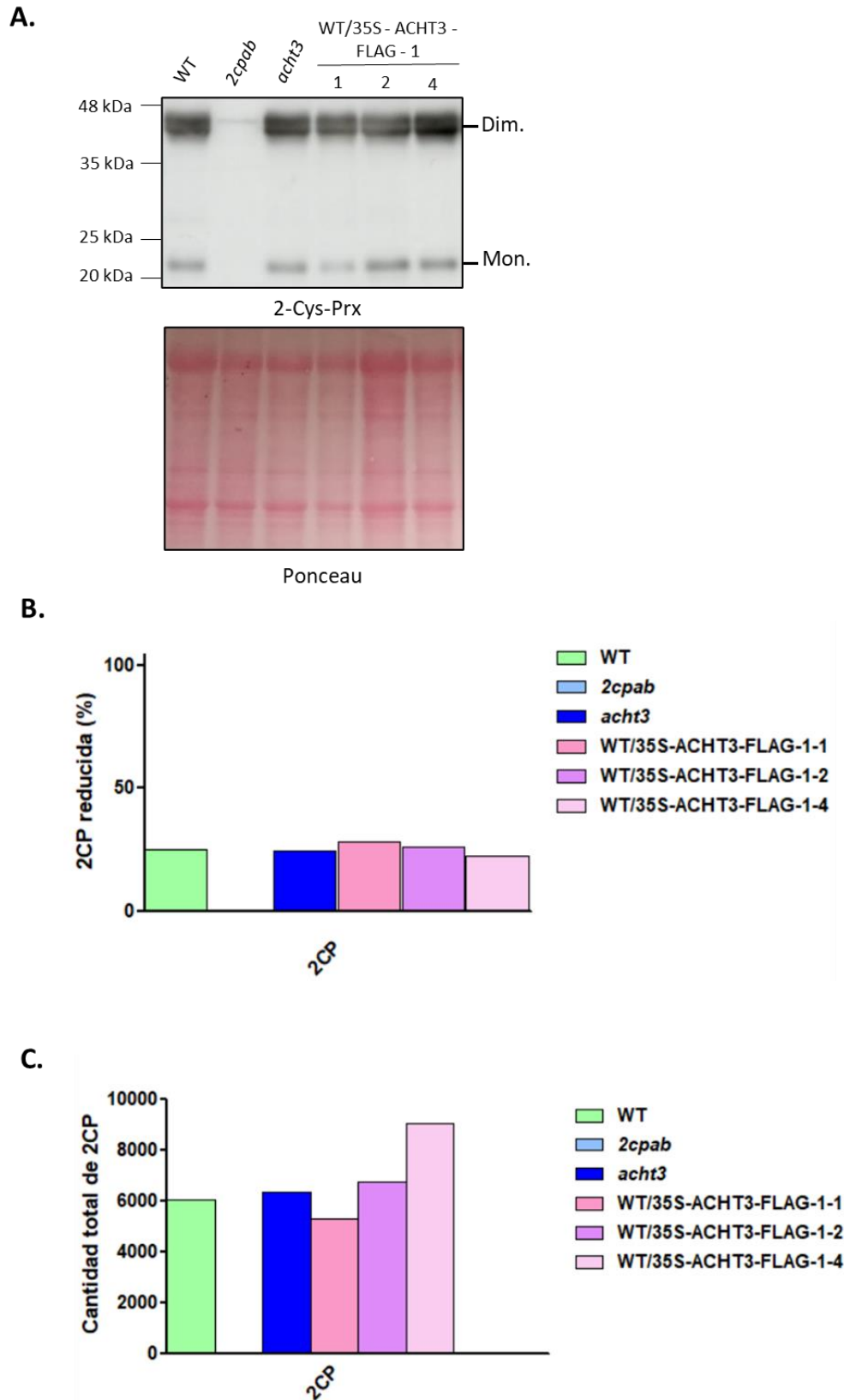
**Figura 10: Influencia de ACHT3 sobre el estado redox de enzimas metabólicas.** Membranas resultantes, junto a su respectivo Ponceau, de los análisis por western blot sobre la subunidad gamma de la ATP sintasa (ATPC) [A], RuBisCO activasa (RCA) [B], fructosa-1,6-bifosfatasa isoforma del cloroplasto (FBPasa chl.) [C] y fructosa-1,6-bifosfatasa isoforma del citosol (FBPasa cit.) [D]. [E] Gráfico donde se muestra el porcentaje de enzima reducida en las diferentes líneas de estudio y para

cada una de las enzimas mencionadas. [F] Gráfico donde se recogen los datos de proteína total existente para cada enzima en cada una de las líneas de estudio.

