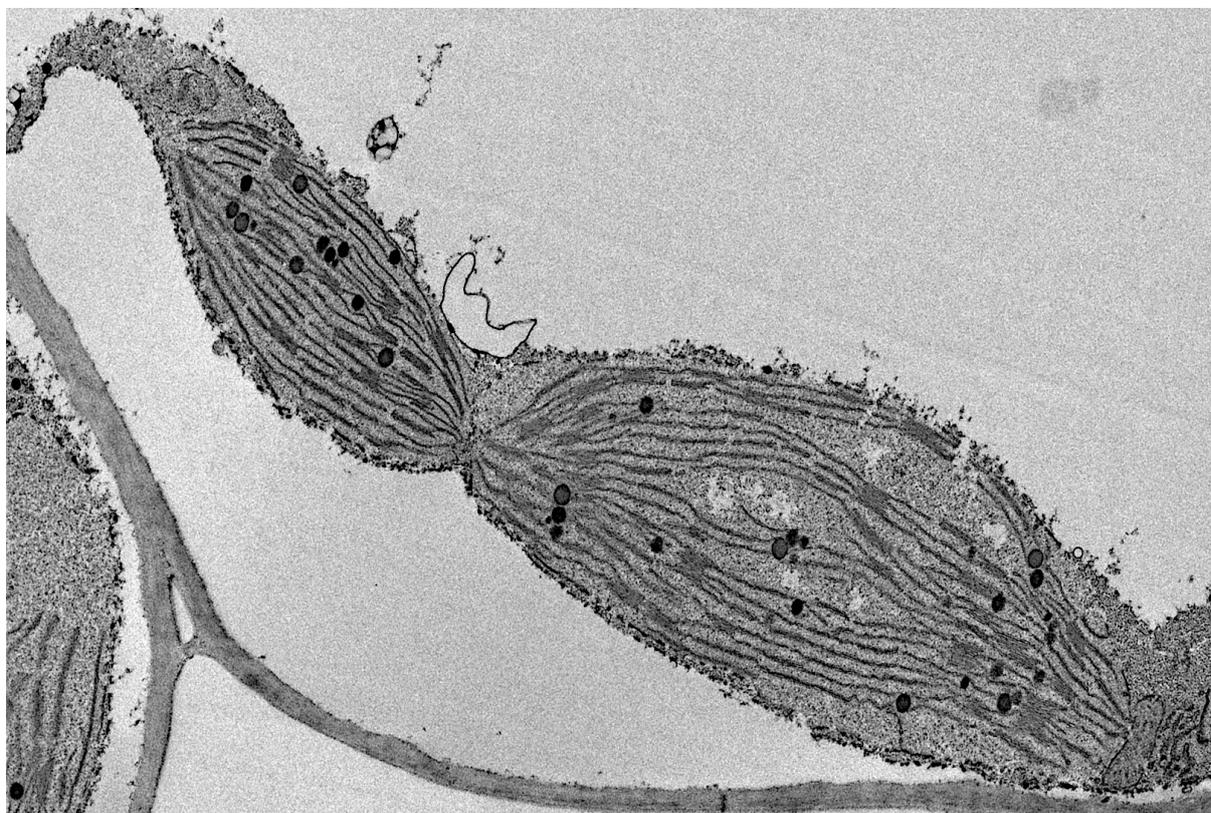


TESIS DOCTORAL

Papel de las fibrilinas en la defensa de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* frente a estreses abióticos



Diego Torres Romero
Sevilla, 2021

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

Portada: Imagen de microscopía electrónica de dos cloroplastos de *Arabidopsis thaliana*. La imagen fue obtenida en el servicio de microscopía de la Universidad de Granada.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular
Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad de Sevilla

TESIS DOCTORAL

Papel de las fibrilinas en la defensa de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* frente a estreses abióticos

Trabajo presentado por **Diego Torres Romero** para optar al grado de Doctor

Diego Torres Romero

Sevilla, 2021

Director

Tutora

Dr. Ángel Mérida Berlanga

Dra. Mercedes García González

Científico Titular del Consejo Superior de
Investigaciones Científicas

Profesora Titular de la Universidad de
Sevilla

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018



FINANCIACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS DOCTORAL

Agradezco a los fondos de financiación e instituciones que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral llevada a cabo en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF, CSIC-US). La Tesis Doctoral ha sido financiada por una ayuda para contrato predoctoral para la formación de doctores (antigua FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad, con referencia **BES-2016-076955**, adscrito al proyecto **BIO2015-65272-C2-2-P** (“Identificación de elementos que intervienen en la respuesta de las plantas a estrés lumínico mediada por fibrilinas”) del Ministerio de Economía y Competitividad, cuyo Investigador Principal es el Doctor Ángel Mérida Berlanga, cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y por el Fondo Social Europeo (FSE). Los fondos para el desarrollo experimental de la Tesis se han obtenido del citado Proyecto BIO2015-65272-C2-2-P y del PGC2018-096851-B-C22 del Ministerio de Ciencia e Innovación (“Análisis funcional de las fibrilinas asociadas a los plastoglobulos”, también con el Doctor Ángel Mérida como Investigador Principal). Ambos Proyectos han estado cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar este trabajo mostrando mi agradecimiento a todas las personas que de un modo u otro han hecho posible su realización.

En primer lugar, me gustaría expresar un profundo agradecimiento a mi director, Ángel, por darme la oportunidad de realizar este trabajo con él. Gracias por tu dedicación, tu paciencia y tu apoyo.

En segundo lugar, gracias a todas las personas que han pasado por mi laboratorio y de las que he aprendido tanto: Tomás; Sandy; Fran; Paula y, en especial, Ángeles, por darme fuerza en los momentos más estresantes del trabajo.

También dar las gracias a otros investigadores y amigos que, sin necesidad, me han enseñado tanto cada vez que he tenido alguna duda o algún problema. Ignacio, por tu paciencia y dedicación. Isa, por dejarlo todo cada vez que te necesitaba. Inma, por todo lo anterior y muchísimo más que, aparte de tus conocimientos, has compartido conmigo tu tiempo y tus risas; gracias de corazón.

Gracias a mis compañeros y queridos amigos doctorandos: Ana, Laura, Manuel y Mari. Hemos sufrido juntos los momentos estresantes de la Tesis Doctoral, pero también hemos aprovechado al máximo los momentos buenos, tanto dentro como fuera del trabajo. No sé cómo podría haber aguantado sin vosotros. De hecho, creo que no lo habría conseguido.

También quiero agradecer a todos aquellos que ya no están y también han sido parte de mis años en el IBVF: Javi, Ana Laureano, Lucía y Juanma, sin olvidar a mi querido amigo Isidro, aunque no haga falta recordarle ni decirle nada.

Agradezco también a los técnicos del IBVF Alicia, Rocío, José Enrique, Carlos, José María y, por supuesto, a Pablo. Vuestra ayuda ha sido inestimable. Al resto de personas que han hecho de mis horas de trabajo un lugar un poco más agradable: Gloria, Fernando, Migue, Pedro, Irene, Toñi y todos aquellos a los que en este justo momento no recuerdo.

A mis grandes amigas y amigos ajenos al trabajo por apoyarme y aguantarme en estos cuatro años concretamente y en todos los que han pasado y pasarán. Gracias Alberto, Amelia, Antonio, Augusto, Jesús, Macarena y Marina. No sé qué haría sin vuestra amistad.

Por último y no menos importante, gracias a mi querido Guzmán. Gracias por apoyarme en los peores momentos de esta Tesis Doctoral. Gracias por tener tanta paciencia conmigo y por preocuparte tantísimo por mí. Gracias por tu amor y por tu apoyo incondicional. Gracias por hacer de nuestra vida un lugar más bonito y alegre.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÍNDICE

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xvii
RECETARIO	xxv
OBJETIVOS	xxxi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aspectos generales de los cloroplastos.....	3
1.2. La membrana tilacoidal.....	3
1.2.1. Composición	6
1.3. Mecanismos de fotoprotección	8
1.3.1. Mecanismos de fotoprotección constitutiva.....	8
1.3.1.1. Fotoprotección por carotenoides.....	8
1.3.1.2. Flujo cíclico de electrones	9
1.3.1.3. Clororrespiración	9
1.3.1.4. Otros agentes de fotoprotección constitutiva.....	10
1.3.2. Mecanismos fotoprotectores de larga duración	10
1.3.3. Mecanismos fotoprotectores por disipación de energía: apantallamiento no fotoquímico.....	11
1.4. Los plastoglóbulos.....	12
1.4.1. ¿Qué son?.....	12
1.4.2. Dinámica de los plastoglóbulos	13
1.4.2.1. Des-etiolación.....	13
1.4.2.2. Senescencia	13
1.4.2.3. Transición de cloroplasto a cromoplasto.....	14
1.4.2.4. Estrés abiótico	14
1.4.3. Composición	15
1.4.3.1. Metabolitos	15
1.4.3.2. Proteínas.....	16
1.4.3.3. Incorporación de proteínas a los plastoglóbulos.....	18
1.4.4. Origen y evolución de los plastoglóbulos y sus componentes	18
1.4.5. Función de los plastoglóbulos	20
1.4.5.1. Papel en el metabolismo de tocoferoles y quinonas.....	20
1.4.5.2. Papel en el metabolismo de los carotenoides.....	22



1.4.5.3. Papel en la catabolización de clorofila y lípidos	23
1.5. Las fibrilinas	24
1.5.1. Filogenia de las fibrilinas	25
1.5.2. Características generales y localización.....	27
1.5.3. Expresión génica.....	28
1.5.4. Función de las fibrilinas	29
1.5.4.1. Integrantes de la subfamilia 1-2	29
1.5.4.2. FBN4	30
1.5.4.3. FBN5	31
1.5.4.4. FBN6	31
2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1. Material biológico	37
2.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
2.1.1.1. Condiciones de cultivo en tierra de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2.1.1.2. Condiciones de cultivo <i>in vitro</i> y esterilización de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2.1.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
2.1.2.1. Condiciones de cultivo en tierra de <i>Nicotiana benthamiana</i>	38
2.1.3. <i>Escherichia coli</i>	39
2.1.3.1. Cultivo en medio líquido de <i>Escherichia coli</i>	39
2.1.3.2. Cultivo en medio sólido de <i>Escherichia coli</i>	39
2.1.4. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
2.1.4.1. Cultivo en medio líquido de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
2.1.4.2. Cultivo en medio sólido de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
2.1.5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2.1.5.1. Cultivo en medio líquido de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2.2. Obtención de mutantes doble, triple y cuádruple de <i>Arabidopsis</i>	41
2.2.1. Cruce de plantas parentales.....	41
2.2.2. Selección de la progenie.....	41
2.3. Métodos de caracterización vegetal	43
2.3.1. Curvas de crecimiento	43
2.3.2. Extracción y cuantificación de pigmentos	43
2.3.2.1. Carotenoides y clorofilas	43
2.3.2.2. Antocianinas	44
2.3.3. Técnicas de microscopía.....	44



2.3.3.1. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de hojas de <i>A. thaliana</i>	44
2.3.3.2. Análisis mediante microscopía confocal.....	45
2.3.4. Determinación de parámetros fotosintéticos	45
2.3.4.1. Análisis del fotosistema II mediante fluorimetría de amplitud de pulso modulada (PAM)	45
2.3.5. Medidas de estrés oxidativo.....	47
2.3.5.1. Determinación de los niveles de malondialdehído	47
2.3.5.2. Detección de la presencia de peróxido de hidrógeno e ion superóxido	48
2.4. Fraccionamiento celular	49
2.4.1. Aislamiento de cloroplastos y separación de fracciones estromáticas y de membranas	49
2.4.2. Fraccionamiento de membranas.....	49
2.5. Preparación de extractos crudos vegetales.....	50
2.6. Métodos de análisis de proteínas	51
2.6.1. Determinación de la concentración de proteínas	51
2.6.2. Concentración de fracciones proteicas	51
2.6.3. Separación de proteínas mediante electroforesis.....	51
2.6.3.1. En condiciones desnaturalizantes	51
2.6.3.2. En condiciones nativas	52
2.6.4. Inmunodetección de proteínas (immunoblots).....	52
2.6.4.1. Tinción de proteínas en membranas de PVDF con azul Coomassie	54
2.6.5. Rastreo de proteínas que interaccionen con FBNs mediante ensayo de doble híbrido en levadura	54
2.6.5.1. Oligonucleótidos utilizados para las clonaciones del doble híbrido.....	56
2.6.6. Rastreo de proteínas que interaccionen con FBNs mediante ensayo de coinmunoprecipitación (Co-IP)	57
2.6.7. Expresión transitoria en <i>Nicotiana benthamiana</i>	58
2.6.7.1. Complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC)	58
2.6.7.2. Estudio de localización sub-organular mediante fusión a la proteína fluorescente verde (GFP)	59
2.6.7.3. Oligonucleótidos utilizados para los experimentos de expresión transitoria... ..	59
2.6.8. Preparación de muestras proteicas y análisis mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS)	61
2.6.9. Análisis informático de secuencias proteicas	62
2.7. Métodos de análisis y manipulación de DNA	62
2.7.1. Plásmidos y vectores utilizados	62



2.7.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>Echerichia coli</i> a pequeña escala	65
2.7.3. Aislamiento de DNA total de tejidos vegetales	65
2.7.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	65
2.7.5. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	66
2.7.6. Determinación de la concentración de DNA	66
2.7.7. Restricción de DNA	66
2.7.8. Ligación de fragmentos de DNA a plásmido	66
2.7.9. Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	66
2.7.10. Sistema Gateway	67
2.7.11. Secuenciación automática de DNA.....	68
2.7.12. Análisis informático de secuencias de DNA.....	69
2.8. Métodos de análisis y manipulación de RNA	69
2.8.1. Precauciones	69
2.8.2. Aislamiento de RNA total de tejidos vegetales	69
2.8.3. Determinación de la concentración e integridad de RNA	70
2.8.4. Reacción de retrotranscripción (RT).....	70
2.8.5. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR)	70
2.8.6. Análisis transcriptómico de tejidos vegetales mediante RNA-Seq	71
2.9. Métodos de transformación genética	72
2.9.1. <i>Escherichia coli</i>	72
2.9.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	72
2.9.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
2.9.4. <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
2.9.4.1. Transformación por inmersión floral.....	74
2.9.4.2. Selección de transformantes	74
2.9.4.3. Selección de líneas transgénicas	75
3. RESULTADOS	75
3.1. Caracterización de la función de los miembros del subgrupo de fibrilinas 1-2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
3.1.1. Análisis transcriptómico mediante RNA-Seq de plantas <i>fbn1a-fbn1b</i> sometidas a estrés lumínico	81
3.1.2. Fibrilina 2 presenta una localización dual: soluble en el estroma y asociada a membranas tilacoidales	81
3.1.3. Aislamiento de un mutante carente de la proteína FBN2	85



3.1.4. El estrés lumínico reduce el crecimiento del triple mutante <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i>	87
3.1.5. La acumulación de antocianinas inducida por estrés lumínico está afectada en los diferentes mutantes del subgrupo FBN1-2	89
3.1.6. Las proteínas del subgrupo FBN1-2 protegen al PSII en condiciones de estrés conjunto por alta intensidad lumínica y baja temperatura	91
3.1.7. Mutaciones en las proteínas del grupo FBN1-2 aumentan el estrés oxidativo mediado por alta intensidad lumínica y baja temperatura.....	97
3.1.8. Los fenotipos observados en el mutante <i>fbn2</i> revierten al ser transformado con el DNA genómico de FBN2	100
3.1.9. Búsqueda de proteínas que interaccionen con FBN2 mediante ensayos de Co-IP	104
3.1.10. FBN2 interacciona <i>in vivo</i> con FBN1a, FBN1b o con otro polipéptido de FBN2 ..	108
3.1.11. FBN2 interacciona <i>in vivo</i> con la aleno óxido sintasa (AOS)	109
3.2. Análisis de la función de FBN4.....	115
3.2.1. Los mutantes KO <i>fbn4-1</i> y <i>fbn4-2</i> carecen de la proteína FBN4.....	115
3.2.2. FBN4 presenta una localización diferente a las del subgrupo 1-2.....	117
3.2.3. La eliminación de FBN4 no afecta a la tasa de crecimiento en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	120
3.2.4. La ausencia de FBN4 no afecta a la inducción de los niveles de antocianinas mediada por estrés lumínico	123
3.2.5. FBN4 no interviene en la protección del PSII frente a estrés conjunto por alta intensidad lumínica y baja temperatura	123
3.2.6. FBN4 no interacciona con las proteínas del subgrupo FBN1-2 ni con otro polipéptido de FBN4 mediante el sistema BiFC	126
3.2.7. Búsqueda de proteínas que interaccionen con FBN4 mediante ensayo de doble híbrido en levaduras	128
3.2.8. Búsqueda de proteínas que interaccionen con FBN4 mediante ensayo de Co-IP.	131
3.2.9. Análisis de la interacción entre las proteínas FBN4 y la codificada por el gen At3g53470.....	133
3.2.10. FBN4 no interviene en la protección frente a la aparición de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	136
3.2.11. La ausencia de cuatro de las proteínas más abundantes de los PGs reduce drásticamente el número de estos en condiciones de estrés conjunto por alta intensidad lumínica y baja temperatura	139
3.3. Caracterización de la proteína “Acclimation of photosynthesis to environment 1” (APE1).....	147
3.3.1. APE1 contiene dos dominios transmembrana	147
3.3.2. APE1 interacciona <i>in vivo</i> con FBN2	149
3.3.3. Patrón de localización de APE1	151
3.3.4. Aislamiento de plantas mutantes homocigotas para el gen APE1	151



Índice

4. DISCUSIÓN	155
4.1. Subgrupo 1-2 de FBNs	157
4.2. FBN4	162
4.3. APE1	164
5. CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA	175



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Ultraestructura de la membrana tilacoidal.....	5
Figura 1.2: Localización de los mecanismos de fotoprotección actuando en exceso de luz (flechas rojas) o de electrones (flechas azules)	12
Figura 1.3: Micrografías electrónicas de cloroplastos en hojas de roseta de <i>Arabidopsis</i>	13
Figura 1.4: Micrografías electrónicas de cloroplastos en hojas de <i>Solanum tuberosum</i> (A y C) y en hojas de roseta de <i>Arabidopsis</i> (B y D)	15
Figura 1.5: Estudio de coexpresión y de función del “core” proteico plastoglobular.....	17
Figura 1.6: Los PGs cloroplásticos son sitios para el metabolismo y almacenamiento de prenilquinonas.....	22
Figura 1.7: Los PGs de gerontoplastos participan en el desmontaje de los tilacoides, en la hidrólisis de galactolípidos y en el catabolismo de la clorofila durante la senescencia	24
Figura 1.8: Árbol filogenético de FBNs de distintos organismos.....	26
Figura 1.9: Localización sub-cloroplástica de FBN1a.....	27
Figura 3.1: Localización sub-cloroplástica de la proteína FBN2 mediante expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	82
Figura 3.2: Titulación del anticuerpo Anti-FBN2	83
Figura 3.3: Estudio de la localización sub-cloroplástica de la proteína FBN2 mediante inmunoblot	84
Figura 3.4: Estudio mediante inmunoblot del perfil de distribución de FBN2 en MTs fraccionadas en gradiente discontinuo de sacarosa	85
Figura 3.5: Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> y resultados de los análisis mediante PCR de la inserción de T-DNA en el genoma de dichas líneas.....	86
Figura 3.6: Identificación de la proteína FBN2 en plantas WT y el mutante KO <i>fbn2</i>	87
Figura 3.7: Curvas de crecimiento de los mutantes KO <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> frente al WT	88
Figura 3.8: Foto de plantas WT y mutantes KO <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> sometidas a un estrés por ALF	89
Figura 3.9: Niveles de antocianinas en plantas WT y en los diferentes mutantes del subgrupo FBN1-2 sometidas a un estrés conjunto por ALF	90
Figura 3.10: Estudio de la acumulación de antocianinas tras la adición de ácido jasmónico en plantas WT y mutante <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> sometidas a estrés por ALF	91
Figura 3.11: Valores (en falso color) de F_v/F_m de plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> sometidas a estrés por ALF durante 0, 1 y 7 días	92
Figura 3.12: Niveles de F_v/F_m de plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> sometidas a estrés por ALF durante 0, 1 y 7 días.....	93
Figura 3.13: Niveles de F_v/F_m de plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> sometidas a estrés por AL durante 0, 1 y 7 días	94
Figura 3.14: $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y 1-qL a intensidades crecientes de luz actínica de plantas WT y mutantes <i>f bn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> en CN de crecimiento	95



Índice

Figura 3.15: $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y 1-qL a intensidades crecientes de luz actínica de plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> sometidas a estrés por ALF durante 1 día.....	96
Figura 3.16: $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y 1-qL a intensidades crecientes de luz actínica de plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i> sometidas a estrés por ALF durante 7 días	97
Figura 3.17: Determinación de la presencia de peróxido de hidrógeno mediante tinción con DAB en plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i>	98
Figura 3.18: Determinación de la presencia de ión superóxido mediante tinción con NBT en plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i>	99
Figura 3.19: Determinación de los niveles de MDA en plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2</i>	100
Figura 3.20: Resultado de los análisis mediante PCR de la inserción del gen FBN2 en el genoma de plantas mutantes <i>fbn2</i>	101
Figura 3.21: Estudio de la expresión del gen FBN2 en plantas WT, mutante <i>fbn2</i> y transgénicas <i>fbn2::FBN2</i> T4.5 y T5.6.....	102
Figura 3.22: Niveles de F_v/F_m obtenidos para plantas WT y transgénicas T4.5 y T5.6 sometidas a un estrés por ALF	103
Figura 3.23: Niveles de antocianinas en plantas WT y transgénicas T4.5 y T5.6 sometidas a un estrés conjunto por ALF	104
Figura 3.24: Estudio de la solubilización de FBN2 por el detergente Tritón X-100.....	105
Figura 3.25: Estudio de la especificidad de Anti-FBN2.....	106
Figura 3.26: Estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre FBN1a y FBN2 mediante ensayo de BiFC 108	
Figura 3.27: Estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre polipéptidos de FBN2 mediante ensayo de BiFC	109
Figura 3.28: Estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre FBN2 y AOS (A) y entre FBN1a y AOS (B) mediante ensayo de BiFC.....	110
Figura 3.29: Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes <i>fbn4-1</i> y <i>fbn4-2</i> y resultados de los análisis mediante PCR de la inserción de T-DNA en el genoma de dichas líneas.....	115
Figura 3.30: Titulación del anticuerpo Anti-FBN4	116
Figura 3.31: Identificación de la proteína FBN4 en plantas WT y mutantes KO <i>fbn4-1</i> y <i>fbn4-2</i>	117
Figura 3.32: Estudio de la localización sub-cloroplástica de la proteína FBN4 mediante inmunoblot	118
Figura 3.33: Localización sub-cloroplástica de la proteína FBN4 mediante expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	119
Figura 3.34: Estudio mediante inmunoblot del perfil de distribución de FBN4 en MTs fraccionadas en gradiente discontinuo de sacarosa	120
Figura 3.35: Curvas de crecimiento de los mutantes KO <i>fbn4-1</i> y <i>fbn4-2</i> frente al WT en CN 121	
Figura 3.36: Curvas de crecimiento de los mutantes KO <i>fbn4-1</i> y <i>fbn4-2</i> frente al WT en AL . 122	
Figura 3.37: Niveles de antocianinas en plantas WT y mutante <i>fbn4-1</i>	123
Figura 3.38: Valores (en falso color) de F_v/F_m (A) y niveles de F_v/F_m (B) de plantas WT y mutante <i>fbn4-1</i> sometidas a estrés por ALF durante 0, 1 y 7 días	124

x

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

Figura 3.39: Φ (II), Φ (NPQ), Φ (NO) y 1-qL a intensidades crecientes de luz actínica en plantas WT mutante <i>fbn4-1</i> sometidas a estrés por ALF durante 0,1 y 7 días	126
Figura 3.40: Estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre FBN4 y FBN1a (A) y entre FBN4 y FBN2 (B) mediante ensayo de BiFC.....	127
Figura 3.41: Estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre polipéptidos de FBN4 mediante ensayo de BiFC	127
Figura 3.42: Estudio de la expresión de FBN4 en levadura	129
Figura 3.43: Estudio de la solubilización de FBN4 por el detergente Tritón X-100	132
Figura 3.44: Estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre FBN4 y At3g53470 mediante ensayo de BiFC	134
Figura 3.45: Localización sub-cloroplástica de la proteína codificada por el gen At3g53470 mediante expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	134
Figura 3.46: Estudio mediante inmunoblot del perfil de distribución de At3g53470 en MTs fraccionadas en gradiente discontinuo de sacarosa	135
Figura 3.47: Determinación de la presencia de peróxido de hidrógeno mediante tinción con DAB en plantas WT y mutante <i>fbn4-1</i>	137
Figura 3.48: Determinación de la presencia de ión superóxido mediante tinción con NBT en plantas WT y mutante <i>fbn4-1</i>	138
Figura 3.49: Determinación de los niveles de MDA en plantas WT y mutante <i>fbn4-1</i>	139
Figura 3.50: Resultados de los análisis mediante PCR de la inserción de T-DNA en el genoma de las líneas mutantes <i>fbn2-fbn4</i> (A) y <i>fbn1a-fbn1b-fbn2-fbn4</i> (B)	140
Figura 3.51: Análisis de cortes ultrafinos de cloroplastos en plantas WT y mutante <i>fbn1a-fbn1b-fbn2-fbn4</i>	141
Figura 3.52: Análisis de cortes ultrafinos de cloroplastos en plantas WT y mutantes <i>fbn1a-fbn1b</i> , <i>fbn2</i> , <i>fbn4</i> y <i>fbn2-fbn4</i>	142
Figura 3.53: Análisis del número de PGs de cloroplastos en plantas WT y plantas de las distintas combinaciones de mutantes KO de FBN1-4	143
Figura 3.54: Predicción de la presencia de dominios transmembrana en APE1 de <i>Glycine max</i> (A) y <i>Arabidopsis thaliana</i> (B)	148
Figura 3.55: Alineamiento de ortólogos de APE1 de diferentes organismos fotosintéticos.....	149
Figura 3.56: Estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre FBN2 y APE1 mediante ensayo de BiFC ..	150
Figura 3.57: Estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre FBN1b y APE1 mediante ensayo de BiFC.	150
Figura 3.58: Localización sub-cloroplástica de la proteína APE1 mediante expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	151
Figura 3.59: Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes <i>ape1-1</i> y <i>ape1-2</i> y resultados de los análisis mediante PCR de la inserción de T-DNA en el genoma de dichas líneas.....	152



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Mutantes empleados en este trabajo	37
Tabla 2.2: Oligonucleótidos empleados para la selección de las plantas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
Tabla 2.3: Ecuaciones empleadas para el cálculo de las concentraciones de clorofilas y carotenoides (Porra <i>et al.</i> , 1989; Lichtenthaler & Buschmann, 2001) a partir de las absorbancias indicadas, el peso de cada planta y el volumen de metanol empleado	44
Tabla 2.4: Anticuerpos primarios empleados en esta Tesis Doctoral	53
Tabla 2.5: Medios SD para testar fenotipos durante el ensayo de doble híbrido.....	56
Tabla 2.6: Oligonucleótidos empleados en los ensayos de doble híbrido	57
Tabla 2.7: Oligonucleótidos utilizados para clonar los genes en los vectores usados en expresión transitoria.....	61
Tabla 2.8: Plásmidos y vectores empleados en esta tesis doctoral	65
Tabla 2.9: Oligonucleótidos empleados para comprobar por secuenciación automática que los fragmentos de DNA que iban a ser utilizados para las distintas construcciones de esta tesis estaban correctos	68
Tabla 2.10: Oligonucleótidos empleados para el estudio de la expresión de distintos genes mediante QRT-PCR	71
Tabla 2.11: Oligonucleótidos utilizados para la selección de plantas transgénicas	75
Tabla 3.1: Proteínas que coimmunoprecipitan con la población asociada a membranas de FBN2	107
Tabla 3.2: Proteínas que interaccionan con FBN4 mediante ensayo de doble híbrido	130
Tabla 3.3: Proteínas que coimmunoprecipitan con FBN4.....	132



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ABREVIATURAS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ABREVIATURAS

ABC1K	Kinasa atípica ABC1
Abs	Absorbancia
ACT2	Actina 2
Ade	Adenina
AL	Alta intensidad lumínica ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
ALF	Alta intensidad lumínica y baja temperatura ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 10°C)
AOC	Aleno óxido ciclasa
AOS	Aleno óxido sintasa
APE1	“Acclimation of photosynthesis to environment 1”
APS	Persulfato amónico
APX	Ascorbato peroxidasa
BHT	Hidroxitolueno butilado
BiFC	Complementación bimolecular de la fluorescencia
BLAST	“Basic local alignment search tool”
BSA	Seroalbúmina bovina fracción V
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
CAT	Catalasa
CFP	“Cyan fluorescent protein”
CN	Condiciones normales ($120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y $20/22^{\circ}\text{C}$)
CCD4	“Carotenoid cleavage dioxygenase 4”
CEF	Flujo cíclico de electrones
Chl	Clorofila
Co-IP	Coinmunoprecipitación
Ct	Ciclo umbral (“Threshold cycle”)
CTE	Cadena de transporte electrónico
CTP	Péptido de tránsito al cloroplasto
CURT1	“Curvature thylakoid 1”
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DC	Día corto (8h de luz/16h de oscuridad)
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DHAP	Fosfato dihidroxiacetona
DNAc	DNA complementario
dNTP	Desoxirribonucleósido trifosfato
DGDG	Digalactosidil diacilglicerol
DL	Día largo (16h de luz/8h de oscuridad)
DO 10X	“10X Dropout solution”



Abreviaturas

DO ₅₉₀	Densidad óptica a 590 nm
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
DTT	Dicloro difenil tricloroetano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELT4	Esterasa/lipasa/tioesterasa 4
FBA	Fructosa bifosfato aldolasa
FBN	Fibrilina
FBP	Fructosa 1,6-bifosfato
Fd	Ferredoxina
FG	Fosfatidil glicerol
F'	Fluorescencia al aplicar luz actínica de intensidad variable
F	Fluorescencia de emisión en hojas adaptadas a oscuridad
F ₀	Fluorescencia basal en hojas adaptadas a oscuridad
F _m '	Fluorescencia máxima de los pulsos saturantes tras el pulso saturante inicial
F _m	Fluorescencia máxima (emitida al aplicar un pulso de luz saturante a hojas adaptadas a oscuridad)
FNR	Ferredoxina:NADP ⁺ óxidoreductasa
F _v	Fluorescencia variable
F _v /F _m	Rendimiento cuántico máximo del PSII
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GFP	"Green fluorescent protein"
GPX	Glutación peroxidasa
gpf	Gramos de peso fresco
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo
HBP3	Proteína de unión a hemoglobina 3
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
His	Histidina
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
Leu	Leucina
LHC	Complejo colector de luz
LHCII	Complejo colector de luz del PSII
LOX	Lipoxigenasa
MDA	Malondialdehído
MEGA	"Molecular evolutionary genetics analysis"
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MGDG	Monogalactosidil diacilglicerol
MS	Espectrometría de masas

xviii

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

MT	Membrana tilacoidal
MM	Masa molecular
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NASC	"Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Center"
NBT	"Nitroblue tetrazolium"
NCBI	"National Center for Biotechnology Information"
NDC1	NAD(P)H deshidrogenasa C1
NDH	NADH deshidrogenasa
NPQ	Apantallamiento no fotoquímico
OEC	Complejo productor de oxígeno
OPDA	Ácido 12-oxi-fitodienoico
p/v	Relación masa/volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAM	Fluorimetría de amplitud de pulso modulada
PAP	Proteína asociada a los plastos
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
Pc	Plastocianina
PC-8	Plastocromanol-8
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PES	Poliétersulfona
PES (1 y 2)	"Phytol ester synthase (1 y 2)"
PGL	Plastoglobulina
PGM48	Metalopeptidasa M48
PGR5	Regulación del gradiente de protones 5
PGRL1	"PGR5-like photosynthetic phenotype 1"
PIPES	Piperazina-N,N'-bis(ácido-2-hidroxiopropanosulfónico)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PQ	Plastoquinona
PQ-9	Plastoquinona-9
PQ-9-H ₂	Plastoquinol
PS (I y II)	Fotosistema (I y II)
PsbA	Proteína D1 del fotosistema II
PTOX	Oxidasa terminal del plastidio
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
QRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
Redox	Reducción-oxidación
RNAi	RNA interferente
RNAm	RNA mensajero



Abreviaturas

RNasas	Ribonucleasas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Reacción de retrotranscripción
SB	“Sample buffer”
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
SQDG	Sulfoquinovosil diacilglicerol
TAG	Triacilglicerol
TAIR	“The <i>Arabidopsis</i> Information Resource”
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
TOF	Tiempo de vuelo
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
Trp	Triptófano
v/v	Relación volumen/volumen
VDE	Violaxantina deepoxidasa
Vitamina C	Ascorbato
Vitamina E	α -tocoferol
Vitamina K1	Filoquinona
VTE1	“Vitamin E deficient 1”
WT	Ecotipo silvestre
X- α -Gal	“5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside”
YFP	“Yellow fluorescent protein”
YPDA	“Yeast extract-peptones-dextrose-adenine”
Φ (II)	Rendimiento cuántico efectivo del PSII
Φ (NO)	Rendimiento cuántico de la disipación de energía no regulada
Φ (NPQ)	Rendimiento cuántico de la disipación de energía regulada
1-qL	Porcentaje de aceptores primarios reducidos del PSII

xx

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

RECETARIO

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

RECETARIO

ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS

- **Solución de esterilización:** 14% (masa/volumen) (p/v) de hipoclorito sódico y 10% (p/v) de dodecilsulfato sódico (SDS).

MEDIOS DE CULTIVO

- **MS 1X:** (Murashige & Skoog, 1962) solidificado con fitogel (Duchefa Biochemie) al 0,7% (p/v) y tamponado a pH 5,8 con MES 0,5 g/l. [MES, Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico].
- **LB:** bactotripton 10 g/l, NaCl 10 g/l y extracto de levadura 5 g/l.
- **YPDA:** difco peptonas 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, glucosa 2% (p/v) y hemisulfato de adenina 0,003% (p/v).
- **SD:** 100 ml/l de "10X Dropout Solution" (10X DO*), bases nitrogenadas de levaduras sin aminoácidos ni sulfato de amonio 1,7 g/l, sulfato de amonio 5 g/l y glucosa 2% (p/v).
- **10X DO:** L-arginina 200 mg/l, L-isoleucina 300 mg/l, L-lisina HCl 300 mg/l, L-metionina 200 mg/l, L-fenilalanina 500 mg/l, L-treonina 2000 mg/l, L-tirosina 300 mg/l, L-valina 1500 mg/l y uracilo 200 mg/l.

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

- **Solución de extracción:** 1% (volumen/volumen) (v/v) de ácido clorhídrico en metanol puro.

FRACCIONAMIENTO CELULAR

- **Tampón de trituración:** sorbitol 400 mM, tricina-KOH 20 mM, EDTA 10 mM, NaHCO₃ 10 mM y seroalbúmina bovina fracción V (BSA) 0,15% (p/v).
- **Tampón de lisis:** Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 25 mM pH 7,5, KCl 40 mM, Mg₂Cl 7 mM, inhibidores de proteasas de SERVA (10 µl/ml) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM.
- **Tampón de fraccionamiento:** sacarosa 45% (p/v) preparada en tricina-KOH 5 mM pH 7,5, EDTA 0,2 mM y dicloro difenil tricloroetano (DTT) 0,2 mM.



MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

- **Solución de fijación I:** glutaraldehido 4% (v/v) preparado en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4.
- **Solución de fijación II:** tetróxido de osmio 1% (p/v) preparado en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4.

EXTRACTOS CRUDOS

- **Tampón de rotura:** HEPES 50 mM pH 7,5, inhibidores de proteasas de SERVA (10 µl/ml) y PMSF 1 mM.

ESTRÉS OXIDATIVO

- **Tampón de extracción:** tampón fosfato sódico 10 mM pH 7,4, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM, Tritón X-100 0,2% (v/v), 3 µl de hidroxitolueno butilado (BHT) 100X por cada 200 µl de Tampón de extracción e inhibidores de proteasas de SERVA (10 µl/ml tampón).
- **Solución DAB:** 0,05% (p/v) de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en tampón Tris-Acetato 10 mM pH 4. [Tris: Tris-(hidroximetil)aminoetano].
- **Solución NBT:** 0,5% (p/v) de cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

- **2X SDS-SB:** Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4% (p/v), 2-mercaptoetanol 2% (v/v), glicerol 20% (v/v) y azul de bromofenol 0,005% (p/v).
- **2X SB:** Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 40% (v/v) y azul de bromofenol 0,005% (p/v).
- **Tampón de corrida A:** Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 0,19 M y SDS 0,1% (p/v).
- **Tampón de corrida B:** Tris-HCl 25 mM pH 8,3 y glicina 0,19 M.

MÉTODO DE LOWRY

- **Solución A:** Na₂CO₃ 2% (p/v), NaOH 0,4% (p/v), tartrato sódico-potásico 0,16 % (p/v) y SDS 1% (p/v).
- **Solución B:** SO₄Cu·5H₂O 4% (p/v).



TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

- **Disolución de CaCl₂**: CaCl₂ 60 mM, glicerol 15% (v/v), PIPES 10 mM pH 7. [PIPES, piperazina-N,N'-bis(ácido-2-hidroxiopropanosulfónico)].
- **Medio de infiltración**: sacarosa 5% (p/v) y Silwet L-77 (Lehle Seeds, EEUU) 0,005% (v/v).

ANÁLISIS DE WESTERN BLOT

- **Solución de bloqueo**: TBS 1X, Tween-20 0,1% (v/v) y leche en polvo desnatada (Applichem) 5% (p/v).
- **Solución de lavado**: TBS 1X y Tween-20 0,05% (v/v).

TINCIÓN DE PROTEÍNAS

- **Coomassie Blue**: coomassie Brilliant Blue 0,25% (p/v), metanol 45% (v/v), ácido acético 10% (v/v).
- **Solución desteñidora**: metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).

ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO

- **Cracking buffer**: urea 8 M, SDS 5% (p/v), Tris-HCl 40 mM pH 6,8, EDTA 0,1 mM, azul de bromofenol 0,4 mg/ml, inhibidores de proteasas de SERVA (10 µl/ml) y PMSF 1 mM.

EXPRESIÓN TRANSITORIA

- **Tampón de inducción**: MES 52,6 mM pH 5,6, glucosa 29,2 mM, NaH₂PO₄ 1,89 mM, 2,5 ml de AB salt (NH₄Cl 373,9 mM, MgSO₄·7H₂O 24,34 mM, KCl 40,2 mM, CaCl₂ 1,36 mM, FeSO₄·7H₂O 0,18 mM) y acetosiringona 0,2 mM.

ELECTROFORESIS DE DNA

- **TBE 0,5X**: Tris 5,39 g/l, ácido bórico 2,75 g/l y EDTA 0,37 g/l.
- **Tampón de carga 10X**: glicerol 50% (v/v), xilenocianol 0,1% (p/v), EDTA 0,1 M y azul de bromofenol 0,1% (p/v).



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto de Tesis Doctoral es analizar el papel de las fibrilinas en la defensa de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* frente a los estreses abióticos por alta intensidad lumínica, por baja temperatura o por una combinación de ambos.

Para tal fin se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la función de los miembros del subgrupo formado por las fibrilinas 1a, 1b y 2.
- Analizar la función de la proteína fibrilina 4 en función de lo descubierto para el subgrupo 1a, 1b y 2.
- Caracterizar la proteína APE1, una proteína que interacciona con los miembros del subgrupo 1a, 1b y 2.

Algunos de los resultados que se presentan en esta Tesis Doctoral ya han sido publicados:

- **Torres-Romero, D;** Gómez-Zambrano, Á; Serrato, AJ; Sahrawy, M; Mérida, Á. (2021). *Arabidopsis fibrillin 1-2 subfamily exerts their functions via specific protein-protein interactions. Journal of Experimental Botany*



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

1. INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales de los cloroplastos

Los cloroplastos pertenecen a la familia de orgánulos plastídicos, la cual incluye orgánulos especializados tales como: amiloplastos (almacenamiento de almidón), cromoplastos (almacenamiento de pigmentos), leucoplastos (almacenamiento), oleoplastos (almacenamiento de lípidos), gerontoplastos (plástidos de senescencia) y etioplastos (plástidos en desarrollo) (Rolland *et al.*, 2018). Solo los cloroplastos son fotosintéticamente competentes. La estructura de los cloroplastos maduros se define por tres sistemas de membranas: las membranas de las envolturas externa e interna y la membrana tilacoidal (MT) (Staehelein, 1986). La organización de estas membranas provoca la existencia de tres compartimentos acuosos separados: el espacio intermembrana entre las dos membranas de la envoltura, el estroma cloroplastídico entre la membrana de la envoltura interna y la MT y el lumen dentro de la MT (Staehelein, 1986).

El estroma de los cloroplastos alberga todas las reacciones metabólicas independientes de la luz. Entre ellas, destaca la asimilación de CO₂ mediante el ciclo de Calvin-Benson-Bassham en términos de mayor rendimiento metabólico. En contraste, la MT es el lugar en el que se llevan a cabo las reacciones dependientes de luz, funcionando como una célula solar biológica que convierte la luz solar en un transporte de electrones y gradiente de protones a través de ella (Kirchhoff, 2019).

1.2. La membrana tilacoidal

La fotosíntesis oxigénica apareció hace más de 2400 millones de años. Llevada a cabo por las cianobacterias, fueron los primeros organismos capaces de utilizar la energía solar para extraer electrones del agua y transferirlos a una cadena de transporte electrónico (CTE) localizada en una membrana (Hohmann-Marriott y Blankenship, 2011). Salvo en algunas cianobacterias, en la mayoría de los organismos fotosintéticos oxigénicos la CTE se localiza en membranas especializadas conocidas como tilacoides. Los tilacoides forman un sistema de membranas intracelulares que alberga la mayor parte de los componentes involucrados en la recolección y utilización de la energía lumínica. El transporte de electrones fotosintético genera transportadores de energía química (ATP) y poder reductor (ferredoxina y NAD(P)H) utilizados para la fijación de CO₂ y el resto del catabolismo celular (Rast *et al.*, 2015).

Los componentes principales de los tilacoides incluyen a la plastoquinona (PQ) y la plastocianina (Pc), transportadores móviles que transportan electrones entre los grandes complejos pigmentos-proteínas: los fotosistemas I (PSI) y II (PSII), a través del complejo del



Introducción

citocromo b_6f (Rast *et al.*, 2015). Finalmente, un complejo ATPasa utiliza la energía almacenada en el gradiente de protones establecido a través de la MT por la CTE para sintetizar ATP. Esta maquinaria molecular está altamente conservada desde cianobacterias hasta plantas (Allen *et al.*, 2011), aunque los sistemas de captación de luz son más diversos, variando desde los ficobilisomas solubles en cianobacterias y algas rojas a los complejos colectores de luz integrados en la membrana de plantas (Mullineaux, 2005).

A pesar de que la ultraestructura de algunos de los componentes de la CTE se ha determinado con enorme resolución en años recientes (Nelson y Yocum, 2006; Eberhard *et al.*, 2008), los procesos que guían la construcción de varios de los complejos durante la biogénesis de la MT están ahora empezando a descubrirse. Docenas de subunidades proteicas y cientos de cofactores orgánicos como clorofilas, carotenoides, citocromos y quinonas, además de metales y otros iones, tienen que reunirse y ensamblarse correctamente. Estos componentes tan diversos tienen que ser sintetizados y llevados juntos a un ambiente lipídico para ser ensamblados en un orden estricto y secuencial tanto en el espacio como en el tiempo (Rast *et al.*, 2015).