- **Determinación del estado redox en la enzima 2-Cys Prx**

Para la proteína 2CP podemos observar un comportamiento diferente al resto de proteínas estudiadas en el apartado anterior, ya que se detectan 2 bandas con un peso molecular de 22 kDa y 44 kDa, que se encuentran bastante espaciadas en la membrana. Esto se debe a que en estado oxidado, los puentes disulfuro que se generan son intermoleculares, por lo que se forma un dímero de 44 kDa. Por otra parte, en el estado reducido no se forman puentes intermoleculares, por lo que la proteína queda en estado monomérico, con menor peso molecular (22 kDa).

Por tanto, al estudiar la membrana revelada tras la realización del western blot para la enzima 2CP (**Figura 11A**), se observa que la planta WT, al igual que para las muestras de plantas transgénicas y para el mutante *acht3*, presenta una banda más intensa en la zona superior correspondiente con la forma dimérica oxidada, mientras que en la zona inferior se observa una banda menos intensa que se corresponde al estado reducido monomérico; para la muestra *2cpab*, al ser una planta mutante que carece de esta enzima, no se observa banda para ninguno de los dos estados, como era de esperar. Al igual que en el estudio de la regulación redox del resto de enzimas, se ha realizado un gráfico que permite observar el porcentaje de proteína 2CP reducida para las líneas mencionadas de estudio (**Figura 11B**), el cual muestra que las distintas plantas siguen un comportamiento redox homogéneo (excepto para el mutante, donde al no tener enzima, no existen datos para ella). Por otro lado, se muestra otra gráfica (**Figura 11C**) donde se recoge la cantidad total de proteína 2CP existente en cada línea, que se presenta sin cambios significativos.



**Figura 11: Influencia de ACHT3 sobre el estado redox de la proteína 2-Cys-Peroxisredoxina (2CP).**  
**[A]** Membrana que muestra el resultado del análisis realizado por western blot, con su correspondiente Ponceau, de la proteína 2-Cys-peroxirredoxina (2CP) en estado oxidado (banda superior, dim. = dímero) y en estado reducido (banda inferior, mon. = monómero) para cada una de

las líneas de estudio. [B] Porcentaje de proteína 2CP que se encuentra en estado reducido para cada línea de estudio. [C] Cantidad total de proteína 2CP para cada una de las líneas de estudio.

## 6. DISCUSIÓN

En este trabajo, se ha estudiado el papel de la proteína ACHT3 en diferentes estados de crecimiento y en la oxidación de enzimas cloroplastídicas, utilizando para ello plantas de *Arabidopsis thaliana*. ACHT3 es una tiorredoxina atípica rica en cisteína e histidina, con capacidad de regular el estado redox de proteínas cloroplastídicas. Actúa sobre proteínas diana reducidas con el fin de oxidarlas y que pasen a un estado inactivo para que, en presencia de luz, las tiorredoxinas típicas las vuelvan a reducir y se encuentren activas.

### 6.1. Alteraciones en los niveles de ACHT3 no afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas

Se han utilizado 2 tipos de líneas transgénicas, una con promotor inducible y otra con promotor constitutivo 35S, y con T-DNA que contiene el gen ACHT3. También se han tomado dos mutantes knock-out: *acht3* y *2cpab*. Estas líneas se han utilizado debido a que se han transformado previamente con una construcción que expresa el gen de interés y se han descartado aquellas plantas que no habían obtenido la construcción utilizando BASTA<sup>®</sup>, herbicida al cual las plantas transformadas son resistentes. La proteína 2CP es una peroxidasa tiol-dependiente que interviene en la oxidación de enzimas cloroplastídicas en la oscuridad, y presenta 2 isoformas en el interior del cloroplasto: 2CPA y 2CPB. Ambas participan en la regulación redox de este orgánulo al estar implicadas en reacciones de intercambio tiol-sulfuro ligadas a la reducción del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el aceptor final del poder reductor (Ojeda et al., 2018). Por tanto, se ha utilizado el doble mutante *2cpab* en este trabajo, ya caracterizado en anteriores publicaciones (Ojeda et al., 2018), para estudiar su comportamiento en comparación con la sobreexpresión de ACHT3. El mutante *acht3* se ha genotipado por PCR, ya que esta técnica permite identificar la inserción de T-DNA en genes en estudio a través del uso de cebadores que hibridan con la copia silvestre o con la mutada (**Figura 5A**). De esta manera, se ha confirmado que el gen ACHT3 presenta una inserción de T-DNA (**Figura 5B**).