La MT en plantas se encuentra en el interior del cloroplasto, rodeada por el estroma cloroplastídico. En cloroplastos sin desarrollar o proplastidios, la MT puede formar una estructura continua con la envoltura interna del cloroplasto; en cloroplastos maduros, ambas estructuras se encuentran separadas (Vothknecht y Westhoff, 2001). En plantas superiores, la MT tiene una estructura tridimensional compleja que por lo general consiste en una especie de discos apilados llamados granas que están interconectadas por las lamelas. Esta dualidad provoca la aparición de distintas regiones: las membranas estromáticas no apiladas, las membranas apiladas de las granas y los márgenes de las granas, cada una con una composición proteica diferente (Andersson y Andersson, 1980) (Figura 1.1).



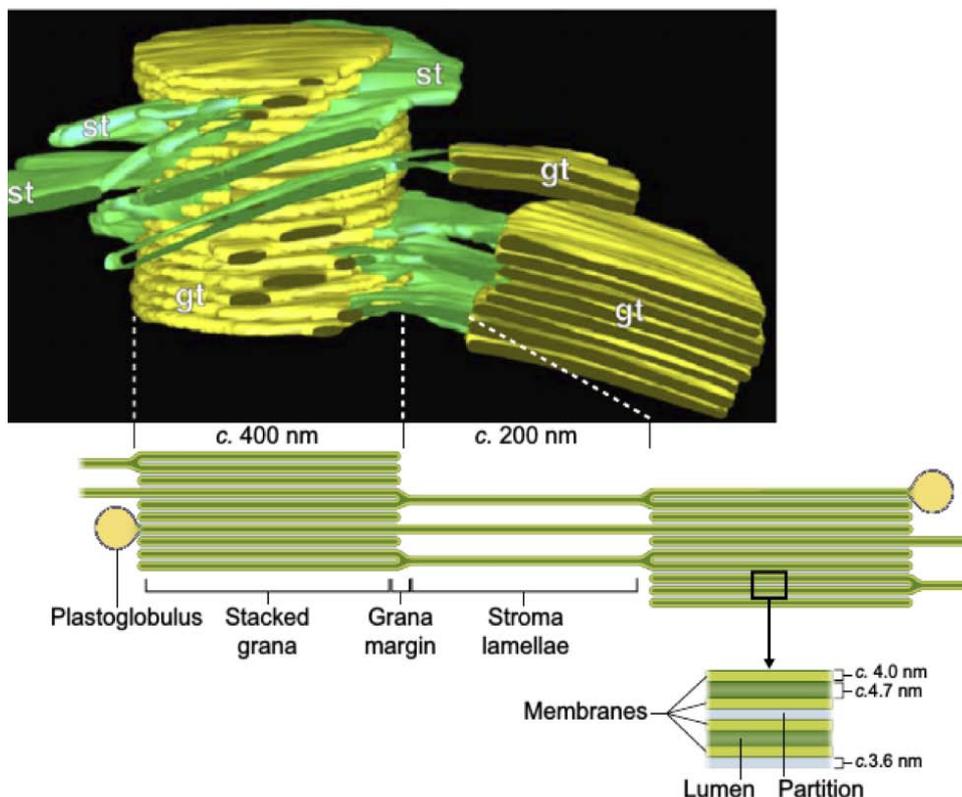


Figura 1.1: Ultraestructura de la membrana tilacoidal. Reconstrucción en 3D de la arquitectura tilacoidal derivada de tomografía electrónica. gt = grana; st = lamela. Imagen adaptada de Kirchoff *et al.*, 2019.

La estructura tridimensional de las granas se basa en un modelo helicoidal, donde las granas tienen una forma aproximadamente cilíndrica compuestas de un número variable de sacos apilados con forma de discos aplanados y diámetros en el rango de los 400-600 nm. Las granas están conectadas por una serie de lamelas paralelas en espiral alrededor de ellas con una disposición de hélice dextrógiara (Mustárdy y Jánssy, 1979; Mustárdy y Garab, 2003).

Existen algunas irregularidades que solo han podido ser observadas gracias a la reconstrucción tridimensional usando datos de tomografía electrónica. Uno de estos detalles es la intersección grana-lamela, la cual parece una hendidura cuya longitud varía considerablemente, sugiriendo un posible mecanismo para regular el movimiento de protones y proteínas de membrana entre los distintos dominios de la MT (Austin y Staehelin, 2011). En las granas, el espacio entre tilacoides adyacentes (el espacio intertilacoidal), es más estrecho que el lumen (espacio intratilacoidal), siendo el ancho de ambos de 3,2 y 4,5 nm respectivamente (Daum y Kühlbrandt, 2011). En un espacio tan aglomerado, el movimiento de proteínas sería altamente restringido sin la existencia de un desapilamiento de las granas (Garab, 2014).



1.2.1. Composición

Al igual que otras membranas biológicas, los tilacoides contienen glicerolípidos organizados en bicapas impermeables a iones que permiten la generación de una fuerza protón-motriz (Williams, 1998). Sin embargo, la composición lipídica de la MT es bastante diferente a la de otras membranas celulares. En la mayoría de plantas, algas y cianobacterias, la MT está compuesta principalmente por cuatro clases de lípidos: dos galactolípidos neutrales, el monogalactosidil diacilglicerol (MGDG) y el digalactosidil diacilglicerol (DGDG); dos lípidos aniónicos, el sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) y el fosfolípido fosfatidil glicerol (FG) (Douce y Joyard, 1996; Kobayashi y Wada, 2016). El MGDG y el DGDG son los constituyentes principales, en torno al 50% y al 25% respectivamente (Dorne *et al.*, 1990), y son encontrados casi exclusivamente en la MT y en la envoltura interna del cloroplasto en condiciones ordinarias de crecimiento. El DGDG puede reemplazar a los fosfolípidos en otras membranas celulares de planta en condiciones de privación de fosfato (Kobayashi y Wada, 2016). Los lípidos de la MT también son inusuales en el hecho de que poseen grupos acilo altamente insaturados.

Los diferentes lípidos se distribuyen asimétricamente en las capas de la membrana expuestas al estroma y al lumen (Douce y Joyard, 1996). En torno a un 40% de los lípidos tilacoidales están unidos a proteínas (Páli *et al.*, 2003). Es por ello que son tratados como componentes estructurales de la mayor parte de los complejos proteicos fotosintéticos: PSI (Qin *et al.*, 2015), PSII (Umena *et al.*, 2011) y complejo colector de luz II (LHCII) (Liu *et al.*, 2004). Además, están involucrados en distintas reacciones de la fotosíntesis (Mizusawa y Wada, 2011).

La MT presenta una densa acumulación de proteínas. Las proteínas integrales y los complejos pigmentos-proteínas ocupan en torno al 70-80% del área total de las granas (Haferkamp *et al.*, 2010). La mayor parte de estas proteínas están codificadas en el núcleo, ya que el genoma del cloroplasto es relativamente pequeño. Una vez expresadas, son transportadas al cloroplasto gracias a un pequeño péptido de tránsito al cloroplasto (CTP) en el extremo amino terminal, el cual está presente en 4255 proteínas del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Emanuelsson *et al.*, 2000). Análisis proteómicos a gran escala de MTs de plantas han identificado unas 400 proteínas en total pertenecientes a estas estructuras. Aproximadamente la mitad son proteínas transmembrana, la mayoría de las cuales forman los complejos de la fotofosforilación, tanto lineal como cíclica, y de la respiración vegetal: PSI, PSII, LHCII, complejo del citocromo b_6/f , ATP sintasa, complejo NADH deshidrogenasa (NDH), complejo PGR5-PGRL1 (PGR5, regulación del gradiente de protones 5; PGRL1: fenotipo fotosintético de tipo PGR5 1, “PGR5-like photosynthetic phenotype 1”) y la oxidasa terminal del plastidio (PTOX). Los siguientes grupos mayoritarios de proteínas son los compuestos por proteínas “de mantenimiento” y por proteínas



de protección frente al estrés oxidativo. En el primero encontramos chaperonas, proteínas translocadoras, proteasas e isomerasas que actúan en la focalización, maduración, plegamiento y ensamblaje, reparación y degradación de proteínas. El segundo grupo está compuesto por la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), tiorredoxinas y fibrilinas (FBNs) (Peltier *et al.*, 2002; Friso *et al.*, 2004; van Wijk, 2004). De todas estas proteínas, al menos 40-80 proteínas son específicas del lumen. De estas, las más conocidas son las proteínas del complejo productor de oxígeno (OEC), la Pc y la violaxantina deepoxidasa (VDE), pero también hay otras como el citocromo c_{6A} , la lipocalina CHL (precursor de la lipocalina cloroplástica) y las proteasas DEG1, DEG5 y DEG8, involucradas en el ensamblaje y degradación del PSII (Kieselbach y Schröder, 2003; Järvi *et al.*, 2013; Järvi *et al.*, 2015). Una de las familias de proteínas que cabría resaltar es curvatura del tilacoide 1 (“curvature thylakoid 1”, CURT1). Esta familia, conservada en plantas y cianobacterias, está formada por cuatro proteínas en *Arabidopsis thaliana* (CURT1A, B, C y D), son capaces de oligomerizar y se encuentran principalmente en los márgenes de las granas (Armbruster *et al.*, 2013). Esta familia media la forma de las granas de manera dependiente de los niveles de proteínas de la misma y facilita la curvatura de la membrana en los márgenes de las granas. La inhibición de la alteración mediada por CURT1 de la ultraestructura tilacoidal en *Arabidopsis thaliana* reduce la eficiencia fotosintética y la adaptación de la planta a condiciones de luz adversas, tanto controladas como naturales. La falta de CURT1 provoca un menor nivel de ajuste del diámetro de las granas, lo que conlleva a un mal funcionamiento de los mecanismos de regulación como el ciclo de reparación del PSII. La sobreexpresión de CURT1A en plantas induce la curvatura de la membrana tilacoidal y la hiperflexión tilacoidal (Pribil *et al.*, 2018).

Posiblemente lo más característico de la MT sea su heterogeneidad lateral u orden de las proteínas de membrana en diferentes dominios: PSII y LHCII se encuentran principalmente en las regiones apiladas de las granas; PSI y ATP sintasa se localizan exclusivamente en las lamelas y los márgenes de las granas; el complejo del citocromo b_6f está equitativamente distribuido por toda la MT. La separación lateral del PSII y del LHCII, mostrando un nivel bajo de protuberancia al estroma, y del PSI y de la ATP sintasa, con sus extensas estructuras expuestas al estroma, optimiza la densidad de empaquetamiento de la membrana (Andersson y Andersson, 1980).

Como se ha dicho previamente, los tilacoides contienen la mayor parte de los componentes responsables de la recolección y utilización de la energía lumínica. Esto puede ocasionar daños de los que tienen que ser capaces de protegerse.



1.3. Mecanismos de fotoprotección

La luz es esencial para la fotosíntesis. Sin embargo, en exceso puede ser peligrosa para el aparato fotosintético debido a que puede causar daño fotooxidativo y disminuir la eficiencia de la fotosíntesis debido a la fotoinhibición (Pinnola y Bassi, 2018). Los mecanismos generales del daño producido por la luz son principalmente dos:

- La clorofila singlete en estado excitado ($^1\text{Chl}^*$), especialmente en el PSII, experimenta un cruce intersistema (proceso no radiativo que implica la transición entre dos estados electrónicos) a clorofila triplete en estado excitado ($^3\text{Chl}^*$). La clorofila triplete reacciona con oxígeno molecular (O_2) produciendo oxígeno singlete en estado excitado ($^1\text{O}_2^*$) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan los componentes tilacoidales (Prasil *et al.*, 1992; Tjus *et al.*, 1998; Tjus *et al.*, 2001).
- El transporte de electrones reduce el O_2 a ion superóxido (O_2^-) siempre que los aceptores finales de electrones sean limitantes. SOD, más una peroxidasa o una flavoproteína (hierroflavoproteína) catalizan su detoxificación a agua. Sin embargo, la eliminación de ROS falla en condiciones de estrés tales como la baja temperatura o la alta intensidad lumínica, causando así daño fotooxidativo (Murata *et al.*, 2007; Gerotto *et al.*, 2016).

Los tres sitios principales donde se generan moléculas oxidantes en el aparato fotosintético son el PSI, el PSII y el LHCII (Pinnola y Bassi, 2018).

1.3.1. Mecanismos de fotoprotección constitutiva

Existen diversos mecanismos de fotoprotección que las plantas poseen de forma constitutiva.

1.3.1.1. Fotoprotección por carotenoides

Los carotenoides están presentes en los tilacoides en dos formas distintas: una fracción libre que supone en torno al 15% de la población total de carotenoides y que lleva a cabo su función antioxidante al eliminar ROS producidos en los centros de reacción y LHCs; otra fracción de carotenoides unidos a la maquinaria fotosintética donde pueden estar en contacto estrecho con las moléculas de clorofilas (Pinnola y Bassi, 2018). Existen tres mecanismos de fotoprotección donde intervienen los carotenoides: modulación de $^3\text{Chl}^*$, eliminación de ROS y modulación de $^1\text{Chl}^*$ (Edge *et al.*, 1997; Pinnola y Bassi, 2018).



1.3.1.2. Flujo cíclico de electrones

El flujo cíclico de electrones (CEF) se produce alrededor del PSI y previene la fotoinhibición del PSII. El CEF incrementa la transferencia de electrones desde el PSI a la PQ sin la producción de O₂ ni la acumulación de NADPH, lo que resulta en la generación de un gradiente de protones a través de la MT que conlleva a la síntesis de ATP y la disipación de calor (Heber y Walker, 1992). En plantas C₃ se produce bajo ciertas condiciones de estrés, como sequía o alta intensidad lumínica (Jöet *et al.*, 2002).

El CEF ocurre vía dos mecanismos redundantes: el principal requiere de un complejo de al menos dos proteínas, PGR5 y PGRL1 (DalCorso *et al.*, 2008; Hertle *et al.*, 2013); el minoritario requiere del complejo de la NDH (Yamamoto *et al.*, 2011). El complejo de la NDH es un complejo grande, con un gran número de subunidades y fue identificado como un homólogo del complejo I mitocondrial. El complejo de la NDH media en el transporte electrónico desde reductores estromáticos a la PQ, probablemente desde la ferredoxina (Fd) y no desde el NADPH (Yamamoto *et al.*, 2011). El complejo PGR5-PGRL1 es necesario para la inducción del apantallamiento no fotoquímico (“Non-Photochemical Quenching”, NPQ) al inducir la acidificación del lumen (DalCorso *et al.*, 2008; Hertle *et al.*, 2013). El proceso consiste en que el PSI cede electrones a la Fd, que a su vez se los cede a la PQ vía los complejos PGR5-PGRL1 y NDH, para luego ser cedidos al complejo del citocromo b₆f; éste se los cede a la Pc, que finalmente hace que vuelvan al PSI (Heber y Walker, 1992; Hertle *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2011).

1.3.1.3. Clororrespiración

Es el transporte electrónico de la respiración dentro del cloroplasto, que transporta electrones desde el NADPH al O₂ a través de la población de PQs. Es un mecanismo que previene la oxidación completa de dicha población en oscuridad, además de prevenir su completa reducción en condiciones de exceso de luz. El componente principal involucrado es la PTOX, la cual oxida a la PQ y reduce el O₂ a agua, pudiendo generar O₂⁻ en una reacción asociada a situaciones de alta intensidad lumínica u otras condiciones de estrés, condiciones bajo las que los niveles de PTOX aumentan (en condiciones normales posee niveles bajos de proteína) (Dietz *et al.*, 2016). Algunos autores mantienen que este proceso es llevado a cabo en conjunción con el complejo de la NDH (Niyogi, 2000). Así, ambos equilibrarían el estado rédox de los transportadores de electrones.



1.3.1.4. Otros agentes de fotoprotección constitutiva

Como se ha visto, la producción de ROS en plantas es inevitable. A los protectores anteriores, se suman otras especies antioxidantes encargadas de desactivar ROS, cuyos sistemas de acción incluyen componentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Entre los componentes no enzimáticos aparecen prenilquinonas como el α -tocoferol (vitamina E) y el plastoquinol (PQ-9-H₂); ascorbato (vitamina C) y glutatión. Mientras que los carotenoides median la eliminación física de ROS mediante la transferencia de energía de excitación, las prenilquinonas median la eliminación química mediante el transporte de electrones (Krieger-Liszky y Trebst, 2006; Yadav *et al.*, 2010). Por ejemplo, la vitamina E puede reaccionar con ¹O₂ para formar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en una reacción de transferencia de dos electrones (Neely *et al.*, 1988). La vitamina C tiene numerosos mecanismos de actuación, entre los que encontramos la eliminación de OH⁻ a través de APX (Dietz *et al.*, 2016). El glutatión actúa mediante el ciclo ascorbato-glutatión (Foyer *et al.*, 1994).

Entre los componentes antioxidantes enzimáticos encontramos a SOD, APX, catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y peroxirredoxina. Estas enzimas están presentes en todos los compartimentos subcelulares. El oxidante principal producido por el PSI es O₂⁻, que puede ser producido en exceso de luz por la fotorreducción de O₂, siendo rápidamente dismutado en H₂O₂ por acción de SOD (Asada, 2006; Smirnov y Arnaud, 2018). El sistema de detoxificación del H₂O₂ en cloroplastos es operado por el ciclo ascorbato-glutatión, en el cual APX utiliza la vitamina C como un donador de electrones específico para reducir el H₂O₂ producido por SOD a agua. En este contexto, el ciclo agua-agua es esencial para evitar el daño por luz en el PSI (Asada, 1992; Asada, 1999).

1.3.2. Mecanismos fotoprotectores de larga duración

Cuando las plantas son expuestas a condiciones de estrés durante un tiempo largo se activan estos mecanismos de fotoprotección, que incluyen la expresión o represión de genes específicos, la acumulación de metabolitos antioxidantes y el cambio de la arquitectura de los cloroplastos, de las hojas y de la planta en general (Moejes *et al.*, 2017).

En el caso concreto de la aclimatación a la alta intensidad lumínica, los mecanismos de fotoprotección incluyen la disminución de tamaño del LHC a través de cambios en la expresión de los genes que componen el mismo y/o la degradación de sus proteínas (Escoubas *et al.*, 1995; Ballottari *et al.*, 2007), el incremento en la capacidad para el transporte electrónico fotosintético y el incremento de la fijación de CO₂. Estos mecanismos implican la regulación de la expresión de genes nucleares y cloroplásticos (Pfannschmidt *et al.*, 1999).



1.3.3. Mecanismos fotoprotectores por disipación de energía: apantallamiento no fotoquímico

La producción de $^3\text{Chl}^*$ derivada del exceso de $^1\text{Chl}^*$ es una propiedad de las clorofilas y la capacidad de controlar dicha producción es esencial para la supervivencia de la planta. Existe un conjunto de mecanismos inducibles para eliminar el exceso de $^1\text{Chl}^*$ y disipar la energía resultante, sin daño para la planta, en forma de calor. El conjunto de estos mecanismos recibe el nombre de NPQ. El NPQ es desencadenado por un exceso de luz y requiere de la existencia de un gradiente de protones a través de la MT. La concentración de protones en el lumen es determinada por el balance existente entre la ratio del transporte electrónico fotosintético y la disipación del gradiente de protones a través de la actividad del complejo de la ATP sintasa (Pinnola y Bassi, 2017). En condiciones de exceso de luz, el ciclo de Calvin-Benson-Bassham se satura y la actividad ATPasa disminuye progresivamente debido a la falta de sustratos, P_i y ADP, lo que provoca la acidificación del lumen y esto, a su vez, desencadena el NPQ en el complejo antena (Joliot y Finazzi, 2010). Los componentes del NPQ son numerosos, pero tres de ellos, principales, sobresalen por la escala de tiempo en la que se produce su inducción y su relajación tras la exposición de plantas adaptadas a oscuridad a un exceso de luz:

- **qE.** Se trata de una disipación reversible y rápida, en torno a décimas de segundo, causada por el aumento de protones en el lumen tilacoidal. Esta acidificación del lumen es producida por el agotamiento de ADP y P_i , que limitan la actividad ATPasa y el regreso de los protones desde el lumen a la parte estromática (Li *et al.*, 2000; Peers *et al.*, 2009; Alboresi *et al.*, 2010). En plantas, qE es modulado por la zeaxantina de tal modo que es requerida la presencia de esta xantofila para la completa activación de qE (Li *et al.*, 2002).
- **qZ.** Una disipación más lenta, activada en cuestión de minutos y dependiente de la zeaxantina. Incrementa la disipación por qE. Este mecanismo está presente en algunas plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* y es debido probablemente a la unión de la zeaxantina a los complejos antena (Dall'Osto *et al.*, 2005; Nilkens *et al.*, 2010).
- **qH, qI, qM o qT.** qH, conocido como la disipación sostenida, es catalizado por una lipocalina plástica (Malnoë *et al.*, 2018). qI es el componente más lento del NPQ y se atribuye a procesos donde interviene una disminución en el centro de reacción del PSII tras daño por luz (Krause *et al.*, 1990). Tanto qM como qT no son considerados realmente como componentes del NPQ. qT corresponde a la



disipación fotoquímica del PSI mediada por la transición de estado (Nilkens *et al.*, 2010; Allorent *et al.*, 2013). Este componente es poco importante en plantas superiores (Xu *et al.*, 2015). qM depende de una disminución de la absorción de fotones causada por el movimiento del cloroplasto lejos del exceso de luz y hacia la pared celular (Cazzaniga *et al.*, 2013; Dall’Osto *et al.*, 2014).

En la Figura 1.3 se puede observar un resumen de todos los mecanismos de fotoprotección vistos y explicados en esta tesis doctoral.

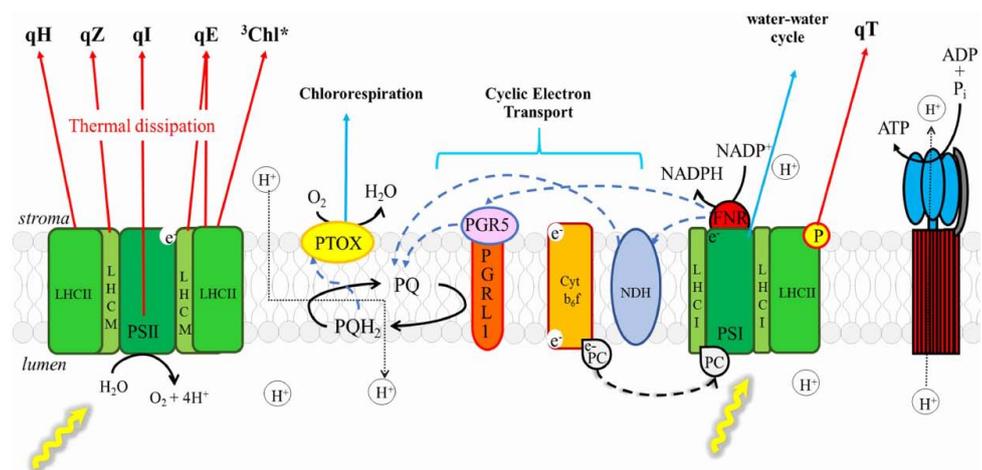


Figura 1.2: Localización de los mecanismos de fotoprotección actuando en exceso de luz (flechas rojas) o de electrones (flechas azules). Los componentes NPQ (qE, qZ, qI, qH), qT y ³Chl* catalizan la disipación por calor. La clororrespiración, el flujo cíclico de electrones y el ciclo agua-agua disipan poder reductor en exceso. FNR = ferredoxina:NADP⁺ óxidorreductasa. Imagen tomada de Pinnola y Bassi, 2018.

1.4. Los plastoglobulos

1.4.1. ¿Qué son?

Los plastoglobulos (PGs) son partículas lipoproteicas rodeadas por una monocapa lipídica y que están presentes en los plastos de la mayoría de tejidos vegetales fotosintéticos y no fotosintéticos. En los cloroplastos de plantas superiores se consideran continuaciones de la capa externa de la bicapa lipídica de la MT, facilitando así el intercambio de metabolitos hidrófobos entre la MT y los PGs (Austin *et al.*, 2006; Bréhélin *et al.*, 2007; Bréhélin y Kessler, 2008; Sing y McNellis, 2011). Típicamente poseen un diámetro de 30-500 nm aproximadamente, incrementando su tamaño en varias veces el original de forma reversible durante varios estreses abióticos y en transiciones típicas del desarrollo, como la senescencia (van Wijk and Kessler, 2017). En un principio se pensó que tenían un papel exclusivamente de reserva de lípidos, pero datos posteriores indicaron que podían también participar en el transporte de metabolitos, en



estrés, en senescencia o en el desarrollo e incluso relacionarse con elementos del ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Besagni y Kessler, 2012; Lundquist *et al.*, 2012a; Singh y McNellis, 2011; Yang *et al.*, 2006).

1.4.2. Dinámica de los plastoglobulos

Una de las características más llamativas de los PGs es su naturaleza dinámica, pudiendo aumentar o disminuir rápidamente su tamaño durante transiciones del desarrollo o en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (van Wijk y Kessler, 2017).

1.4.2.1. Des-etiolación

Los etioplastos contienen PGs globulares, normalmente próximos o incrustados dentro de cuerpos prolamelares, que son estructuras paracristalinas que contienen protoclorofilida reductasa y lípidos. Durante la des-etiolación, la abundancia en PGs y cuerpos prolamelares disminuye de forma concomitante con la formación de tilacoides, lo que sugiere que los PGs contribuyen al desarrollo de los mismos, probablemente proveyéndoles de carotenoides, prenilquinonas y triacilglicerolos (TAGs) para la síntesis de la membrana lipídica (Sundqvist y Dahlin, 1997). La composición de los PGs de etioplastos y de los cuerpos prolamelares no es idéntica y difieren sustancialmente de los PGs de cloroplastos (Ytterberg *et al.*, 2006).

1.4.2.2. Senescencia

Durante la senescencia de la hoja, las MTs, sus complejos proteicos y cofactores asociados son desmontados de forma controlada (Besagni y Kessler, 2013). Algunos autores han utilizado imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para visualizar este proceso, durante el cual los PGs muestran un aumento dramático de su tamaño (Figura 1.2).

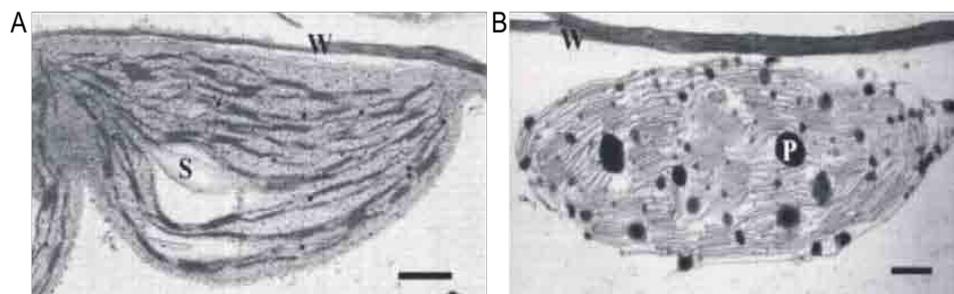


Figura 1.3: Micrografías electrónicas de cloroplastos en hojas de roseta de *Arabidopsis*. A, cloroplastos de hojas de roseta jóvenes (3 semanas). B, cloroplastos de hojas de roseta en senescencia (6 semanas). S = almidón, W = pared celular y P = plastoglobulo. La barra indica un tamaño de 1 µm. Imagen adaptada de Kaup *et al.*, 2002.

Hay una fuerte correlación entre el desmontaje de los tilacoides y el aumento de tamaño de los PGs. Prenilquinonas y ácidos grasos libres, aunque no glicolípidos ni proteínas, se



Introducción

acumulan en los PGs durante el proceso de senescencia. Sin embargo, el contenido en carotenoides y ésteres carotenoides en los PGs (que es bajo en hojas jóvenes y maduras) se ve incrementado en etapas tempranas de la senescencia, mientras que el contenido total en carotenoides en la hoja disminuye. Posteriormente disminuye a niveles bajos en etapas tardías de la senescencia (Tevini y Steinmüller, 1985). Trabajos más recientes también han mostrado que los PGs juegan un papel en la degradación de la clorofila y el reciclaje del fitol (Vom Dorp *et al.*, 2015).

Varios trabajos han sugerido que los PGs son liberados desde los cloroplastos senescentes, bien tras la ruptura de la envuelta cloroplastídica, bien a través de algún otro mecanismo (Lichtenthaler, 2012; Liu, 2016; van Doorn y Prisa, 2014). Estos PGs liberados serían entonces degradados en las vacuolas (Lichtenthaler, 2012). Algunos de estos trabajos han mostrado la salida de cuerpos ricos en lípidos desde gerontoplastos al citosol en células de la epidermis de tépalos en senescencia en flores de *Iris* y en hojas de *Citrillus lanatus* (Liu, 2016; van Doorn y Prisa, 2014). Se observó cómo cuerpos lipídicos en la vacuola compartían una apariencia ultramicroscópica similar a los PGs en los cloroplastos, sugiriendo que los PGs fueron asimilados y degradados por la vacuola después de que fuesen secretados desde los cloroplastos (Liu, 2016).

1.4.2.3. Transición de cloroplasto a cromoplasto

Los cromoplastos se desarrollan a partir de cloroplastos y es por ello que estos son sometidos a un proceso de “desverdizado” durante el cual las MTs y su contenido son removidos y/o reciclados (Egea *et al.*, 2010). Durante esta transición, los PGs acumulan carotenoides y otros lípidos prenilos mediante síntesis *de novo* y movilizándolos desde las MTs y las membranas de la envuelta (Deruère *et al.*, 1994; Simkin *et al.*, 2007). Es un proceso de transición plastídica bien controlado y que ha sido ampliamente estudiado en frutos en maduración portadores de carotenoides como el tomate (Kahlau y Bock, 2008; Liu *et al.*, 2015). También ha sido estudiado en menor medida en pétalos de plantas de pepino (Vainstein *et al.*, 1994).

1.4.2.4. Estrés abiótico

Cuando las plantas son expuestas a un estrés por sequía o por alta intensidad lumínica o transferidas a un medio con condiciones limitantes de nitrógeno, los PGs aumentan rápidamente de tamaño y, en cuanto se elimina cualquiera de estos estreses, su tamaño vuelve a la normalidad (Figura 1.4) (Eymery y Pascal, 1999; Gaude *et al.*, 2007).



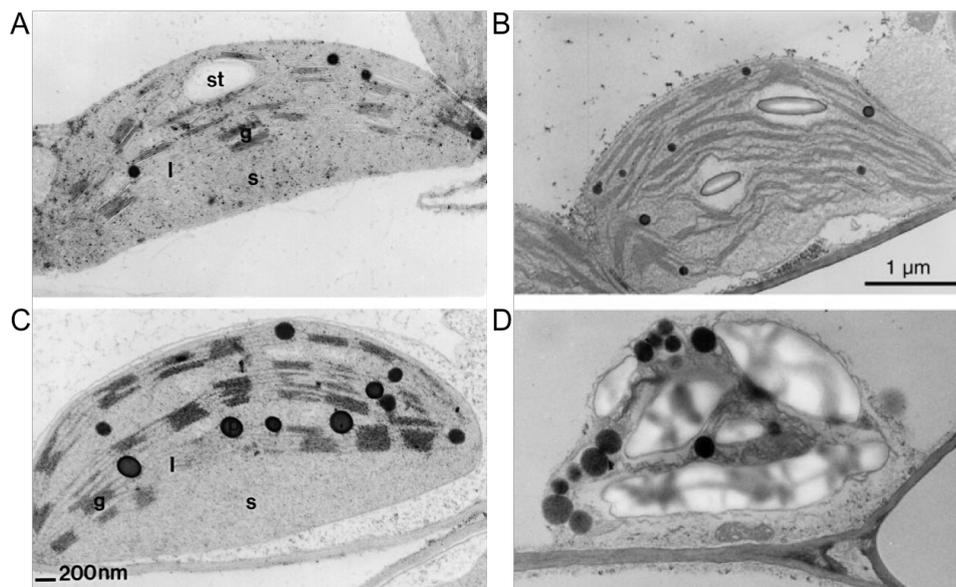


Figura 1.4: Micrografías electrónicas de cloroplastos en hojas de *Solanum tuberosum* (A y C) y en hojas de roseta de *Arabidopsis* (B y D). A y B, cloroplastos de plantas crecidas en condiciones normales. C, cloroplastos de plantas sometidas a estrés por sequía. D, cloroplastos de plantas sometidas a privación de nitrógeno. g = Grana; l = lamela; p = plastoglobulo; s = estroma; st = almidón. Imágenes adaptadas de Eymery y Pascal, 1999; Gaude *et al.*, 2007.

Estos cambios en el tamaño de los PGs y, frecuentemente, en el grado de tinción con OsO_4 en las imágenes de TEM probablemente reflejan un intercambio de metabolitos entre la MT y los PGs y, posiblemente, la síntesis *de novo* de nuevos metabolitos y su exportación (van Wijk y Kessler, 2017). Cambios en la mayoría de los metabolitos plastoglobulares como el α -tocoferol (vitamina E), algunas quinonas, fitoesteroles o TAGs contribuyen al cambio reversible en el tamaño y propiedades de los PGs (Vidi *et al.*, 2006; Gaude *et al.*, 2007).

1.4.3. Composición

1.4.3.1. Metabolitos

En los PGs se encuentran presentes tres clases principales de moléculas pequeñas:

- Lípidos neutros: TAG, fitoesteroles y ácidos grasos libres (Gaude *et al.*, 2007).
- Prenilquinonas: vitamina E, plastoquinona-9 (PQ-9), plastocromanol-8 (PC-8) y filoquinona (vitamina K1) (Lohmann *et al.*, 2006; Vidi *et al.*, 2006; Zbierzak *et al.*, 2010).
- Varios carotenoides y apocarotenoides.

Se puede asumir que los componentes apolares están “escondidos” en el interior de los PGs y cubiertos por lípidos polares y proteínas en la superficie de los mismos (Hansmann y Stitte, 1982). Cambios en el contenido metabólico de los PGs afectan tanto a su tamaño como



Introducción

a su forma y son reflejados en la osmiofilidad en imágenes de TEM, como se ha podido ver en PGs aislados de hojas de manzanos (Lundquist *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2010).

1.4.3.2. Proteínas

El “core” proteico de los PGs cloroplastídicos está formado por unas 30 proteínas. Ninguna de estas proteínas tiene dominios transmembrana conocidos o predichos en concordancia con la naturaleza de monocapa lipídica de los PGs, ya que los dominios transmembrana proteicos requieren de una bicapa lipídica para su inserción en la membrana. Por ello, las proteínas tienen que localizarse en la periferia de los PGs, probablemente insertando pequeños dominios hidrófobos dentro del núcleo hidrofóbico o a través de interacciones con otras proteínas plastoglobulares, dependiendo de su función (Pozueta-Romero *et al.*, 1997; Kessler *et al.*, 1999; Austin *et al.*, 2006).

Usando datos de RNAm del genoma completo de *Arabidopsis*, Lundquist y cols. (Lundquist *et al.*, 2012a) generaron una red de coexpresión usando las proteínas del “core” plastoglobular como nodos (Figura 1.5). Esta red sugería la existencia de cuatro módulos mayoritarios de coexpresión, cada uno con funciones específicas y diferentes entre módulos, como senescencia, proteólisis de cloroplastos, metabolismo de carotenoides, regulación redox del cloroplasto, ciclo de Calvin-Benson-Bassham o biogénesis de cloroplastos. Este análisis ha ayudado a asociar las proteínas del PG con diferentes funciones o procesos.



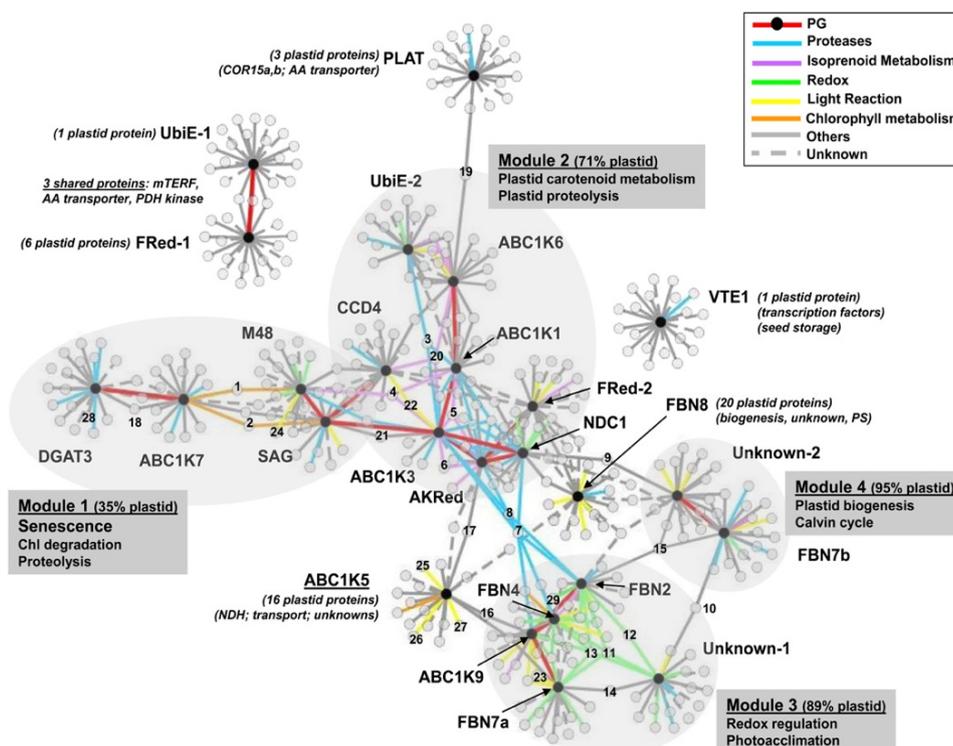


Figura 1.5: Estudio de coexpresión y de función del “core” proteico plastoglobular. Para cada gen del PG, los 20 genes con mayor índice de coexpresión de un análisis de genoma completo mediante MetaOmGraph se compilaron en una red de coexpresión plastoglobular y se visualizaron con el programa Cytoscape. Cada gen es representado por un único nodo. Las líneas de colores representan las interacciones entre los genes del PG y los genes coexpresados y sus colores van acordes a la anotación funcional del gen coexpresado. Aparecen marcados con números 27 genes que se encuentran en posiciones importantes dentro de la red y/o tienen funciones particularmente interesantes. Imagen tomada de Lundquist *et al.*, 2012a.

Las FBNs son el componente proteico principal y suponen aproximadamente el 50% del total de proteínas plastoglobulares (Lundquist *et al.*, 2012a; Vidi *et al.*, 2007).

Otro tipo de proteínas abundantes de los PGs son las que pertenecen a la familia de kinasas atípicas ABC1 (ABC1K), las cuales se creen que juegan un papel importante en la regulación del metabolismo de los PGs (Ytterberg *et al.*, 2006; Bréhélin *et al.*, 2007; Lundquist *et al.*, 2012b). Son kinasas homólogas a una ABC1K en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*, donde regula la síntesis de ubiquinona (Poon *et al.*, 2000; Tauche *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2011).

También aparecen en los estudios de composición proteica como parte del “core” del PG la bien estudiada enzima deficiente en vitamina E 1 (“vitamin E deficient 1”, VTE1), una tocoferol ciclasa implicada en la biosíntesis de vitamina E y PC-8 (Porfirova *et al.*, 2002); las enzimas fitol éster sintasa 1 y 2 (“phytol ester synthase 1 y 2”, PES1 y PES2), involucradas en la formación de ésteres de fitilo usando moléculas de fitol provenientes de la degradación de la clorofila o usando ácidos grasos libres provenientes de la degradación de galactolípidos (Lippold *et al.*, 2012); una



Introducción

esterasa/lipasa/tioesterasa 4 (ELT4), cuya función aún no ha sido estudiada; una NAD(P)H deshidrogenasa C1 (NDC1) que reduce a la PQ-9 oxidada a PQ-9-H₂ (plastoquinol) en los PGs (Piller *et al.*, 2011) y juega un papel esencial como reductasa en la biosíntesis de la vitamina K1 (Fatihi *et al.*, 2015); dioxigenasa de corte de carotenoide 4 (“carotenoid cleavage dioxygenase 4”, CCD4), una proteína identificada como el regulador negativo mayoritario del contenido de carotenoides en semillas mediante un estudio de asociación del genoma completo (“genome-wide association study”, GWAS) de *Arabidopsis*, cuyos mutantes de pérdida de función poseen niveles más altos en el contenido de β-caroteno en semillas disecadas y niveles mucho más altos de carotenoides en hojas con senescencia inducida por oscuridad (González-Jorge *et al.*, 2013); una metalopeptidasa M48 (PGM48) poco abundante perteneciente a la familia de las metaloproteasas de zinc, que es la única peptidasa encontrada en los PGs y que actúa como un regulador positivo de la senescencia al degradar posiblemente a CCD4 (la sobreexpresión de PGM48 reduce los niveles de CCD4, aunque incrementa significativamente los niveles de ABC1K7 y PES1) (Bhuiyan *et al.*, 2016); otras proteínas presentes en los PGs, como metiltransferasas, reductasas o la proteína de unión a hemoglobina 3 (HBP3), tienen varios dominios funcionales predichos, pero sus funciones no han sido aún estudiadas (Lundquist *et al.*, 2012a).

1.4.3.3. Incorporación de proteínas a los plastoglobulos

Aún queda por resolver el detalle de cómo son trasladadas a los PGs las proteínas que se encuentran en estos suborgánulos. Se desconoce si proceden de otras localizaciones cloroplásticas, como los tilacoides o el estroma, o si son trasladadas después de su síntesis. Algunas proteínas pertenecientes a la familia de las FBNs cambian su localización en función de las condiciones ambientales. En *Capsicum annuum* y en *Nicotiana tabacum*, FBN1a se encuentra, en condiciones normales, principalmente en el estroma, pero en respuesta a sequía o alta intensidad lumínica la proteína cambia preferentemente a una localización plastoglobular (Rey *et al.*, 2000; Simkin *et al.*, 2007). Algunos autores sugieren que dicha localización podría depender de las características físico-químicas de las proteínas al poder ser éstas modificadas mediante óxido-reducción o fosforilación (Lundquist *et al.*, 2012a).

1.4.4. Origen y evolución de los plastoglobulos y sus componentes

Se han observado partículas electrodensas por TEM en otros organismos además de plantas vasculares, como en *Physcomitrella patens*, algas verdes o cianobacterias (Katz *et al.*, 1995; Rinnan y Holopainen, 2004; Schmidt *et al.*, 2006). Sin embargo, solo en el caso del alga verde halotolerante *Dunaliella bardawil* se han aislado sus PGs y han sido analizados para obtener sus contenidos en metabolitos y proteínas (Davidi *et al.*, 2014; Davidi *et al.*, 2015). Varios



estudios han descrito la existencia de PGs en cianobacterias, donde son nombrados como partículas lipídicas o gotas lipídicas, pero sus proteomas y metabolomas aún no se conocen (van de Meene *et al.*, 2006; Peramuna y Summers, 2014). La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 posee partículas lipídicas en abundancia y su distribución está restringida a los tilacoides (van de Meene *et al.*, 2006), algo similar a lo que ocurre en la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Nierzwicki-Bauer, 1983). Su localización intracelular sugiere un papel en el mantenimiento de los tilacoides o en la biogénesis de los mismos, similar a los PGs de los plastos. Mutantes “knock out” de dos homólogos de FBN de *Synechocystis* sp. PCC 6803 poseen un fenotipo de sensibilidad a la luz, lo que sugiere un papel determinado en fotoprotección o reparación (Cunningham *et al.*, 2010). Homólogos de muchas de las proteínas plastoglobulares de plantas superiores están presentes en otros organismos fotosintéticos y son parte del conjunto de proteínas llamado “GreenCut”, que se encuentra exclusivamente en organismos fotosintéticos (Karpowicz *et al.*, 2011). Por ejemplo, análisis filogenéticos de la familia de las ABC1K muestran que estas proteínas ya estaban presentes en archaeas, pero que dicha familia se expandió a los eucariotas fotosintéticos. La mayor parte de las proteínas de la familia ABC1K en los plastos derivan de la endosimbiosis de una cianobacteria, mientras que la proteína ABC1K9 probablemente derive del organismo huésped de la endosimbiosis y pertenece a un clado ancestral separado junto con el único integrante de la familia localizado en la mitocondria, ABC1K10 (Lundquist *et al.*, 2012b). Asimismo, la filogenia de las FBNs muestra que esta familia, tanto en algas como en plantas, probablemente derive también de cianobacterias y experimentó varias duplicaciones tras la endosimbiosis (Laizet *et al.*, 2004).

Imágenes tomadas mediante tomografía crioelectrónica de células de *Chlamydomonas reinhardtii* muestran PGs de unos 65 nm de diámetro asociados a las MTs, con puntos de contacto poco frecuentes entre ambos (Engel *et al.*, 2015). La composición de los PGs de *Chlamydomonas* es desconocida, pero su genoma codifica homólogos de muchas proteínas plastoglobulares de plantas superiores, como por ejemplo FBNs o ABC1Ks. *Chlamydomonas* contiene una estructura adicional de tipo plastoglobular, el ocelo naranja rico en carotenoides, que sensa la luz y lleva a cabo respuestas fototácticas (Kreimer, 2009). Análisis del proteoma del ocelo mediante espectrometría de masas y purificación reveló que contiene homólogos de proteínas del proteoma plastoglobular de plantas superiores, como HBP3, ABC1K1, ABC1K3 y enzimas de la biosíntesis de los carotenoides (Schmidt *et al.*, 2006; Merchant *et al.*, 2007; Boyd *et al.*, 2011).

Dunaliella bardawil, a diferencia de las plantas superiores, acumula tanto gotas lipídicas en su citoplasma como PGs especializados en sus cloroplastos que pueden contener grandes



Introducción

cantidades de β -caroteno con una isomería inusual. Ambos cuerpos lipídicos han sido aislados y analizados para determinar su composición química y la composición de su proteoma. Sus PGs son ricos en TAGs, β -caroteno y fitoeno. El proteoma de sus gotas lipídicas citoplasmáticas es muy similar al proteoma de las mismas estructuras que se encuentran en *Chlamydomonas*, mientras que la composición del proteoma de sus PGs se parece en gran medida tanto al proteoma del ocelo de *Chlamydomonas* como al proteoma de los PGs de *Arabidopsis*, incluyendo homólogos de FBN1, FBN7, FBN8; VTE1; NDC1; HBPs; PESs; PGM48; ABC1K1, ABC1K3, ABC1K5, ABC1K6 y ABC1K9; y enzimas de la ruta de biosíntesis de β -caroteno. La alta similitud entre los proteomas de los PGs de *D. bardawil* y de plantas superiores es sorprendente y sugiere que las funciones de estas estructuras podrían estar muy conservadas. A diferencia de otras especies de *Dunaliella*, no se han detectado ocelos en *D. bardawil*, por lo que se ha propuesto que esta estirpe combina en sus PGs las funciones de los PGs de plantas superiores y *Chlamydomonas* y de los ocelos de esta última (Katz *et al.*, 1995; Davidi *et al.*, 2014; Davidi *et al.*, 2015).

1.4.5. Función de los plastoglobulos

Históricamente se ha postulado que los PGs servían simplemente como reservorio de vitaminas o lípidos, pero gracias a los últimos estudios que demuestran el número de proteínas que los componen, el abanico de funciones que se les atribuye es cada vez más amplio.

1.4.5.1. Papel en el metabolismo de tocoferoles y quinonas

Los miembros de la familia de las prenilquinonas localizados en los plastos (PQ-9, vitamina K1, PC-8, vitamina E y α -tocoferolquinol) juegan un papel importante como transportadores electrónicos en la fotosíntesis y/o como antioxidantes lipídicos. La PQ-9 es bien conocida por transferir electrones desde el PSII al complejo del citocromo b_6/f , pero también actúa protegiendo a los lípidos de la membrana tilacoidal de la oxidación por parte de ROS (Kruk *et al.*, 2003; Ksas *et al.*, 2015; Kruk *et al.*, 2016). En torno al 50% del total de PQ-9 se encuentra en los PGs y no está directamente involucrada en el transporte electrónico, constituyendo una población no fotoactiva (Szymańska y Kruk, 2010; Ksas *et al.*, 2015). La filoquinona es requerida para el transporte electrónico dentro del PSI y no parece funcionar como un antioxidante lipídico. La vitamina E sí actúa como tal y es oxidada por el α -tocoferolquinol, el cual puede ser convertido en vitamina E a través de un ciclo de reparación donde está involucrada VTE1 (van Wijk and Kessler, 2017). PC-8, el derivado de cromanol de PQ-9, también actúa como un antioxidante de lípidos en hojas (Szymańska y Kruk, 2010). Ya hemos comentado previamente que estas cinco prenilquinonas pueden encontrarse en los PGs de cloroplastos, pero también se localizan allí las dos enzimas clave, VTE1 y NDC1, implicadas en su biosíntesis, su reciclaje redox y su reparación.



La mayor parte de VTE1 se encuentra en los PGs, aunque también esté presente en la envoltura del cloroplasto (Lundquist *et al.*, 2012a) (Figura 1.6).

La población plastoglobular de VTE1 también actúa en el ciclo redox de los tocoferoles (Martinis *et al.*, 2013). El ciclo de reparación también requiere una dehidratasa (Kobayashi y DellaPenna, 2008) y ésta podría ser alguna de las reductasas poco o nada caracterizadas del proteoma de los PGs.

NDC1 se encuentra en los PGs y está conservada desde cianobacterias. Juega un papel esencial como reductasa en la biosíntesis de la vitamina K1 y reduce a la PQ-9 oxidada a PQ-9-H₂ en los PGs, que es la población no fotosintéticamente activa de la misma. Esto afecta al estado redox de las PQ-9 totales. Así, se ha propuesto que NDC1 en los PGs condiciona el medio lipídico para las reacciones que favorecen la presencia de condiciones reductoras, como por ejemplo la biosíntesis de vitamina K1, la formación de PC-8 y el reciclaje de los tocoferoles (Piller *et al.*, 2011; Fatih *et al.*, 2015).



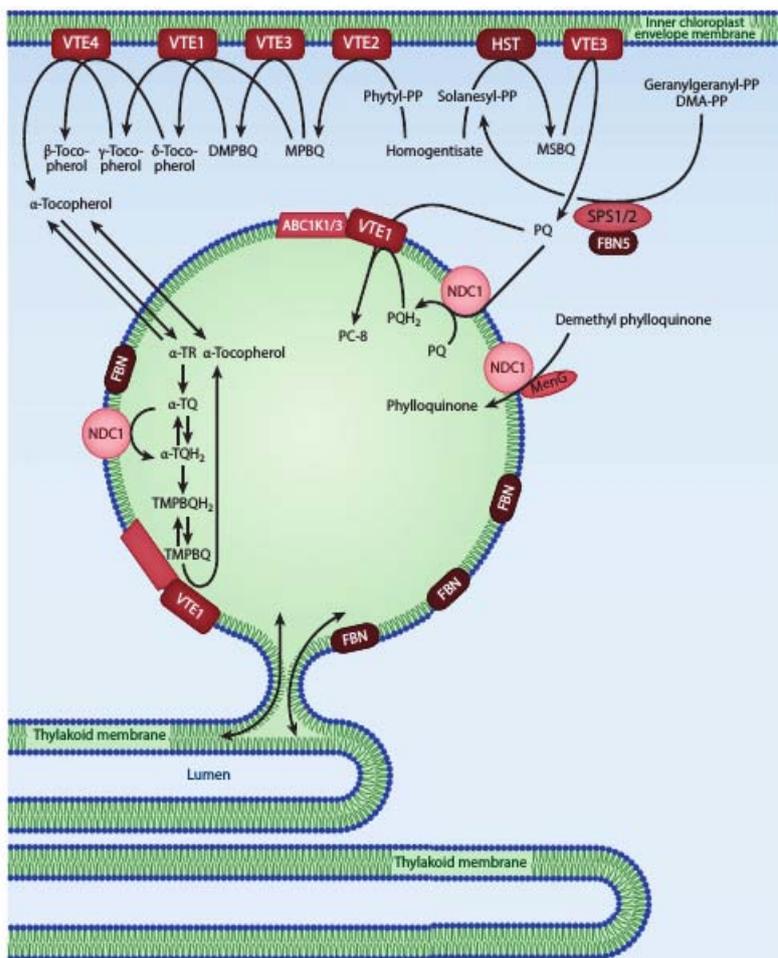


Figura 1.6: Los PGs cloroplásticos son sitios para el metabolismo y almacenamiento de prenilquinonas. VTE1 prefiere sustratos reducidos para la biosíntesis de vitamina E y PC-8, así como para el reciclaje de vitamina E. NDC1 provee los sustratos reducidos PQ-H₂ y TMPBQ para la biosíntesis de PC-8 y el reciclaje de vitamina E, respectivamente. También cataliza la reducción de demetil filoquinona antes de la metilación por MenG. ABC1K1 promueve el aumento en la producción de vitamina E en alta intensidad lumínica y ABC1K3 es requerida para la acumulación de PC-8 y el reciclaje de vitamina E en condiciones normales. Estas quinasa podrían actuar directamente sobre la actividad de VTE1, posiblemente mediante fosforilación. Las FBNs estarían actuando como proteínas estructurales. El homólogo de FBN5 se encuentra en el estroma y es requerido para la actividad de SPS1 y SPS2. Imagen tomada de van Wijk y Kessler, 2017.

1.4.5.2. Papel en el metabolismo de los carotenoides

La enzima PES1 fue encontrada como parte del “core” de los PGs de cloroplastos. Como se ha mencionado anteriormente, está involucrada en la formación de ésteres de fitilo usando ácidos grasos libres provenientes de la degradación de galactolípidos. Los niveles de RNAm de PES1 aumentan enormemente durante la senescencia. Además, los niveles de carotenoides en los PGs son normalmente muy bajos, pero aumentan transitoriamente durante la senescencia de forma concomitante a la pérdida de carotenoides en las MTs (Tevini y Steinmüller, 1985; Lippold *et al.*, 2012; Lundquist *et al.*, 2012a).



Como también se ha comentado previamente, CCD4 es una proteína que forma parte del “core” de los PGs en cloroplastos. Dicha proteína y sus homólogos en diferentes especies de plantas están involucradas en el corte de carotenoides, resultando en la formación de uno o más apocarotenoides (Huang *et al.*, 2009).

1.4.5.3. Papel en la catabolización de clorofila y lípidos

La aparición de PGs extra grandes durante la senescencia y la privación de nitrógeno es un proceso que se da al mismo tiempo que el desmantelamiento de las MTs y complejos proteicos y a la liberación y descomposición de cofactores y pigmentos, entre los que se incluyen los carotenoides y la clorofila (Besagni y Kessler, 2013; Gaude *et al.*, 2007). La descomposición de la clorofila libera fitol, mientras que la descomposición de galactolípidos tilacoidales libera ácidos grasos libres y diacilgliceroles (DAGs) (Schelbert *et al.*, 2009; Hörtensteiner, 2013; Tjellström *et al.*, 2015; Kelly y Feussner, 2016). La esterificación del fitol con los ácidos grasos libres produce ésteres de fitilo de ácidos grasos, mientras que la combinación de los ácidos grasos libres con los DAGs forma TAGs. Los ésteres de fitilo de ácidos grasos y los TAGs se acumulan en los PGs cloroplastídicos durante la senescencia y la privación de nitrógeno (Besagni y Kessler, 2013; Gaude *et al.*, 2007).

Las enzimas PES1 y PES2, como parte del “core” de los PGs, juegan un papel clave en los procesos de esterificación. Ambas son fuertemente reguladas durante la senescencia y la privación de nitrógeno (Figura 1.7). ELT4 también forma parte del “core” de los PGs y podría también contribuir, junto a PES1 y PES2, a la síntesis de ésteres de fitilo de ácidos grasos y TAGs en condiciones de privación de nitrógeno, aunque su función no ha sido aún estudiada.

Se ha demostrado que varias de las enzimas localizadas en los plastos involucradas en la síntesis de jasmonato son reclutadas y transportadas a los PGs en el doble mutante “knock out” *abc1k1-abc1k3* (Figura 1.7) (Lundquist *et al.*, 2013). Estas enzimas son las lipoxigenasas 2, 3 y 4 (LOX2, LOX3 y LOX4), la aleno óxido ciclasa (AOC) y la aleno óxido sintasa (AOS). Las LOXs oxidan los ácidos grasos 16:3 y 18:3 y son entonces convertidos en ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) por AOC y AOS. El OPDA es entonces transportado al peroxisoma, donde varios ciclos de β -oxidación lo transforman en la hormona jasmonato (Wasternack y Hause, 2013). AOS fue declarada en un principio como parte del “core” de los PGs por algunos autores (Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006), pero su distribución generalizada por diferentes fracciones de membrana cloroplástica han impedido su asignación de forma más reciente como tal (Lundquist *et al.*, 2012a). Datos obtenidos del estudio de mutantes triple “knock down” de FBN1a, FBN1b y FBN2 de *Arabidopsis*, sugieren que los PGs son el sitio de iniciación para la biosíntesis de jasmonato,



Introducción

particularmente durante situaciones de estrés, y que este proceso involucra preferentemente el reciclaje de ácidos grasos desde lípidos tilacoidales antes que la biosíntesis de ácidos grasos *de novo* (Youssef *et al.*, 2010).

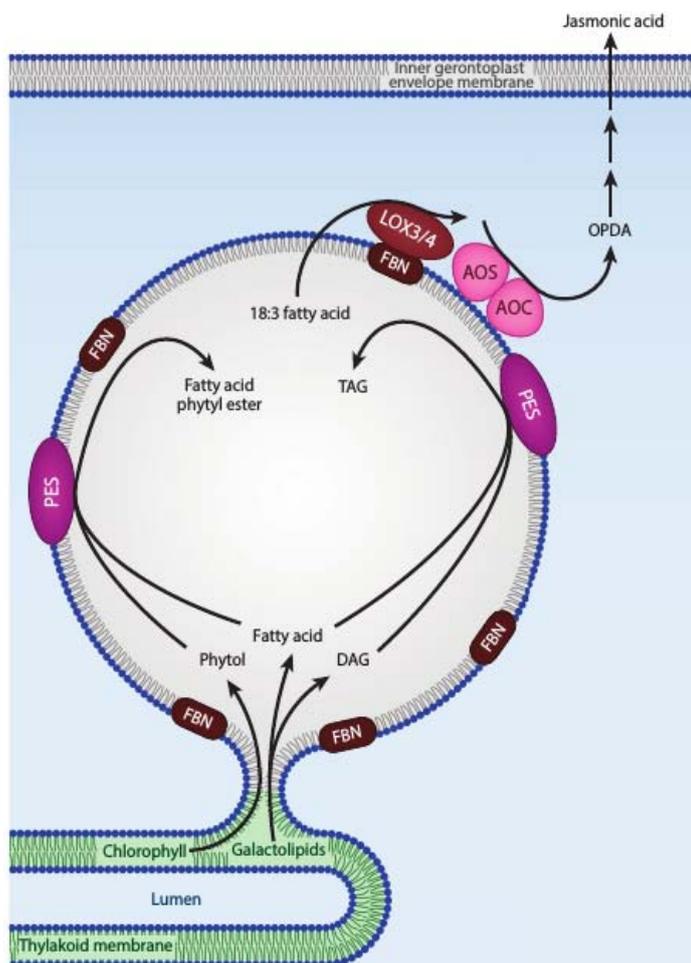


Figura 1.7: Los PGs de gerontoplastos participan en el desmontaje de los tilacoides, en la hidrólisis de galactolípidos y en el catabolismo de la clorofila durante la senescencia. El fitol libre es liberado desde la clorofila. PES1 y PES2 combinan fitol y ácidos grasos libres, derivados de la hidrólisis de galactolípidos, en ésteres de fitol de ácidos grasos. Estas enzimas también sintetizan TAGs desde ácidos grasos libres y diglicéridos. Durante la senescencia, los PGs de los gerontoplastos reclutan enzimas de la vía del jasmonato (como LOX3, LOX4, AOC o AOS), contribuyendo al desmontaje de los tilacoides y la producción de jasmonato. Imagen tomada de van Wijk y Kessler, 2017.

1.5. Las fibrilinas

Ya en los años 70 y 80 se mencionaba en algunos trabajos la presencia de una proteína abundante de unos 30 kDa en cromoplastos fibrilares de *Rosa rugosa* (Wuttke, 1976), *Tropaeolum majus* (Winkenbach *et al.*, 1976) y *Palisota barberi* (Knoth *et al.*, 1986). Sin embargo, ninguna de estas investigaciones le dio ningún nombre ni analizó en profundidad la proteína.



La primera vez que se aisló alguna de las proteínas de esta familia fue en cromoplastos de *Capsicum annuum*. Los autores descubrieron una proteína de aproximadamente 32 kDa de masa molecular a la que se le dio el nombre de fibrilina debido a su asociación con las estructuras fibrilares enriquecidas en carotenoides en estos cromoplastos, siendo además el primer componente identificado del proteoma de los PGs, y cuya secuencia se dedujo a partir de secuenciación de cDNA (Deruère *et al.*, 1994). Sin embargo, otros grupos descubrieron casi al mismo tiempo otras proteínas de parecida masa molecular y asociadas no solo a los cromoplastos, sino también a los cloroplastos. Por esta razón les dieron el nombre de proteínas asociadas a los plastos (“plastid-lipid associated protein”, PAP) (Pozueta-Romero *et al.*, 1997; Pozueta-Romero *et al.*, 1998). Estudios posteriores en diferentes especies de plantas confirmaron que se encuentran efectivamente en todo tipo de plastos y que, además, pueden aparecer de forma soluble en el estroma o asociadas a los PGs o a las MTs (Hernández-Pinzón *et al.*, 1999; Kessler *et al.*, 1999; Monte *et al.*, 1999). También se encuentran en todas las especies de plantas vasculares estudiadas hasta el momento, así como en cianobacterias y algas (Kessler *et al.*, 1999; Laizet *et al.*, 2004).

Posteriormente, tras ir identificando homólogos en otras plantas, se les dieron diferentes nombres, como plastoglobulinas (PGL) (Bréhélin *et al.*, 2007), la abreviatura FIB (Youssef *et al.*, 2010) o CHR (CHRB, CHRC, CHR...) (Vishnevetsky *et al.*, 1999). En este trabajo se usa el término fibrilina y la abreviatura FBN siguiendo la recomendación propuesta por Singh y McNellis (2011).

1.5.1. Filogenia de las fibrilinas

Las FBNs de plantas y cianobacterias tienen un alto grado de conservación entre sí, sugiriendo que los genes de las mismas se originaron en organismos procariontes y fueron posteriormente heredados por organismos eucariotes (Laizet *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2009).

Algunos autores han comparado evolutivamente las FBNs de *Chlamydomonas*, *Arabidopsis*, *Malus domestica* (manzano), *Oriza sativa* (arroz) y FBNs de otras plantas superiores, cuya regulación o función ha sido estudiada, como *Brassica napus*, *Brassica rapa* o *Pisum sativum* L. y han obtenido 12 grupos filogenéticos o clados (Figura 1.8) (Singh y McNellis, 2011). No se han usado FBNs de cianobacterias porque la mayoría de los genomas de las mismas solo poseen una o dos FBNs, sobre todo relacionadas a las FBNs 1a, 1b y 2. De hecho, la mayoría de las FBNs cuya función biológica ha sido estudiada pertenece a este mismo grupo. Los miembros de este grupo, junto con FBN4, constituyen las proteínas más abundantes en los PGs (Ytterberg *et al.*, 2006; Bréhélin *et al.*, 2007; Lundquist *et al.*, 2012a).



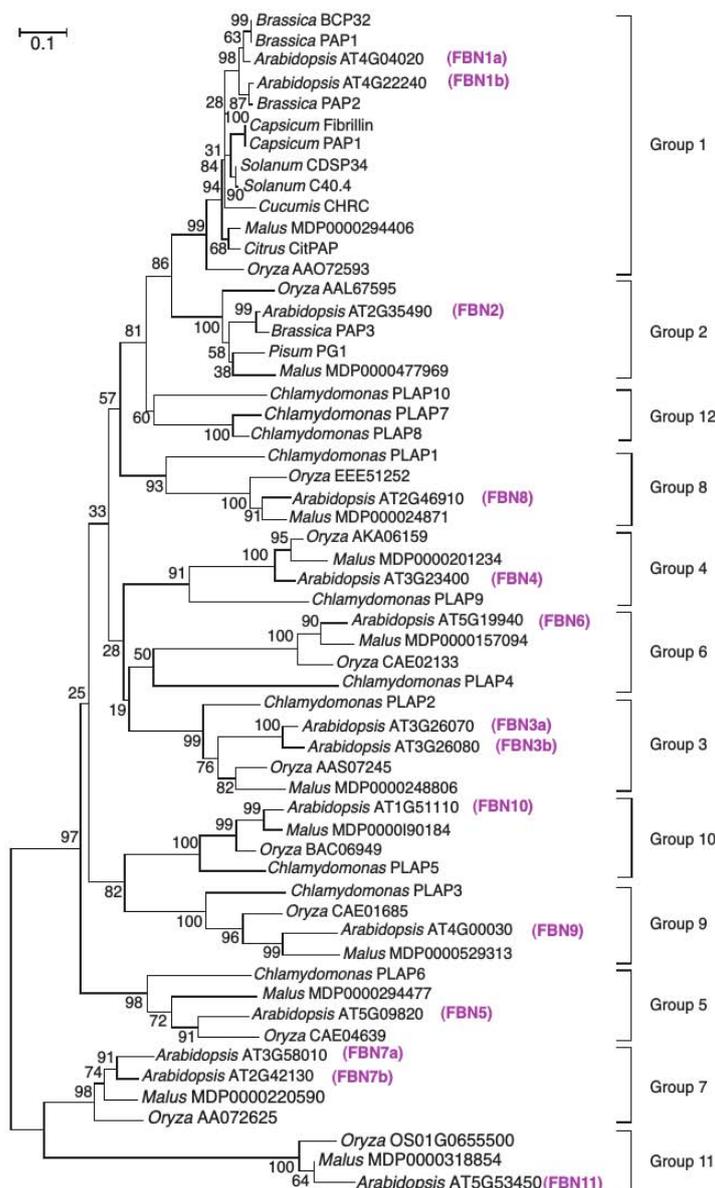


Figura 1.8: Árbol filogenético de FBNs de distintos organismos. Las FBNs de *Chlamydomonas*, *Arabidopsis*, *Oryza sativa*, *Malus domestica*, así como otras cuya regulación o función ha sido estudiada (como por ejemplo de *Brassica rapa*, *Brassica napus* o *Pisum sativum* L.), se han comparado filogenéticamente. Los autores de dicho análisis filogenético lo llevaron a cabo con el programa informático MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/mega4/mega.html>) (Tamura *et al.*, 2007). Los resultados muestran cómo estas proteínas se separan en 12 grupos filogenéticos diferenciados, de entre los cuales solo el clado 12 es exclusivo de algas. Las proteínas pertenecientes a los clados 1 y 2 son las que más se han estudiado. El grupo 11 está compuesto por FBN11, más separada evolutivamente del resto y de la cual se desconoce aún su función. Figura tomada de Singh y McNellis, 2011.

El genoma de *Arabidopsis* codifica para 14 FBNs. Las secuencias génicas de las FBNs del grupo 1, FBN1a y FBN1b, de *Arabidopsis* comparten entre sí un porcentaje de identidad del 78%, sugiriendo que se originaron tras un proceso de duplicación reciente. El grupo 11 está formado



por una FBN con características únicas dentro de la familia de las FBNs conocida como FBN11 en *Arabidopsis*. El tamaño de esta proteína es considerablemente mayor del que tienen el resto de proteínas de su misma familia, concretamente en torno al doble, y existen en su secuencia zonas que no tienen homología con las demás, sugiriendo un papel específico y distinto al del resto de FBNs. En todos los grupos encontramos al menos una proteína perteneciente a las plantas vasculares de forma general y encontrada en el genoma de *Arabidopsis* en particular, con excepción del grupo 12, constituido exclusivamente por proteínas pertenecientes a algas verdes. Esto puede deberse a que, en plantas vasculares, la función que realizan las proteínas de este grupo puede llevarse a cabo por proteínas presentes en el resto de grupos (Singh y McNellis, 2011; Lundquist *et al.*, 2012a).

1.5.2. Características generales y localización

La familia de las FBNs en *Arabidopsis*, como se ha mencionado previamente, se compone de 14 proteínas. Estas proteínas van aproximadamente desde los 21 a los 42 kDa de masa molecular; la excepción es FBN11, que tiene una masa molecular de unos 76 kDa. Su hidrofobicidad y sus puntos isoeléctricos, que oscilan entre 4 y 9, concuerdan con su localización intracloroplástica (Laizet *et al.*, 2004; Lundquist *et al.*, 2012a). Algunos autores han propuesto que, de las 14 FBNs existentes en *Arabidopsis*, siete se encuentran principalmente en los PGs (FBN1a, FBN1b, FBN2, FBN4, FBN7a, FBN7b, FBN8). El resto de la familia se localiza en el estroma (FBN5) o en las membranas plastídicas (FBN3a, FBN3b, FBN6, FBN9, FBN10, FBN11), probablemente en los tilacoides (Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006; Lundquist *et al.*, 2012a; Kim *et al.*, 2015). Algunos autores han inmunolocalizado mediante TEM algunas de las FBNs, como en el caso de FBN1a de *Arabidopsis*, la cual se encuentra en la superficie de los PGs (Figura 1.9) (Austin *et al.*, 2006).

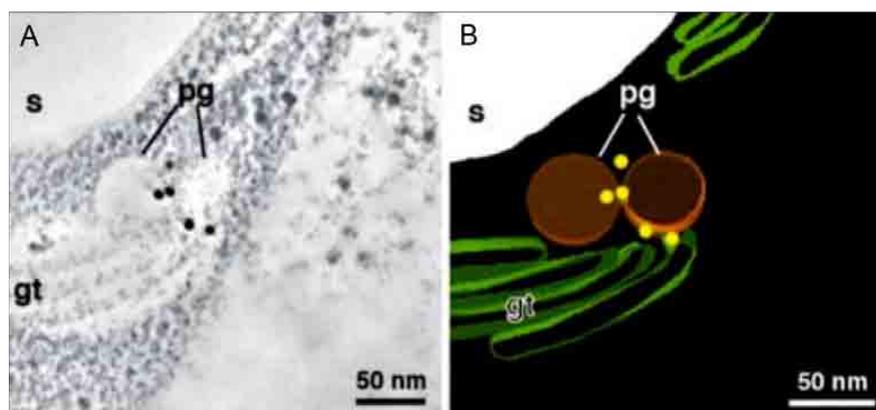


Figura 1.9: Localización sub-cloroplástica de FBN1a. A, ensayo de inmunolocalización de FBN1a, donde se puede observar que su localización es la superficie de los PGs. B, imagen realizada por tomografía en 3D. En amarillo se señala la inmunolocalización de FBN1a. pg = plastoglobulo; gt = grana; s = almidón. Imagen adaptada de Austin *et al.*, 2006.



Introducción

Aunque se trata de una familia de proteínas diversa, muestra bastante conservación en sus secuencias en las regiones amino y carboxilo terminales. Algunas poseen dominios exclusivos a las demás FBNs, como el dominio de tipo lipocalina (DLDKLQGWRLLY) de FBN4 entre los aminoácidos 131-143 de la proteína no procesada. Dicho residuo está muy bien conservado en FBN4 de diversas especies, pero no en el resto de FBNs (Singh *et al.*, 2011). Las lipocalinas se caracterizan por tener estructuras compactas y estables formadas por un barril con 8 láminas beta antiparalelas en cuyo interior se encuentra un sitio de unión a ligandos que interactúa con una gran variedad de moléculas pequeñas hidrófobas, incluyendo esteroides, retinoides, bilinas y lípidos (Charron *et al.*, 2015; Schiefner y Skerra, 2015).

1.5.3. Expresión génica

Las FBNs se expresan en muchos tejidos diferentes, aunque sus niveles de expresión varían claramente de un tejido a otro. FBN1 en *Solanum demissum* es conocida como proteína inducida por luz ("light-induced protein") y anteriormente como C40.4. Es equivalente a CDSP 34 en *Solanum tuberosum*. Ha sido detectada en hoja, tallo y raíces, siendo en las hojas donde es más abundante (Monte *et al.*, 1999). En varias especies de café (*Coffea arabica* y *Coffea canephora*), FBN1 se expresa principalmente en las flores, aunque también puede verse expresión en las hojas (Simkin *et al.*, 2008). En *Arabidopsis*, FBN1a se expresa mayoritariamente en células del mesófilo y en células guarda (Yang *et al.*, 2006). Un ejemplo de expresión diferencial entre FBN1a y FBN1b se encuentra en *Brassica rapa*, donde la primera se expresa fuertemente en semillas, hojas y anteras, mientras que la segunda posee una expresión más fuerte en pétalos amarillos. Por otro lado, en esta misma especie, FBN2 posee unos niveles bajos de expresión en pétalos, anteras, sépalos, pistilo, semillas, frutos y hojas (Kim *et al.*, 2001).

El estado del cloroplasto también puede condicionar la expresión de estas proteínas. Mutantes de *Arabidopsis* carentes de una proteasa cloroplastídica (CLPR), con un retraso en el crecimiento, un aumento de los PGs y un fenotipo verde pálido, muestran un aumento de la expresión de FBN1a y FBN1b (Rudella *et al.*, 2006; Zybailov *et al.*, 2009). Un efecto similar, como hemos mencionado anteriormente, ha sido observado en tomate, donde plantas sobreexpresoras de FBN1 de pimiento hace que la transición cloroplasto-cromoplasto se vea retrasada (Simkin *et al.*, 2007).

El estado de desarrollo de la planta también influye en la expresión de los genes de FBNS. En *Brassica rapa* decae la expresión de FBN1b durante la senescencia foliar (Kim *et al.*, 2001). En *Solanum demissum*, la expresión de FBN1 se induce durante el proceso de tuberización.



Igualmente presenta una regulación circadiana, con un pico de RNAm y de proteínas al final del período de luz diaria (Monte *et al.*, 1999).

Las hormonas son otro de los elementos que pueden modificar la expresión de estas proteínas. Las giberelinas, por ejemplo, aumentan la acumulación de carotenoides en flores de *Crocus sativus* y activan la expresión de FBN1. En dicha especie, el promotor de este gen posee 9 copias de elementos que responden a giberelinas (Leitner-Dagan *et al.*, 2006). Otras hormonas, como las auxinas, también influyen en la expresión de los genes de FBNs retrasando la acumulación de FBN1 en los cromoplastos de los frutos de *Capsicum annuum*. El ácido abscísico, por el contrario, acelera dicho proceso (Deruère *et al.*, 1994).

1.5.4. Función de las fibrilinas

Se han realizado un gran número de trabajos con FBNs, aunque solo con algunas de ellas, de diferentes organismos y en distintas condiciones de cultivo. A pesar de esto, el amplio número de proteínas de esta familia unido a la, por lo general, alta homología existente entre sus miembros han sido un obstáculo a la hora de establecer sus funciones con precisión.

Aun así, uno de los aspectos más estudiados y mejor conocidos es la influencia que ejercen diferentes condiciones de estrés, tanto biótico como abiótico, en la expresión de las FBNs.

1.5.4.1. Integrantes de la subfamilia 1-2

Estudios filogenéticos muestran que FBN1a, FBN1b y FBN2 forman una subfamilia (Laizet *et al.*, 2004). Poseen regiones hidrófobas homólogas e intrones en posiciones casi idénticas (Laizet *et al.*, 2004; Singh y McNellis, 2001).

Hay numerosos estudios sobre las FBNs 1a y 1b o sus ortólogos en diferentes especies de plantas (Leitner-Dagan *et al.*, 2006; Caplan *et al.*, 2009). Existe una influencia clara de distintos tipos de estreses abióticos, como calor, baja temperatura (Laizet *et al.*, 2004), alta intensidad lumínica (Yang *et al.*, 2006) o sequía (Eymery, 1999; Kim *et al.*, 2001; Laizet *et al.*, 2004) sobre la expresión de este grupo de FBNs. Las expresiones de los genes ortólogos de FBN1 en *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum*, CDSP 34, aumentan en condiciones de estrés por sequía y por alta intensidad lumínica (Gillet *et al.*, 1998). Se ha propuesto que estas proteínas desempeñan un papel en la protección de la planta frente a estreses abióticos, aunque no se ha descrito el mecanismo por el que realizarían dicha función.

También se ha propuesto que estas proteínas tienen un papel estructural en los PGs. Así, se ha visto que la proteína FBN1 de *Capsicum annuum* purificada combinada con carotenoides,



Introducción

lípidos polares y diésteres de xantofila puede reconstituir *in vitro* las fibrillas de carotenoides observadas en cromoplastos de *C. annuum* (Deruère *et al.*, 1994). Igualmente, la sobreexpresión del ortólogo de las FBN1s en *Nicotiana tabacum* produce más PGs y de mayor tamaño (Rey *et al.*, 2000; Shanmugabalaji *et al.*, 2013).

Youssef *et al.* (2010) llevaron a cabo un estudio con plantas de *Arabidopsis thaliana* con los niveles de las tres proteínas de este subgrupo reducidos mediante la técnica del RNAi. Los autores realizaron los distintos análisis en el mutante triple “knock down”, pero no en los distintos mutantes simples. Plantas con niveles reducidos de estas tres proteínas presentaron mayores niveles de fotoinhibición del PSII frente a una combinación de estreses por alta luz y baja temperatura. También describieron una anormal organización de las MTs. Igualmente, describieron una serie de alteraciones fisiológicas, como un retraso en el crecimiento del mutante triple, un déficit en la acumulación de antocianinas y un patrón de expresión atípico de algunos genes inducidos por jasmonato, todo ello bajo el mismo estrés. Estas características fenotípicas fueron similares en un mutante deficiente de jasmonato y fueron abolidas al tratar las plantas con dicha hormona. Los autores sugieren que el jasmonato tendría una función, no descrita hasta la fecha, en la aclimatación de los cloroplastos a estreses abióticos y que la biosíntesis de jasmonato provocada por estrés (de frío y luz) está condicionada por la acumulación de las proteínas analizadas (FBN1a, FBN1b y FBN2).

1.5.4.2. FBN4

La mayor parte de los estudios realizados en esta FBN han sido llevados a cabo en *Arabidopsis* y en manzano (*Malus domestica*), empleando mutantes “knock out” por inserción de T-DNA (*fbn4-1* y *fbn4-2* en *Arabidopsis*) o “knock down” (*fbn4* KD en manzano) (Singh *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012).

Los autores observaron que el número de PGs totales en *fbn4* KD era igual al observado en plantas WT, aunque la osmiofilidad de los PGs cloroplásticos era menor. El mutante *fbn4* KD posee tres lípidos en sus PGs en menores cantidades que plantas silvestres, de entre los cuales uno de ellos es la PQ-9, un componente lipídico mayoritario en esos suborgánulos. De hecho, el contenido en PQ en los PGs en el mutante es de menos del 10% del que posee una planta silvestre, mientras que el contenido en PQ total en el cloroplasto es similar en ambas líneas de plantas. Los autores del estudio defienden que estos resultados indican que FBN4 es requerida para la acumulación de PQ y de otros lípidos en los PGs (uniéndose a ellos a través de su residuo de lipocalina y transportándolos desde y hacia los PGs) y que la disminución en su contenido en



el mutante es consistente con resultados como la disminución en la osmiofilidad de los PGs (Singh *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012).

Dicho mutante también produce una mayor cantidad de antocianinas que la planta silvestre cuando la intensidad lumínica a la que es sometida aumenta (Singh *et al.*, 2010).

En base a estos resultados, los autores sugieren que las funciones de FBN4 serían la de transportar ciertos elementos hacia dentro y hacia fuera de los PGs y la de proteger frente al estrés provocado por una alta intensidad lumínica. También defienden que podría estar implicada de alguna manera en el desarrollo de los PGs.

1.5.4.3. FBN5

Como hemos mencionado previamente, FBN5 de *Arabidopsis* se localiza en el estroma y no en los PGs (Lundquist *et al.*, 2012a). Es esencial para la biosíntesis de PQ-9 mediante su unión a SPS1 y SPS2, enzimas implicadas en la síntesis de la parte solanesil de PQ-9. La ausencia de la proteína FBN5 es letal para *Arabidopsis* y los estudios se han llevado a cabo en plantas con niveles de expresión reducidos de FBN5. Estas plantas muestran menores tasas de crecimiento que el WT y acumulan menos cantidad de PQ-9 y de su producto, PC-8, aunque los niveles de vitamina E no se vieron afectados. También muestran menor tasa fotosintética y niveles mayores de peróxido de hidrógeno bajo condiciones de estrés por frío. Todo esto indica que FBN5 es requerida para la biosíntesis de PQ-9 a través de su interacción con SPS1 y SPS2, posiblemente al unirse a la fracción solanesil (hidrofóbica) de estas enzimas y generando un complejo homodimérico FBN5/SPS que estimula la actividad enzimática de las mismas (Kim *et al.*, 2015).

1.5.4.4. FBN6

FBN6 es la única proteína de la familia de las FBNs que se encuentra en fracciones purificadas de la envoltura (Bouchnak *et al.*, 2019). Estudios *in vivo*, mediante la fusión a la proteína verde fluorescente ("green fluorescent protein", GFP), muestran que FBN6 se localiza en fracciones de las MTs y de la envoltura (Lee *et al.*, 2019).

Esta proteína se coexpresa preferentemente con genes que codifican componentes de la maquinaria fotosintética, como proteínas del centro de reacción del PSI, del LHC y del OEC (PsbY, PsbO1 o Lchb6). La pérdida de FBN6 en *Arabidopsis thaliana* conduce a la perturbación de la homeostasis de ROS, lo que podría sugerir que esta proteína forma parte de la maquinaria de secuestro de estos compuestos. Las plantas carentes de esta proteína también poseen mayores niveles de glutatión. Ambos factores podrían explicar el fenotipo de retraso en el crecimiento que poseen estas plantas. También poseen un metabolismo del sulfato alterado, concretamente una alteración en la reducción del sulfato, que puede ser la causa de la tolerancia a cadmio



Introducción

observada en estas plantas. En ellas, además, al ser sometidas a intensidades lumínicas moderadas, las hojas primarias comienzan a decolorarse y a contener PGs agrandados. En definitiva, FBN6 parece permitir que las plantas sean resistentes a estrés por intensidades lumínicas moderadas, además de favorecer la tolerancia a niveles tóxicos de cadmio (Lee *et al.*, 2019).

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

2. MATERIALES Y MÉTODOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

2.1.1. *Arabidopsis thaliana*

Para la realización del presente trabajo se ha utilizado la cepa silvestre de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0), perteneciente a la familia de las Brassicáceas. Las líneas mutantes simples utilizadas provienen de las colecciones de líneas de inserción de T-DNA del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK (SIGnAL, <http://signal.salk.edu>) y de GABI-KAT (<https://www.gabi-kat.de>), mantenidas en el Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, <http://arabidopsis.info>), en Reino Unido. Las diferentes líneas mutantes dobles, triples y cuádruples se han obtenido mediante cruces. La Tabla 2.1 recoge la información de cada una de las líneas mutantes empleadas.

Mutante	Locus	Identificador	Deficiencia	Referencia	Mutación
<i>fbn1a-fbn1b</i>	At4g04020/ At4g22240	SALK_024528 y SAIL_384_a10 respectivamente	Ausencia de FBN1a y FBN1b	Gámez- Arjona 2014b	Primer exón y tercer exón respectivamente
<i>fbn2</i>	At2g35490	SALK_124590	Ausencia de FBN2	Alonso, 2003	Primer exón
<i>fbn4-1</i>	At3g23400	SALK_014831	Ausencia de FBN4	Singh <i>et al.</i> , 2010	Cuarto exón
<i>fbn4-2</i>	At3g23400	SALK_122950	Ausencia de FBN4	Singh <i>et al.</i> , 2010	5'UTR
<i>fbn1a-fbn1b- fbn2</i>			Ausencia de FBN1a, FBN1b y FBN2	Esta tesis	
<i>fbn2-fbn4</i>			Ausencia de FBN2 y FBN4	Esta tesis	
<i>fbn1a-fbn1b- fbn2-fbn4</i>			Ausencia de FBN1a, FBN1b, FBN2 y FBN4	Esta tesis	
<i>ape1-1</i>	At5g38660	SALK_133182	Ausencia de APE1	Alonso, 2003	Tercer intrón
<i>ape1-2</i>	At5g38660	GABI_174C06		Kleinboelting, 2012	Primer intrón

Tabla 2.1: Mutantes empleados en este trabajo. La tabla indica la proteína eliminada, el código AGI, el identificador de la línea mutante, la deficiencia del mutante, dónde se obtuvo y dónde se localiza la mutación.



2.1.1.1. Condiciones de cultivo en tierra de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas se vernalizaron durante 4 días mediante incubación en agua, oscuridad y frío (4°C) para la sincronización de la germinación. Posteriormente se sembraron en turba vegetal COMPO SANA®-Universal previamente humedecida. Las plantas se crecieron en fitotrón (Radiber S.A. o Aralab Climatic Chamber FITOCLIMA D1200 PLLH) o en cámaras de crecimiento de plantas (Aralab Climatic Chamber FITOCLIMA 12000 PLH) bajo un fotoperíodo de 16h de luz/8h de oscuridad (condiciones de día largo o DL) o bajo un fotoperíodo de 8h de luz/16h de oscuridad (condiciones de día corto o DC). La temperatura en las cámaras fue de 22°C durante el día y 20°C durante la noche, mientras que en el fitotrón era igual que en las cámaras o 10°C durante todo el día para los ensayos donde intervenía estrés por baja temperatura. La humedad relativa fue del 70% en todos los casos. La intensidad lumínica al nivel de las plantas era de 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ tanto en el fitotrón como en las cámaras, excepto en ensayos con estrés por alta intensidad lumínica (AL, 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Las plantas eran regadas con agua cada 3-4 días.

2.1.1.2. Condiciones de cultivo *in vitro* y esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*

El proceso de esterilización de semillas se realizó mediante incubación durante 5 minutos en una solución de esterilización* (véase Recetario) y cinco lavados posteriores con agua estéril. Una vez esterilizadas, se sembraban en placas de Petri estériles con medio MS 1X* suplementado con sacarosa al 2% (p/v). En el caso de semillas de plantas transformadas con el fragmento genómico de FBN2, el medio se suplementó con kanamicina a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. Una vez sembradas, la germinación de las semillas se coordinaba mediante incubación de las placas de Petri en oscuridad a 4°C durante 4 días.

2.1.2. *Nicotiana benthamiana*

Los experimentos de localización de proteínas mediante fusión traduccional a la proteína testigo GFP y de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) se llevaron a cabo con plantas de *N. benthamiana*, perteneciente a la familia de las *Solanáceas*.

2.1.2.1. Condiciones de cultivo en tierra de *Nicotiana benthamiana*

Las plantas de *N. benthamiana* se cultivaron en invernadero bajo un fotoperíodo de 16h de luz/8h de oscuridad. La turba empleada fue COMPO SANA®-Universal previamente humedecida. Las plantas se regaron con agua cada 3-4 días.