Con el fin de determinar si las plantas transgénicas tienen la capacidad de sobreexpresar la proteína ACHT3, se germinaron semillas de cada línea transgénica independiente en placas y se analizaron las plántulas resultantes a través de un análisis por western blot usando los anticuerpos correspondientes (**Tabla 1**). El fenotipo de cada una de las plántulas crecidas era similar (**Figura 6A, 7A**), ya que visiblemente no se apreciaron diferencias significativas. Sin embargo, cuando se detectaron los niveles de proteína ACHT3 en cada línea, se observó que



ninguna de las líneas WT/P<sub>DEX</sub>-ACHT3-HA presentaba la proteína de interés cuando esta se detectó con su etiqueta correspondiente (**Figura 6B**). Este resultado llamó la atención, ya que al expresarse la proteína a través de un promotor inducible y estando en el medio de cultivo el agente inductor que lo activaba (dexametasona), lo previsible es que se exprese la proteína de interés y, por tanto, que haya abundancia de ella; al no ser así, es posible que exista algún mecanismo que silencie la expresión del gen. Otra posibilidad es que el anticuerpo HA no esté funcionando correctamente, puesto que no hay ningún control positivo que nos indique su efectividad, o también que haya problemas con la dexametasona y no esté funcionando. Se reincubó la membrana con anti-2CP (**Figura 6C**) para ver si los niveles de esta peroxirredoxina habían variado, pero se observó que estaba presente en cada una de las muestras en cantidades similares.

Con respecto a la otra línea transgénica, WT/35S-ACHT3-FLAG, algunas líneas sí que expresaban la proteína ACHT3 con su etiqueta correspondiente; no obstante, solo lo hicieron para algunas de las líneas en estudio: WT/35S-ACHT3-FLAG-1, 3, 7 y 9 (**Figura 7B**). Estas líneas se sembraron y crecieron en tierra, con el fin de observar su comportamiento de cara a la expresión de la proteína de interés. En relación al resto de proteínas observadas en esta línea transgénica, todas las muestras presentaban 2CP, AGPasa y NTRC (**Figuras 7C, 7D y 7E**), no afectando por tanto la sobreexpresión de ACHT3 al resto de proteínas de estudio.

El análisis de proteínas por western blot de aquellas plantas crecidas en tierra mostró que todas las réplicas WT/35S-ACHT3-FLAG-3 sobreexpresaban ACHT3, mientras que las de WT/35S-ACHT3-FLAG-1 lo hacían solo para 5 de ellas y WT/35S-ACHT3-FLAG-9 para ninguna (**Figura 8**). Es un comportamiento bastante heterogéneo, ya que en plántulas todas ellas presentaban la sobreexpresión pero en tierra ya no lo hacen; incluso dentro de una misma línea, donde en su conjunto son réplicas, en algunos casos aparece banda y, por tanto, proteína y en otros no. Al margen de esto, también cabe destacar que la intensidad de la banda no es muy elevada, por lo que a pesar de tener ACHT3, esta aparece en cantidades muy pequeñas, sobre todo para la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-3 (**Figura 8**). Este comportamiento parece indicar que existe un mecanismo que silencia la expresión de la proteína de interés. Estudios anteriores han demostrado que las vías transcripcionales y post-transcripcionales de silenciamiento génico junto con diferentes siRNA apagan la actividad de transposones para evitar la inestabilidad genómica en las plantas (El-Sappah et al., 2021; Mirouze et al., 2009). Es probable que esto también ocurra en casos de inserciones de segmentos de ADN, como el

utilizado en este caso; no obstante, al no ocurrir de forma equitativa en cada una de las plantas, no se puede afirmar que este sea el proceso que esté ocurriendo en el estudio.