2.1.3. *Escherichia coli*

En el presente trabajo se han empleado las estirpes de *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) y BL21 (Invitrogen).

2.1.3.1. Cultivo en medio líquido de *Escherichia coli*

Escherichia coli se cultivó en medio Luria-Bertani (LB*) (Sambrook *et al.*, 1989). Dependiendo del volumen del cultivo se emplearon tubos de ensayo o matraces erlenmeyers, manteniendo una proporción volumen líquido:volumen vacío de 1:4 para una buena aireación y un crecimiento óptimo del cultivo. La incubación de los cultivos se llevó a cabo en un incubador (Innova®43) a 37 °C de temperatura y 200 revoluciones por minuto (rpm) de agitación orbital. Todo el material empleado, junto a los medios, tubos de ensayo y matraces erlenmeyers eran previamente esterilizados en autoclave. Los antibióticos añadidos al medio eran esterilizados por filtración a través de membranas de polietersulfona (PES) de 0,22 μ m de diámetro de poro. Para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, según la resistencia que confiriese el plásmido usado, el medio LB se suplementaba con el correspondiente antibiótico. Las concentraciones finales en el medio empleadas fueron: ampicilina 50 μ g/ml, gentamicina 25 μ g/ml, kanamicina 50 μ g/ml y espectinomicina 25 μ g/ml.

2.1.3.2. Cultivo en medio sólido de *Escherichia coli*

El cultivo en medio sólido se realizaba en medio LB suplementado con bacto-agar 15 g/l (LB-agar). Las placas se incubaban en una estufa a 37 °C. Para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, al igual que en el medio líquido, el medio se suplementaba con ampicilina, gentamicina, kanamicina o espectinomicina a las mismas concentraciones finales que las empleadas para el cultivo en medio líquido.

2.1.4. *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación genética de *A. thaliana* y los ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* se utilizó la estirpe de *A. tumefaciens* C58C1 (Wood *et al.*, 2001).

2.1.4.1. Cultivo en medio líquido de *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens se cultivaba en medio LB a 30 °C y a 175 rpm en un incubador Innova®43. Igual que en el cultivo de *E. coli*, se emplearon tubos de ensayo o matraces erlenmeyers dependiendo del volumen del cultivo, manteniendo una proporción líquido:volumen vacío de 1:4 para una buena aireación y un crecimiento. Igualmente, todo el material empleado, junto a los medios, tubos de ensayo y matraces erlenmeyers eran previamente esterilizados en autoclave. Los antibióticos añadidos al medio eran esterilizados por filtración a través de



Materiales y Métodos

membranas PES de 0,22 μm de diámetro de poro. Los antibióticos usados eran rifampicina, a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$ en todos los casos, puesto que la estirpe empleada es resistente a dicho antibiótico (Hood *et al.*, 1993); y kanamicina (concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$), tanto para estirpes transformadas con el vector pPZP211 (empleado en la transformación de *A. thaliana*) como para estirpes transformadas con los vectores utilizados en los ensayos de BiFC y aquellas transformadas con el vector pEarlyGate103 (pEG103).

2.1.4.2. Cultivo en medio sólido de *Agrobacterium tumefaciens*

El cultivo en medio sólido se realizaba en medio LB-agar suplementado con rifampicina a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. Para la selección de colonias portadoras de vectores (pPZP211, pXNGW, pXCGW o pEG103), al igual que en el medio líquido, el medio se suplementaba con kanamicina (concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$). Las placas se incubaban en una estufa a 30 $^{\circ}\text{C}$.

2.1.5. *Saccharomyces cerevisiae*

Para el ensayo de doble híbrido se emplearon dos cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas utilizadas fueron Y2HGold e Y187, cuyos tipos sexuales son MATa y MAT α respectivamente. Ambas poseen auxotrofías a adenina, histidina, leucina y triptófano. Ambas estirpes de *S. cerevisiae* carecen del activador transcripcional GAL4, lo cual permite el ensayo de doble híbrido.

2.1.5.1. Cultivo en medio líquido de *Saccharomyces cerevisiae*

Los medios empleados para el cultivo líquido de *S. cerevisiae* fueron tres: como medio rico para el cultivo rutinario de levaduras no transformadas se usó YPDA*; como medio de conjugación se empleó YPDA 2X; como medio mínimo de selección se usó SD*. El medio mínimo se suplementaba con adenina 200 mg/l, leucina 1000 mg/l, histidina 200 mg/l y/o triptófano 200 mg/l según las auxotrofías de la estirpe que se fuese a crecer o a seleccionar. En algunos casos se empleaban además aureobasidina 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y X- α -Gal 20 mg/ml como marcadores.

Saccharomyces cerevisiae se cultivaba a 30 $^{\circ}\text{C}$ y a 150 rpm en un incubador Innova®43. Para la conjugación la agitación orbital era de 50 rpm.

2.1.5.2. Cultivo en medio sólido de *Saccharomyces cerevisiae*

Los medios sólidos se obtenían añadiendo bacto-agar 20 g/l. Del mismo modo que los medios líquidos, los medios sólidos se preparaban de manera diferente según fuese el tipo de selección que se iba a emplear. Las cantidades empleadas de cada aminoácido eran las mismas que las utilizadas en los medios líquidos. Las placas se incubaban a 30 $^{\circ}\text{C}$.



2.2. Obtención de mutantes doble, triple y cuádruple de *Arabidopsis*

2.2.1. Cruce de plantas parentales

Para la obtención de estos mutantes se seleccionaban plantas receptoras de ambos parentales, que serían fecundadas con polen del otro parental. Para facilitar el trabajo, se les cortaban a las plantas receptoras las flores que no iban a ser utilizadas. El hermafroditismo de *A. thaliana* implica que sus flores se autofecundan antes de abrirse, por lo que aquellas flores que eran utilizadas como receptoras debían estar en un estadio temprano de su desarrollo. A dichas flores se les eliminaban los sépalos y los pétalos con ayuda de pinzas y lupa y, una vez comprobado que las anteras aún no estaban amarillas y por tanto la autofecundación no había tenido lugar, se les eliminaban los estambres. Del parental correspondiente se cortaba un estambre de una flor a punto de abrir y se empleaba para fecundar las flores a las que previamente habíamos dejado únicamente con el pistilo. Para ello bastaba únicamente con dar unos toques con la antera sobre el estigma del pistilo “desnudo”. Una parte de los cruces acabarían desarrollando silicuas, mientras que otros abortarían, debido probablemente a daños en algún tejido durante la manipulación. Las silicuas que maduraban, una vez secas, se cortaban para recoger sus semillas. Para la obtención del mutante triple *fbn1a-fbn1b-fbn2* se utilizaron como parentales los mutantes *fbn1a-fbn1b* y *fbn2*; para la obtención del mutante cuádruple *fbn1a-fbn1b-fbn2-fbn4* se usaron los mutantes *fbn1a-fbn1b-fbn2* y *fbn4*; el mutante doble *fbn2-fbn4* se obtuvo por segregación del cruce anterior.

2.2.2. Selección de la progenie

Las semillas resultantes de los cruces, todas ellas heterocigotas para las mutaciones de sus parentales, eran sembradas en tierra y se dejaban florecer y secar. Las semillas resultantes de la autofecundación de las mismas se sembraban también en tierra. Esta generación de plantas presentaba una distribución mendeliana de las mutaciones de los parentales. Se seleccionaban, mediante extracción de DNA genómico (apartado 2.7.3) y PCR (apartado 2.7.9), las plantas homocigotas para las mutaciones que interesaban.

La Tabla 2.2 muestra los cebadores empleados para la selección de las plantas mutantes.

Gen	Alelo amplificado	Oligonucleótidos (5' - 3')
FBN1a	Silvestre	At4g04020_LP_F: CTATCCAGGCCCATTTAGTCC
		At4g04020_RP_R: TCACCGGAAATTAACCTCC
	Mutante	LBb1.3: ATTTTGCCGATTTGGAAC



Materiales y Métodos

At4g04020_RP_R: TCACCGGGAAATTAACCTTCC		
FBN1b	Silvestre	At4g22240_F: AAGAACCCTACTCCAGCTCCGA
		At4g22240_R: TCAAGGATTCAAGAGAGGGCTT
	Mutante	SynLB3: TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGAT
		At4g22240_R: TCAAGGATTCAAGAGAGGGCTT
FBN2	Silvestre	FBN2_SALK_LP: TGTAATCAGCAATCCATTCCG
		FBN2_SALK_RP: TTCAGTCCGTACACCGAATC
	Mutante	Lb1.3: ATTTTGCCGATTCGGAAC
		FBN2_SALK_RP: TTCAGTCCGTACACCGAATC
FBN4	Silvestre <i>fbn4-1</i>	FBN4_LP: TCTTGCTGAGTTTGAATGGG
		FBN4_RP: TTGCCAATCCGTTCTCTCTAC
	Mutante <i>fbn4-1</i>	Lb1.3: ATTTTGCCGATTCGGAAC
		FBN4_RP: TTGCCAATCCGTTCTCTCTAC
	Silvestre <i>fbn4-2</i>	FBN4_2_LP: ACGGCAAATGTTACGTAATC
		FBN4_2_RP: TTCTTTAGCAGCCACTTCAGC
	Mutante <i>fbn4-2</i>	Lb1.3: ATTTTGCCGATTCGGAAC
		FBN4_2_RP: TTCTTTAGCAGCCACTTCAGC
APE1	Silvestre <i>ape1-1</i>	SALK_133182_LP: GATAGGTGCACTACGTCTCGG
		SALK_133182_RP: TCGTGGGAATAATTTGGAC
	Mutante <i>ape1-1</i>	Lb1.3: ATTTTGCCGATTCGGAAC
		SALK_133182_RP: TCGTGGGAATAATTTGGAC
	Silvestre <i>ape1-2</i>	APE1_GABI: AGTATGTGGAAATGGGACTGTAGC
		APE1_R: CTGCGTTAAAATAGGAGTAGCACA
	Mutante <i>ape1-2</i>	APE1_GABI: AGTATGTGGAAATGGGACTGTAGC



GABI_8474: ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT

Tabla 2.2: Oligonucleótidos empleados para la selección de las plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*

2.3. Métodos de caracterización vegetal

2.3.1. Curvas de crecimiento

Las plantas eran cultivadas en tierra en fitotrón o en cámara de crecimiento de plantas. Cada 3-4 días, se cortaba la parte aérea de la planta y se pesaba en una balanza de precisión. El primer punto se tomaba 10 días después de la siembra, unos 3 días después de la germinación, y el último punto se tomaba 28-30 días después de la siembra, cuando la inflorescencia tenía un par de centímetros aproximadamente. Cada punto de la curva contaba con 5-6 plantas, con objeto de obtener un valor medio \pm desviación estándar.

2.3.2. Extracción y cuantificación de pigmentos

2.3.2.1. Carotenoides y clorofilas

Para el aislamiento y cuantificación de las clorofilas y carotenoides se emplearon los métodos descritos por Porra *et al.* (1989) y Lichtenthaler y Buschmann (2001) respectivamente. Se usaban 3-4 plantas completas por cada línea. Cada una, previamente pesada en una balanza de precisión, se introducía en un tubo y se añadía metanol puro suficiente para cubrir por completo la planta. Los tubos se cubrían con papel de aluminio y se incubaban en oscuridad durante toda la noche a 4°C y con agitación. Al día siguiente se medían las absorbancias a 665 nm, 652 nm y 470 nm y se calculaban las concentraciones de pigmentos aplicando las fórmulas en la Tabla 2.3. Tanto los pesos obtenidos como las cantidades de metanol empleadas se tenían en cuenta a la hora de calcular las concentraciones.



µg pigmento/ml metanol	
Clorofila a	Chl a = 16,29 Abs ₆₆₅ – 8,54 Abs ₆₅₂
Clorofila b	Chl b = 30,66 Abs ₆₅₂ – 13,58 Abs ₆₆₅
Clorofilas totales	Chl a + b = 22,12 Abs ₆₅₂ + 2,71 Abs ₆₆₅
Carotenoides	Carotenoides = (1000 Abs ₄₇₀ – 1,63 Chl a -104,96 Chl b) / 221

Tabla 2.3. Ecuaciones empleadas para el cálculo de las concentraciones de clorofilas y carotenoides (Porra *et al.*, 1989; Lichtenthaler & Buschmann, 2001) a partir de las absorbancias indicadas, el peso de cada planta y el volumen de metanol empleado.

2.3.2.2. Antocianinas

Se usaban 3-4 plantas completas por cada línea. Siguiendo el método Rabino y Mancinelli (Rabino & Mancinelli, 1986), se pesaba cada planta en una balanza de precisión, se troceaba y posteriormente se introducía en un tubo al que se añadía 1 ml de Solución de extracción*. Los tubos se incubaban en oscuridad durante 5 h a 4°C y con agitación. Finalmente se medía la absorbancia a 530 nm y 657 nm. Los niveles de antocianina se calculaban mediante la fórmula Niveles de antocianina = (Abs₅₃₀ – 0,2 Abs₆₅₇) / gramos de peso fresco

2.3.3. Técnicas de microscopía

2.3.3.1. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de hojas de *A. thaliana*

Se recogían hojas de plantas silvestres y mutantes de *A. thaliana* crecidas bajo un fotoperíodo de DL tanto en condiciones normales de crecimiento (CN, 22 °C día/20 °C noche y 120 µmol m⁻²s⁻¹) como en condiciones de estrés por alta intensidad lumínica y baja temperatura (ALF, 10 °C y 600 µmol m⁻²s⁻¹). Se cortaban cuadrados de hojas de unos 2 mm² con una cuchilla y se procedía a fijarlos en Solución de fijación I* durante 3 h a 4°C y en vacío. Después, las muestras se lavaban tres veces con el tampón cacodilato manteniendo cada lavado 5 min a 4°C. Posteriormente, se terminaban de fijar las muestras manteniéndolas durante 1 h a 4°C con Solución de fijación II*, para luego volver a lavarse tres veces con agua destilada manteniendo cada lavado 20 min a 4°C. Después de estos lavados, se incubaban con una solución acuosa de acetato de uranilo 2% (p/v) durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente



se deshidrataban en una serie de soluciones con concentración creciente de acetona a temperatura ambiente: 30 min al 50%, 30 min al 70%, 30 min al 90%, 2 incubaciones de 20 min al 100%. Tras ello, se procedía a embeber progresivamente las muestras deshidratadas en la resina Spurr (Sigma) mediante varias incubaciones a temperatura ambiente y agitación, disminuyendo la cantidad de acetona y aumentando la de resina: 1 h en 3:1 acetona 100%/resina, 2 h en 1:1 acetona 100%/resina, 2 h en 1:3 acetona 100%/resina, 2 h en resina Spurr 100%, 12 h en resina Spurr 100% a 4°C, 1 h en resina Spurr 100% a 4°C. La resina se polimerizaba entonces a 70°C durante 7 h (Spurr, 1969). Se obtuvieron secciones ultrafinas (60 nm) al cortar las muestras con un microtomo Leica Ultracut (Viena, Austria) provisto de una cuchilla de diamante. Las secciones se contrastaban con una solución acuosa al 2% de acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds, 1963). Las muestras se observaban entonces con un microscopio electrónico STEM LEO 910 (Oberkochen, Alemania) a 80 kV, equipado con una cámara digital Gatan Bioscan 792 (Pleasanton, CA, USA). Se analizaron secciones de 2 hojas diferentes por cada línea de planta usada y por cada condición ambiental.

2.3.3.2. Análisis mediante microscopía confocal

Para este análisis se usaban hojas de *N. benthamiana* que habían sido infiltradas días antes con *A. tumefaciens* para expresar de manera transitoria diferentes productos génicos a estudiar. Un pequeño trozo de estas hojas se colocaba sobre un porta y se le añadía agua para que las células del mesófilo no perdieran turgencia y se observasen sin dificultad en el microscopio. El microscopio empleado era un microscopio confocal láser de barrido Leica DM6000 (Leica, Microsystems) equipado con un objetivo 63x de inmersión en agua. La expresión de GFP en el ensayo de localización y de YFP/CFP (“yellow fluorescent protein/cyan fluorescent protein”) y autofluorescencia de las clorofilas en el ensayo de BiFC era captada tras excitar con un láser de argón a 488 nm y posteriormente ser detectada a 500-525 nm y 630-690 nm respectivamente.

2.3.4. Determinación de parámetros fotosintéticos

2.3.4.1. Análisis del fotosistema II mediante fluorimetría de amplitud de pulso modulada (PAM)

Las hojas fotosintéticamente activas captan energía de la luz solar mediante los complejos colectores de luz del PSII y del PSI (LHCII y LHCI respectivamente; *light harvesting complex*). La energía lumínica absorbida por el PSII se convierte en energía química mediante procesos fotoquímicos (reducción de las quinonas mediante transferencia electrónica procedente de la clorofila P680). Una parte pequeña de la energía, aquella que no puede ser



Materiales y Métodos

empleada en fotosíntesis, es disipada en forma de calor o de fluorescencia emitida por la clorofila (Chl-F) mediante procesos no fotoquímicos para evitar que un exceso de energía dañe la maquinaria fotosintética. En condiciones fisiológicas normales, la fotosíntesis es predominante frente a los procesos disipativos. Sin embargo, cuando la planta se encuentra ante situaciones adversas, dicha maquinaria no es capaz de trabajar a pleno rendimiento y la energía sobrante debe ser disipada. Como consecuencia de ello, los procesos no fotoquímicos aumentan. Por tanto, la emisión de fluorescencia remite a la eficiencia fotosintética, con la que muestra una relación inversa, y puede proporcionar evidencias directas del mecanismo y dinámica de los primeros eventos de la fotosíntesis (Brooks & Niyogi, 2011; Baker, 2008; Maxwell & Johnson, 2000; Govindjee, 2004).

Chl-F es utilizada como medida indirecta y no invasiva del estado funcional de la planta. En este trabajo se tomaban las medidas de Chl-F con un fluorímetro de pulso de amplitud modulada IMAGING-PAM M-Series instrument (Walz, Efeltrich, Alemania).

Las medidas realizadas con el IMAGING-PAM recibían el nombre de curvas de luz. Antes de realizar las medidas, las plantas se adaptaban a la oscuridad durante 30 min (o 15 min, dependiendo del experimento en cuestión). En una planta adaptada a la oscuridad, los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos están desactivados. Sin embargo, la planta posee una fluorescencia mínima conocida como F_0 al ser iluminada con luz no actínica (1 Hz, intensidad 4). Al aplicar un pulso de 0,8 s de luz saturante ($2700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), los centros de reacción se saturan, de forma que la energía que llega a los fotosistemas está en exceso y parte se disipa en forma de fluorescencia, alcanzando un máximo de emisión, lo que se conoce como F_m o fluorescencia máxima de plantas adaptadas a la oscuridad. Los valores de fluorescencia obtenidos al aplicar luz actínica de intensidad variable se conocen como F' . Una vez realizado el pulso saturante inicial, la planta se adapta a la luz y los subsiguientes pulsos saturantes durante 0,8 s se conocen como F_m' (fluorescencia máxima de plantas adaptadas a la luz), siendo este valor siempre inferior a F_m debido a la existencia de procesos fotoquímicos y no fotoquímicos de disipación, conocido este último como NPQ.

Las curvas de luz eran llevadas a cabo haciendo incidir sobre la planta intensidades crecientes de luz actínica (0, 1, 11, 21, 36, 56, 111, 146, 231, 336, 396, 461, 531, 611, 801, 1076, $1251 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en intervalos de 30 s. Cada período de iluminación acababa con un pulso de luz saturante de $2700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 0,8 s de duración para medir la nueva F_m' en cada punto de la curva.



Con los datos anteriormente descritos se calculaban una serie de parámetros que permitían profundizar en el análisis del proceso fotosintético:

- **Rendimiento cuántico máximo del PSII:** consiste en el cociente F_v/F_m . F_v es la fluorescencia variable y se expresa como $F_m - F_0$. La disminución de este parámetro se considera un indicador de pérdida de función o daño del aparato fotosintético (Bilger *et al.*, 1995).
- **Rendimiento cuántico efectivo del PSII ($\Phi(II)$).** Se calcula como $(F_m' - F') / F_m'$. Este valor es proporcional al rendimiento cuántico del PSII. Las tasas de consumo de ATP y NADPH son los principales factores que determinan $\Phi(II)$. En este nivel de consumo influyen procesos como la conductancia estomática, la fotorrespiración, la tasa de exportación de azúcares, la tasa de regeneración de la ribulosa 1,5-bifosfato, cambios en el transporte electrónico fotosintético o la eficiencia de carboxilación (Baker, 2008).
- **Rendimiento cuántico de la disipación de energía regulada ($\Phi(NPQ)$).** NPQ se determina como $(F_m - F_m') / F_m'$ y, en condiciones en las que la energía de la luz absorbida supera a la capacidad de transformación en energía química de la cadena de transporte electrónico, constituiría un mecanismo de protección de la planta frente a daños de fotoinhibición de gran importancia para la adaptación a corto plazo a cambios en las condiciones ambientales. $\Phi(NPQ)$ se calcula como $1 - \Phi(II) - 1 / (NPQ + 1 + qL (F_m / F_0 - 1))$. Este parámetro aumenta al incrementar la intensidad de la luz actínica en un proceso regulado y dependiente de la acidificación del lumen y la activación de la violaxantina de-epoxidasa (Müller *et al.*, 2001).
- **Rendimiento cuántico de la disipación de energía no regulada ($\Phi(NO)$).** Se calcula como $1 / (NPQ + 1 + qL (F_m / F_0 - 1))$. Este parámetro prácticamente permanece constante a cualquier intensidad y es consecuencia del bloqueo del transporte electrónico provocado por daños irreversibles debidos a reacciones secundarias, como puede ser la formación de ROS.
- **Porcentaje de aceptores primarios reducidos del PSII (1-qL).** qL se calcula como $F_0' (F_m' - F) / ((F_m' - F_0') / F)$. F es la fluorescencia de emisión de la planta adaptada a oscuridad.

2.3.5. Medidas de estrés oxidativo

2.3.5.1. Determinación de los niveles de malondialdehído

La tasa de peroxidación lipídica era determinada midiendo la concentración de malondialdehído (MDA) con ácido tiobarbitúrico (TBA) siguiendo una adaptación de los modelos



Materiales y Métodos

de Buege y Aust (Buege & Aus, 1978) y el kit *Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit* (MAK085, Sigma-Aldrich). Los lípidos peroxidados reaccionan con el TBA y forman malondialdehído. Se pesaban 200 mg de hojas de roseta y se machacaban con una pequeña mano de mortero de plástico en un tubo de microcentrífuga, manteniéndolo en hielo el máximo tiempo posible, con 100 µl de Tampón de extracción*. El BHT que incluye es un antioxidante que se usaba para evitar daños en las membranas durante el proceso. A las muestras trituradas se les añadía otros 100 µl de Tampón de extracción y, una vez homogeneizadas, se centrifugaban durante 30 min a 4°C y 13000 rpm en una centrífuga 5804R y rotor F45-30-11 (Eppendorf).

El sobrenadante se pasaba a un tubo limpio y se le añadían 600 µl de una solución de ácido tiobarbitúrico, se mezclaban vigorosamente y se calentaba durante 60 min a 95°C. Pasado este tiempo, se enfriaba 10 min en hielo. Por último, se medía la absorbancia a 532 nm. La peroxidación se da como concentración de MDA, la cual se calculaba a partir de una recta patrón con cantidades crecientes de MDA (0-20 nmoles) que recibían el mismo tratamiento que las muestras.

2.3.5.2. Detección de la presencia de peróxido de hidrógeno e ion superóxido

Este ensayo se basa en el método de tinción por DAB, usado para la detección de peróxido de hidrógeno, y por NBT, para la detección del ion superóxido (Soursa *et al.*, 2012). La Solución DAB* y la Solución NBT* se preparaban momentos antes de ser usadas y se empleaban tanto en plantas silvestres como en plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Dichas plantas se habían cultivado en tierra.

Para la tinción de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana*, las plantas se cultivaban en tierra y bajo un fotoperíodo de DL durante 23 d o de DC durante 34 d. Una vez pasados estos días tras la siembra de las semillas, a las plantas se les aplicaba un de estrés por ALF durante 7 días. Las medidas se tomaban a 0 y 7 d de estrés en el caso de plantas crecidas en DC y a 0, 1 y 7 d de estrés en el caso de plantas crecidas en DL. No se tomaban medidas de las plantas completas, sino 1-2 hojas de 3 plantas por línea y para cada tinción que, tras ser cortadas, se añadían a tubos Falcon de 15 ml individuales. El compuesto se añadía entonces a dichos tubos hasta cubrir la hoja por completo y se tapaban con papel de aluminio. Se mantenían durante 24 h en oscuridad y bajo las mismas condiciones de temperatura e irradiancia previas. Una vez pasado el tiempo de incubación, los tubos se destapaban y se mantenían en esas condiciones durante 30 min. Para eliminar las clorofilas, las hojas eran entonces lavadas 3-4 veces con etanol 96% e incubando 1h a 45-60°C en cada lavado. Las hojas se mantenían en agua destilada hasta ser fotografiadas.



2.4. Fraccionamiento celular

2.4.1. Aislamiento de cloroplastos y separación de fracciones estromáticas y de membranas

Se seguía el método descrito por Koochak *et al.*, 2019. Las plantas de *Arabidopsis thaliana* se sembraban en tierra y se cultivaban en fotoperíodo de DL durante aproximadamente 28 días. Se recogían 10-30 g de hojas de roseta y se mantenían en hielo hasta ser trituradas. Tras ser recogida toda la muestra, se le añadía el Tampón de trituración*. El volumen total de Tampón de trituración dependía de la cantidad de muestra empleada, usando 45 ml para la cantidad más pequeña de muestra usada y 85 ml para la mayor. Las hojas se trituraban con una batidora *Minipimer 600 Watt Turbo* (BRAUN) en varios ciclos de triturado, alternando 10 segundos de triturado propiamente dicho con 1-2 min de espera para favorecer el enfriamiento de la muestra. Esto se repetía hasta que la misma quedaba completamente triturada. El extracto resultante se filtraba a través de 2 capas de filtro *Miracloth* (Millipore, MA, USA) con un tamaño de poro de 100 μm para eliminar los restos vegetales sobrantes, para seguidamente ser centrifugado durante 2 min a 2.000 x g y 4 $^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se descartaba y el precipitado, formado por cloroplastos aislados, se resuspendía en el Tampón de lisis* para llevar a cabo la lisis de los mismos. La lisis se llevaba a cabo manteniendo la muestra en dicho tampón e incubando durante 10 min en hielo. Posteriormente, el extracto se ultracentrifugaba en una centrífuga *Optima XPN* (Beckman Coulter) durante 1 h a 100.000 x g y 4 $^{\circ}\text{C}$ en tubos apropiados para el rotor SW 32.1 Ti para separar el estroma (SN) de la fracción de membranas.

La concentración de proteínas en cada fracción obtenida era determinada mediante la técnica espectrofotométrica conocida como método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

2.4.2. Fraccionamiento de membranas

Basado en el método empleado por Besagni y cols. (Besagni *et al.*, 2011). El precipitado obtenido (apartado 2.4.1) se resuspendía en 5 ml de Tampón de fraccionamiento*. A continuación, se sonicaba el extracto de membranas durante 15 s con un 10% de amplitud en un sonicador *Digital Sonifier*[®] con un convertidor modelo 102C (101-135-066R) para separar los plastoglobulos de las membranas tilacoidales. El proceso se repetía 3 veces con un período de descanso entre cada sonicación de 59 s. El extracto resultante se ultracentrifugaba, sin freno ni aceleración, en una centrífuga *Optima XPN* (Beckman Coulter) durante 14-18 h a 100.000 x g y 4 $^{\circ}\text{C}$ en tubos apropiados para el rotor SW 32.1 Ti. La ultracentrifugación se llevaba a cabo en un gradiente de sacarosa discontinuo compuesto de 2,5 ml de sacarosa 38% (p/v), 2,5 ml de sacarosa 20% (p/v), 2 ml de sacarosa 15% (p/v) y 3 ml de sacarosa 5% (p/v). Los gradientes se



Materiales y Métodos

hacían por duplicado y se preparaban en el mismo tampón empleado para la sacarosa 45%, la cual era añadida en el fondo del tubo después de preparar el gradiente. Una vez centrifugado, los gradientes se dividieron en distintas fracciones de 500 µl.

Las fracciones obtenidas se analizaban mediante inmunoblot (apartado 2.6.4). Las proteínas en dichas fracciones se precipitaban siguiendo una adaptación del método descrito por Wessel y Flügge (Wessel & Flügge, 1983), para eliminar los restos de lípidos. De los 500 µl de cada fracción se tomaban 200 µl (para las fracciones 1-14 se hacía por duplicado) y se le añadía 160 µl de cloroformo y 480 µ de metanol. La mezcla se agitaba vigorosamente y se completaba con 640 µl de agua. La mezcla se centrifugaba 1 min a máxima velocidad y se eliminaba la parte superior, teniendo en cuenta que las proteínas se posicionaban en la interfase. A la parte restante se le añadía otros 480 µl de metanol y se agitaba vigorosamente. Posteriormente, la muestra era centrifugada durante 5 min a máxima velocidad, tras lo cual se descartaba el sobrenadante casi por completo y el precipitado de proteínas se dejaba secar aproximadamente 30 min en vacío. Finalmente, el precipitado se resuspendía en 2X SDS-SB*. Las fracciones 1-14 eran resuspendidas en 10 µl de 2X SDS-SB, mientras que el resto de fracciones se resuspendían en 20 µl del mismo. Todo el volumen de cada fracción distinta era cargado en gel de poliacrilamida (apartado 2.6.3.1).

2.5. Preparación de extractos crudos vegetales

Para la preparación de extractos crudos vegetales se empleaban hojas de roseta cortadas en el momento del fotoperíodo adecuado para cada ensayo.

Tanto la cantidad de material como el volumen del Tampón de rotura* empleados dependían de cada ensayo en concreto. Por normal general, la cantidad de muestra de *Arabidopsis* empleada para los extractos crudos era de aproximadamente 1 g y el volumen de Tampón de rotura, 1ml.

Para volúmenes pequeños, las hojas se trituraban con una trituradora *Tissue Tearor™* (Biospec products, INC). Para volúmenes grandes, se trituraban con una batidora BRAUN *Minipimer 600 Watt Turbo* (BRAUN).

Los restos de hojas se eliminaban mediante centrifugación durante 15-30 min a 14.000 rpm y 4°C en una centrífuga 5804R y rotor F45-30-11 (Eppendorf), tras lo cual los extractos solubles se recuperaban y conservaban a 4°C.



2.6. Métodos de análisis de proteínas

2.6.1. Determinación de la concentración de proteínas

La cuantificación del contenido proteico se realizaba mediante el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). A cada muestra, en un volumen final de 200 µl en agua, se le añadían 50 µl de NaOH 0,5 N y 750 µl de una disolución obtenida al mezclar en proporción 100:1 la Solución A* y la Solución B*, respectivamente. La mezcla se agitaba brevemente mediante inversión y se incubaba 5 min a 37°C. Seguidamente, se le añadían 75 µl del reactivo Folin-Ciocalteu preparado en agua a una proporción 1:1 y las muestras se incubaban de nuevo 5 min a 37°C. Para finalizar, se medía la absorbancia a 750 nm y se determinaba la concentración de proteínas con una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA. Esta recta patrón se trataba de la misma forma que las muestras a analizar.

2.6.2. Concentración de fracciones proteicas

Cuando la concentración de proteínas era demasiado pequeña para su visualización en gel teñido con Coomassie o en inmunoblot, se precipitaba con acetona a -20 °C.

Se añadía a la muestra 4 veces su volumen de acetona -20 °C y se mezclaba bien por inversión. Se incubaba entonces aproximadamente 30 min a -20 °C y posteriormente se centrifugaba durante 10 min a máxima velocidad en una centrífuga de mesa y 4 °C. Por último, se descartaba el sobrenadante y se dejaba secar 5-10 min a temperatura ambiente el precipitado para eliminar los restos de acetona.

2.6.3. Separación de proteínas mediante electroforesis

2.6.3.1. En condiciones desnaturalizantes

La separación analítica de proteínas en condiciones desnaturalizantes era llevada a cabo mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) en presencia de SDS (SDS-PAGE) empleando el sistema discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970).

Dependiendo del ensayo, los geles que se usaban se compraban ya preparados, *Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels* (Bio-Rad) o se preparaban en el momento de la forma descrita a continuación. El gel de separación se preparaba a una concentración de poli(acrilamida) del 10% (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) y SDS 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8,8. El gel de empaquetamiento se preparaba a una concentración de poli(acrilamida) del 4% (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) y SDS 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 125 mM pH 6,8. Los geles eran polimerizados mediante la adición de persulfato amónico (APS) 0,1% (p/v) y N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED) 6,6 mM como agentes catalizadores de la polimerización.



Materiales y Métodos

A las muestras se les añadía tampón de carga 2X SDS-SB. Posteriormente se hervían 5 min a 95°C antes de ser cargadas en el gel. Como patrón de tamaño se utilizaba el marcador de masa molecular Page Ruler® Prestained Protein Ladder (Fermentas), con un rango de pesos moleculares de 10-170 kDa. El grosor de los geles era de 0,75 mm y la electroforesis se llevaba a cabo en Tampón de corrida A* y en una cubeta Mini Protean® Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 100 V durante 1,5 h a temperatura ambiente.

2.6.3.2. En condiciones nativas

La separación analítica de proteínas en condiciones nativas se llevaba a cabo prácticamente de la misma forma que en condiciones desnaturalizantes (apartado 2.6.3.1). Las únicas diferencias correspondían a la preparación de los geles y los tampones.

En la preparación de los geles, tanto el de separación como el de empaquetamiento no poseían SDS. Por último, las muestras eran cargadas directamente, sin hervir, tras ser mezcladas con el tampón 2X SB*.

Para este caso, la composición del Tampón de corrida B* también era diferente.

2.6.4. Inmunodetección de proteínas (immunoblots)

En primer lugar, se realizaba la transferencia de las proteínas de un gel de poli(acrilamida a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,2 µm de diámetro de poro, incluidas en el kit de transferencia *Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi 0,2 µm PVDF Transfer Kit* (Bio-Rad), mediante el sistema de transferencia *Trans-Blot® Turbo™ Blotting System* (Bio-Rad). La transferencia se llevaba a cabo habitualmente siguiendo el protocolo *Mixed MW*, predefinido en el aparato de transferencia, a una intensidad de corriente continua de 1,3 A durante 7 min. Tras la transferencia se incubaba la membrana durante 1,5 h a temperatura ambiente y con agitación en Solución de bloqueo*. Con ello se conseguía la saturación de la membrana. A continuación, se incubaba durante 1 h con una dilución adecuada del anticuerpo primario preparado en Solución de bloqueo. En la Tabla 2.4 se pueden ver los distintos anticuerpos primarios utilizados en esta tesis y sus diluciones correspondientes.



Nombre	Dilución	Referencia	Característica
Anti-FBN2	1:5000	Esta tesis	Reconoce la secuencia de aminoácidos RSSLPSESESESDL de FBN2
Anti-FBN2 Co-IP	No aplica	Esta tesis	Reconoce la secuencia completa de aminoácidos de FBN2
Anti-FBN4	1:1000	Esta tesis	Reconoce la secuencia de aminoácidos CPDSFRPSSNPGTGD de FBN4
Anti-FBN4 Co-IP	No aplica	Esta tesis	Reconoce la secuencia completa de aminoácidos de FBN4
Anti-FBN1a	1:5000	Agrisera	Reconoce a FBN1a y se usa como marcador de plastoglobulos
Anti-At3g53470	1:1000	Esta tesis	Reconoce la secuencia completa de aminoácidos de At3g53470
Anti-Psba	1:8000	Agrisera	Reconoce a la proteína D1 del PSII de <i>A. Thaliana</i> y se usa como marcador de membranas tilacoidales
Anti-GLN2	1:5000	Agrisera	Reconoce a la glutamina sintetasa cloroplástica de <i>A. thaliana</i>
Anti-GAL4	1:5000	Clontech	Reconoce 147 aminoácidos de la parte amino terminal del factor de transcripción GAL4 de <i>Saccharomyces</i>

Tabla 2.4: Anticuerpos primarios empleados en esta Tesis Doctoral

Tras la incubación con el anticuerpo primario, la membrana era lavada 3 veces con Solución de lavado* para eliminar los anticuerpos unidos a la membrana de forma inespecífica. Por regla general se daba un lavado rápido con abundante Solución de lavado seguida de un lavado de 15 min, otro de 10 min y un último lavado de 5 min. Posteriormente, la membrana era incubada durante 1 h con el anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate a una dilución 1:50.000 en Solución de bloqueo o con el anticuerpo secundario Goat Anti-Chicken IgY



Materiales y Métodos

(H + L) HRP Conjugate (Agrisera) a una dilución 1:10.000 en Solución de bloqueo. Todas las incubaciones con anticuerpos primarios y secundarios y con Solución de lavado eran realizadas a temperatura ambiente y con agitación. Para finalizar, se llevaba a cabo la detección de la unión antígeno-anticuerpo gracias a la actividad peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario, la cual actúa sobre el sustrato del kit *WesternBright® Quantum®* (advansta) dando lugar a un producto quimioluminiscente. La membrana de PVDF era incubada 5 min en oscuridad con una solución 1:1 de los reactivos presentes en el kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La visualización de la señal se llevaba a cabo exponiendo la membrana a un aparato de captación de imágenes *Chemidoc™ Imaging System* (Bio-Rad) durante un tiempo variable de 1-15 min.

2.6.4.1. Tinción de proteínas en membranas de PVDF con azul Coomassie

La visualización de las proteínas transferidas por electroforesis se llevaba a cabo mediante tinción con la solución Coomassie Blue*. La membrana se incubaba con el reactivo anterior a temperatura ambiente y con agitación durante aproximadamente 15 min, seguida de 4-5 lavados con Solución desteñidora*.

2.6.5. Rastreo de proteínas que interaccionen con FBNs mediante ensayo de doble híbrido en levadura

Para este ensayo se empleó el sistema *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System* (Clontech, PT3247-1 (PR742219)) siguiendo las instrucciones del manual de usuario (Cat. N.º 630489). Dicho sistema se basa en la reconstrucción del activador transcripcional GAL4 cuando interaccionan 2 proteínas de fusión. Ambas proteínas se denominaban proteína cebo o X, unida al dominio de unión al DNA de GAL4 (BD), y proteína presa o Y, unida al dominio de activación (AD). Estas proteínas no son capaces por sí solas de activar la transcripción de los genes testigos dependientes de GAL4. Cuando la proteína X se expresa en levadura, el BD de GAL4 se une a la región reguladora del gen testigo, siendo esto insuficiente para activar la transcripción. Cuando la proteína Y se expresa en levadura, el AD de GAL4 puede unirse a otros componentes de la maquinaria de transcripción, pero tampoco puede activar la transcripción del gen testigo, en este caso por no localizarse en la región reguladora. Sin embargo, cuando se expresan las proteínas X e Y en un diploide, tanto el BD como el AD de GAL4 se localizan en la región reguladora, permitiendo así la transcripción de los genes testigos en la célula diploide originada. En el sistema *Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid*, los genes testigos son AUR1-C, HIS3, ADE2 y MEL1. La expresión de AUR1-C en *Saccharomyces cerevisiae* confiere resistencia a aureobasidina A. La expresión de HIST3 y ADE2 permite sintetizar a la levadura tanto histidina como adenina y crecer así en un medio carente de este aminoácido esencial y de esta base



nitrogenada. La expresión de MEL1 permite a la célula secretar α -galactosidasa, una enzima que le da a la levadura un tono azulado en presencia del sustrato X- α -Gal. En esta tesis doctoral, la secuencia codificante de la parte amino terminal del gen FBN4 se fusionó al dominio BD. Para ello, su secuencia codificante se clonó en el vector pDEST-GBKT7, el cual confería prototrofia a triptófano, y seguidamente se transformó la estirpe Y2HGold de *Saccharomyces cerevisiae*. Además, se hacían tres ensayos como control: test de autoactivación para comprobar que las proteínas recombinantes no activaban por sí solas los genes reporteros; test de toxicidad para comprobar que las proteínas de fusión no eran letales para la levadura; test de expresión para comprobar que la proteína de fusión se expresaba correctamente en la levadura. Para este último, un cultivo de Y2HGold transformado con la construcción se inoculaba en medio YPDA. Aproximadamente 8 horas después, una vez que el cultivo alcanzaba una DO_{600} de 0,4-0,6, se enfriaba añadiéndole hielo y agua respectivamente en dos pasos sucesivos y centrifugando tras cada uno de ellos. El precipitado resultante se resuspendía en una solución precalentada y conocida como Cracking buffer*. Posteriormente, se añadía a la resuspensión bolas de vidrio, se calentaba a 70°C para luego ser centrifugado y el precipitado se resuspendía en 2X SDS-SB. Seguidamente se procedía como se indica en el apartado 2.6.3.1. Para llevar a cabo la búsqueda de interactores, se utilizó una genoteca de *Arabidopsis* de la casa comercial Takara clonada en el vector pGADT7-RecAB, el cual confería resistencia a leucina y se transformó la estirpe Y187. Esta genoteca contenía el DNAC procedente de una cantidad representativa de RNAm de *Arabidopsis thaliana*, transcrito en distintas condiciones de cultivo. La genoteca estaba normalizada para eliminar los RNAs con un exceso de representación. Para la conjugación, las distintas estirpes Y2HGold y la genoteca de Takara se cultivaban durante 24 h en medio YPDA 2x. Posteriormente, cada una de las estirpes Y2HGold se incubaba con la genoteca durante 24-36 h, a 30°C y 50 rpm de agitación orbital. Tras esto, las células se sembraban en 4 medios diferentes: SD-Trp, donde crecían las células con el plásmido pDEST-GBKT7, para comprobar que las células crecían correctamente; SD-Leu, donde crecían las células con el plásmido pGADT7-RecAB de la genoteca, para comprobar que las células crecían correctamente; SD-Leu-Trp, donde crecían las células diploides, permitía estimar mediante diferentes diluciones seriadas el número de diploides obtenidos, es decir, el número aproximado de interacciones que se probaron; SD-Leu-Trp-His-Ade más aureobasidina y X- α -Gal, donde crecían solo aquellos diploides donde existía interacción. La Tabla 2.5 muestra el crecimiento (+) o no crecimiento (-) de las diferentes estirpes en varios medios SD.



Estirpe	Aureobasidina	SD-Ade	SD-His	SD-Leu	SD-Trp
Y2HGold	-	-	-	-	-
Y187	-	-	-	-	-
Y2HGold (pDEST-GBKT7)	-	-	-	-	+
Y187 (pGADT7-RecAB)	-	-	-	+	-
Células diploides [pDEST-GBKT7 + pGADT7-RecAB]	**	*	*	+	+

Tabla 2.5: Medios SD para testar fenotipos durante el ensayo de doble híbrido. *Las células diploides solo crecían en ausencia de histidina y adenina si había interacción entre las proteínas testadas. **Antibiótico utilizado también como marcador de interacción entre las proteínas testadas.

Los diploides que crecían en medio sin histidina, sin adenina, sin triptófano, sin leucina, con aureobasidina y que adquirían un tono azul se analizaban para saber qué proteína de la genoteca interaccionaba con nuestro cebo. Para ello, la colonia diploide se hervía a 100°C durante 10 min y se usaba como molde en PCR con oligonucleótidos específicos. Los cebadores flanqueaban la región de inserción del DNAC de la genoteca en el vector pGADT7-RecAB. Los productos de estas reacciones de amplificación se secuenciaban y, mediante la base de datos (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se determinaba la proteína que interaccionaba con nuestro cebo.

2.6.5.1. Oligonucleótidos utilizados para las clonaciones del doble híbrido

La Tabla 2.6 muestra los oligonucleótidos utilizados para realizar las construcciones empleadas en los ensayos de doble híbrido.



Gen	Oligonucleótidos (5' – 3')
FBN4	FBN4_attB1_Bait1_F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTCATCATCTGGATCAGGAGGA
	FBN4_attB2_Bait1_R4: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGACCTAAAGACCGAGAAGAGAA
Insertos de la genoteca en el plásmido pGADT7- RecAB	2HY_AD_ampliF: CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC
	2HY_AD_ampliR: GTGAACTGCGGGTTTTTCAGTATCTACGAT

Tabla 2.6: Oligonucleótidos empleados en los ensayos de doble híbrido.

2.6.6. Rastreo de proteínas que interaccionen con FBNs mediante ensayo de coimmunoprecipitación (Co-IP)

Para el análisis de interacción por coimmunoprecipitación (Co-IP) podíamos partir tanto desde la fracción estromática como desde la fracción de membranas (apartado 2.4.1), dependiendo de en cuál se encontrase la proteína de interés. El procedimiento inicial del ensayo difería en base a la fracción usada.

En el caso de la fracción de membranas, se cogía una alícuota de 250 µg de proteínas y se resuspendía en un volumen final de 500 µl de tampón fosfato 100 mM pH 7 suplementado con Tritón X-100, para su solubilización, a una concentración final variable dependiente de la proteína de interés. El Tritón X-100 separaba las proteínas de las membranas tilacoidales y es por esto que la concentración necesitada dependía de la proteína con la que se estuviese trabajando. La mezcla se incubaba entonces durante 30 min a 4 °C para posteriormente ser centrifugada durante 20 min a 20.000 x g y 4 °C. El precipitado de la centrifugación se descartaba y el sobrenadante se empleaba para el ensayo de Co-IP usando anticuerpos policlonales específicos (GenScript) que reconocían las proteínas de interés completas y el kit comercial *Dynabeads™ C-Immunoprecipitation Kit* (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la fracción estromática, se empleaban directamente 250 µg de proteínas para el ensayo de Co-IP sin necesidad de ser solubilizadas.

Una vez realizado el ensayo de Co-IP, se procedía a la precipitación con acetona de las proteínas (apartado 2.6.2). Tras eliminar los restos de acetona del precipitado, los 250 µg de proteínas eran divididos en dos fracciones: 50 µg se empleaban para la inmunodetección de



Materiales y Métodos

proteínas mediante inmunoblot y se procedía como se indica en el apartado 2.6.3.1; los 200 µg restantes eran nuevamente precipitados con acetona y, tras eliminar los restos de disolvente, eran enviados al servicio de Proteómica del IBVF para su posterior análisis.

2.6.7. Expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*

Basado en el método descrito por Marillonnet y cols. (Marillonnet *et al.*, 2005).

Distintos DNAs codificantes se clonaban en diferentes vectores binarios como pXCGW o pXNGW para ser transformados posteriormente en *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. Las bacterias portadoras de plásmidos se cultivaban en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes durante 16-24 h a 30°C y 150 rpm de agitación orbital. Una vez crecidos los cultivos, las células se recogían por centrifugación durante 5 min a 4.000 rpm en una centrífuga 5804R y rotor A-4-44 (Eppendorf). El sobrenadante se eliminaba y las células (precipitado) se resuspendían en 3 ml de Tampón de inducción*. El proceso se repetía 2 veces, con una primera centrifugación de 10 min a 4.000 rpm y una segunda de 5 min a 4.000 rpm. Una vez en el tampón de inducción de nuevo, se incubaba la mezcla 2-3 h a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se recogían nuevamente centrifugando 5 min a 4.000 rpm y posteriormente se resuspendían en 2 ml de MES 10 mM suplementado con acetosiringona 0,2 mM.

Para cada ensayo de expresión transitoria, además de con las estirpes transformadas con uno de los distintos plásmidos para expresión transitoria, la mezcla de infiltración se completaba con una línea de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el vector binario p19. Dicho vector permite la traducción de la proteína p19, la cual inhibe los mecanismos de silenciamiento génico, potenciando así la expresión transitoria de proteínas en plantas. Dicha mezcla de infiltración, antes de infiltrar las hojas de *N. benthamiana* y una vez combinadas todas las estirpes a expresar, debía tener una DO₆₀₀ de 0,1. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se procedía a infiltrar las hojas, provenientes de plantas crecidas durante 3-4 semanas bajo un fotoperíodo de DL. La infiltración se llevaba a cabo de la siguiente manera: la mezcla de las distintas estirpes se introducía en una jeringa y la hoja de *N. benthamiana* se pinchaba con una aguja estéril; el extracto con la mezcla se infiltraba con suavidad a través de la herida provocada en la hoja; al tercer día, se observaban en el microscopio confocal.

2.6.7.1. Complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC)

Los ensayos de BiFC se realizaban con los vectores binarios pXNGW y pXCGW. Ambos vectores permitían una fusión carboxilo terminal de un fragmento de YFP y CFP respectivamente. El plásmido pXNGW posee la secuencia de DNAC que codifica para el fragmento de YFP que va



del aminoácido 1 al 172, mientras que el plásmido pXCGW posee la secuencia de DNAC para el fragmento de CFP que va desde el aminoácido 154 al 239. Ambos vectores provienen del plásmido pPZP312, con un promotor 35S y un terminador de la transcripción CaMV, derivado del plásmido pRT100 (Kim *et al.*, 2009). Los DNAs codificantes de los siguientes genes fueron clonados mediante el sistema Gateway en ambos vectores: FBN4, FBN2, FBN1a, FBN1b, AOS y APE1. Finalmente, con estos vectores se transformaba *A. tumefaciens* mediante electroporación. Cada estirpe portadora del plásmido pXNGW se combinaba con otra portadora de pXCGW y una última conteniendo p19, procediendo a continuación a transformar de forma transitoria hojas de *N. benthamiana* tal como se indica en el apartado anterior.

2.6.7.2. Estudio de localización sub-organular mediante fusión a la proteína fluorescente verde (GFP)

Los ensayos de localización sub-cloroplástica de las proteínas mediante fusión a la proteína testigo GFP se hacían con el vector pEarlyGate103 o con el vector pGWB5, los cuales permiten una fusión traduccional de GFP en el extremo carboxilo de la proteína de estudio. Estos plásmidos poseen un promotor 35S proveniente del virus del mosaico de la coliflor y un terminador de la transcripción CaMV. Los siguientes DNAs codificantes fueron clonados mediante el sistema Gateway en alguno de los vectores: FBN2, FBN4 y APE1. Finalmente, con estos vectores se transformaba *A. tumefaciens* mediante electroporación. Cada estirpe portadora de alguno de los 2 plásmidos de localización se combinaba con otra portadora de p19 y se transformaba de forma transitoria hojas de *N. benthamiana*.

2.6.7.3. Oligonucleótidos utilizados para los experimentos de expresión transitoria

Gen	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Descripción
FBN1a	At4g04020_GatewayC_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA-GGCTTCATGGCGACGGTACAATTGTCC	Usado junto con At4g04020_GatewayC_R para clonar el DNAC del gen FBN1a y añadirle las dianas attB del sistema GATEWAY.
	At4g04020_GatewayC_R	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA-GGCTTCATGGCGACGGTACAATTGTCC	Usado junto a At4g04020_GatewayC_F para clonar el DNAC del gen FBN1a y añadirle las dianas attB del sistema Gateway. Elimina el codón stop para hacer así fusión C-terminal.
FBN1b	PAP1b_GATEWAY_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA-GGCTTCATGGCGACGGTACAATTGTCC	Usado junto con PAP1b_GATEWAY_R para clonar el DNAC del gen FBN1b y añadirle las dianas attB del sistema GATEWAY



Materiales y Métodos

	PAP1b_GATEWAY_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG-GGTCAGGATTCAAGAGAGGGCTTCC	Usado junto a PAP1b_GATEWAY_F para clonar el DNac del gen FBN1b y añadirle las dianas attB del sistema Gateway. Elimina el codón stop para hacer así fusión C-terminal
FBN2	AtFBN2_attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA-GGCTTCATGGCTACGCTCTTACCCTG	Usado junto con AtFBN2_attB2_wostop_R para clonar el DNac del gen FBN2 y añadirle las dianas attB del sistema GATEWAY.
	AtFBN2_attB2_wostop_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG-GGTAGAGCTCAAGCAGAGAGCTTCC	Usado junto a AtFBN2_attB1_F para clonar el DNac del gen FBN2 y añadirle las dianas attB del sistema Gateway. Elimina el codón stop para hacer así fusión C-terminal.
FBN4	AtFBN4_attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA-GGCTTCATGGCGACTTCTTACTTTC	Usado junto con AtFBN4_attB2_wostop_R para clonar el DNac del gen FBN4 y añadirle las dianas attB del sistema GATEWAY
	AtFBN4_attB2_wostop_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT-GGGTAAGCAATGACGAATACCTTAAG	Usado junto a AtFBN4_attB1_F para clonar el DNac del gen FBN4 y añadirle las dianas attB del sistema Gateway. Elimina el codón stop para hacer así fusión C-terminal
At3g53470	At3g53470_attB1_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC-AGGCTATGGACATTACTGTTCGAATC	Usado junto con At3g53470_attB2_R para clonar el DNac del gen At3g53470 y añadirle las dianas attB del sistema GATEWAY
	At3g53470_attB2_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT-GGCTTGACAGGAGCAAGAATGGTG	Usado junto con At3g53470_attB1_F para clonar el DNac del gen At3g53470 y añadirle las dianas attB del sistema Gateway. Elimina el codón stop para hacer así fusión C-terminal
AOS	AOS_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA-GGCTTCATGGCTTCTATTCAACCCT	Usado junto a AOS_attB2 para clonar el DNac del gen AOS en el sistema GATEWAY y añadirle las dianas attb
	AOS_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC-TGGCGAAAAGCTAGCTTTCTTAA	Usado junto a AOS_attB1 para clonar el DNac del gen AOS en el sistema GATEWAY. Elimina el stop codon para permitir fusión C-terminal



APE1	APE1_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA- GGCTTCATGGGATCTATAACGGTAGCT	Usado junto a APE1_attB2 para clonar el DNac del gen APE1 en el sistema GATEWAY y añadirle las dianas attb
	APE1_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT- GGACAAGAGGTAGAAGATACAGA	Usado junto a APE1_attB1 para clonar el DNac del gen APE1 en el sistema GATEWAY. Elimina el stop codón para permitir fusión C-terminal

Tabla 2.7: Oligonucleótidos utilizados para clonar los genes en los vectores usados en expresión transitoria. Los cebadores poseen en el extremo 5' las secuencias attBs necesarias para las clonaciones mediante el sistema Gateway, usando los DNac de dichos genes.

2.6.8. Preparación de muestras proteicas y análisis mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS)

El tratamiento de las proteínas y posterior análisis se llevó a cabo según el modelo descrito por Vowinckel y cols. (Vowinckel *et al.*, 2014), con ciertas modificaciones. Y fue llevado a cabo por el Servicio de Proteómica del IBVF.

Tras el ensayo de Co-IP, las muestras de proteínas se precipitaban con acetona a -20°C (apartado 2.6.2), tras lo cual se descartaba el sobrenadante y el precipitado era resuspendido en una solución de *RapiGest*TM (Waters, www.waters.com) 0,2% (v/v) preparada en bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃) 50 mM. Se añadía entonces DTT 5 mM y se incubaba durante 30 min a 60°C. Posteriormente se añadía 2-iodoacetamida (IAA) 10 mM y se incubaba de nuevo durante 30 min, esta vez a temperatura ambiente y en oscuridad. La digestión de la muestra proteica se llevaba a cabo incubando la misma con tripsina, en un ratio tripsina:proteína de 1:40, durante toda la noche y a 37°C. Tras la digestión, 1 µg de proteína era analizada en un espectrómetro de masas *Tandem Quadrupole Time-of-Flight* (AB/Sciex) acoplado con un *Nanospray III Ion Source* (AB/Sciex) y un nano-HPLC (Eksigent Ultra 2D). La separación peptídica era llevada a cabo, removiendo las impurezas, en una precolumna (C18 PepMapTM100 column NAN75-15-03-C18-PC, Thermo Fisher) usando ácido fórmico 0,1% (v/v) y acetonitrilo 5% (v/v) como los solventes a un flujo de 3 µl/min durante 10 min. Los péptidos eran entonces eluidos en la columna analítica usando el spray emisor de electrones incorporado (*New Objective PicoFrit column*, 75 µm id x 250 mm, con *Reprosil-PUR* 3 µm) y separados en un gradiente continuo 5-35% de solvente B durante 60 min a un flujo de 250 nl/min. El solvente A era ácido fórmico 0,1% (v/v) y el solvente B estaba compuesto por acetonitrilo con ácido fórmico 0,1% (v/v). La fuente de iones trabajaba con los siguientes parámetros: ISVF = 2600, GS1 = 20, CUR = 25. El modo de obtención de datos, usando el método DDA, se configuraba para obtener una alta resolución de escaneo TOF-MS



Materiales y Métodos

sobre un rango de masas de 400-1250 m/z, seguido por escaneos MS/MS de 50 candidatos iónicos por ciclo (rango de escaneo de masas de 230-1500 m/z) con fondo de sustracción dinámico, operando el instrumento en modo de alta sensibilidad. El tiempo de acumulación iónica se establecía en 250 ms (MS) o 65 ms (MS/MS).

Las proteínas se identificaban usando el programa *ProteinPilot v5.0.1* (Sciex) con el método *Paragon* y la base de datos de proteomas de *Arabidopsis* www.Uniprot.org.

2.6.9. Análisis informático de secuencias proteicas

Las secuencias de aminoácidos de todas las proteínas utilizadas o mencionadas en esta Tesis Doctoral se tomaban de la base de datos de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR). Dichas secuencias se analizaron con la aplicación SnapGene Version 4.3. Para la obtención de la gráfica de alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diferentes genes ortólogos se usaba el programa MacVector versión 17.

2.7. Métodos de análisis y manipulación de DNA

2.7.1. Plásmidos y vectores utilizados

Los plásmidos utilizados para esta tesis doctoral son los especificados en la Tabla 2.8.

Plásmido	Referencia	Resistencia en bacteria	Uso y características
pJET1.2	Thermo Fisher	Ampicilina	Usado para programar fragmentos de DNA que van a ser usados para generar construcciones
pDONR207	Thermo Fisher	Gentamicina	Clonación mediante recombinación (sistema Gateway) de fragmentos de DNA generados mediante PCR. Tiene los sitios de recombinación attP
pXCGW	Cortesía de Wolf Frommer	Espectinomina	Para los experimentos de BiFC. Contiene la secuencia codificante para la parte carboxilo de CFP
pXNGW	Cortesía de Wolf Frommer	Espectinomina	Para los experimentos de BiFC. Contiene la secuencia codificante para la parte amino de YFP
pEarlyGate103	Early <i>et al.</i> , 2006	Kanamicina	Para expresión de proteínas fusionadas a GFP en <i>Nicotiana benthamiana</i>
pGWB5	Nakagawa <i>et al.</i> , 2009	Kanamicina	Para expresión de proteínas fusionadas a GFP en <i>Nicotiana benthamiana</i>
pGADT7-RecAB	Takara	Ampicilina	La genoteca de Takara está clonada en este plásmido. Confiere prototrofia para leucina
pDEST-GBKT7	Rossignol <i>et al.</i> , 2007	Kanamicina	Expresión de proteínas en levaduras. Confiere prototrofia para triptófano



pPZP211-OCS	Cortesía de Myriam Calonje	Espectinomycinina	Expresión de genes en <i>Arabidopsis thaliana</i> . Confiere resistencia a kanamicina en plantas y posee el terminador de la transcripción OCS
pJET1.2-AtFBN4-attBs	Esta tesis	Ampicilina	Secuencia codificante de FBN4 con CTP (péptido de tránsito al cloroplasto), sin codón de terminación y con las dianas attBs para el sistema Gateway
pDONR207-AtFBN4	Esta tesis	Gentamicina	Secuencia codificante de FBN4 con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attLs para el sistema Gateway
pXNGW-AtFBN4	Esta tesis	Espectinomycinina	Secuencia codificante de FBN4 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -nYFP). Usado para experimentos de BiFC
pXCGW-AtFBN4	Esta tesis	Espectinomycinina	Secuencia codificante de FBN4 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -cCFP). Usado para experimentos de BiFC
pEG103-AtFBN4	Esta tesis	Kanamicina	Secuencia codificante de FBN4 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal de GFP-His(6X)). Usado para experimentos de localización con GFP
pJET1.2-AtFBN4-Bait1-attBs-Y2H	Esta tesis	Ampicilina	Secuencia amino terminal de FBN4 (Bait1) sin CTP, con codón de terminación y con las dianas attBs que permite su clonación en el vector pDEST-GBKT7 para ensayo de doble híbrido en levadura
pDONR207-AtFBN4-Bait1-attBs-Y2H	Esta tesis	Gentamicina	Secuencia amino terminal de FBN4 (Bait1) sin CTP, con codón de terminación y con las dianas attLs que permite su clonación en el vector pDEST-GBKT7 para ensayo de doble híbrido en levadura
pDEST-GBKT7-AtFBN4-Bait1	Esta tesis	Kanamicina	Secuencia amino terminal de FBN4 (Bait1) sin CTP, con codón de terminación y clonado mediante Gateway. Permite la fusión traduccional N-terminal a GAL4 BD. Usado en ensayo de doble híbrido en levadura
pJET1.2-AtFBN4-attBs-woctp	Esta tesis	Ampicilina	Secuencia codificante de FBN4 con codón de terminación, sin CTP y con dianas attBs para el sistema Gateway. Permite su clonación en pDEST17
pDONR207-AtFBN4-attBs-woctp	Esta tesis	Gentamicina	Secuencia codificante de FBN4 con codón de terminación, sin CTP y con dianas attLs para el sistema Gateway. Permite su clonación en pDEST17
pXNGW(-nYFP)-Fib1b	Gámez-Arjona, 2014a	Espectinomycinina	Secuencia codificante de FBN1b con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -nYFP). Usado para experimentos de BiFC
pXCGW(-cCFP)-Fib1b	Gámez-Arjona, 2014a	Espectinomycinina	Secuencia codificante de FBN1b con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -cCFP). Usado para experimentos de BiFC
pJET1.2-AtFBN2-attBs	Esta tesis	Ampicilina	Secuencia codificante de FBN2 con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attBs para el sistema Gateway
pDONR207-AtFBN2	Esta tesis	Gentamicina	Secuencia codificante de FBN2 con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attLs para el sistema Gateway



Materiales y Métodos

pXNGW(-nYFP)-AtFBN2	Esta tesis	Espectinomicona	Secuencia codificante de FBN2 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -nYFP). Usado para experimentos de BiFC
pXCGW(-cCFP)-AtFBN2	Esta tesis	Espectinomicona	Secuencia codificante de FBN2 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -cCFP). Usado para experimentos de BiFC
pEG103-AtFBN2	Esta tesis	Kanamicina	Secuencia codificante de FBN2 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a GFP-His(6X)). Usado para experimentos de localización con GFP
pGWB5-AtFBN2	Esta tesis	Kanamicina	Secuencia codificante de FBN2 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a GFP-His(6X)). Usado para experimentos de localización con GFP
pDEST-GBKT7-AtFBN2-WCTP	Esta tesis	Kanamicina	Secuencia codificante de FBN2 sin CTP, con codón de terminación y clonado mediante Gateway. Permite la fusión traduccional N-terminal a GAL4 BD. Usado en ensayo de doble híbrido en levadura
PPZP211-OCS-AtFBN2g	Esta tesis	Espectinomicona	DNA genómico de FBN2 usado para expresión en <i>A. thaliana</i> . Confiere resistencia a kanamicina en plantas y posee el terminador de la transcripción OCS
pJET1.2-At3g53470-attBs	Esta tesis	Ampicilina	Secuencia codificante de At3g53470 con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attBs para el sistema Gateway
pDONR207-At3g53470	Esta tesis	Gentamicina	Secuencia codificante de At3g53470 con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attLs para el sistema Gateway
pXNGW(-nYFP)-At3g53470	Esta tesis	Espectinomicona	Secuencia codificante de At3g53470 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -nYFP). Usado para experimentos de BiFC
pXCGW(-cCFP)-At3g53470	Esta tesis	Espectinomicona	Secuencia codificante de At3g53470 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -cCFP). Usado para experimentos de BiFC
pGWB5-At3g53470	Esta tesis	Kanamicina	Secuencia codificante de At3g53470 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a GFP-His(6X)). Usado para experimentos de localización con GFP
pJET1.2-AOS-attBs	Esta tesis	Ampicilina	Secuencia codificante de AOS con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attBs para el sistema Gateway
pDONR207-AOS-attBs	Esta tesis	Gentamicina	Secuencia codificante de AOS con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attLs para el sistema Gateway
pXNGW-AOS-attBs	Esta tesis	Espectinomicona	Secuencia codificante de AOS con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -nYFP). Usado para experimentos de BiFC
pXCGW-AOS-attBs	Esta tesis	Espectinomicona	Secuencia codificante de AOS con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -cCFP). Usado para experimentos de BiFC



pJET1.2-APE1-attBs	Esta tesis	Ampicilina	Secuencia codificante de APE1 ape1 con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attBs para el sistema Gateway
pDONR207-APE1-attBs	Esta tesis	Gentamicina	Secuencia codificante de APE1 con CTP, sin codón de terminación y con las dianas attLs para el sistema Gateway
pXNGW-APE1	Esta tesis	Espectinomicina	Secuencia codificante de APE1 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -nYFP). Usado para experimentos de BiFC
pXCGW-APE1	Esta tesis	Espectinomicina	Secuencia codificante de APE1 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a -ccFP). Usado para experimentos de BiFC
pEG103-APE1	Esta tesis	Kanamicina	Secuencia codificante de APE1 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a GFP-His(6X)). Usado para experimentos de localización con GFP
pGWB5-APE1	Esta tesis	Kanamicina	Secuencia codificante de APE1 con CTP y sin codón de terminación (permite la fusión traduccional C-terminal a GFP-His(6X)). Usado para experimentos de localización con GFP

Tabla 2.8: Plásmidos y vectores empleados en esta tesis doctoral.

2.7.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *Echerichia coli* a pequeña escala

El DNA plasmídico era aislado de cultivos de 5 ml de *E. coli* en LB incubados a 37 °C y con 200 rpm de agitación orbital durante 18-24 h. Se hacía uso del kit comercial *Isolate II Plasmid Mini Kit* (Bioline), basado en la lisis alcalina de las células, siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante.

2.7.3. Aislamiento de DNA total de tejidos vegetales

El aislamiento de DNA vegetal se llevó a cabo mediante el kit *i-genomic Plant DNA Extraction Mini Kit* (iNtRON, ahora Labotaq) o mediante el kit *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo en ambos casos las instrucciones suministradas por los fabricantes.

2.7.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación y análisis de fragmentos de DNA se realizaban mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001) de concentración variable 0,7-2% (p/v) en función del tamaño de los fragmentos de DNA que se querían separar. El tampón utilizado para preparar los geles y para correrlos era TBE 0,5X*. La electroforesis se llevaba a cabo en cubetas horizontales *Wide Mini-Sub[®] Cell GT* (Bio-Rad), a 100-120 voltios durante un tiempo variable, donde los geles de agarosa eran sumergidos en TBE 0,5X. Las muestras se suplementaban con 1/10 de su volumen de Tampón de carga 10X*. Para la detección del DNA se añadía al gel bromuro de etidio (3, 8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio) a una concentración final de 0,5 µg/ml



Materiales y Métodos

y se visualizaba iluminando el gel con un transiluminador de luz ultravioleta. Como patrones de tamaño se utilizaban 5 µl de *HyperLadder II* o de *HyperLadder III* (Bioline).

2.7.5. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa se empleaba el kit comercial *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) y se seguían las instrucciones del fabricante.

2.7.6. Determinación de la concentración de DNA

La concentración de DNA de las muestras se determinaba corriendo las mismas en un gel de agarosa (apartado 2.7.4) o espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop modelo ND-100.

2.7.7. Restricción de DNA

La digestión de DNA con endonucleasas de restricción se llevaba a cabo incubando aproximadamente 0,5 µg del DNA con 3-10 U de la enzima correspondiente durante 1-2 h a la temperatura indicada para dicha enzima (37°C generalmente). El volumen final era variable, pero el volumen de la enzima siempre fue inferior a la décima parte del volumen de reacción. El tampón de incubación de la enzima y su concentración dependía de las recomendaciones establecidas por la compañía comercial, Takara o New England Biolabs. Cuando se realizaban restricciones dobles, es decir, con dos endonucleasas, se utilizaba un único tampón de incubación adecuado para ambas enzimas; cuando esto no era posible, se realizaba una restricción primero con su tampón correspondiente y luego, tras la inactivación de la primera enzima, se realizaba la siguiente restricción. La inactivación de la enzima dependía también de las recomendaciones de los fabricantes, siendo la incubación a 65°C durante 10 min la más frecuente de las utilizadas.

2.7.8. Ligación de fragmentos de DNA a plásmido

La ligación de fragmentos de ADDNAN se llevaba a cabo usando el kit comercial *CloneJET PCR Cloning* (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. La relación inserto:vector utilizada era siempre de 5:1 en un volumen final de reacción de 20 µl. La reacción de ligación se llevaba a cabo a temperatura ambiente durante 5-30 min.

2.7.9. Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR era realizada en un termociclador *T personal* (Whatman-Biometra). La reacción era llevada a cabo en un volumen final de 25 o 50



μl, en una mezcla de reacción conteniendo: 1-10 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP), 0,4 μM de cada oligonucleótido y la DNA polimerasa con su tampón correspondiente. Los oligonucleótidos eran sintetizados por SIGMA. En función del fragmento a amplificar y su aplicación, se empleaba un tipo de DNA polimerasa. Para el análisis de plantas mutantes y transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, así como para la selección de colonias portadoras de un plásmido, se usaban las enzimas *BioTaq polimerasa* (Bioline) o *MyTaqTM* (Bioline). Para la clonación de fragmentos de DNA en vectores se usaba la enzima *iProof[®] High-Fidelity DNA Polymerase* (Bio-Rad), debido a su alta fidelidad y estabilidad. El programa de amplificación utilizado constaba de una etapa de desnaturalización inicial de 2-3 min a 95 o 98°C, dependiendo de la DNA polimerasa empleada, seguido de 30-35 ciclos de amplificación. Cada ciclo constaba de una etapa de desnaturalización de 15-30 segundos a 95 o 98°C, una etapa de apareamiento de 15-30 segundos a temperatura variable dependiente de los cebadores empleados, y una etapa de extensión a 72°C durante un tiempo variable que dependía del tamaño del fragmento de DNA a amplificar y de la DNA polimerasa. El programa terminaba con una incubación de 5-10 min a 72°C. El resultado de la reacción de PCR era analizado mediante electroforesis en geles de agarosa (apartado 2.7.4).

2.7.10. Sistema Gateway

El sistema Gateway (InvitrogenTM) es una metodología pensada para facilitar la clonación de fragmentos de DNA al sustituir el método tradicional de clonación mediante digestión con enzimas de restricción y ligación por una recombinación específica de secuencia. El sistema proporciona un modo versátil para transferir segmentos de DNA entre vectores. Este sistema se basa en dos reacciones enzimáticas conocidas como BP y LR. La reacción BP se basa en la introducción de una secuencia codificante flanqueada por sitios attB en el vector “de entrada”, conocido como pDONR, el cual contiene sitios attP. Los denominados sitios attB son incorporados a la secuencia codificante que deseamos clonar mediante PCR. Tras una reacción de recombinación entre los sitios attB y attP, la secuencia codificante se introduce dentro del pDONR, el cual pasa a denominarse pENTRY y cuyos sitios de recombinación se convierten en sitios attL. Mediante la reacción LR, la secuencia codificante que se encuentra clonada en un pENTRY se transfiere por recombinación al vector “de salida” que corresponda, conocidos como pDEST. Ésta es una reacción de recombinación entre los sitios attL del pENTRY y los sitios attR del pDEST que permite la transferencia del gen desde el primero al segundo, quedando de nuevo flanqueado por las secuencias attB. La orientación correcta del gen se mantiene en todo momento. Tanto el pDONR como el pDEST poseen, entre los sitios attP y attR respectivamente, un fragmento de DNA que codifica para una toxina letal para la estirpe DH5α de *E. coli* y que



Materiales y Métodos

permite la selección negativa de las colonias transformantes que no hayan recibido el pENTRY con el gen de interés.

2.7.11. Secuenciación automática de DNA

Para la secuenciación de fragmentos de DNA, las muestras se enviaban a un servicio de secuenciación externo perteneciente a la empresa STAB VIDA, Lda. siguiendo las instrucciones proporcionadas por el mismo.

En la Tabla 2.9 en pueden observar los oligonucleótidos empleados para secuenciar los distintos fragmentos de DNA empleados en esta tesis.

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')
FBN2	FBN2_1: ATTCGGTGTACGGAAGTGAAT
	FBN2_2: TTCAACAAAGGTGTCAACCC
FBN4	FBN4_1: ACCGGTTGATTTAACCGATGA
	FBN4_2: AAACGTCCAGTAGGTAGACCA
Inserto general en pJET1.2	M13 reverse: AGCGGATAACAATTTACACAGG
	T7 promoter: TAATACGACTCACTATAGGG
	pJet_F: CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
	pJet_R: AAGAACATCGATTTCCATGGCAG
AOS	AOS_1: CCATCGGAGCCTAAACACGAAAAG
	AOS_2: GGGATGAAGATTTTGTTCGAAT
	AOS_3: ACAGATCTAATCTCCTCCGCTAAT
	AOS_4: TAAGTAGCTTAAAACCTAGGGAAG
APE1	APE1_F: TTCCACGAGCTCTTCCATCAGT
	APE1_R: CTGCGTTAAAATAGGAGTAGACA

Tabla 2.9: Oligonucleótidos empleados para comprobar por secuenciación automática que los fragmentos de DNA que iban a ser utilizados para las distintas construcciones de esta tesis estaban correctos.



2.7.12. Análisis informático de secuencias de DNA

Para el alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoácidas se empleaba la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), proporcionada por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), así como el programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), diseñado por Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Pterson y Sudhir Kumar y disponible en (<https://www.megasoftware.net/>). Este software usaba el programa CLUSTALW2 (Chenna *et al.*, 2003), proporcionado por el *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI).

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizaba el programa informático SnapGene[®] versión 4.3.

2.8. Métodos de análisis y manipulación de RNA

2.8.1. Precauciones

Cuando se trabajaba con RNA había que tomar ciertas precauciones para evitar la degradación del RNA por acción de las RNasas:

- Todo el material de vidrio utilizado había de ser esterilizado a 200°C durante 2 h en un horno.
- Todas las soluciones utilizadas se debían preparar con agua Milli-Q suplementada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) 0,01% (p/v) y ser autoclavada.
- Tanto el sitio como el equipo de trabajo se tenían que limpiar con NaOH 0,4 N para eliminar las RNasas.

2.8.2. Aislamiento de RNA total de tejidos vegetales

Para el aislamiento de RNA se utilizaban dos métodos de extracción, mediante el uso del kit comercial *Rneasy Plant Mini kit* (QIAGEN) o mediante el método descrito a continuación. Para este método, se usaba entre 10 y 100 mg de material congelado en nitrógeno líquido. El material era triturado en un tubo de microcentrífuga con una punta azul sellada o un pistilo estéril para dicho tubo. Al material triturado se le añadía 0,8-1 ml de Trizol (TRIsure[™], Bioline) y la mezcla se centrifugaba durante 5 min a 4 °C y 12.000 x g. Tras la centrifugación, el sobrenadante se transfería a un tubo de microcentrífuga nuevo y se incubaba durante 5 min a temperatura ambiente. Entonces se añadían 200 µl de cloroformo a la mezcla anterior y se agitaba vigorosamente por inversión durante 15 min, tras lo cual se incubaba durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifugaba posteriormente durante 15 min a 4 °C y 12.000 x g. La



Materiales y Métodos

fase acuosa o superior era a continuación transferida a un tubo de microcentrifuga nuevo y se le añadían 500 µl de isopropanol, se incubaba 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaba durante 10 min a 4 °C y 13.000 rpm en una centrífuga 5804R y rotor F45-30-11 (Eppendorf). El sobrenadante era descartado y el precipitado era resuspendido en 750 µl de cloruro de litio 3 M. Se incubaba. Se incubaba así 10 min a temperatura ambiente y se volvía a centrifugar igual que la vez anterior. El sobrenadante se descartaba de nuevo y el precipitado se resuspendía en etanol 85% (v/v) para ser “lavado”. Se centrifugaba por última vez de la misma manera, el sobrenadante se descartaba por última vez y el precipitado se dejaba secar previamente a su resuspensión en 50 µl de agua Milli-Q suplementada con DEPC.

2.8.3. Determinación de la concentración e integridad de RNA

La concentración de RNA de las muestras se determinaba corriendo las mismas en un gel de agarosa (apartado 2.7.4), mediante lo cual se analizaba también su integridad, o espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop modelo ND-100.

2.8.4. Reacción de retrotranscripción (RT)

Para estudiar los niveles de expresión indicado, para probar la expresión de transgenes de plantas transgénicas, para obtener el DNAc de una determinada secuencia codificante o para las reacciones de PCR cuantitativa (QRT-PCR), el RNA total aislado se retrotranscribía usando el kit *QuantiTect® Reverse Transcription kit* (QIAGEN). El RNA se trataba en primer lugar con DNAsa I, siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar el DNA genómico contaminante. Una vez eliminado el DNA, se procedía a la reacción de RT propiamente dicha, para lo cual se habían de seguir igualmente las instrucciones del fabricante del kit, obteniéndose finalmente una preparación de DNAc monocatenario.

2.8.5. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR)

Los niveles absolutos o relativos de RNAm se podían determinar mediante PCR cuantitativa en tiempo real de los transcritos presentes en una preparación de DNAc. Esta cuantificación es una potente técnica experimental que combina una alta especificidad y sensibilidad (Czechowski *et al.*, 2004). Dicha técnica se basa en la determinación del ciclo umbral o “Threshold Cycle” (Ct) para cada muestra en cada experimento de QRT-PCR. El Ct para una muestra es definido como el número de ciclos de PCR a partir del cual la señal de fluorescencia es mayor que el nivel mínimo de detección del aparato (Ginzinger, 2002). De este modo, los valores de Ct de diferentes muestras pueden ser usados para calcular la abundancia del RNAm



de interés en cada una de ellas, ya que los valores de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de DNAC inicial y ésta es proporcional a los niveles de RNAm.

Los niveles de expresión de distintos genes se cuantificaban con el kit *SensiMixTM SYBR & Fluorescein kit* (Bioline) o con el kit *LUNA[®] Universal pPCR Master Mix Kit* (New England Biolabs). Las mezclas de reacción de PCR se preparaban según las instrucciones de los fabricantes. Para cada gen se usaba una pareja de cebadores específicos, como puede verse en la Tabla 2.10, y el gen que codifica para la isoforma 2 de la actina (ACT2) se usaba como normalizador de la expresión al poseer expresión constitutiva (Charrier *et al.*, 2002). La cuantificación relativa de los genes de estudio respecto al gen control permitía comparar la expresión de los primeros en diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* aun sin conocer en términos absolutos sus niveles de expresión. La expresión del gen problema (mut) respecto al silvestre (WT) quedaba tal que $(WT) = 2^{-(\Delta Ct_{mut} - \Delta Ct_{WT})}$ (Livak & Schmittgen, 2001), donde ΔCt era el el Ct del gen de interés en una muestra menos el Ct del gen control en la misma.

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')
FBN2	FBN2_QRT-PCR_F: GCAGGCTTCATGTAAAAACCGT
	FBN2_QRT-PCR_R: ACTACTGACCGAAACTGAAC

Tabla 2.10: Oligonucleótidos empleados para el estudio de la expresión de distintos genes mediante QRT-PCR.

2.8.6. Análisis transcriptómico de tejidos vegetales mediante RNA-Seq

El aislamiento de RNA total se llevaba a cabo mediante el uso del kit comercial *Rneasy Plant Mini kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaban dos réplicas biológicas por cada línea de planta y por cada condición utilizada para la preparación de las librerías en la secuenciación de nueva generación (“Next-generation sequencing”, NGS). Previamente se llevaba a cabo un análisis de la calidad y concentración del RNA total, tal que el número de integridad del RNA (RIN) y la concentración fuesen mayores de 8 y de 50 ng/ μ l respectivamente. Las librerías de moléculas de DNAC se preparaban usando 1 μ g de RNA total de cada réplica independiente con el kit *Kapa Stranded mRNA Library Preparation Kit*. Las librerías se secuenciaban en la plataforma *Illumina HiSeq 4000* con secuenciación de lectura pareada con una longitud de lectura de 150 pb. Cada réplica biológica generaba entre 60 y 80 millones de lecturas. La calidad de los datos producidos se determinaba con el nivel de calidad Phred (“Phred quality score”) usando la herramienta FastQC. Para finalizar, los análisis de



Materiales y Métodos

expresión génica se llevaban a cabo mediante el mapeo contra el genoma de referencia de *Arabidopsis thaliana* (TAIR10).

2.9. Métodos de transformación genética

2.9.1. *Escherichia coli*

Las células competentes de *Escherichia coli* DH5 α se preparaban siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan (Hanahan, 1983) tanto por el Servicio de Cultivos Biológicos perteneciente al Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja (Sevilla) como por mí.

400 ml de medio LB se inoculaban con 4 ml de un cultivo saturado de la estirpe DH5 α de *E. coli* en un matraz erlenmeyer de 2 l. El cultivo se incubaba a 37 °C con una agitación orbital de 250 rpm hasta tener una DO₅₉₀ (densidad óptica a 590 nm) de 0,375. Posteriormente el cultivo se pasaba a tubos estériles de polipropileno previamente enfriados y se dejaban en hielo 5-10 min para detener su crecimiento. Las células se recogían mediante centrifugación durante 7 min a 4 °C y 1.600 x g sin freno y se resuspendían en 10 ml de la Disolución de CaCl₂*. Las células se volvían a centrifugar durante 5 min a 4 °C y 1.100 x g y se volvían a resuspender en 10 ml de la disolución de CaCl₂. Tras ello, se mantenían 30 min en hielo y se centrifugaban de nuevo igual que la vez anterior. Finalmente, las células recogidas se resuspendían en 2 ml de Disolución de CaCl₂, se distribuían en alícuotas de 100 μ l, se congelaban inmediatamente en N₂ líquido y se conservaban a -80°C.

Para la transformación, una alícuota de 100 μ l con una suspensión de células competentes previamente descongeladas en hielo se mezclaban con 5-10 μ l de la preparación de DNA transformante (no más de un 10% del volumen). La mezcla resultante se incubaba aproximadamente 30 min en hielo para posteriormente ser incubada 90 segundos a 42°C (choque térmico propiamente dicho). Tras ello, se añadía rápidamente 1 ml de LB y se incubaba la mezcla durante 1 h a 37 °C y con agitación orbital. Para finalizar, las células eran sembradas en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con diferentes antibióticos en función de la resistencia incluida en el DNA transformante y crecidos durante 1 día a 37°C.

2.9.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Las células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* y su consiguiente transformación por electroporación se realizaron siguiendo el procedimiento descrito por Mattanovich y cols. (Mattanovich *et al.*, 1989). 300 ml de medio LB se inoculaban con 3 ml de un cultivo saturado de la estirpe C58C1 de *A. tumefaciens* en un matraz erlenmeyer de 1 l y se



incubaba a 30 °C con 200 rpm de agitación orbital hasta tener una DO₆₀₀ de 0,5 (unas 3-4 h aproximadamente). El cultivo se enfriaba entonces en hielo durante 10 min para detener su crecimiento. Las células se recogían por centrifugación durante 5 min a 4 °C y 4.000 g y se “lavaban” 3 veces (centrifugación seguida de resuspensión) en 10 ml de HEPES 1 mM pH 7 y una última vez con glicerol 10% (v/v). Para finalizar, las células se resuspendían en 3 ml de glicerol 10% (v/v), se distribuían en alícuotas de 100 µl, se congelaban inmediatamente en N₂ líquido y se conservaban a -80°C. La transformación se llevaba a cabo con una alícuota de 100 µl de células electroporables. Dicha transformación se llevaba a cabo mediante electroporación. Para ello, la alícuota se descongelaba en hielo y se mezclaba con 150 ng del DNA a introducir. La mezcla se pasaba a una cubeta de electroporación de gTPbio (GTP008), y se mantenía en hielo hasta recibir un pulso de 2,5 kV y 15 µF en un electroporador *MicroPulser*TM 411BR 09965 (Bio-Rad). Inmediatamente después, se añadía a la mezcla 1 ml de LB y se transfería el cultivo electroporado a un tubo de microcentrífuga. Se incubaba durante 1 h a 30 °C y a 150 rpm de agitación orbital. Para finalizar, las células transformadas se sembraban en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con diferentes antibióticos en función de la resistencia incluida en el DNA transformante y crecidas durante 2 días a 30 °C.

2.9.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Para la transformación de las levaduras en el ensayo de doble híbrido se empleó el método descrito por Gietz y Woods (Gietz & Woods, 2002): “Quick and Easy Transformation Protocol”. Se empezaba creciendo un cultivo de levadura en medio YPDA 2X durante toda la noche a 30 °C y con 200 rpm de agitación orbital. Una vez crecido, las células eran recogidas por centrifugación en microtubos de centrífuga durante 1 min a 14.000 rpm en una microcentrífuga *Spectrafuge*TM C2400-230V (Labnet) y resuspendidas en la siguiente mezcla de transformación, donde los componentes habían de ser añadidos en el orden especificado: 240 µl de polietilenglicol (PEG) 3500 50% (p/v), 36 µl de acetato de litio 1 M, 50 µl de DNA “carrier” 2 mg/ml previamente hervido durante 5 min y 34 µl del plásmido transformante (0,1-1 µg) en agua. La mezcla resultante se incubaba durante 40-60 min a 42 °C y luego se recogían nuevamente mediante centrifugación. Para finalizar, las células se resuspendían en 1 ml de agua estéril y sembradas en el correspondiente medio selectivo: SD-Leu en el caso de Y187 transformada con el plásmido pGADT7 y SD-Trp en el caso de Y2HGold transformada con el plásmido pGBKT7. Las placas eran entonces incubadas durante 3-4 días a 30 °C.



2.9.4. *Arabidopsis thaliana*

Durante esta tesis se han obtenido plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, mutantes para el gen FBN2, transformadas con la secuencia génica completa del gen FBN2, incluido aproximadamente 1 kb de promotor, y denominada *fbn2::FBN2*.

2.9.4.1. Transformación por inmersión floral

El método seguido para la transformación por inmersión floral es el descrito por Clough y Bent (Clough & Bent, 1998), mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Se cultivaban plantas de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de DL hasta que las inflorescencias primarias tenían unos 5 cm de longitud, momento en el que se cortaban para favorecer la aparición de un gran número de inflorescencias secundarias. La transformación de las plantas se llevaba a cabo 2-4 días después. 2 días previos a la transformación de las plantas se inoculaba una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* portadora del plásmido a transferir en un matraz erlenmeyer con 20 ml de LB suplementado con el correspondiente antibiótico, que en nuestro caso es kanamicina. Se incubaba durante 24 h a 30 °C y con agitación orbital de 150 rpm. Transcurridas las 24 h, se usaban 10 ml de este cultivo para inocular 300 ml de LB suplementado con kanamicina. Se dejaba crecer este cultivo a 30 °C y con 150 rpm de agitación orbital hasta alcanzar una DO_{600} de 0,8-2, lo cual conllevaba aproximadamente 24 h. En este momento, las células de *A. tumefaciens* se recogían mediante centrifugación durante 20 min y a 4.000 rpm en una centrífuga 5804R y rotor A-4-44 (Eppendorf) y se resuspendían en Medio de infiltración* hasta obtener una DO_{600} de 0,8. Se sumergían entonces las inflorescencias de las plantas en esta suspensión durante 10 segundos aproximadamente con agitación suave y se cubrían posteriormente con film transparente para mantener una alta humedad y evitar así la desecación. Las plantas eran mantenidas de esta forma durante 24 h a baja intensidad lumínica. Finalmente se retiraba el film transparente y se dejaban crecer las plantas en condiciones de DL hasta que se podían recoger las semillas.