La presencia de una doble banda en el análisis de la línea WT/35S-ACHT3-FLAG-1 es algo *a priori* llamativo: se presume que la banda que muestra la presencia de ACHT3 con la etiqueta FLAG es la de menor movilidad electroforética, por lo que la banda inferior puede deberse a varias causas: degradación de la proteína o presencia del fenómeno de splicing alternativo, proceso por el cual un mismo gen puede generar moléculas de ARN mensajero (ARNm) de diferente tamaño una vez se ha procesado el pre-ARNm y se obtiene el ARN maduro.

Para determinar de forma precisa el rendimiento fotosintético de las diferentes líneas de estudio, se han analizado distintos parámetros a través del fluorímetro IMAGING-PAM. En relación al parámetro Y(II), tanto las plantas transgénicas como el mutante *acht3* presentan valores similares al silvestre (**Figura 9B**), aunque existe un punto concreto, el tomado hacia los 42 segundos aproximadamente, donde se observa que el valor para Y(II) del mutante *2cpab* es mayor que el resto, indicando así que la ausencia de la proteína 2CP aumenta el rendimiento cuántico del fotosistema II, respaldando resultados anteriormente demostrados en otros estudios (Ojeda et al., 2018). Los valores de Y(NPQ) son inversamente proporcionales a los valores obtenidos en Y(II), por lo que, teniendo esto en cuenta, llama la atención que los valores para Y(NPQ) en el caso de las plantas transgénicas sea algo menor (**Figura 9C**) mientras que en Y(II) se tuviesen un comportamiento similar al resto de muestras. Esta diferencia es visiblemente observable gracias a la imagen con escala de colores (**Figura 9D**), indicando que las plantas transgénicas disipan menor cantidad de energía en forma de calor. De ser así, los valores en Y(II) deberían ser mayores para estas plantas, mostrando que la energía lumínica que se toma se usa preferiblemente para hacer la fotosíntesis, cosa que no ocurre al observar el gráfico correspondiente (**Figura 9B**). Por tanto, se determinó el parámetro Y(NO), que muestra la disipación de energía en forma de calor no regulada, puesto que se cumple la siguiente condición matemática para estos tres parámetros:  $Y(II) + Y(NPQ) + Y(NO) = 1$ .

Los valores de este parámetro (Y(NO)) resultaron ser más elevados en las transgénicas que en el resto de plantas en estudio, indicando por tanto que estas plantas disipan la energía en forma de calor pero de manera no regulada (**Figura 9E**) en lugar de hacerlo de forma regulada. Finalmente, los resultados de ETR (**Figura 9F**) muestran que la ausencia de ACHT3 produce

una aumento en la velocidad de transporte de electrones a través del fotosistema II, especialmente a partir de 200 PAR.

### **6.2. ACHT3 participa en la oxidación de RCA y FBP-asa**

Por tanto, para conocer el efecto de la sobreexpresión de ACHT3 sobre el estado redox de las enzimas del cloroplasto, se ha realizado un ensayo de alquilación en condiciones de luz. Estudios de transición luz-oscuridad no se pudieron realizar dado que el comportamiento de las plantas transgénicas descendientes de una misma planta no era homogéneo, debido a que algunas plantas expresaban ACHT3 pero otras no. En caso de haber sido equitativo, estos análisis hubieran sido de gran interés, ya que nos hubieses permitido estudiar la función de ACHT3 en la oxidación de las enzimas en oscuridad.