2.9.4.2. Selección de transformantes

La selección de las semillas transformadas se realizaba mediante el estudio de la resistencia a kanamicina (concentración final en el medio de 50 µg/ml), debido a que solo las plantas transformadas habían incorporado el plásmido portando el gen que confiere dicha resistencia. La selección propiamente dicha se llevaba a cabo mediante su siembra en placa de Petri en medio MS suplementado con kanamicina. Los transformantes crecían sin dificultad mientras que las semillas de plantas no transformadas no germinaban o dejaban de crecer tras la germinación, presentando clorosis y finalmente llevando a la muerte de la plántula. Las plantas



transformadas, llamadas generación F_0 , se dejaban crecer para obtener la siguiente generación, F_1 .

2.9.4.3. Selección de líneas transgénicas

Las semillas de la F_1 se sembraban de nuevo en medio MS suplementado con kanamicina y se analizaban las plantas resistentes al antibiótico. Para ello, se realizaba la extracción del DNA genómico (apartado 2.7.3) en primer lugar y, usando este como molde, se realizaban las PCRs oportunas para comprobar si poseían la inserción del gen FBN2. En la Tabla 2.11 se encuentran los cebadores empleados para tal fin.

Una vez seleccionadas las plantas de la F_1 resistentes a kanamicina y comprobado que tenían el inserto, se dejaban crecer y se recogían semillas de dichas plantas de forma individualizada. Estas semillas, llamadas generación F_2 , se sembraban de la misma forma que anteriormente y eran analizadas por PCR nuevamente hasta encontrar alguna planta homocigota para la inserción del gen FBN2. A éstas se les extraía RNA (apartado 2.8.2) y se probaba la expresión del transgén mediante retrotranscripción (apartado 2.8.4).

Pareja de oligonucleótidos (5' – 3')	Tamaño de bandas		
	WT	<i>fbn2</i>	<i>fbn2</i> ::FBN2
FBN2g_EcoRI_F: GAATTCCAATCAATCCCCATCCACCTTC	1488	-	1488
FBN2_SALK_RP: TTCAGTTCCGTACACCGAATC			
FBN2_SAIL_LP: GATTCCTCTACTAGCTGCGGG	674	-	674
FBN2g_KpnI_R: GGTACCTCAGAGCTCAAGCAGAGAGCTTCC			

Tabla 2.11: Oligonucleótidos utilizados para la selección de plantas transgénicas.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

3. RESULTADOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

3.1. CAPÍTULO I

Caracterización de la función de los miembros del subgrupo de fibrilinas 1-2 de *Arabidopsis thaliana*

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización de la función de los miembros del subgrupo de fibrilinas 1-2 de *Arabidopsis thaliana*

Como se ha comentado en la Introducción, se ha estudiado la función de los miembros de este subgrupo en *Arabidopsis* mediante la técnica de iRNA, con la cual se conseguía disminuir la expresión de los tres miembros del subgrupo (Youssef *et al.*, 2010). Esta aproximación no permite analizar el papel de cada uno de los miembros por separado, por lo que decidimos estudiar los diferentes mutantes simples, dobles y triples de FBN1a, -1b y -2. Los mutantes empleados en este estudio son mutantes “knock-out” (KO) por inserción de T-DNA. No se analizan los mutantes simples *fbn1a* o *fbn1b* debido a que trabajos previos del Grupo habían demostrado que FBN1a y FBN1b pueden formar homodímeros y heterodímeros, (Gámez-Arjona *et al.*, 2014a) sugiriendo un alto grado de redundancia funcional.

3.1.1. Análisis transcriptómico mediante RNA-Seq de plantas *fbn1a-fbn1b* sometidas a estrés lumínico

El análisis de RNA-Seq se llevó a cabo en el mutante doble *fbn1a-fbn1b* de *Arabidopsis thaliana* en dos condiciones de crecimiento y con dos réplicas biológicas por cada línea de planta y por cada condición. Las plantas analizadas fueron crecidas en CN o crecidas en CN y sometidas a 3 horas de estrés lumínico (AL, 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

El análisis mostró que, a nivel de RNAm, no existían diferencias significativas en la expresión de genes en este mutante con respecto a la línea silvestre (WT).

Los resultados mostraron que no existe ningún gen diferencialmente expresado en las plantas WT y el mutante doble en CN. Por otro lado, únicamente tres genes se expresaron de forma diferencial entre ambas líneas en AL. Dos de estos genes correspondían a FBN1a y FBN1b, mientras que el tercer gen es ATMRD1, que codifica para la proteína “Mto responding down 1”. Esta proteína no está caracterizada y no se conoce su función.

Los resultados del análisis transcriptómico indican que las FBNs 1a y 1b no ejercen su función modulando la expresión de genes dianas y sugieren que el mecanismo de acción de estas FBNs se llevaría a cabo sobre proteínas.

3.1.2. Fibrilina 2 presenta una localización dual: soluble en el estroma y asociada a membranas tilacoidales

Estudios proteómicos previos indicaban que FBN2 se encuentra localizada mayoritariamente en los PGs, siendo 1188 veces más abundante en estos que en el estroma y



Resultados

Capítulo I

59 veces más abundante que en los tilacoides en general (Lundquist *et al.*, 2012). Cuando se analiza mediante microscopía confocal el patrón de localización de los polipéptidos FBN1a y FBN1b fusionados a la proteína testigo GFP y expresados transitoriamente en *Nicotiana benthamiana*, se observa un patrón de localización en forma de puntos, patrón que es característico de proteínas asociadas a los PGs (Gámez-Arjona *et al.*, 2014a). Por el contrario, el polipéptido FBN2-GFP muestra un patrón de localización diferente. La localización del péptido de fusión FBN2-GFP coincide con la autofluorescencia de las clorofilas (Figura 3.1), indicando que FBN2 puede localizarse soluble en el estroma o estar asociada a las MTs de una manera uniforme.

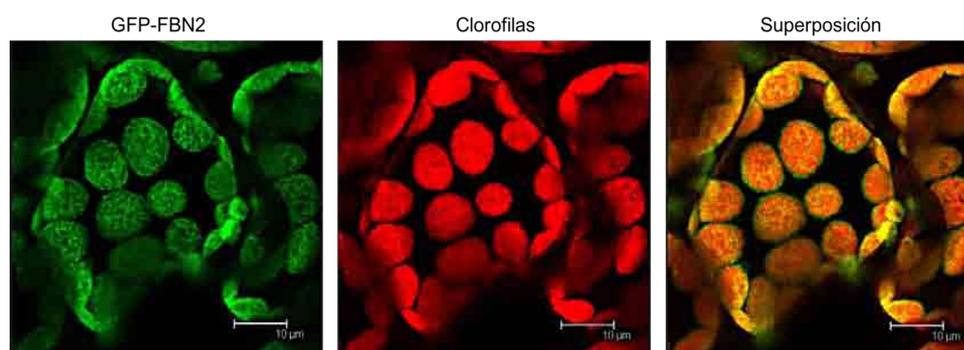


Figura 3.1: Localización sub-cloroplástica de la proteína FBN2 mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*. Se observan las imágenes tomadas mediante microscopía confocal de fluorescencia de la proteína FBN2 fusionada a la proteína testigo GFP. La construcción se expresó bajo el control del promotor constitutivo 35S. Se muestra la señal emitida por el péptido de fusión FBN2-GFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 10 µm.

Al objeto de corroborar los resultados obtenidos mediante fusión con GFP, se llevaron a cabo análisis de inmunoblot de las fracciones soluble y asociada a membranas, separadas mediante ultracentrifugación, de cloroplastos aislados de plantas WT. Previamente a este análisis se llevó a cabo la titulación del anticuerpo primario Anti-FBN2, anticuerpo específico producido durante esta tesis doctoral y que reconoce al epítipo RSSLPSESESDL de la proteína FBN2, comprendido entre los aminoácidos 53 y 66, para encontrar su dilución óptima de trabajo. Se usaron para este fin extractos crudos obtenidos de plantas WT.

En la Figura 3.2 se muestra que la dilución idónea para el empleo del anticuerpo mencionado es 1:2000, dilución a la que se obtiene una señal más clara.



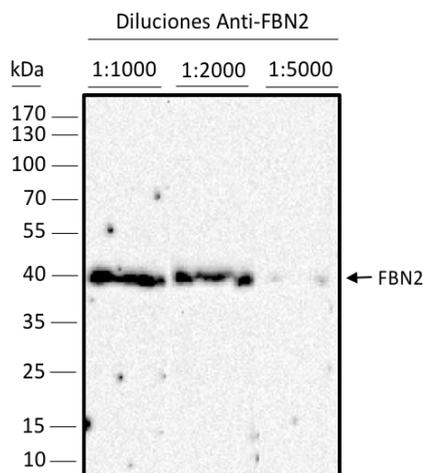


Figura 3.2: Titulación del anticuerpo Anti-FBN2. Inmunoblot con el anticuerpo primario Anti-FBN2 de extractos crudos de hojas de roseta de *A. thaliana*. 30 µg de proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con el anticuerpo mencionado. En la parte superior se muestran las diluciones del anticuerpo empleadas en cada calle. A la derecha se indica la banda correspondiente a la proteína FBN2. A la izquierda se muestra la posición y la masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores.

Tras la titulación del anticuerpo, se procedió a analizar la localización de FBN2 mediante inmunoblot en fracciones separadas.

La Figura 3.3 muestra los resultados de la incubación de ambas fracciones con los anticuerpos Anti-FBN2, Anti-GLN2 y Anti-PsbA. GLN2 es la glutamina sintetasa 2, que es empleada en este estudio como marcador estromático. PsbA es la proteína D1 del PSII y se usa como marcador de MTs. Se observó que ambas fracciones solo presentaban señal de sus respectivos marcadores, indicando que no existía contaminación de una fracción a otra. La proteína FBN2 aparecía en ambas fracciones analizadas y en proporciones similares, indicando así que se encontraba presente tanto de forma soluble en el estroma como asociada a las MTs. Sin embargo, con estos dos ensayos no se podía asegurar que la población de FBN2 asociada a MTs se localizase exclusivamente en asociación con los PGs o pudiera tal vez estar también asociada a otras regiones de las mismas. Las diferencias en los patrones de localización de las proteínas FBN1s y FBN2 son la primera evidencia de diferencia de funciones entre estas proteínas.



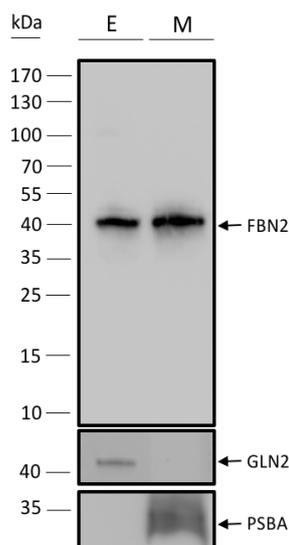


Figura 3.3: Estudio de la localización sub-cloroplástica de la proteína FBN2 mediante inmunoblot. Se rompieron cloroplastos aislados de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* y se aislaron las fracciones estromática (E) y de membranas (M) por ultracentrifugación a 100000 g y 4°C durante 1 hora. El precipitado se resuspendió en el mismo volumen que el sobrenadante y 30 µg de proteínas de cada fracción fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con los anticuerpos Anti-FBN2, Anti-GLN2 o Anti-PsbA. Las flechas indican las bandas correspondientes a cada una de las proteínas reconocidas. A la izquierda se muestra la posición y la masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores.

Se decidió estudiar entonces el perfil de distribución de FBN2 dentro de las MTs. Para ello, se aislaron cloroplastos de hojas de roseta de plantas WT de *A. thaliana* y, una vez aislados, se rompieron y se separaron las fracciones estromática y de membrana por ultracentrifugación. Se descartó la fracción estromática y la fracción de membrana se aplicó a un gradiente discontinuo de sacarosa para ser ultracentrifugada y separada en fracciones de 0,5 ml.



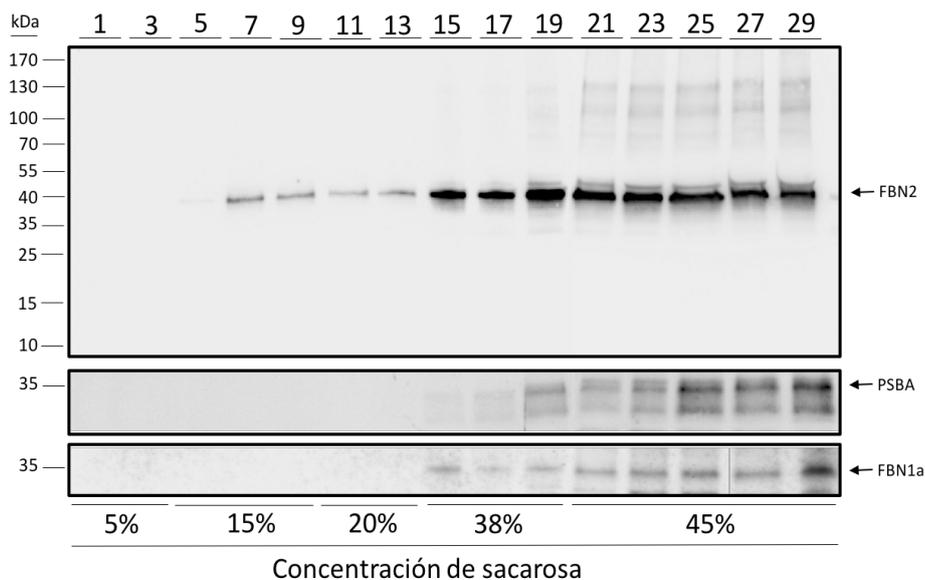


Figura 3.4: Estudio mediante inmunoblot del perfil de distribución de FBN2 en MTs fraccionadas en gradiente discontinuo de sacarosa. Cloroplastos aislados de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* se rompieron y la fracción de membranas se ultracentrifugó a 100000 g y 4°C durante 16 horas en gradiente discontinuo de sacarosa. Cantidades desconocidas de proteínas de las distintas fracciones fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con los anticuerpos primarios Anti-PsbA, Anti-FBN1a y Anti-FBN2. Abajo se muestran los porcentajes de sacarosa correspondientes a cada fracción. A la izquierda se muestra la posición y la masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores. Las flechas indican las bandas correspondientes a cada una de las proteínas reconocidas.

En la Figura 3.4 se puede comprobar que FBN2 se distribuye por las MTs en la mitad superior de fracciones más densas, aunque también aparece en menor medida en fracciones menos densas con un porcentaje de sacarosa entre 15% y 20%. Se puede observar cómo la proteína tiene un perfil de distribución en las MTs mucho más amplio que el obtenido para PsbA, usada aquí como marcador del PSII. Esto podría indicar que FBN2 se localizaría en los PGs, pero también en otras zonas de las MTs donde también se encontrarían los fotosistemas.

3.1.3. Aislamiento de un mutante carente de la proteína FBN2

El primer paso en la caracterización de un mutante de *Arabidopsis thaliana* es la comprobación de que se trata de un mutante homocigoto para el gen de estudio. Se llevó a cabo el genotipado de dos líneas mutantes KO del gen que codifica para FBN2 (At2g35490), obtenidas de las diferentes colecciones de mutantes de *Arabidopsis* por inserción de T-DNA del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK y de Syngenta (Sessions *et al.*, 2002). La finalidad de caracterizar dos mutantes en vez de uno era la de demostrar que ambos se comportaban de la misma manera y, por tanto, las alteraciones fenotípicas observadas se deberían a la ausencia de la proteína estudiada y no a otra mutación. Se seleccionó una línea homocigota para una de las líneas estudiadas (SALK_124590), que posee una inserción en el primer exón, mientras que la



Resultados
Capítulo I

otra supuesta línea de inserción analizada era en realidad homocigota silvestre (datos no mostrados). Para estos ensayos se utilizó como molde DNA extraído de las plantas y los oligonucleótidos específicos indicados en Materiales y Métodos. Ante la falta de un segundo mutante KO del gen FBN2, se procedió a la obtención de una línea transgénica de FBN2 donde se revirtió el genotipo mutante *fbn2* mediante la inserción de la secuencia genómica silvestre en el genoma de la línea mutante previamente analizada (apartado 3.1.8). Por otro lado, se llevó a cabo también el genotipado de la línea mutante *fbn1a-fbn1b-fbn2* producida en esta tesis doctoral, mientras que la línea mutante *fbn1a-fbn1b* ya había sido previamente genotipada (Tesis doctoral Francisco Manuel Gámez Arjona).

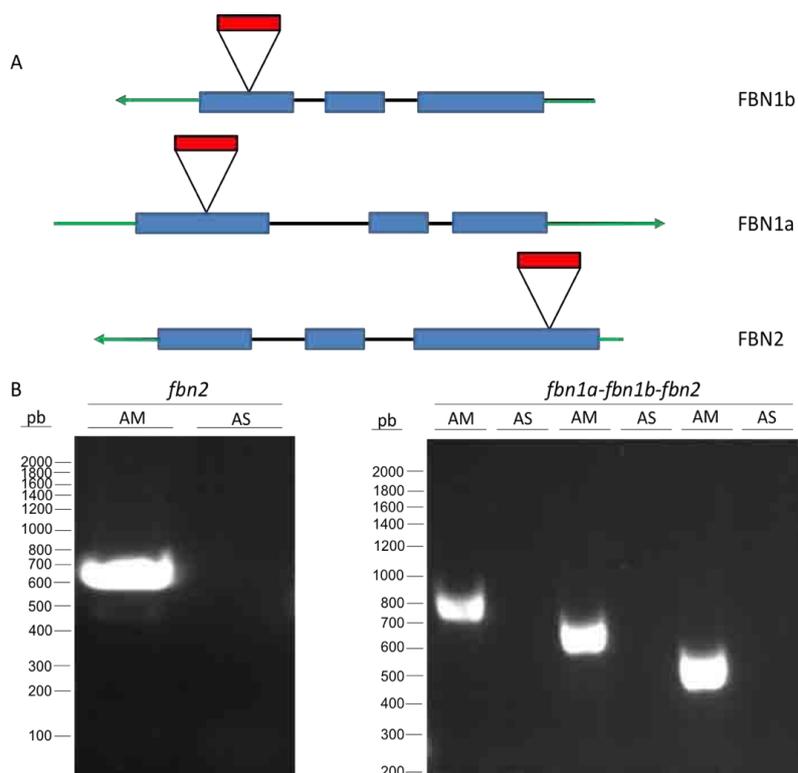


Figura 3.5: Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* y resultados de los análisis mediante PCR de la inserción de T-DNA en el genoma de dichas líneas. Se muestran los sitios de inserción de T-DNA en los genes FBN1b, FBN1a y FBN2 (A) y los resultados de amplificación de sus correspondientes secuencias (B) en las líneas mutantes empleadas. Para la identificación del alelo silvestre mediante PCR se utilizaron oligonucleótidos internos de cada gen y para el alelo mutante se usó uno de los oligonucleótidos del gen más otro propio de la inserción de T-DNA. En A, las cajas azules representan los exones, las rayas negras muestran los intrones, las rayas verdes muestran las regiones sin traducir (“untranslated region”, UTR) y las cajas rojas representan las inserciones de T-DNA. En B, se muestra a la izquierda la posición de las diferentes bandas (en pb) del marcador de tamaño empleado.

En la Figura 3.5 se muestra el esquema de los genes At4g22240 (FBN1b), At4g04020 (FBN1a) y At2g35490 (FBN2) y la inserción de T-DNA en cada línea mutante, además de mostrar



los resultados de los ensayos de PCR empleados para identificar las líneas mutantes homocigotas para cada uno de ellos.

Una vez comprobado que ambas líneas de plantas eran mutantes homocigotas, se procedió a la comprobación de que, además, carecían de la proteína FBN2. No se analizó la expresión de las proteínas FBN1a y FBN1b porque ya habían sido previamente analizadas (Francisco M. Gámez Arjona Tesis Doctoral). Se estudió la expresión de la proteína FBN2 en el mutante *fbn2* y en plantas WT usando extractos crudos de ambas líneas de plantas.

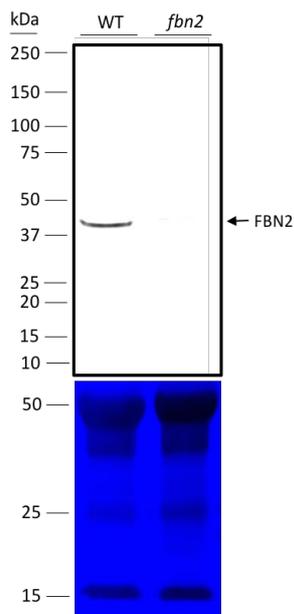


Figura 3.6: Identificación de la proteína FBN2 en plantas WT y el mutante KO *fbn2*. Inmunoblot con el anticuerpo primario Anti-FBN2 de extractos crudos de hojas de roseta de *A. thaliana*. 20 µg de proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con el anticuerpo mencionado. En la parte superior se muestra la línea de planta a la que pertenece cada calle. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína FBN2. Abajo aparece la tinción con azul de Coomassie de la membrana de PVDF, usada como control de carga. A la izquierda se indican las posiciones y las masas moleculares en kDa de las proteínas usadas como marcadores de tamaño.

Se comprobó que el mutante *fbn2* y, por ende, el mutante *fbn1a-fbn1b-fbn2* carecen por completo de la proteína FBN2 (Figura 3.6).

3.1.4. El estrés lumínico reduce el crecimiento del triple mutante *fbn1a-fbn1b-fbn2*

Las curvas de crecimiento de los diferentes mutantes del subgrupo FBN1-2 fueron medidas en condiciones de estrés por AL usando plantas directamente crecidas en estas condiciones (Figura 3.7).



Resultados
Capítulo I

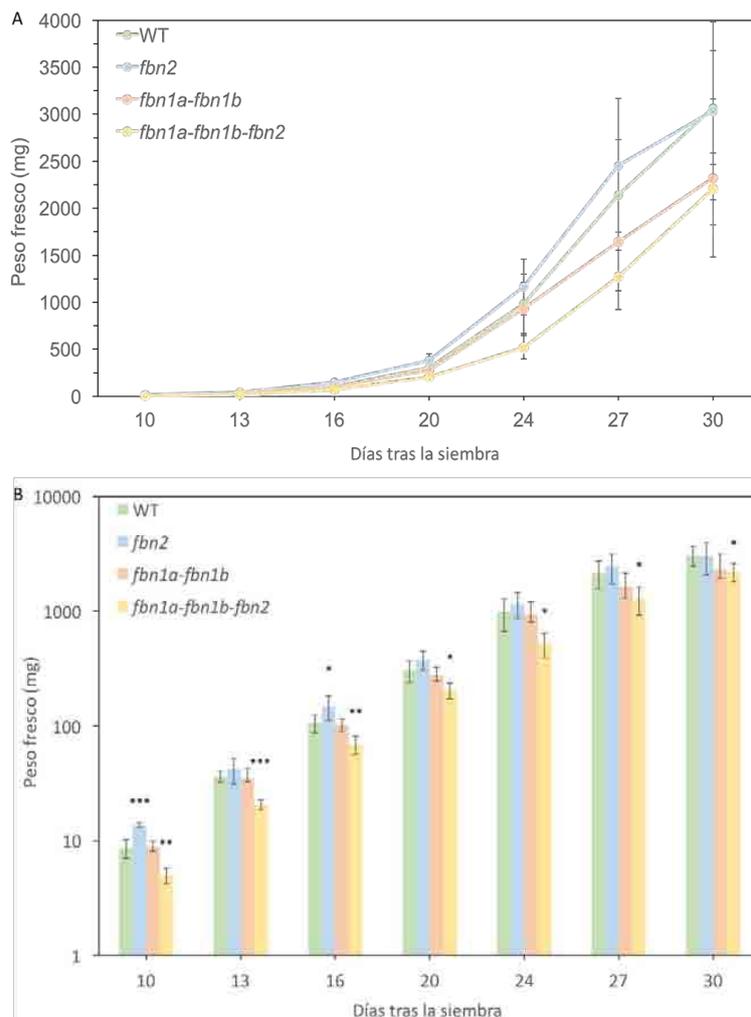


Figura 3.7: Curvas de crecimiento de los mutantes KO *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* frente al WT. Las plantas se crecieron bajo un fotoperiodo de DL y en condiciones de estrés por AL. El peso de la roseta se determinó en diferentes días a lo largo del ciclo de vida de la planta. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) del peso de 5-6 plantas. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$; ** con $p < 0,01$; *** con $p < 0,005$.

El mutante doble *fbn1a-fbn1b* presentó una tasa de crecimiento casi idéntica a la presente en el WT en todos los puntos de la curva analizados, mientras que *fbn2* posee un peso fresco/planta igual al WT en la mayor parte de los puntos de la curva con excepción de aquellos obtenidos a los días 10 y 16, donde obtenemos diferencias. Sin embargo, al no ser estos dos puntos de crecimiento consecutivos y tener el segundo solo una confianza del 95%, lo descartamos y supusimos que se trataba de un artefacto debido al número de réplicas utilizadas. El mutante triple *fbn1a-fbn1b-fbn2* presentó un peso fresco/planta significativamente inferior al WT en todos los puntos de la curva de crecimiento.



Se comprobó, por otro lado, si estos mismos mutantes poseían un comportamiento en su crecimiento similar al ser sometidos a estrés abiótico durante un largo período sin ser germinados en estas mismas condiciones. A los 19 días de crecimiento en CN de plantas de las cuatro líneas anteriores, se aplicó un estrés conjunto por ALF durante 30 días (Figura 3.8).



Figura 3.8: Foto de plantas WT y mutantes KO *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* sometidas a un estrés por ALF. Las plantas fueron germinadas y crecidas en CN durante 19 días para posteriormente aplicárseles un estrés por ALF durante 30 días.

Los resultados mostrados en la Figura 3.7 parecen indicar que tanto las FBN1s como la FBN2 poseen redundancia funcional y que, por tanto, el crecimiento vegetativo solo se ve afectado ante la falta de las tres proteínas. Sin embargo, este efecto deletéreo en el crecimiento de la planta no se observa cuando esta crece en CN y es sometida posteriormente a estrés (Figura 3.8).

3.1.5. La acumulación de antocianinas inducida por estrés lumínico está afectada en los diferentes mutantes del subgrupo FBN1-2

Estudios previos han demostrado que el mutante *knock down* (KD) *fbn1a-fbn1b-fbn2* acumula niveles de antocianinas menores que WT al ser sometido a un estrés por ALF (Youssef *et al.*, 2010). Para diseccionar el papel de las proteínas FBN1s y FBN2 en esta alteración fenotípica se analizó la acumulación de antocianinas en los mutantes KO carentes de FBN1a y FBN1b (*fbn1a-fbn1b*), de FBN2 (*fbn2*) y de las tres proteínas (*fbn1a-fbn1b-fbn2*). Para ello, se crecieron plantas en CN 20 días y se les aplicó posteriormente un estrés por ALF durante 30 días.

En la Figura 3.9 se puede apreciar que los niveles de antocianinas aumentaron en todas las líneas analizadas al aplicar un estrés por ALF. Este aumento fue más bajo en las líneas *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* con respecto a WT y muy similar entre ellas. Estos resultados fueron



Resultados

Capítulo I

apreciables a los 7 días de estrés. En el caso de *fbn1a-fbn1b*, el aumento en la acumulación también fue menor que en WT, pero ligeramente superior al observado en las otras dos líneas mutantes. A los 30 días todas estas diferencias desaparecieron.

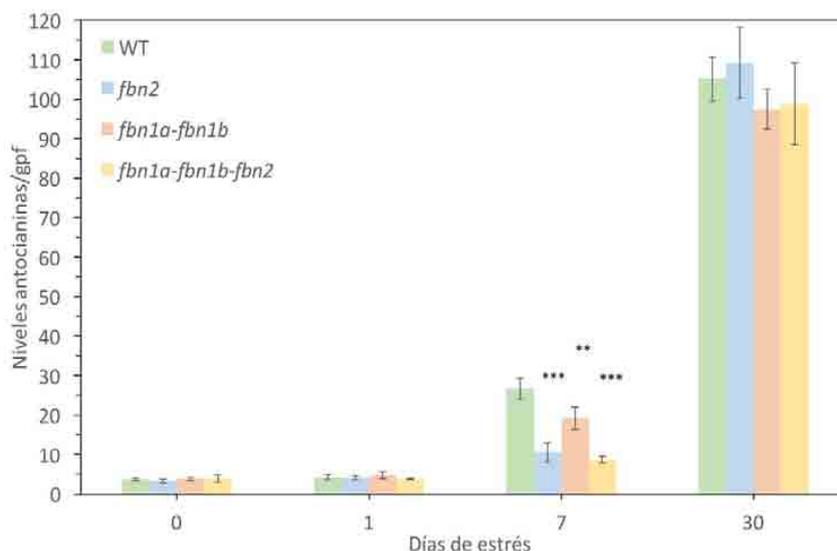


Figura 3.9: Niveles de antocianinas en plantas WT y en los diferentes mutantes del subgrupo FBN1-2 sometidas a un estrés conjunto por ALF. Las plantas fueron cultivadas 20 días en CN de crecimiento, tras lo cual se les aplicó un estrés por ALF durante 30 días. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) del valor obtenido para 4-6 ensayos. **indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,01$; *** con $p < 0,005$.

La biosíntesis de antocianinas es controlada por numerosos factores reguladores a nivel transcripcional y se ha demostrado que el ácido jasmónico media la inducción por alta intensidad lumínica de la acumulación de antocianinas en diferentes especies de plantas, como la soja (Franceschi y Grimes, 1991), aunque el mecanismo molecular de este proceso aún no se conoce.

Todos estos resultados llevaron a estudiar si la acumulación de antocianinas se vería nuevamente restablecida al añadir 2 mM de ácido jasmónico a las plantas sometidas a condiciones de estrés por ALF (Figura 3.10).



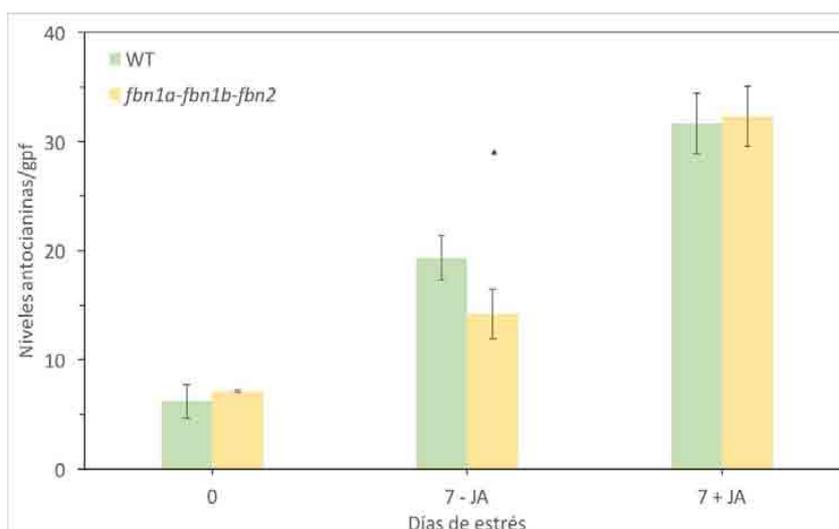


Figura 3.10: Estudio de la acumulación de antocianinas tras la adición de ácido jasmónico en plantas WT y mutante *fbn1a-fbn1b-fbn2* sometidas a estrés por ALF. Las plantas fueron cultivadas 18 días en CN de crecimiento, tras lo cual se sometieron a un estrés por ALF durante 7 días con o sin la adición de ácido jasmónico 2 mM cada 3 días. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) del valor obtenido para 3 ensayos. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$.

Los niveles de antocianinas en las hojas de los mutantes analizados alcanzaron los valores detectados en plantas WT a los 30 días de estrés por ALF (Figura 3.8), indicando que la acumulación de antocianinas fue ralentizada, pero no eliminada, en las líneas mutantes. Este retraso fue abolido tras un tratamiento con ácido jasmónico 2 mM (Figura 3.10), apoyando la idea de que efectivamente dicho retraso es una consecuencia de defectos en la síntesis de ácido jasmónico en las plantas mutantes.

3.1.6. Las proteínas del subgrupo FBN1-2 protegen al PSII en condiciones de estrés conjunto por alta intensidad lumínica y baja temperatura

Una de las funciones propuestas para la familia de FBNs es la de protección del aparato fotosintético frente a diferentes estreses abióticos (Singh y McNellis, 2011). Se analizó el estado del PSII determinando la fluorescencia de la clorofila a del PSII en los mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* en diferentes estreses abióticos como AL, baja temperatura o una combinación de ambos.

Se crecieron las plantas durante 34 días bajo un fotoperiodo de DC y en CN, tras lo cual se les aplicó un estrés por AL, baja temperatura o ALF durante 7 días. Se determinó el F_v/F_m en estas plantas mediante un fluorímetro de amplitud de pulso modulada IMAGING-PAM a 0, 1 y 7 días de estrés.



Resultados

Capítulo I

La Figura 3.11 muestra imágenes de color falso representando los valores F_v/F_m de los diferentes mutantes del subgrupo FBN1-2 y de plantas WT sometidas a estrés por ALF durante 0, 1 y 7 días. La Figura 3.12 muestra los valores numéricos de F_v/F_m de esas mismas plantas. Como puede verse, todas las líneas presentaron niveles similares de este parámetro antes de aplicar el estrés. Tras un día de estrés, se observa que los mutantes presentaban un menor F_v/F_m que el WT. Esta disminución es aún mayor tras 7 días de estrés (Figura 3.12), siendo esta disminución aditiva: hay una mayor disminución en el mutante triple que en sus respectivos parentales. Estas medidas se realizaron en las hojas adultas completamente desarrolladas de la roseta, ya que se observó que las hojas inmaduras pendientes de desarrollo recuperaban los valores iniciales de F_v/F_m tras 7 días de estrés. En algunas de las hojas desarrolladas empleadas en la medición se observó la aparición de necrosis. Estas zonas necróticas fueron más frecuentes en el mutante doble *fnb1a-fnb1b* y aún más frecuentes en el mutante triple *fnb1a-fnb1b-fnb2*, como puede verse en las imágenes en visible en la Figura 3.11.

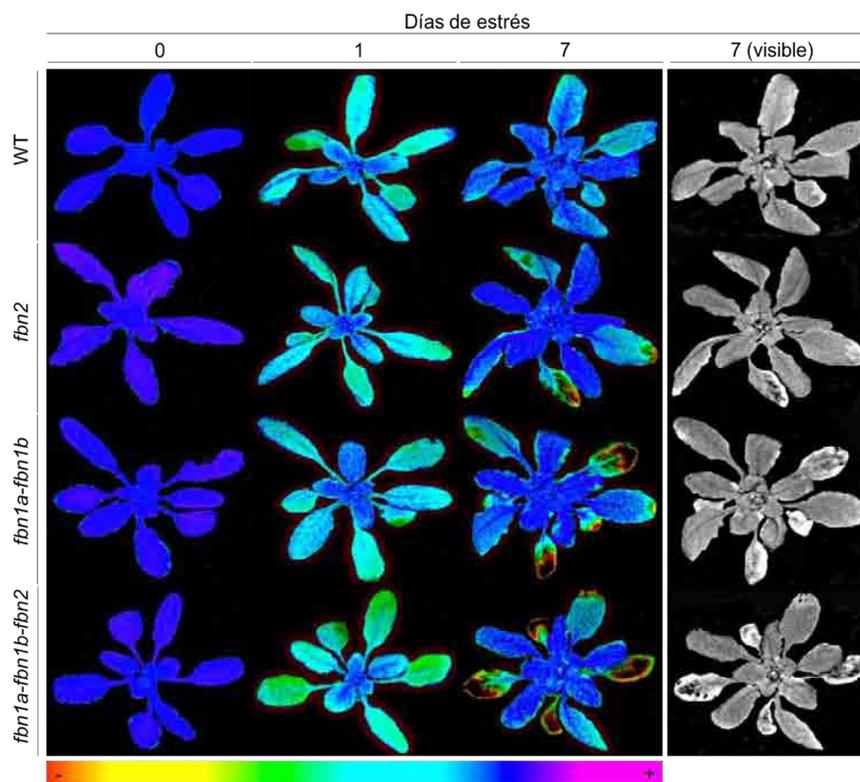


Figura 3.11: Valores (en falso color) de F_v/F_m de plantas WT y mutantes *fnb1a-fnb1b*, *fnb2* y *fnb1a-fnb1b-fnb2* sometidas a estrés por ALF durante 0, 1 y 7 días. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. La emisión de fluorescencia mínima (F_0) y máxima (F_m) se obtuvieron mediante el sistema IMAGING-PAM. F_v se calcula como $F_m - F_0$. La barra al pie de la fotografía indica la escala de valores de F_v/F_m .



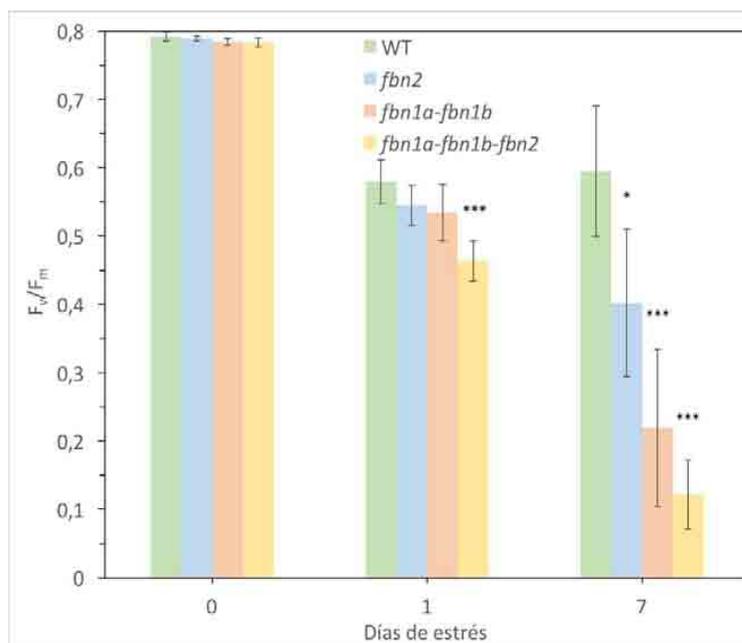


Figura 3.12: Niveles de F_v/F_m de plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* sometidas a estrés por ALF durante 0, 1 y 7 días. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. La emisión de fluorescencia mínima (F_0) y máxima (F_m) se obtuvieron mediante el sistema IMAGING-PAM. F_v se calcula como $F_m - F_0$. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) de 5 medidas. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$; *** con $p < 0,005$.

Al objeto de averiguar a qué tipo de estrés correspondía el fenotipo obtenido en Figura 3.11 y en Figura 3.12, se analizaron los valores de F_v/F_m en condiciones de estrés por AL (Figura 3.13, A) y de estrés por baja temperatura (Figura 3.13, B).



Resultados
Capítulo I

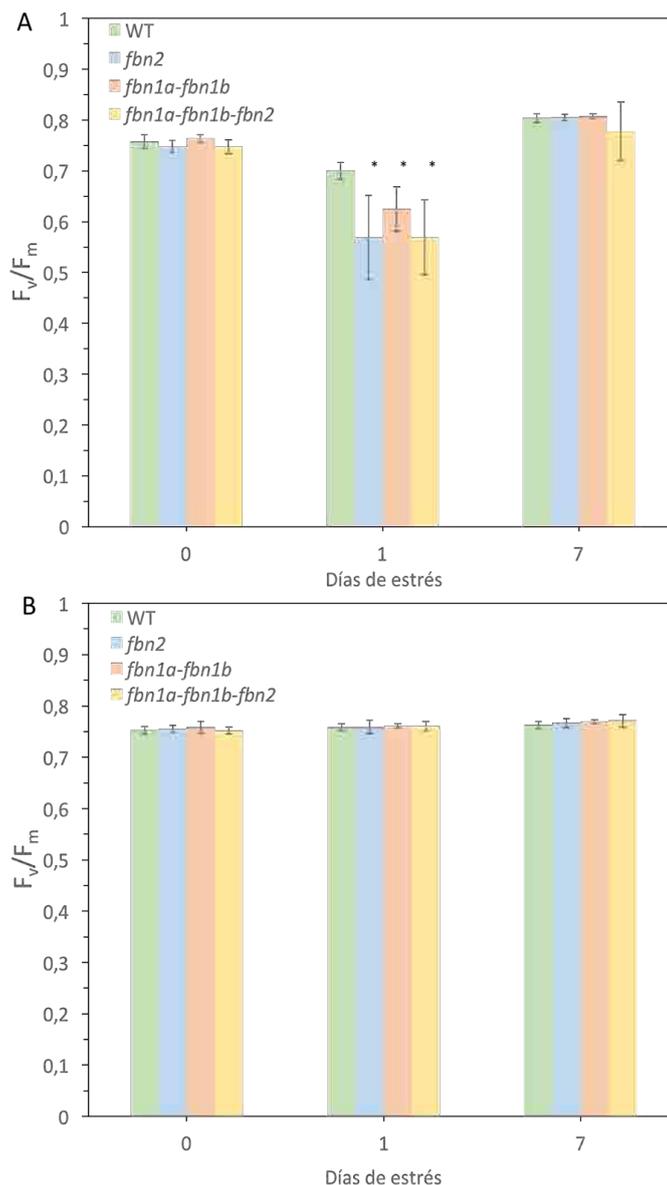


Figura 3.13: Niveles de F_v/F_m de plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* sometidas a estrés por AL durante 0, 1 y 7 días. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. La emisión de fluorescencia mínima (F_0) y máxima (F_m) se obtuvieron mediante el sistema IMAGING-PAM. F_v se calcula como $F_m - F_0$. Los estreses empleados son por AL (A) y por baja temperatura (B). Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) de 5 medidas. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$.

La baja temperatura, como condición de estrés abiótico, no afectó por sí sola al F_v/F_m de los distintos mutantes del subgrupo FBN1-2 (Figura 3.13, B), mientras que el estrés por AL hizo que fuese menor en todos ellos al compararlos con WT (Figura 3.13, A). Esta diferencia significativa desapareció a los 7 días de estrés.



Se procedió a estudiar la respuesta de las distintas líneas de plantas empleadas con respecto a los parámetros fotosintéticos $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y $1-qL$ a diferentes intensidades de luz actínica y en condiciones de estrés por ALF. En CN de crecimiento no se vieron diferencias significativas con respecto a WT (Figura 3.14).