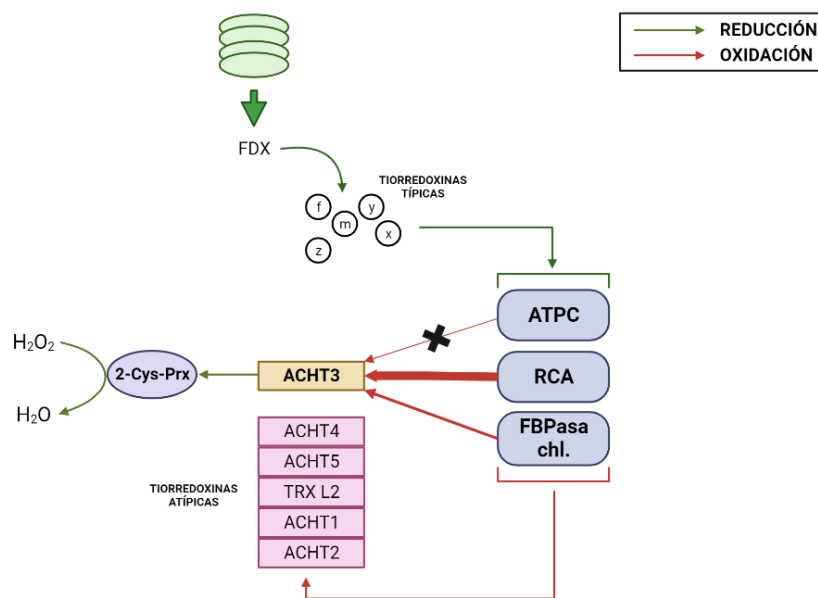
Las proteínas cloroplastídicas analizadas fueron la RCA, la ATPC y FBPasa. En condiciones de luz, las enzimas se encuentran predominantemente reducidas, aunque es importante tener en cuenta que el patrón redox varía dependiendo de cada enzima estudiada. Para ATPC, todas las muestras se encuentran en estado reducido, por lo que la proteína de interés no desempeña un papel importante en la regulación redox de esta proteína, al tener tanto la ausencia como la sobreexpresión de ella un comportamiento idéntico (**Figuras 10A, 10E**). Diferentes estudios han demostrado la participación de NTRC en las reacciones fotoquímicas aguas arriba de la fotosíntesis y de la regulación redox de la subunidad gamma de la ATP sintasa (Cejudo et al., 2019), lo que indica que existen otras tiorredoxinas atípicas que también presenta especificidad de acción por dicha enzima y compensan la falta de ACHT3, lo que sugiere que ATPC no es diana de ACHT3. Para la proteína RCA, la ausencia de ACHT3 no parece tener ningún efecto al tener el mismo comportamiento que la muestra control, pero las plantas transgénicas mantienen la mayor parte de la enzima en estado oxidado (**Figuras 10B, 10E**). Este comportamiento indica que ACHT3 participa en la oxidación de RCA: al acumular mayor cantidad de ACHT3 en las plantas transgénicas, se oxida más cantidad de RCA, o lo que es lo mismo, se reduce menos. Además, estos resultados también parecen sugerir que la tiorredoxina atípica en estudio presenta mayor afinidad de acción por una enzima, como puede ser la RCA, que por otras, como la ATPC. Para el caso de la muestra *2cpab*, se conoce que estas mutaciones impiden la oxidación de enzimas cloroplastídicas, como es la RCA (Cejudo et al., 2019). En el caso de FBPasa cloroplastídica (**Figura 10C**), el comportamiento redox de las muestras WT y *acht3* es parecida, pero en las plantas transgénicas, al igual que ocurría con RCA, la mayor parte de la enzima se encuentra en estado oxidado (**Figura 10E**). Esto parece indicar que ACHT3 tiene un comportamiento similar con esta enzima al que presentaba con la RuBisCO activasa

(efecto oxidante de la enzima). No obstante, algo llamativo para este caso es la diferencia en la cantidad de proteína total que se observa entre las tres primeras muestras (WT, *2cpab*, *acht3*) y las tres plantas transgénicas, ya que en estas últimas la cantidad de enzima total es mucho menor (**Figura 10F**). Es posible que la sobreexpresión de ACHT3 actúe como un mecanismo de silenciamiento génico haciendo que la concentración de FBPasa del cloroplasto disminuya considerablemente: el silenciamiento génico es un mecanismo de retroalimentación negativa que regula la expresión génica para definir el destino celular y regular el metabolismo y la expresión génica en toda la vida de un organismo (El-Sappah et al., 2021); otra posibilidad sería el silenciamiento posicional, que ocurre cuando la inserción de un segmento de ADN se encuentra en una región del genoma que está asociada con la represión de la expresión génica. Si un segmento de ADN se inserta en una región con características epigenéticas específicas, puede heredar el silenciamiento epigenético y los genes en dicha región pueden quedar silenciados (Elgin & Reuter, 2013). Es por ello que se decidió estudiar cómo era el comportamiento de otra isoforma de la FBPasa, en este caso presente en el citosol, para ver si también cambiaban los niveles de esta proteína; sin embargo, se observa que la concentración de FBPasa citosólica eran elevados, sobre todo los de las plantas transgénicas (**Figuras 10D, 10F**). En relación al mutante *2cpab* para la FBPasa cloroplastídica, como ya se ha mencionado, permite que algunas proteínas del cloroplasto se mantengan en estado reducido (Cejudo et al., 2019), como es el de este caso (**Figura 10C**).