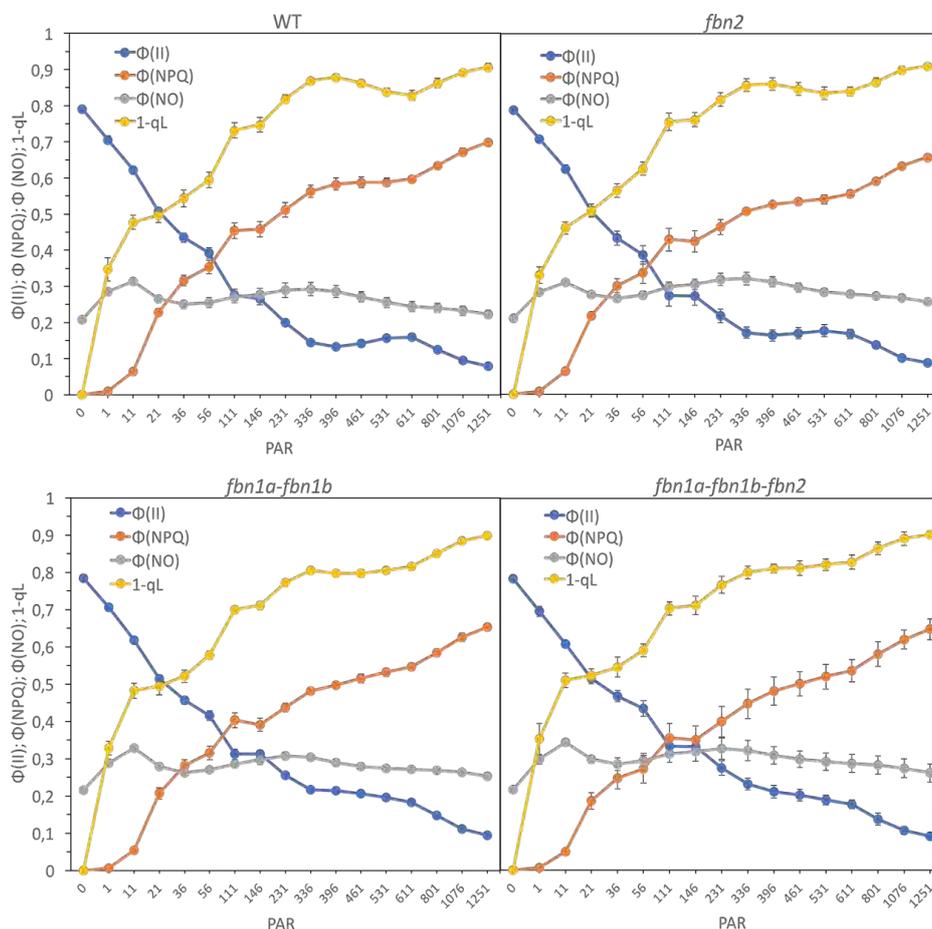


Figura 3.14: $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y $1-qL$ a intensidades crecientes de luz actínica de plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* en CN de crecimiento. Se usó el sistema IMAGING-PAM. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. Cada punto corresponde con la media de 5 medidas independientes (\pm desviación estándar). PAR = radiación fotosintéticamente activa.

Se aplicó un estrés conjunto por ALF durante 1 día y se analizaron los mismos parámetros fotosintéticos que en la Figura 3.14. Se observó que la respuesta obtenida difería de la obtenida en plantas WT y era similar en los tres mutantes utilizados (Figura 3.15). $\Phi(NPQ)$ y $\Phi(NO)$ variaron con respecto a WT, donde se observó que $\Phi(NO)$ aumentaba $\Phi(NPQ)$ disminuía, mientras que los otros dos parámetros restantes se mantenían iguales.



Resultados
Capítulo I

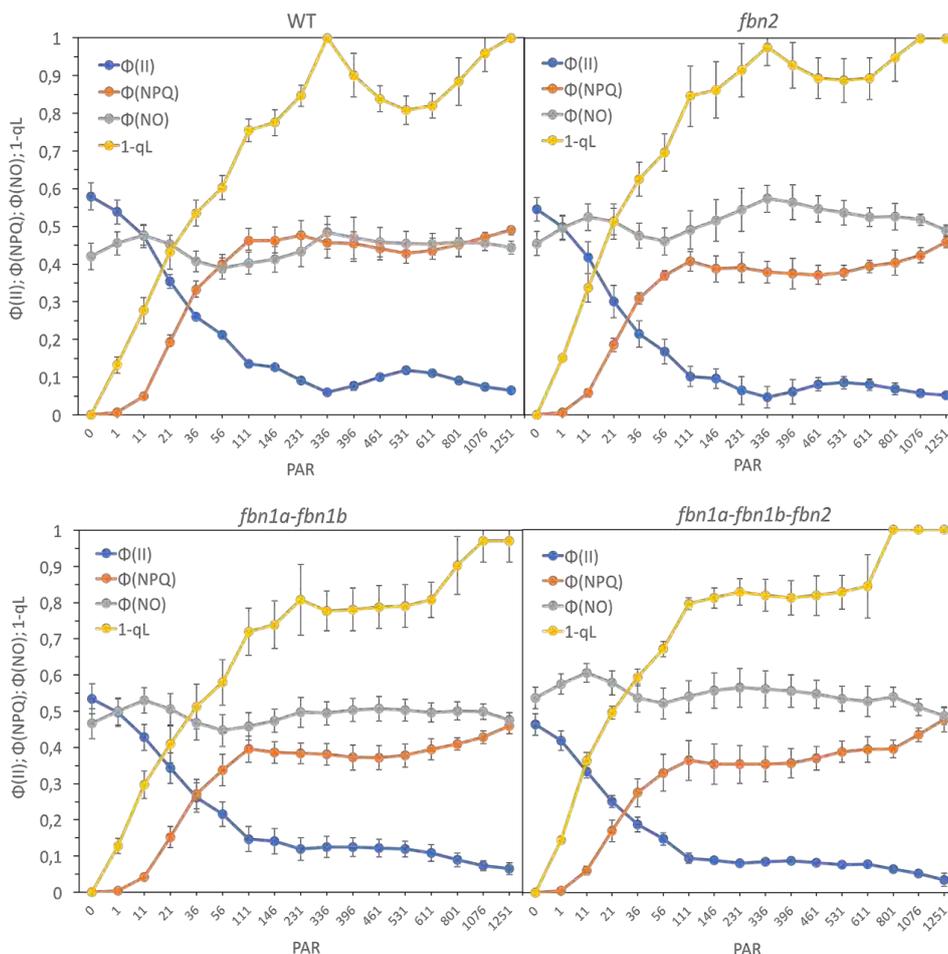


Figura 3.15: $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y $1-qL$ a intensidades crecientes de luz actínica de plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* sometidas a estrés por ALF durante 1 día. Se usó el sistema IMAGING-PAM. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. Cada punto corresponde con la media de 5 medidas independientes (\pm desviación estándar). PAR = radiación fotosintéticamente activa.

Se aplicó un estrés conjunto por ALF durante 7 días y se analizaron los mismos parámetros fotosintéticos que en los casos anteriores. La respuesta obtenida puede ser observada en la Figura 3.16. La disminución de $\Phi(NPQ)$ y el aumento de $\Phi(NO)$ en el mutante *fbn2* fueron aún mayores a 7 días de estrés. En el mutante *fbn1a-fbn1b* estos cambios fueron más acentuados que en el mutante *fbn2*, mientras que su $\Phi(II)$ disminuyó hasta casi ser cero y su $1-qL$ fue casi uno. Esto mismo ocurrió en el mutante *fbn1a-fbn1b-fbn2*, con la apreciación de que su comportamiento fue incluso más acentuado que en el caso de *fbn1a-fbn1b*.



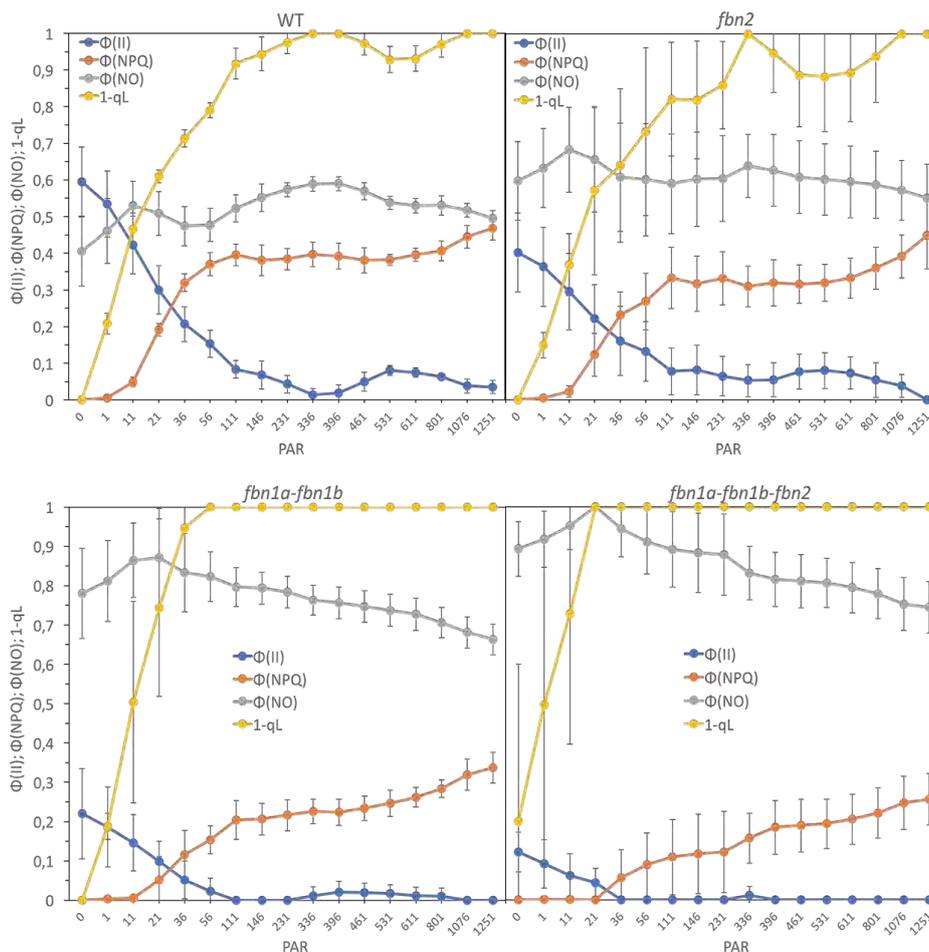


Figura 3.16: $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y $1-ql$ a intensidades crecientes de luz actínica de plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* sometidas a estrés por ALF durante 7 días. Se usó el sistema IMAGING-PAM. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. Cada punto corresponde con la media de 5 medidas independientes (\pm desviación estándar). PAR = radiación fotosintéticamente activa.

Los resultados analizados en los tres ensayos anteriores están en consonancia a lo observado con los niveles de F_v/F_m y apoya la teoría de que FBN2 se comporta de forma diferente a FBN1s y que las consecuencias de la eliminación de estas proteínas son más notables al eliminar ambos grupos de FBNs que al eliminar solo uno de ellos.

3.1.7. Mutaciones en las proteínas del grupo FBN1-2 aumentan el estrés oxidativo mediado por alta intensidad lumínica y baja temperatura

La formación de zonas necróticas en hojas de los diferentes mutantes del subgrupo FBN1-2 sometidos a estrés por ALF podrían indicar la formación de ROS en estas plantas. Para testar esta hipótesis se procedió a analizar el contenido de algunas de estas especies; en



Resultados

Capítulo I

concreto se procedió a la tinción de hojas de los diferentes mutantes para detectar la presencia de H_2O_2 y de O_2^- .

Para estudiar el contenido en peróxido de hidrógeno se llevó a cabo un ensayo de tinción con DAB. Se crecieron plantas de las diferentes líneas 34 días en condiciones de DC, tras lo cual se las sometió a un estrés por ALF. Se tomaron muestras de hojas de plantas a 0 y 7 días de estrés.

A tiempo 0, correspondiente a la tinción en plantas no estresadas, no se observaron diferencias apreciables en el contenido en H_2O_2 en los diferentes mutantes comparados con el WT. Sin embargo, a los 7 días de estrés se puede observar que hubo una mayor acumulación, aunque pequeña, de peróxido en los mutantes del subgrupo FBN1-2 (Figura 3.17).

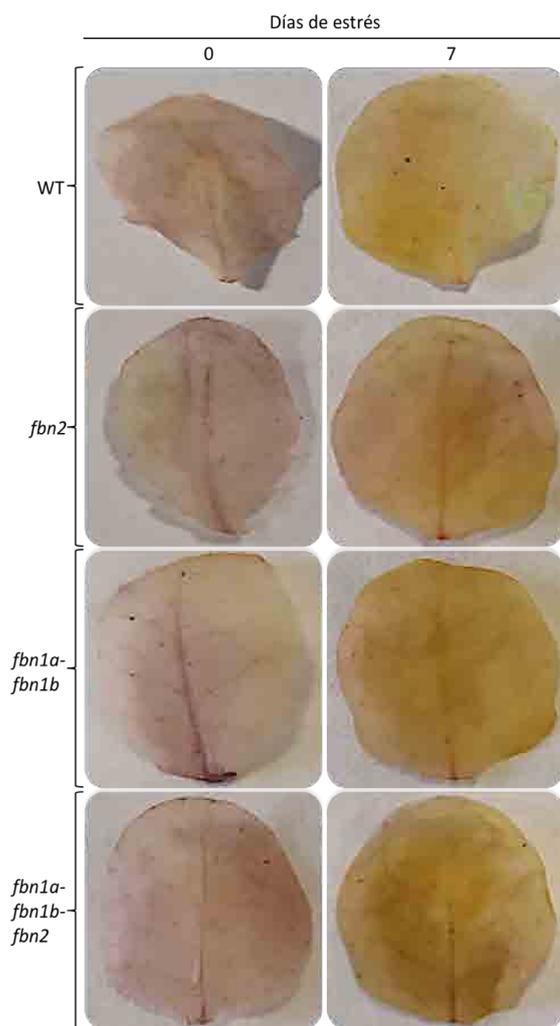


Figura 3.17: Determinación de la presencia de peróxido de hidrógeno mediante tinción con DAB en plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2*. Las plantas fueron crecidas en DC durante 34 días. Posteriormente se sometieron a un estrés por ALF y se tomaron medidas a 0 y 7 días. Las imágenes escogidas son las más representativas de 5 réplicas biológicas.



Para estudiar el contenido en ión superóxido se llevó a cabo un ensayo de tinción con NBT, exactamente de la misma manera y en las mismas condiciones que en el ensayo de H₂O₂.

En el estudio de la presencia de O₂⁻ se puede observar que no existieron diferencias apreciables, al igual que en los casos anteriores, entre los mutantes estudiados y el WT a 0 días de estrés. Cabe mencionar que no fue posible eliminar un mayor porcentaje de clorofila de las hojas tratadas con NBT en este caso y de ahí proviene el color verde de las mismas. Al ser aplicado el estrés por ALF, se observa que, a los 7 días de estrés, se acumuló mayor cantidad de O₂⁻ en los mutantes que en el WT (Figura 3.18).

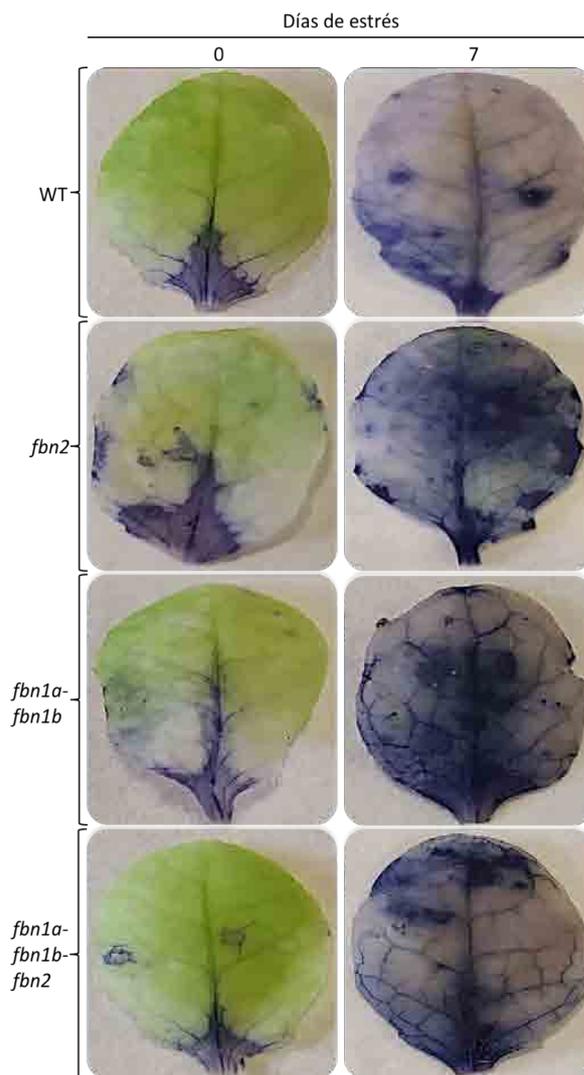


Figura 3.18: Determinación de la presencia de ión superóxido mediante tinción con NBT en plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2*. Las plantas fueron crecidas en DC durante 34 días. Posteriormente se sometieron a un estrés por ALF y se tomaron medidas a 0 y 7 días. Las imágenes escogidas son las más representativas de 5 réplicas biológicas.



Resultados

Capítulo I

Este tipo de análisis, basado en tinción, no es cuantitativo, por lo que se decidió analizar los niveles de MDA en las hojas de las plantas mutantes sometidas a estrés. El MDA es un indicador de la peroxidación de lípidos de membranas provocada por la presencia de ROS (Buege y Aust, 1978).

Se crecieron plantas y se les aplicó un estrés por ALF de la misma forma y en las mismas condiciones que en los dos ensayos anteriores. El análisis de peroxidación lipídica se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se pueden observar en Figura 3.20.

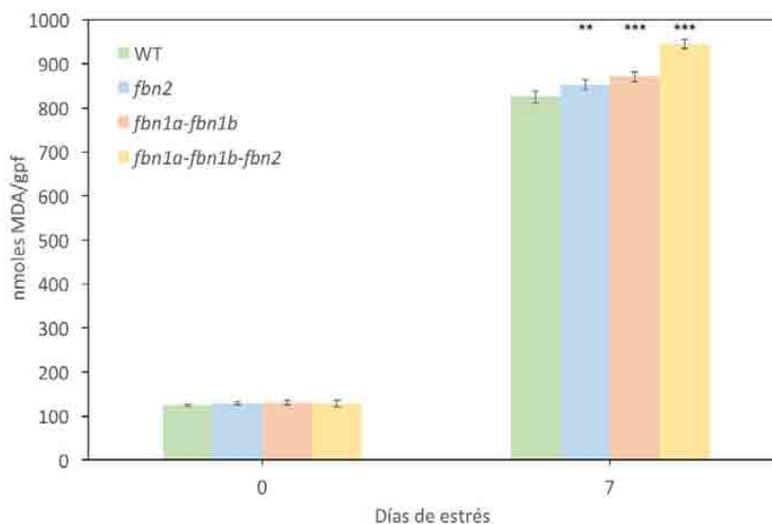


Figura 3.19: Determinación de los niveles de MDA en plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2*. Las plantas fueron crecidas en DC durante 34 días. Posteriormente se sometieron a un estrés por ALF y se tomaron medidas a 0 y 7 días. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) de 5 medidas **indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,01$; *** con $p < 0,005$.

El análisis del contenido de MDA (Figura 3.19) indica que existen diferencias significativas entre los mutantes empleados y WT en cuanto al contenido de ROS. Sin embargo, en concordancia con los resultados obtenidos en las tinciones con DAB (Figura 3.17) y NBT (Figura 3.18), estas diferencias, aunque significativas, no son muy grandes en términos numéricos y, por ello, no se observaban diferencias claras en dichas tinciones.

3.1.8. Los fenotipos observados en el mutante *fbn2* reversionen al ser transformado con el DNA genómico de FBN2

La finalidad de la obtención de esta planta transgénica es la de demostrar que los resultados obtenidos para el mutante KO *fbn2* se deben exclusivamente a la mutación en dicho gen. Al obtener una planta transgénica, partiendo de una planta mutante *fbn2* a la que le ha sido introducida la secuencia genómica completa de FBN2, podemos corroborar que los resultados mostrados en esta tesis doctoral para *fbn2* son exclusivos de la mutación en dicho gen.



La secuencia genómica empleada para este análisis fue obtenida de TAIR (<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&id=34978>), a la cual le ha sido añadida 1kb más de secuencia promotora para que el gen FBN2 esté regulado en la planta transgénica bajo su propio promotor.

Cinco líneas transformantes (resistentes a kanamicina) fueron obtenidas a partir de la transformación del mutante *fbn2*. Se recogieron semillas de forma individualizada de cada una de estas cinco plantas y se analizó la resistencia a kanamicina de estas semillas para ser seleccionadas según su frecuencia de segregación de la resistencia al antibiótico. De todas ellas, se seleccionaron dos líneas transgénicas, conocidas como T4.5 y T5.6, y con un porcentaje de resistencia de sus semillas a kanamicina en torno al 50% para posteriores análisis.

Mediante PCR se analizó la presencia del transgen en las plantas seleccionadas (Figura 3.20).

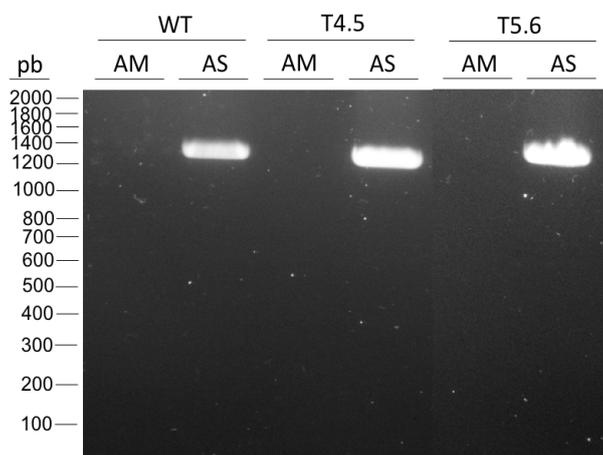


Figura 3.20: Resultado de los análisis mediante PCR de la inserción del gen FBN2 en el genoma de plantas mutantes *fbn2*. Para la identificación del alelo silvestre mediante PCR se utilizaron oligonucleótidos internos de cada gen y para el alelo mutante se usó uno de los oligonucleótidos del gen más otro propio de la inserción de T-DNA.

Una vez comprobada la inserción del gen FBN2, se procedió a estudiar la expresión de la proteína FBN2 mediante inmunoblot en estas plantas y en plantas WT usando extractos crudos de ambas líneas.

En la Figura 3.21 se puede observar que la expresión del gen FBN2 es mayor en la planta transgénica T4.5 que en el WT, posiblemente por la inserción de más de una copia del gen FBN2 en el genoma de las plantas.



Resultados
Capítulo I

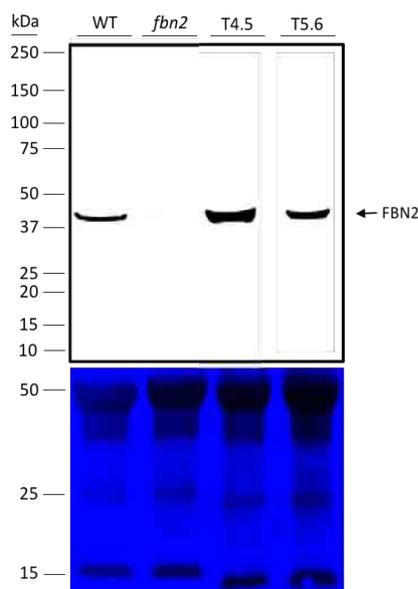


Figura 3.21: Estudio de la expresión del gen FBN2 en plantas WT, mutante *fbn2* y transgénicas *fbn2*::FBN2 T4.5 y T5.6. Inmunoblot con el anticuerpo primario Anti-FBN2 de extractos crudos de hojas de roseta de *A. thaliana*. 20 μ g de proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con el anticuerpo mencionado. En la parte superior se muestra la línea de planta a la que pertenece cada calle. A la derecha se indica la banda correspondiente a la proteína FBN2. Abajo aparece la tinción con azul de Coomassie de la membrana de PVDF usada como control de carga. A la izquierda se indica la masa molecular (kDa) y la posición de migración de proteínas empleadas como marcadores.

Como siguiente paso en la caracterización de las plantas T4.5 y T5.6, se analizó el estado del PSII determinando la fluorescencia de la clorofila a en estas plantas transgénicas y en plantas WT en condiciones de estrés por ALF. Se crecieron las plantas durante 34 días bajo un fotoperiodo de DC, tras lo cual se les aplicó un estrés por ALF durante 7 días. Se determinó el F_v/F_m en estas plantas mediante el sistema IMAGING-PAM a 0, 1 y 7 días de estrés.

La Figura 3.22 muestra los valores de F_v/F_m en las diferentes plantas empleadas en este análisis bajo un estrés por ALF.



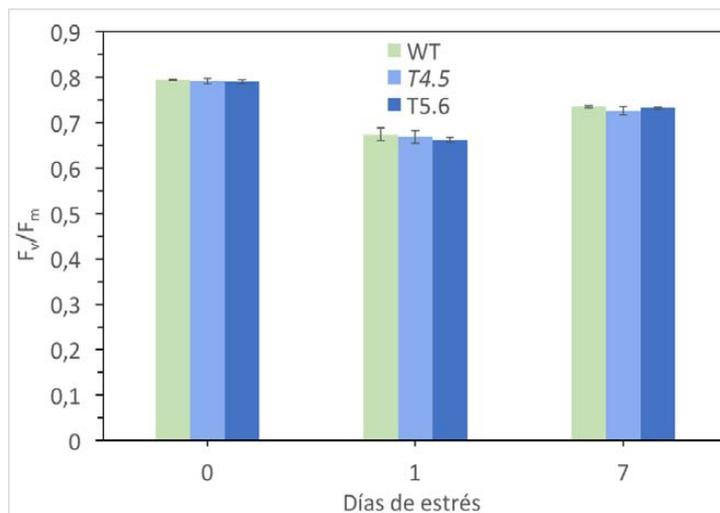


Figura 3.22: Niveles de F_v/F_m obtenidos para plantas WT y transgénicas T4.5 y T5.6 sometidas a un estrés por ALF. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. La emisión de fluorescencia mínima (F_0) y máxima (F_m) se obtuvieron mediante el sistema IMAGING-PAM. F_v se calcula como $F_m - F_0$. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) de 5 medidas.

Al analizar los valores de F_v/F_m observamos que el estado alterado del PSII se revierte al transformar plantas *fbn2* con el DNA genómico de FBN2. Dichos valores (Figura 3.22) son idénticos en plantas WT y en plantas transgénicas.

Para finalizar con la caracterización de las plantas T4.5 y T5.6 se procedió a analizar la acumulación de antocianinas en dichas plantas y en plantas WT en condiciones de estrés conjunto por ALF. Para ello se crecieron plantas durante 42 días bajo un fotoperiodo de DC, tras lo cual se les aplicó un estrés por ALF durante 21 días, tomando muestras a 0, 7 y 21 días de estrés.



Resultados

Capítulo I

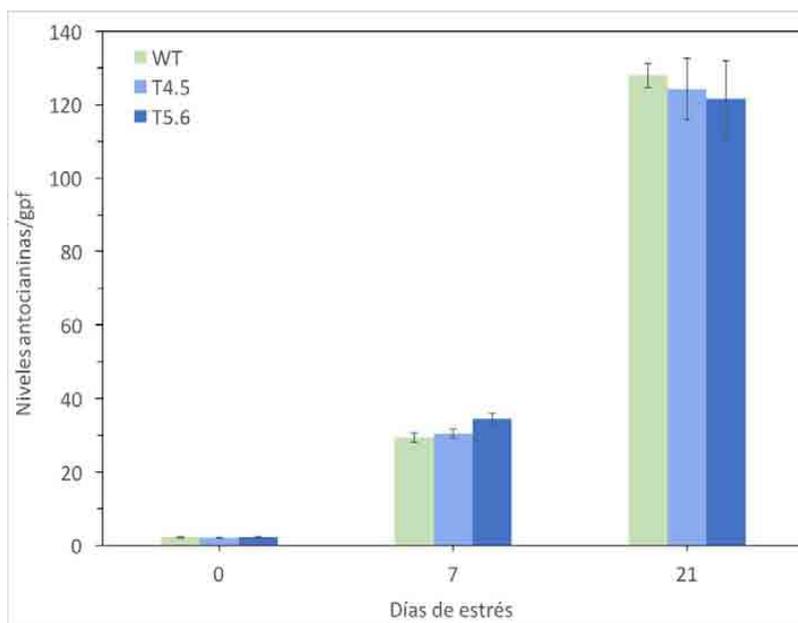


Figura 3.23: Niveles de antocianinas en plantas WT y transgénicas T4.5 y T5.6 sometidas a un estrés conjunto por ALF. Las plantas fueron cultivadas 42 días en CN de crecimiento, tras lo cual fueron sometidas a un estrés por ALF durante 21 días. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) del valor obtenido para 5 ensayos.

En la Figura 3.23 se confirma que la acumulación de antocianinas en las plantas transgénicas *fbn2::FBN2* no difiere de la obtenida en plantas WT. Como se puede observar en todos los análisis llevados a cabo, estas transgénicas se comportan prácticamente de la misma forma que plantas WT, lo que indica que la reversión de la mutación por inserción de T-DNA en el gen FBN2 se ha logrado con éxito.

3.1.9. Búsqueda de proteínas que interaccionen con FBN2 mediante ensayos de Co-IP

Los análisis transcriptómicos realizados con el mutante *fbn1a-fbn1b* sugieren que las FBNs podrían ejercer su papel modulando de algún modo la función de otras proteínas, más que afectando a la expresión de genes diana. Por ello, se procedió a la búsqueda de proteínas que interaccionaran con FBN2. La técnica empleada fue la Co-IP, usando un anticuerpo específico contra la proteína completa FBN2 (Anti-FBN2 Co-IP). Este anticuerpo es diferente al empleado previamente en los análisis de inmunoblots, el cual identificaba sólo a un polipéptido de FBN2. Estos anticuerpos obtenidos contra fragmentos de la proteína no son adecuados para inmunoprecipitar al polipéptido, por lo que se procedió a obtener un nuevo anticuerpo contra la proteína FBN2 completa. Tal como se ha comentado en el apartado anterior, FBN2 se localiza tanto en la fracción soluble, estromática, del cloroplasto, como en la fracción asociada a



membranas. Se decidió co-inmunoprecipitar ambas fracciones por separado con objeto de identificar proteínas que interaccionaran con cada una de las poblaciones de FBN2

El ensayo comenzó con el aislamiento de cloroplastos de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana*. Una vez aislados, se procedió a romperlos y separar ambas fracciones por ultracentrifugación. En el caso de la población de FBN2 asociada a PGs, su inmunoprecipitación podría precipitar también otras proteínas asociadas a los PGs pero que no interaccionen con FBN2. Para evitarlo, tras la separación de ambas fracciones, se procedió a solubilizar la población de membranas incubándola con 0,01% (v/v) de Tritón X-100, una concentración de este detergente no iónico que se determinó suficiente para separarla de las membranas (Figura 3.24).

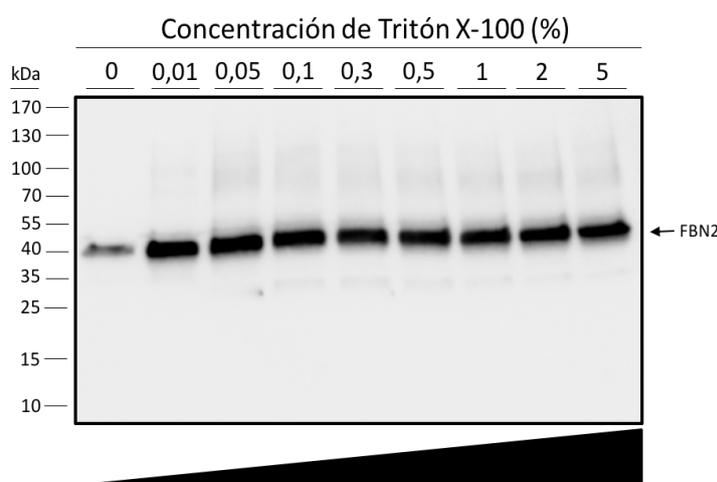


Figura 3.24: Estudio de la solubilización de FBN2 por el detergente Tritón X-100. Cloroplastos aislados de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* se rompieron e incubaron con cantidades crecientes (v/v) de Tritón X-100 a 4°C durante 30 min. Tras la incubación, las muestras fueron ultracentrifugadas a 100000 g y 4°C durante 1 hora y las proteínas de la fracción soluble fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con el anticuerpo primario Anti-FBN2. Los números hacen referencia al porcentaje de Tritón X-100 empleado en cada caso. A la izquierda se indica la masa molecular (kDa) y la posición de migración de proteínas empleadas como marcadores.

Tras la solubilización de la fracción de membranas, se procedió al ensayo de Co-IP y la posterior precipitación con acetona (ver Materiales y Métodos) para concentrar y limpiar la fracción de proteínas tanto con la población de FBN2 estromática como con la población de FBN2 asociada a membranas. Por último, se analizó mediante espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del IBVF. Se llevó a cabo un análisis paralelo usando plantas mutantes *fbn2* para identificar a aquellas proteínas que coimmunoprecipitan de manera no específica. Por otro lado, también se analizó que el anticuerpo Anti-FBN2 Co-IP no reconociera a las proteínas FBN1a o FBN1b mediante inmunoblot tanto en condiciones nativas como desnaturizantes (Figura 3.25).



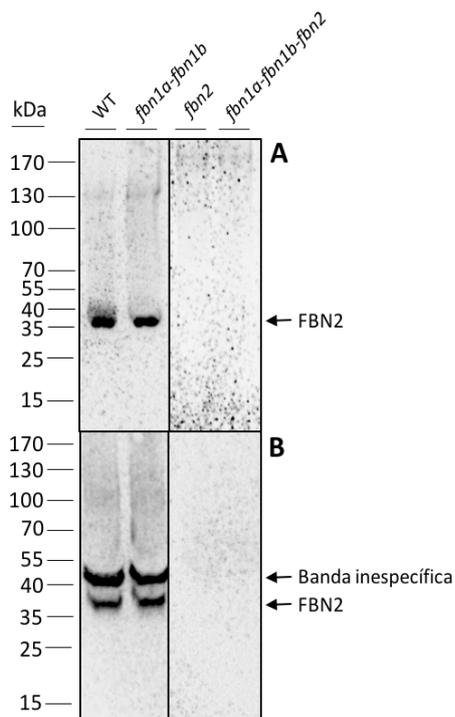


Figura 3.25: Estudio de la especificidad de Anti-FBN2. Se emplearon hojas de roseta de *A. thaliana* de plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2* trituradas con un *Tissue Tearor*TM en 50 mM HEPES pH 7,5. 30 µg de proteínas procedentes de los extractos crudos fueron cargadas en un gel de poliacrilamida nativo (A) o con SDS (B), transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con el anticuerpo primario Anti-FBN2 Co-IP. A la izquierda se indica la masa molecular (kDa) y la posición de migración de proteínas empleadas como marcadores.

Se llevaron a cabo tres ensayos independientes de Co-IP con ambas poblaciones de FBN2. Las proteínas encontradas en todos los ensayos independientes de la población asociada a membranas se encuentran en la Tabla 3. Las únicas proteínas encontradas en todos los ensayos independientes de la población estromática fueron las isoformas 1 y 2 de la fructosa bifosfato aldolasa: FBA1 y FBA2. Estas isoformas han sido descritas como proteínas asociadas a los PGs (Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006), pero no son consideradas parte del “core” como lo son las FBNs 1a, 1b, 2 y 4, entre otras (Lundquist *et al.*, 2012).



Código AGI	Nombre
At4g04020^a	FBN1a
At2g21330^b	FBA1
At4g38970^b	FBA2
At3g45140	LOX2
At5g42650^b	AOS
At5g38660	Aclimatación de la fotosíntesis al ambiente, APE1
At4g19170^a	CCD4
At1g20020	Ferredoxin-NADP(H) óxidoreductasa 2, FNR2
At3g18890	Miembro de la superfamilia de plegamiento Rossmann de unión a NAD(P), Tic62
At3g26840^a	Diacilglicerol acetiltransferasa 4, DGAT4
At5g08740^a	NDC1
At4g23890	Subunidad S de la NAD(P)H-quinona oxidoreductasa, NdhS
At1g32220^a	Proteína relacionada con la flavina reductasa
At4g35250	Miembro de la superfamilia de plegamiento Rossmann de unión a NAD(P)

Tabla 3.1: Proteínas que coimmunoprecipitan con la población asociada a membranas de FBN2. La tabla indica el código AGI de cada gen encontrado, así como su nombre y/o detalles que caractericen a dicho gen. En negrita aparecen las proteínas asociadas a los plastoglobulos, descritas por: ^aLundquist y cols (Lundquist *et al.*, 2012) y ^bVidi y cols (Vidi *et al.*, 2006) y Ytterberg y cols (Ytterberg *et al.*, 2006).

Es interesante observar que la mayor parte de proteínas obtenidas por Co-IP de la población asociada a membrana pertenezcan al “core” del proteoma de los PGs y, sin embargo, no aparezcan las kinasas de tipo ABC1, el tipo de proteínas más abundante en estos sub-organulos después de las FBNs. Esto indica que las proteínas localizadas en el análisis de Co-IP interaccionan efectivamente con FBN2 y no son meros contaminantes presentes en el análisis porque se localizan también en los PGs. También hay otras proteínas que no han sido previamente descritas como parte de dicho “core”, como por ejemplo la isoforma 2 de la ferredoxin-NADP(H) óxidoreductasa (FNR2), la cual forma un complejo con Tic62 (Benz *et al.*,



Resultados

Capítulo I

2009), también encontrada en nuestros análisis de Co-IP. Otro de estos ejemplos es APE1, involucrada en la adaptación de la planta a condiciones ambientales fluctuantes, concretamente a través de las MTs (Walters *et al.*, 2003).

3.1.10. FBN2 interacciona *in vivo* con FBN1a, FBN1b o con otro polipéptido de FBN2

En la Tabla 3.1 se puede observar que FBN1a coinmunoprecipita con FBN2. Para corroborar este resultado, se analizó la interacción *in vivo* entre estos dos polipéptidos empleando el sistema BiFC mediante expresión transitoria de ambos genes en hojas del mesófilo de *N. benthamiana*. El método se basa en la división de la proteína fluorescente YFP en dos mitades, una amino terminal y otra carboxilo terminal (en este trabajo usamos la parte carboxilo terminal de la proteína CFP), que por sí solas no emiten fluorescencia. Estos fragmentos son clonados para que se fusionen traduccionalmente con las proteínas estudiadas. Si dichas proteínas interactúan entre sí, el fluoróforo se reconstruye y se observa fluorescencia de la proteína testigo. Para ello, los cDNA de FBN2 y FBN1a fueron clonados en los vectores binarios pXNGW (nYFP) y pXCGW (cCFP) y posteriormente expresados en *Nicotiana benthamiana*.

Los resultados obtenidos pueden verse en la Figura 3.26. Se puede observar que ambas proteínas interactuaron en un patrón punteado similar al observado para la interacción entre FBN1a y FBN1b (Gámez-Arjona *et al.*, 2014a) y que concuerda con una localización plastoglobular de FBN2.

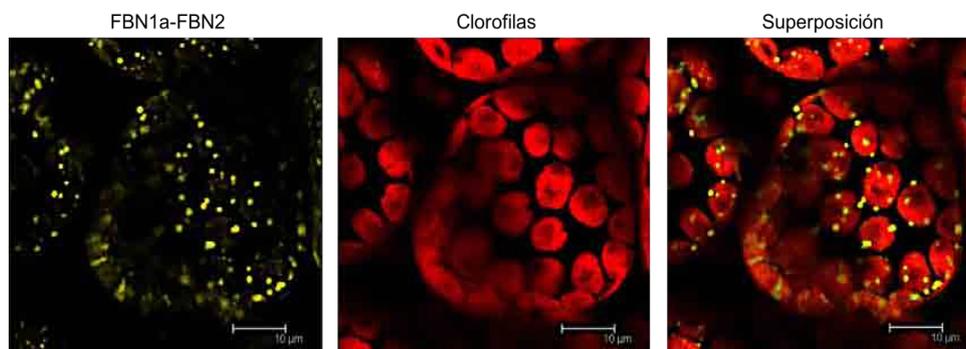


Figura 3.26: Estudio de la interacción *in vivo* entre FBN1a y FBN2 mediante ensayo de BiFC. Los cDNAs que codifican para las proteínas completas de FBN1a y FBN2 se fusionaron al extremo amino terminal de la YFP y al extremo carboxilo terminal de la CFP y se transformaron con ellas hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la fluorescencia de la YFP/CFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 10 µm.

Considerando la homología existente entre FBN2 y las FBN1s y que estas últimas son capaces de interactuar entre ellas y consigo mismas en un patrón cabeza-cola, lo que sugiere la posibilidad de que formen homodímeros, heterodímeros u oligómeros *in vivo* (Gámez-Arjona *et al.*, 2014a), se analizó si FBN2 podía unirse *in vivo* a otros polipéptidos de FBN2 (Figura 3.27).



Se empleó el sistema BiFC de la misma forma y en las mismas condiciones que para estudiar la interacción FBN1a-FBN2.

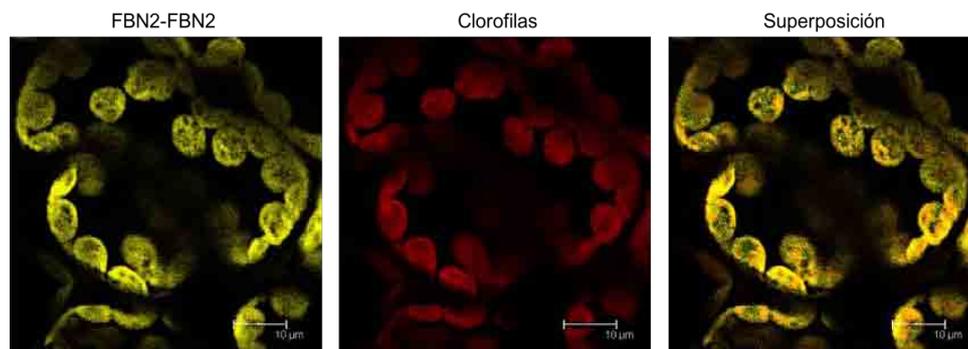


Figura 3.27: Estudio de la interacción *in vivo* entre polipéptidos de FBN2 mediante ensayo de BiFC. El cDNA que codifica para la proteína completa FBN2 se fusionó al extremo amino terminal de la YFP y al extremo carboxilo terminal de la CFP y se transformaron con ellas hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la fluorescencia de la YFP/CFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 10 μm.

FBN2 es capaz de interactuar con otro polipéptido de FBN2. Todos estos datos de interacción entre FBN1a, FBN1b y FBN2 sugieren que estas tres proteínas podrían formar una especie de “red” en la superficie de los PGs. Además, podríamos especular que esa misma “red” sería necesaria para el reclutamiento de otras proteínas como aquellas que encontramos mediante el ensayo de Co-IP (Tabla 3.1) y que han sido descritas como componentes plastoglobulares.

3.1.11. FBN2 interactúa *in vivo* con la aleno óxido sintasa (AOS)

La proteína AOS también fue previamente descrita como parte del “core” del proteoma de los PGs (Ytterberg *et al.*, 2006), pero posteriormente fue eliminada de esta categoría tras análisis más precisos (Lundquist *et al.*, 2012). Esta proteína, junto con la lipoxigenasa (LOX) y la aleno óxido ciclasa (AOC), catalizan los primeros pasos de la biosíntesis del ácido jasmónico en el cloroplasto (Wasternack y Song, 2017). En el análisis de Co-IP de FBN2 aparece también LOX2 (Tabla 3.1), además de AOC, pero esta última no ha sido incluida en la Tabla 3.1 debido a que no aparece en todas las réplicas de Co-IP llevadas a cabo.

FBN2 interactúa con AOS mediante ensayo de Co-IP (Tabla 3.1). Para corroborar esta interacción se empleó de nuevo el sistema BiFC descrito previamente. Debido a la similitud entre las FBN1s y FBN2 y teniendo en cuenta el hecho de que estas proteínas interactúan entre sí, se decidió estudiar si AOS podría igualmente interactuar con FBN1a mediante este mismo sistema. Los resultados obtenidos aparecen en la Figura 3.28, donde se puede



Resultados

Capítulo I

comprobar que AOS interacciona *in vivo* tanto con FBN2 (Figura 3.28, A), como con FBN1a (Figura 3.28, B).