Por último, la proteína 2CP parece comportarse de manera igualitaria para todas las muestras, tanto en la ausencia como en la sobreexpresión de ACHT3 (**Figuras 11A, 11B**), encontrándose en su mayoría en estado oxidado. Los resultados obtenidos concuerdan con el hecho de que 2CP es una proteína intermediaria, por lo que aunque se reduzca cuando obtiene poder reductor, se espera que se oxide rápidamente al cederlo al peróxido de hidrógeno para su conversión en H<sub>2</sub>O. Estudios anteriores han demostrado que las proteínas ACHT actúan de manera similar a otras tiorredoxinas, como TrxL2, presentando una alta eficiencia en la reducción de 2CP (Dangoor et al., 2009). Los niveles totales de 2CP, en general bastante elevados, concuerdan con el hecho de que esta es la peroxirredoxina más abundante en el cloroplasto (Yoshida et al., 2019) (**Figura 11C**).

## 7. CONCLUSIÓN

La caracterización de plantas transgénicas que sobreexpresaban la proteína ACHT3 ha permitido estudiar *in vivo* la funcionalidad de la proteína de interés durante el desarrollo de estas, y su efecto oxidante sobre ciertas enzimas metabólicas del cloroplasto. Los resultados obtenidos indican que ACHT3 es una tiorredoxina atípica que, de forma general, se expresa poco en *Arabidopsis thaliana*, pero que participa activamente en la oxidación de enzimas como la RuBisCO activasa y la fructosa-1,6-bifosfatasa, siendo por tanto estas enzimas diana de ACHT3 (**Figura 12**). El mutante *acht3*, sin embargo, no afecta a las enzimas estudiadas, probablemente debido a la redundancia con otras tiorredoxinas atípicas del cloroplasto, como Trx.L2.



**Figura 12: Regulación redox de ACHT3 sobre enzimas metabólicas en el cloroplasto.** Esquema que representa la función de ACHT3 sobre RCA: RuBisCo activasa; FBPasa chl.: fructosa-1,6-bifosfatasa isoforma cloroplastídica y ATPC: subunidad gamma de la ATPsintasa. Las flechas verdes indican procesos de reducción; las flechas rojas indican procesos de oxidación. El grosor de las flechas indica la importancia en el proceso: mayor grosor, mayor importancia.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Calderón Pérez, A. (2017). *Participación de las Proteínas Redox Tiorredoxina (Trxo1) y Peroxirredoxinas (PrxIIF, 2-CysPrx) de Guisante y Arabidopsis, en Ciclo Celular, Estrés Salino y Glutationalización*. Universidad de Murcia.
- Cejudo, F. J., González, M.-C., & Manuel Pérez-Ruiz, J. (2020). *Redox regulation of chloroplast metabolism*. 186, 9–21. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiaa062>
- Cejudo, F. J., Ojeda, V., Delgado-Requerey, V., González, M., & Pérez-Ruiz, J. M. (2019). Chloroplast redox regulatory mechanisms in plant adaptation to light and darkness. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00380>

- Collet, J.-F., & Messens, J. (2010). Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, *13*(8), 1205–1216. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3114>
- Cortés, S., David Cortés, J., Ladino, J. J., Chavarriaga, P., & López, C. (2014). *Silencing of genes involved in starch biosynthesis in cassava*. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>
- Dangoor, I., Peled-Zehavi, H., Levitan, A., Pasand, O., & Danon, A. (2009). A small family of chloroplast atypical thioredoxins. *Plant Physiology*, *149*(3), 1240–1250. <https://doi.org/10.1104/pp.108.128314>
- Elgin, S. C. R., & Reuter, G. (2013). Position-Effect Variegation, Heterochromatin Formation, and Gene Silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(8), a017780–a017780. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017780>
- El-Sappah, A. H., Yan, K., Huang, Q., Islam, M. M., Li, Q., Wang, Y., Khan, M. S., Zhao, X., Mir, R. R., Li, J., El-Tarabily, K. A., & Abbas, M. (2021). Comprehensive Mechanism of Gene Silencing and Its Role in Plant Growth and Development. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.705249>
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. In *Environmental and Experimental Botany* (Vol. 154, pp. 134–142). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, *155*(1), 93–100. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>
- Hwang, H.-H., Yu, M., & Lai, E.-M. (2017). Agrobacterium -Mediated Plant Transformation: Biology and Applications . *The Arabidopsis Book*, *15*, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
- Isabel, A., Eric, J., Antonio, J., Montero, J., Mireles, V. A., Ruiz, J., Marín, J., & Hernández, J. (2017). *Sistemas antioxidantes del cultivo de Cicer Arietinum L bajo condiciones de estrés abiótico: Revisión de literatura*.
- Joliot, P., & Alric, J. (2013). Inhibition of CO<sub>2</sub> fixation by iodoacetamide stimulates cyclic electron flow and non-photochemical quenching upon far-red illumination. *Photosynthesis Research*, *115*(1), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9826-1>
- Kozuleva, M., Goss, T., Twachtmann, M., Rudi, K., Trapka, J., Selinski, J., Ivanov, B., Garapati, P., Steinhoff, H. J., Hase, T., Scheibe, R., Klare, J. P., & Hanke, G. T. (2016). Ferredoxin: NADP(H) oxidoreductase abundance and location influences redox poise and stress tolerance. *Plant Physiology*, *172*(3), 1480–1493. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01084>
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Dosekocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 6, pp. 1024–1042). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M. E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C. H., Fermani, S., Trost, P., & Lemaire, S. D. (2013). Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: Something old, something new. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 4, Issue NOV). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00470>
- Mirouze, M., Reinders, J., Bucher, E., Nishimura, T., Schneeberger, K., Ossowski, S., Cao, J., Weigel, D., Paszkowski, J., & Mathieu, O. (2009). Selective epigenetic control of retrotransposition in *Arabidopsis*. *Nature*, *461*(7262), 427–430. <https://doi.org/10.1038/nature08328>

- Núñez, C. L. (2016). *Design of chemical solutions for extraction of deoxyribonucleic acid in biotechnological products*.
- Ojeda, V., Pérez-Ruiz, J. M., & Cejudo, F. J. (2018). 2-Cys Peroxiredoxins Participate in the Oxidation of Chloroplast Enzymes in the Dark. *Molecular Plant*, *11*(11), 1377–1388. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.09.005>
- Pedone, E., Limauro, D., D'Ambrosio, K., De Simone, G., & Bartolucci, S. (2010). Multiple catalytically active thioredoxin folds: A winning strategy for many functions. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 67, Issue 22, pp. 3797–3814). <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0449-9>
- Stock, W., Blommaert, L., Daveloose, I., Vyverman, W., & Sabbe, K. (2019). Assessing the suitability of Imaging-PAM fluorometry for monitoring growth of benthic diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *513*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.02.003>
- Wienkoop, S., Baginsky, S., & Weckwerth, W. (2010). Arabidopsis thaliana as a model organism for plant proteome research. In *Journal of Proteomics* (Vol. 73, Issue 11, pp. 2239–2248). <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.012>
- Yokochi, Y., Fukushi, Y., Wakabayashi, K. I., Yoshida, K., & Hisabori, T. (2021). Oxidative regulation of chloroplast enzymes by thioredoxin and thioredoxin-like proteins in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(51). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2114952118/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Yokochi, Y., Sugiura, K., Takemura, K., Yoshida, K., Hara, S., Wakabayashi, K. I., Kitao, A., & Hisabori, T. (2019). Impact of key residues within chloroplast thioredoxin-f on recognition for reduction and oxidation of target proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(46), 17437–17450. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010401>
- Yoshida, K., Hara, A., Sugiura, K., Fukaya, Y., & Hisabori, T. (2018). Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(35), E8296–E8304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808284115>
- Yoshida, K., Yokochi, Y., & Hisabori, T. (2019). New Light on Chloroplast Redox Regulation: Molecular Mechanism of Protein Thiol Oxidation. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01534>