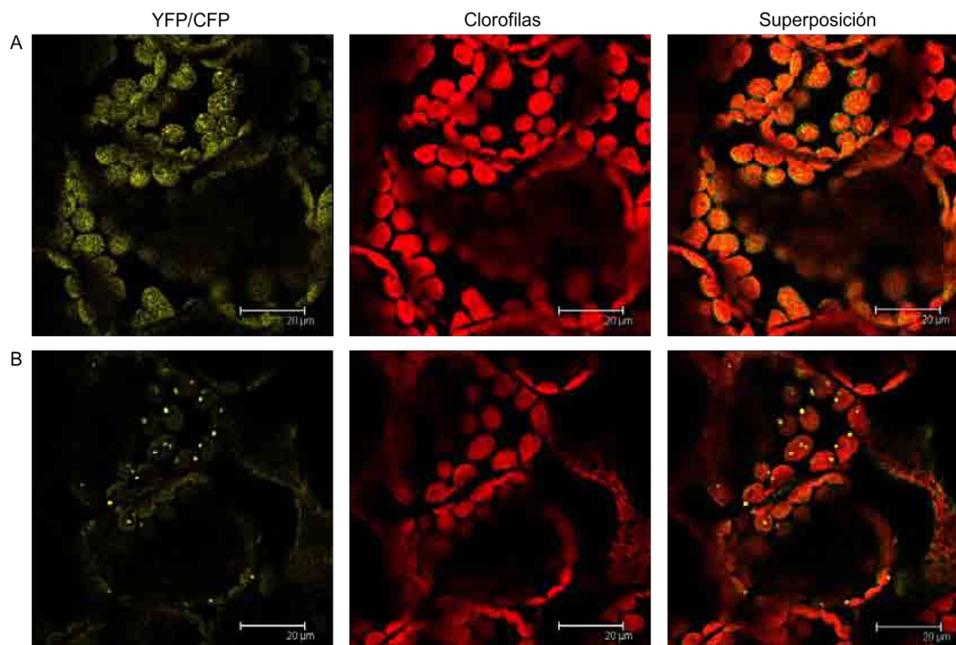


Figura 3.28: Estudio de la interacción *in vivo* entre FBN2 y AOS (A) y entre FBN1a y AOS (B) mediante ensayo de BiFC. Los cDNAs que codifican para las proteínas completas de FBN1a, FBN2 y AOS se fusionaron al extremo amino terminal de la YFP y al extremo carboxilo terminal de la CFP y se transformaron con ellas hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la fluorescencia de la YFP/CFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 20 μm.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

3.2. CAPÍTULO II

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE FBN4

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

3.2. Análisis de la función de FBN4

La proteína FBN4 forma, junto con FBN1a, -1b y -2, el grupo de FBNs más abundante en PGs (Lundquist *et al.*, 2012). Como se ha comentado en la Introducción, se ha propuesto que esta FBN estaría implicada en la acumulación de PQ por los PGs. Sin embargo, no se conoce su mecanismo de acción o el efecto de su eliminación en otros parámetros de la planta. Por ello, se decidió analizar mutantes de *Arabidopsis* carentes de FBN4, así como obtener y analizar las diferentes combinaciones de mutantes carentes de las proteínas FBN1a, -1b, -2 y -4.

3.2.1. Los mutantes KO *fbn4-1* y *fbn4-2* carecen de la proteína FBN4

Con la finalidad de estudiar el fenotipo provocado por la ausencia de FBN4, se procedió a aislar mutantes KO por inserción de T-DNA en el gen que la codifica (At3g23400). La finalidad de caracterizar dos mutantes en vez de uno, como se ha comentado anteriormente, era la de demostrar que ambos se comportaban de la misma manera y, por tanto, las alteraciones fenotípicas observadas se deberían a la ausencia de la proteína estudiada y no a otra mutación. Se obtuvieron dos líneas independientes procedentes de las colecciones del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK, líneas SALK_014831 (nombrada *fbn4-1*) y SALK_122950 (nombrada *fbn4-2*). La línea *fbn4-1* posee una inserción en el cuarto exón, mientras que la línea *fbn4-2* posee una inserción de T-DNA en la región 5'UTR. Se utilizó como molde DNA extraído de las plantas y los oligonucleótidos específicos indicados en Materiales y Métodos.

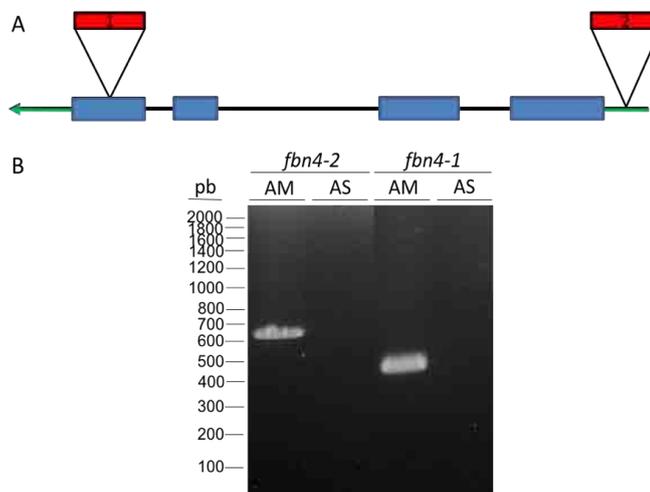


Figura 3.29: Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes *fbn4-1* y *fbn4-2* y resultados de los análisis mediante PCR de la inserción de T-DNA en el genoma de dichas líneas. Se muestran los sitios de inserción de T-DNA en el gen FBN4 en cada línea mutante (A) y los resultados de amplificación de sus correspondientes secuencias (B) en las líneas mutantes empleadas. Para la identificación del alelo silvestre mediante PCR se utilizaron oligonucleótidos internos de cada gen y para el alelo mutante se usó uno de los oligonucleótidos del gen más otro propio de la inserción de T-DNA. En A, las cajas azules representan los exones, las rayas negras muestran los intrones, las rayas verdes muestran las regiones UTR y las cajas rojas representan las inserciones de T-DNA. En B, se muestra a la izquierda la posición de las diferentes bandas (en pb) del marcador de tamaño empleado.



Resultados

Capítulo II

En la Figura 3.29 se muestra el esquema del gen At3g23400 (FBN4) y la inserción de T-DNA en cada línea mutante, además de mostrar los resultados de los ensayos de PCR empleados para identificar líneas mutantes homocigotas para cada uno de ellos.

Una vez comprobado que ambas líneas de plantas eran mutantes homocigotas, se procedió a la comprobación de si carecían de la proteína FBN4. Previamente a este análisis se llevó a cabo la titulación del anticuerpo primario Anti-FBN4, anticuerpo específico producido durante esta tesis doctoral y que reconoce al epítipo PDSFRPSSNPGTGD de la proteína FBN4, comprendido entre los aminoácidos 245 y 258, para encontrar su dilución óptima de trabajo. Se usaron para este fin extractos crudos obtenidos de plantas WT.

En la Figura 3.30 se muestra que la dilución idónea para el empleo del anticuerpo mencionado es 1:1000, dilución a la que se obtiene una señal más clara.

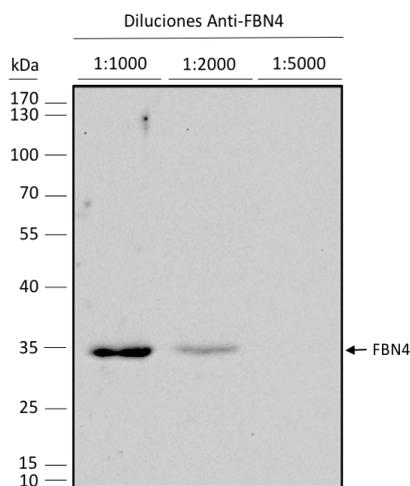


Figura 3.30: Titulación del anticuerpo Anti-FBN4. Inmóblot con el anticuerpo primario Anti-FBN4 de extractos crudos de hojas de roseta de *A. thaliana*. 30 µg de proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con el anticuerpo mencionado. En la parte superior se muestran las diluciones del anticuerpo empleadas en cada calle. A la derecha se indica la banda correspondiente a la proteína FBN4. A la izquierda se muestra la posición y la masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores.

Tras la titulación del anticuerpo, se estudió la expresión de la proteína FBN4 en los mutantes *fbn4-1* y *fbn4-2* y en plantas WT usando extractos crudos de las tres líneas de plantas.



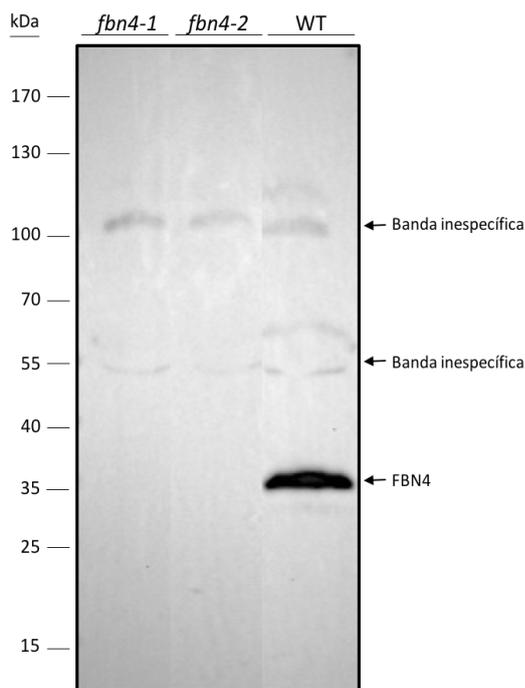


Figura 3.31: Identificación de la proteína FBN4 en plantas WT y mutantes KO *fbn4-1* y *fbn4-2*. Inmunoblot con el anticuerpo primario Anti-FBN4 de extractos crudos de hojas de roseta de *A. thaliana*. 30 µg de proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a membranas de PVDF e incubadas con el anticuerpo mencionado. En la parte superior se muestra la línea de planta a la que pertenece cada calle. A la derecha se indica la banda correspondiente a la proteína FBN4 y dos bandas inespecíficas empleadas como controles de carga. A la izquierda se muestra la posición y la masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores.

Se comprobó que los mutantes *fbn4-1* y *fbn4-2* carecen por completo de la proteína FBN4 (Figura 3.31).

A continuación, se procedió a analizar la localización de FBN4 para darnos una idea de las funciones que puede estar llevando a cabo y, además, corroborar los datos de localización de FBN4 presentes en la bibliografía.

3.2.2. FBN4 presenta una localización diferente a las del subgrupo 1-2

Lundquist y cols. (Lundquist *et al.*, 2012) observaron que FBN4 es 32 veces más abundante en los PGs que en las MTs y 121 veces más abundante en aquellos que en el estroma. En el mismo estudio se indicaba que FBN2 es 1188 veces más abundante en estos que en el estroma y 59 veces más abundante que en los tilacoides en general.

Sin embargo, como se ha comentado previamente, al analizar la localización del péptido de fusión FBN2-GFP mediante microscopía confocal y la presencia de FBN2 en las fracciones solubles o de membranas del cloroplasto, se observó que FBN2 se localiza tanto en el estroma como asociado a las MTs (Figura 3.1).



Resultados

Capítulo II

Con objeto de averiguar en qué compartimento cloroplastídico se encontraba realmente FBN4, se llevaron a cabo los mismos tipos de análisis que los realizados para con FBN2. La Figura 3.32 muestra los ensayos de inmunoblot resultantes de la incubación de las fracciones cloroplásticas solubles y de membranas con los anticuerpos Anti-FBN4, Anti-GLN2 y Anti-PsbA. Ambas fracciones solo presentaban señal de sus respectivos marcadores, indicando que no existía contaminación de una fracción a otra. La proteína FBN4 aparecía exclusivamente en la fracción de MTs, por lo que no hay una población de FBN4 soluble en el estroma como ocurría con FBN2. Sin embargo, con este único ensayo aún no se podía asegurar que la población de FBN4 asociada a MTs se localizase exclusivamente en asociación con los PGs o pudiera tal vez estar también asociada a otras regiones de aquellas.

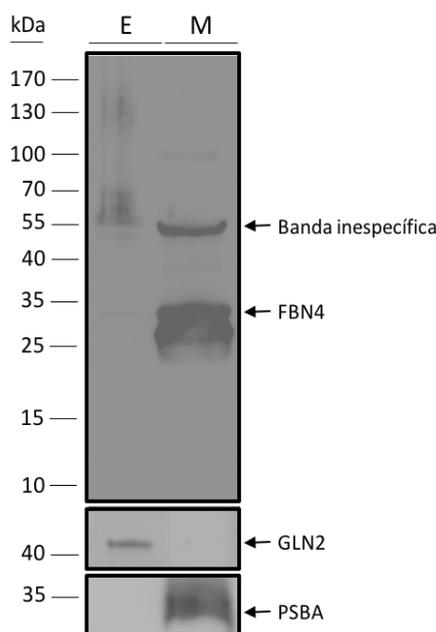


Figura 3.32: Estudio de la localización sub-cloroplástica de la proteína FBN4 mediante inmunoblot. Se rompieron cloroplastos aislados de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* y se aislaron las fracciones estromática (E) y de membranas (M) por ultracentrifugación a 100000 g y 4°C durante 1 hora. El precipitado se resuspendió en el mismo volumen que el sobrenadante y 30 µg de proteínas de cada fracción fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con los anticuerpos Anti-FBN4, Anti-GLN2 o Anti-PsbA. A la derecha aparecen señaladas las bandas correspondientes a cada una de las proteínas reconocidas. A la izquierda se muestra la posición y la masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores.

Con la finalidad de discernir entre estas dos opciones, se realizaron dos ensayos complementarios.

Por un lado, se analizó la localización del péptido de fusión FBN4-GFP mediante su expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* (Figura 3.33).

Por otro lado, se estudió el perfil de distribución de FBN4 dentro de las MTs (Figura 3.34). Para ello, se aislaron cloroplastos de hojas de roseta de plantas WT de *A. thaliana* y, una vez



aislados, se rompieron y se separaron las fracciones estromática y de membrana por ultracentrifugación. Se descartó la fracción estromática y la fracción de membrana se aplicó a un gradiente discontinuo de sacarosa para ser ultracentrifugada y separada en fracciones de 0,5 ml.

En la Figura 3.33 se observa que FBN4-GFP exhibía un patrón de fluorescencia en forma de puntos similar al obtenido en las proteínas FBN1s y característica de las proteínas que se encuentran asociadas a los PGs (Gámez-Arjona *et al.*, 2014a). Aun así, el patrón es ligeramente diferente al de las proteínas FBN1s. En la Figura 3.34 se observa que FBN4 se localiza preferentemente en las fracciones de membranas con una densidad intermedia (fracciones 13-21), fracciones en las que apenas se detecta la presencia de PsbA (marcador de la presencia de PSII). También se detecta la presencia de FBN4 en fracciones de baja densidad (fracciones 3-11) y en aquellas donde se localiza el PSII (fracciones 23-29). Estos datos sugieren que FBN4 se localiza preferentemente en PGs, aunque una pequeña población de esta proteína podría localizarse en otras zonas de las MTs.

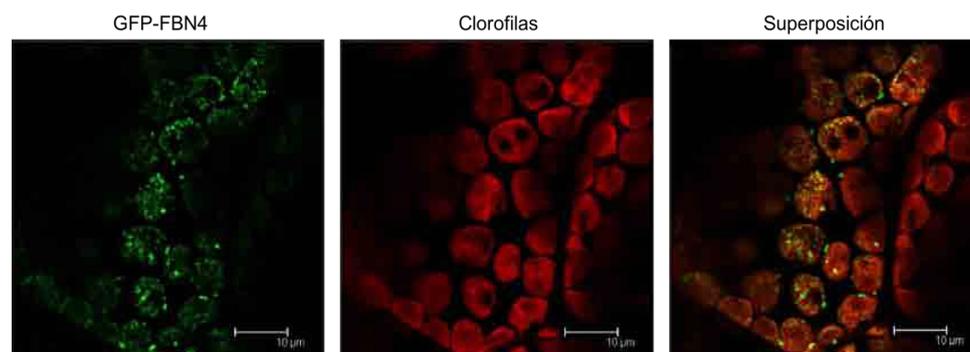


Figura 3.33: Localización sub-cloroplástica de la proteína FBN4 mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*. Se observan las imágenes tomadas mediante microscopía confocal de fluorescencia de la proteína FBN4 fusionada a la proteína testigo GFP. La construcción se expresó bajo el control del promotor constitutivo 35S. Se muestra la señal emitida por el péptido de fusión FBN4-GFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 10 µm.



Resultados
Capítulo II

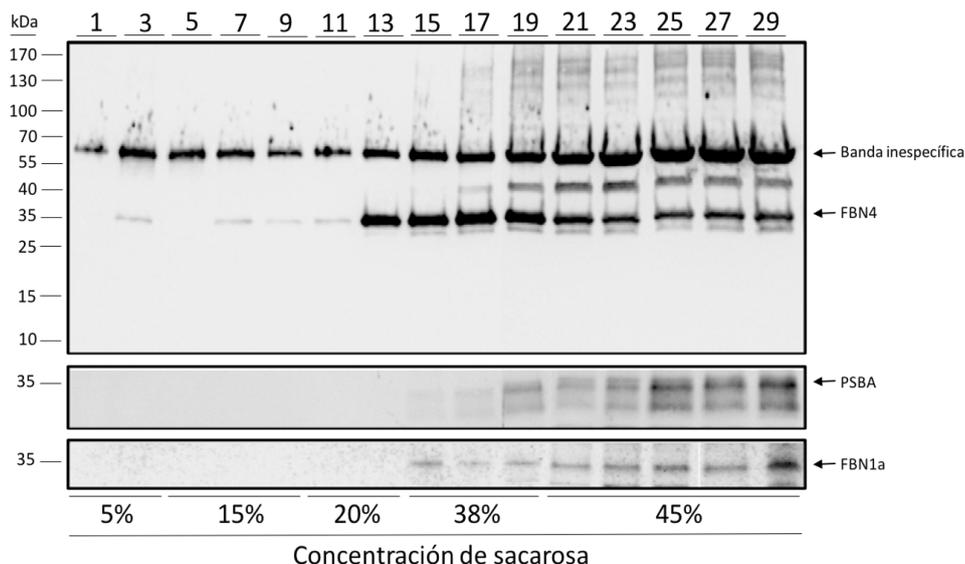


Figura 3.34: Estudio mediante inmunoblot del perfil de distribución de FBN4 en MTs fraccionadas en gradiente discontinuo de sacarosa. Cloroplastos aislados de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* se rompieron y la fracción de membranas se ultracentrifugó a 100000 g y 4°C durante 16 horas en gradiente discontinuo de sacarosa. Cantidades desconocidas de proteínas de las distintas fracciones fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con los anticuerpos primarios Anti-PsbA, Anti-FBN1a y Anti-FBN4. Abajo se muestran los porcentajes de sacarosa correspondientes a cada fracción. A la izquierda se muestra la posición y la masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores. Las flechas indican las bandas correspondientes a cada una de las proteínas reconocidas.

3.2.3. La eliminación de FBN4 no afecta a la tasa de crecimiento en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Las curvas de crecimiento de los dos mutantes de FBN4 en CN indicaron que no existían diferencias significativas en la tasa de crecimiento de ambos mutantes con respecto al WT en estas condiciones (Figura 3.35).



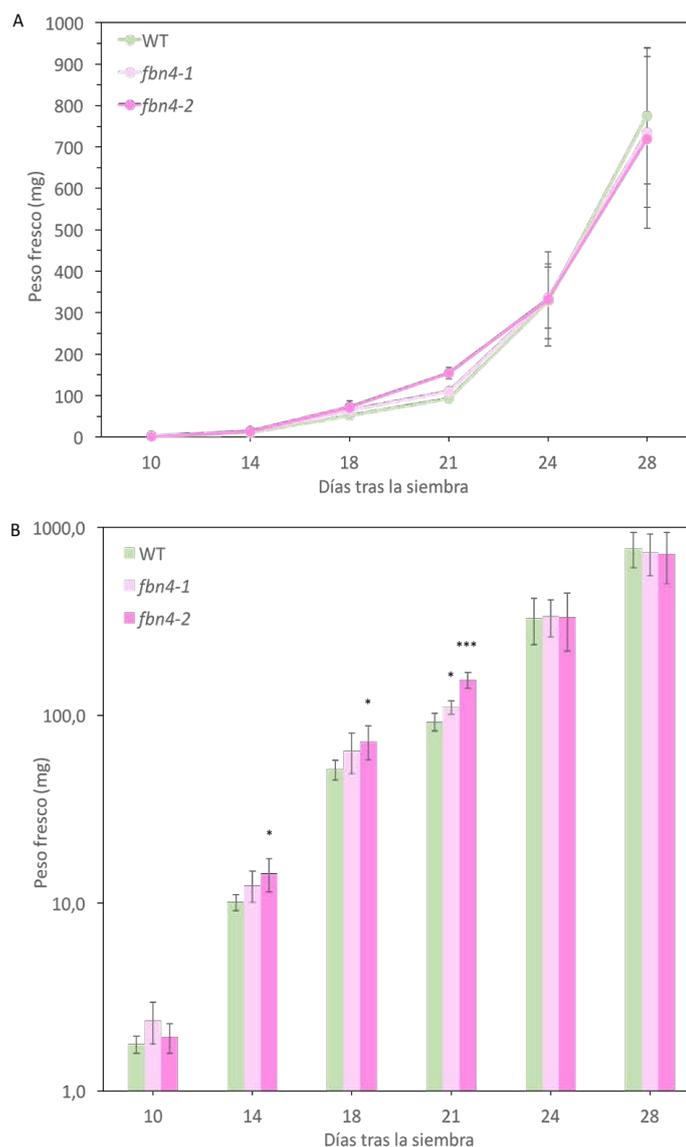


Figura 3.35: Curvas de crecimiento de los mutantes KO *fbn4-1* y *fbn4-2* frente al WT en CN. Las plantas se crecieron bajo un fotoperíodo de DL y CN. El peso de la roseta se determinó en diferentes días a lo largo del ciclo de vida de la planta. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) del peso de 5-6 plantas. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$; *** con $p < 0,005$.

Se ha propuesto que FBN4 contribuye a la resistencia de *Arabidopsis* a diferentes estreses abióticos, por lo que se procedió a estudiar el crecimiento de mutantes carentes de FBN4 sometidos a un estrés por AL.



Resultados
Capítulo II

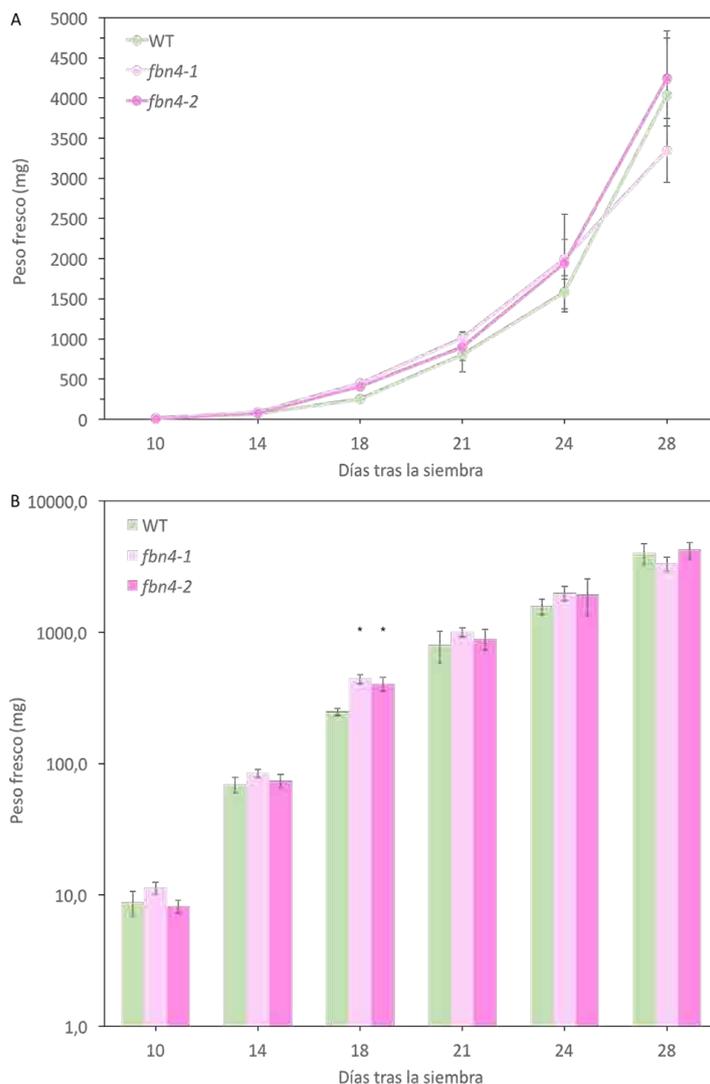


Figura 3.36: Curvas de crecimiento de los mutantes KO *fbn4-1* y *fbn4-2* frente al WT en AL. Las plantas se crecieron bajo un fotoperiodo de DL y en condiciones de estrés por AL. El peso de la roseta se determinó en diferentes días a lo largo del ciclo de vida de la planta. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) del peso de 4-6 plantas. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$; ** con $p < 0,01$; *** con $p < 0,005$.

En la Figura 3.36 se observan las tasas de crecimiento de los mutantes de FBN4 en condiciones de estrés por AL. Ambos mutantes tienen una tasa de crecimiento muy similar entre ellos e igual a su vez de la obtenida en el WT. Los mutantes *fbn4-1* y *fbn4-2* solo presentaron diferencias significativas al día 18, donde poseen un peso fresco/planta ligeramente superior al WT. Dicha diferencia puede ser explicada por el bajo número de réplicas. Por tanto, se puede afirmar que la eliminación de FBN4 no afecta a la tasa de crecimiento de la planta en CN ni en condiciones de estrés por AL.



3.2.4. La ausencia de FBN4 no afecta a la inducción de los niveles de antocianinas mediada por estrés lumínico

En mutantes *fbn4* KD en *Malus domestica* se vio que la acumulación de antocianinas en plantas sometidas a un estrés lumínico era menor que en plantas WT (Singh *et al.*, 2010). Para comprobar si las plantas KO *fbn4* se comportaban de igual forma y teniendo en cuenta que ante alta intensidad lumínica las plantas típicamente acumulan antocianinas como fotoprotectores (Steyn *et al.*, 2002), se decidió analizar la inducción de los niveles de antocianinas mediada por estrés lumínico. Para ello, se crecieron plantas en CN 18 días y fueron sometidas posteriormente a un estrés por ALF durante 7 días (Figura 3.37).

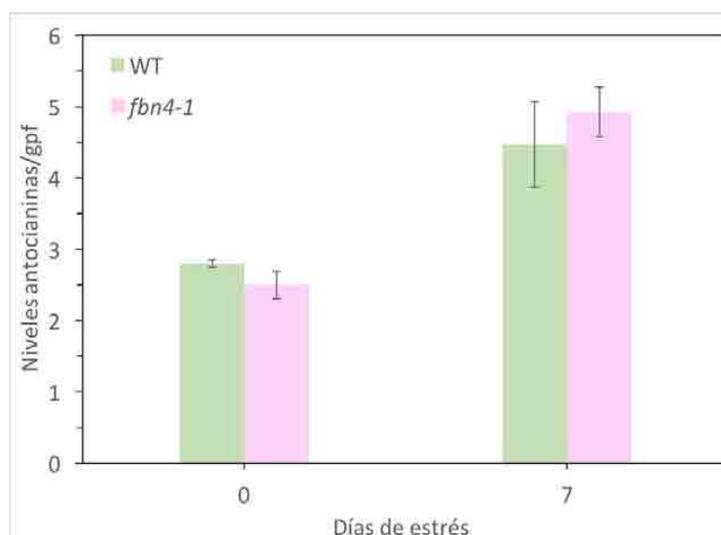


Figura 3.37: Niveles de antocianinas en plantas WT y mutante *fbn4-1*. Las plantas fueron cultivadas 18 días en CN de crecimiento, tras lo cual se les aplicó un estrés por ALF durante 7 días. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) del valor obtenido para 3 ensayos.

Los resultados obtenidos indicaron que la síntesis de antocianinas antes y después de aplicar un estrés por ALF no se ve afectada en la línea mutante *fbn4-1*, al contrario de lo observado en los mutantes del subgrupo FBN1-2, donde se observaba una diferencia significativa a los 7 días de sometimiento a estrés por ALF (Figura 3.9).

3.2.5. FBN4 no interviene en la protección del PSII frente a estrés conjunto por alta intensidad lumínica y baja temperatura

Otra de las funciones propuestas para FBN4 que se ha comentado en la Introducción es la de protección de la planta frente a diferentes estreses abióticos y bióticos. Por ello, se decidió analizar el estado del PSII en el mutante *fbn4-1* mediante fluorimetría PAM para ver si presentaba parámetros fotosintéticos alterados con respecto a los obtenidos para WT al igual



Resultados
Capítulo II

que ocurría en las plantas mutantes del subgrupo FBN1-2. Para el análisis se crecieron plantas durante 34 días bajo un fotoperiodo de DC y en CN, tras lo cual se las sometió a un estrés por ALF durante 7 días.

La Figura 3.38 muestra imágenes de color falso representando los valores de F_v/F_m y los valores numéricos de F_v/F_m del mutante *fbn4-1* y del WT al ser sometidos a estrés por ALF durante 0, 1 y 7 días. Se observó que dichos valores fueron significativamente menores en plantas *fbn4-1* que en plantas WT a 1 día de estrés por ALF. Los valores de F_v/F_m en el mutante *fbn4-1* se recuperaron casi por completo a los 7 días de estrés, contrariamente a lo ocurrido en los mutantes del subgrupo FBN1-2.

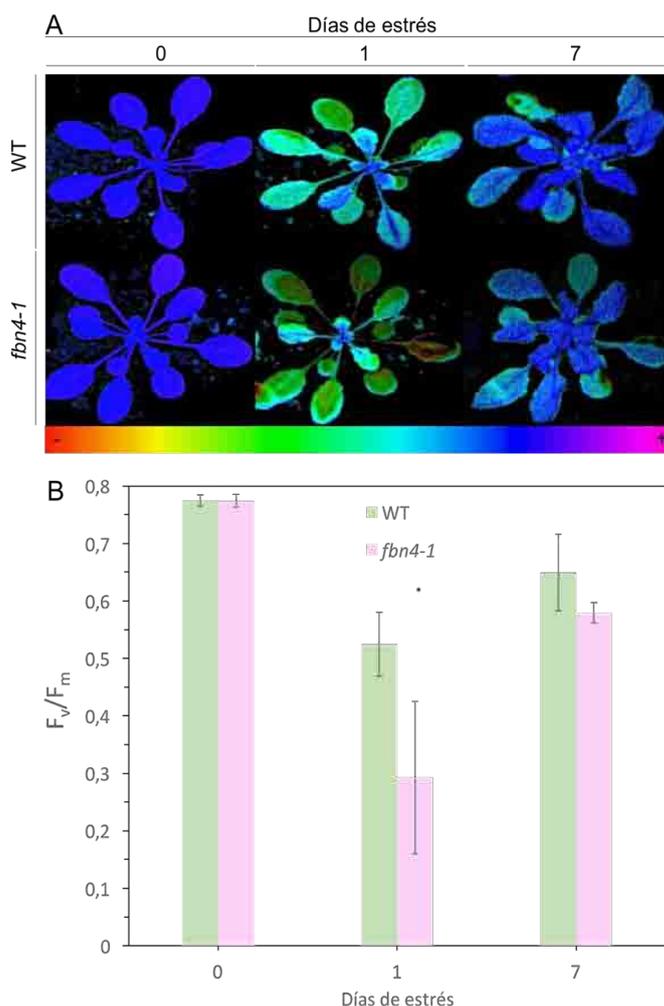


Figura 3.38: Valores (en falso color) de F_v/F_m (A) y niveles de F_v/F_m (B) de plantas WT y mutante *fbn4-1* sometidas a estrés por ALF durante 0, 1 y 7 días. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. La emisión de fluorescencia mínima (F_0) y máxima (F_m) se obtuvieron mediante el sistema IMAGING-PAM. F_v se calcula como $F_m - F_0$. La barra al pie de la fotografía indica la escala de valores de F_v/F_m . En B, cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) de 5 medidas. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$.



Resultados
Capítulo II

Posteriormente se procedió a estudiar la respuesta de este mutante con respecto a los parámetros fotosintéticos $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y $1-qL$ a diferentes intensidades de luz actínica y en condiciones de estrés por ALF para comprobar si la línea mutante *fbn4-1* se comporta de manera diferente al analizar estos parámetros en comparación a los resultados obtenidos para el resto de líneas mutantes empleadas en este trabajo. En CN, al igual que lo que ocurría con el F_v/F_m , no se vieron diferencias significativas con respecto al WT (Figura 3.39).

Tras aplicar un estrés por ALF, se observó que la respuesta obtenida en *fbn4-1* a 1 día de estrés difería de la obtenida en el WT y era muy similar a la presentada por el mutante *fbn2* (Figura 3.14). Se observó que $\Phi(NO)$ aumentaba conforme $\Phi(NPQ)$ disminuía; por otro lado, $\Phi(II)$ era menor en *fbn4-1*, mientras que $1-qL$ aumentó. Al analizar los mismos parámetros fotosintéticos a 7 días de estrés se observó que no existía diferencias significativas con los obtenidos en el WT.

ÁMBITO- PREFIJO**GEISER**

Nº registro

00008744e2100054558**CSV****GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018****DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN****<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>****FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO****29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular**

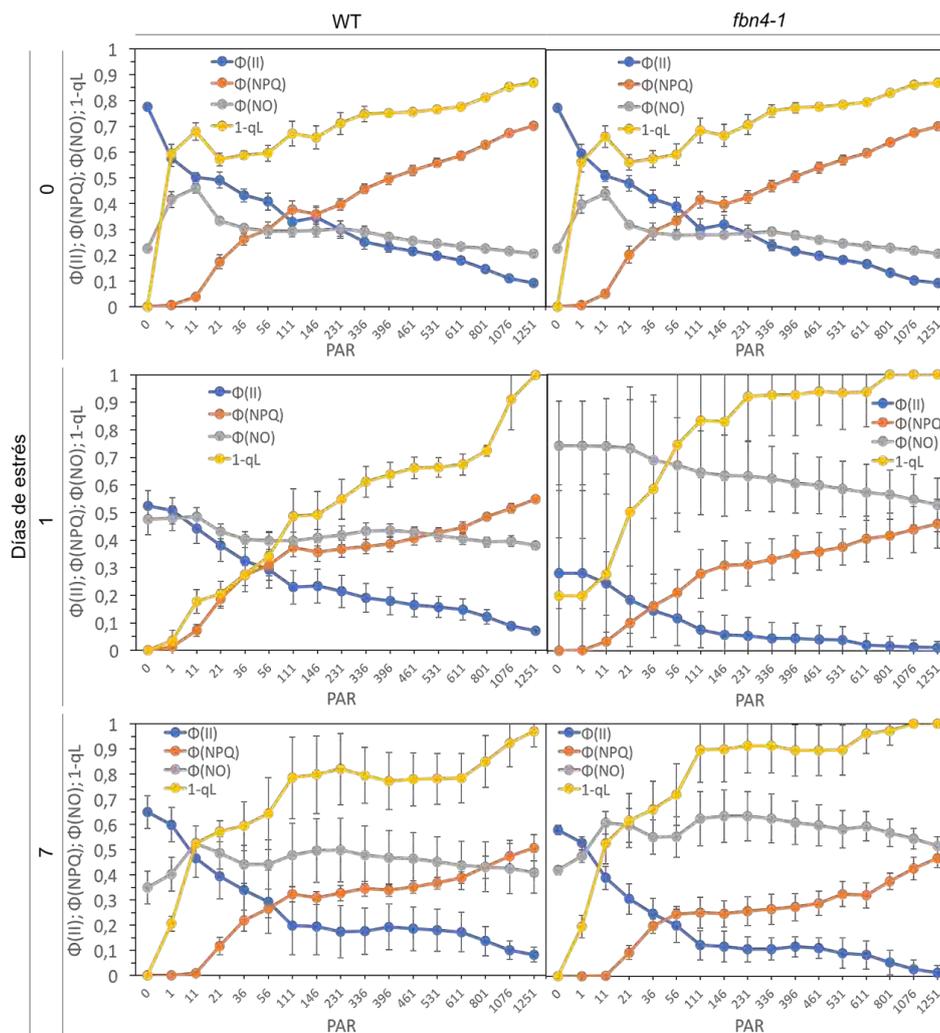


Figura 3.39: $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$ y $1-qL$ a intensidades crecientes de luz actínica en plantas WT mutante *fbn4-1* sometidas a estrés por ALF durante 0,1 y 7 días. Se usó el sistema IMAGING-PAM. Las plantas fueron crecidas en CN y se les aplicó un estrés por ALF durante 7 días. Las plantas se adaptaron a oscuridad 30 min antes de las mediciones. Cada punto corresponde con la media de 5 medidas independientes (\pm desviación estándar). PAR = radiación fotosintéticamente activa.

3.2.6. FBN4 no interacciona con las proteínas del subgrupo FBN1-2 ni con otro polipéptido de FBN4 mediante el sistema BiFC

Hemos demostrado que las FBNs del subgrupo 1-2 pueden interaccionar entre ellas y formar homo- o heterodímeros. Para comprobar si FBN4 interacciona con las FBNs de este subgrupo o con otro polipéptido FBN4, se llevó a cabo el análisis de estas posibles interacciones empleando el sistema BiFC. Para ello, se clonó el cDNA de FBN4 en los vectores pXNGW y pXCGW y se procedió igual que en ocasiones anteriores.



Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 3.40 y 3.41. Se observa que FBN4 no interacciona con las proteínas del subgrupo FBN1-2 ni con otro polipéptido de FBN4 mediante el sistema BiFC. Esto puede implicar que las funciones que está llevando a cabo esta proteína son diferentes a las realizadas por dicho subgrupo.

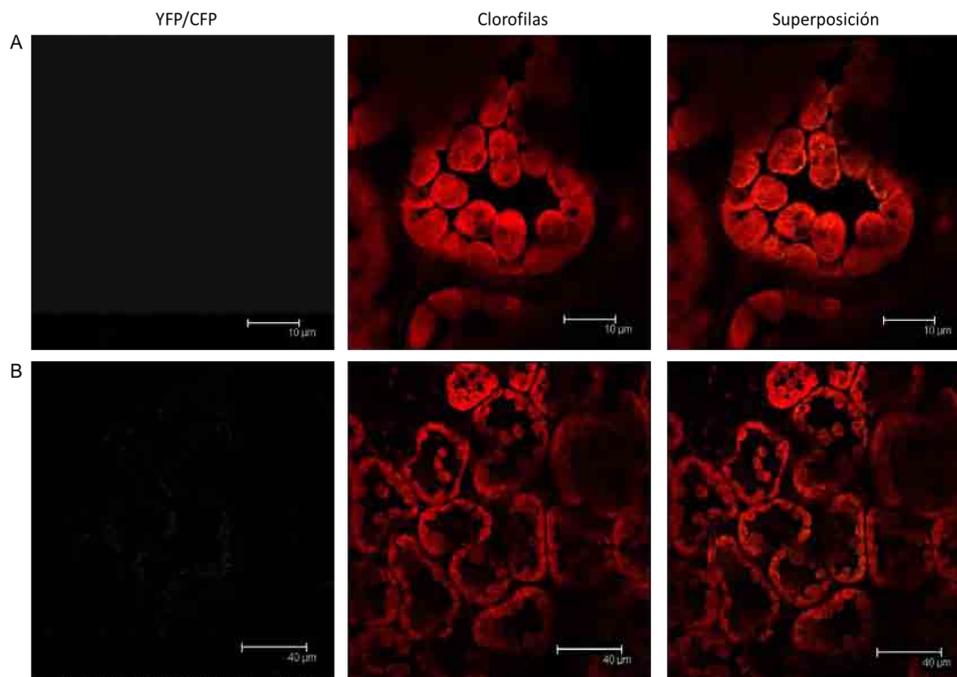


Figura 3.40: Estudio de la interacción in vivo entre FBN4 y FBN1a (A) y entre FBN4 y FBN2 (B) mediante ensayo de BiFC. Los cDNAs que codifican para las proteínas completas de FBN1a, FBN2 y FBN4 se fusionaron al extremo amino terminal de la YFP y al extremo carboxilo terminal de la CFP y se transformaron con ellas hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la fluorescencia de la YFP/CFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. En A, la barra blanca indica el tamaño de 10 µm. En B, la barra blanca indica el tamaño de 40 µm.

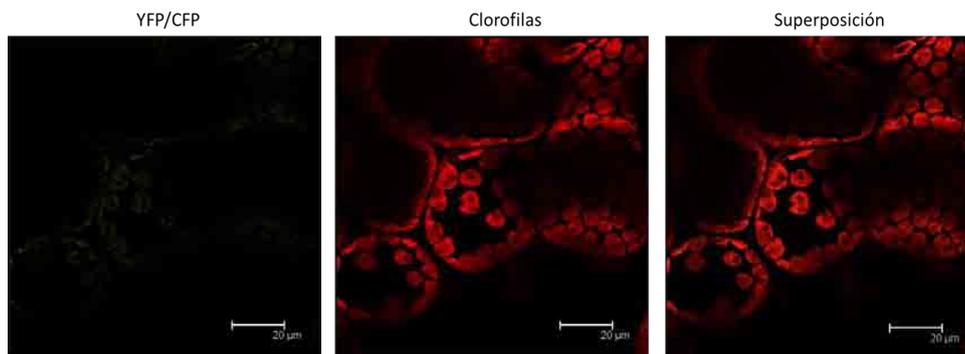


Figura 3.41: Estudio de la interacción in vivo entre polipéptidos de FBN4 mediante ensayo de BiFC. El cDNA que codifica para la proteína completa de FBN4 se fusionó al extremo amino terminal de la YFP y al extremo carboxilo terminal de la CFP y se transformaron con ella hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la fluorescencia de la YFP/CFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 20 µm.



Resultados
Capítulo II

3.2.7. Búsqueda de proteínas que interactúen con FBN4 mediante ensayo de doble híbrido en levaduras

FBN4 no interactúa con las FBNs pertenecientes al subgrupo FBN1-2 mediante BiFC. Para rastrear con qué proteínas podría interactuar y comprobar si tampoco interactúa con las proteínas del subgrupo por otro método, se procedió a la búsqueda de proteínas mediante análisis de doble híbrido en levadura usando una genoteca comercial normalizada de *Arabidopsis* de la casa comercial Takara, realizada en el vector de doble híbrido en levaduras pGADT7-RecAB, y se transformó con ella la estirpe Y187 de *Saccharomyces cerevisiae*. Al realizar los controles de toxicidad previos pertinentes al ensayo de doble híbrido, se observó que la proteína completa FBN4 es tóxica para la levadura y esta no era capaz de crecer al ser transformada con aquella. Por ello, como cebo se empleó el fragmento amino terminal de la proteína FBN4, desde el aminoácido 73 al aminoácido 153. La secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido de tránsito al cloroplasto o CTP fue eliminada. El fragmento de cDNA correspondiente se clonó en el vector de doble híbrido pDEST-GBKT7 (Figura 3.42, A) y, con él, se transformó la estirpe Y2HGold de *S. cerevisiae*.

La expresión de la construcción (Figura 3.42, B) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se comprobó mediante inmunoblot con el anticuerpo primario Anti-GAL4 (reconoce 147 aminoácidos del factor de transcripción GAL4).



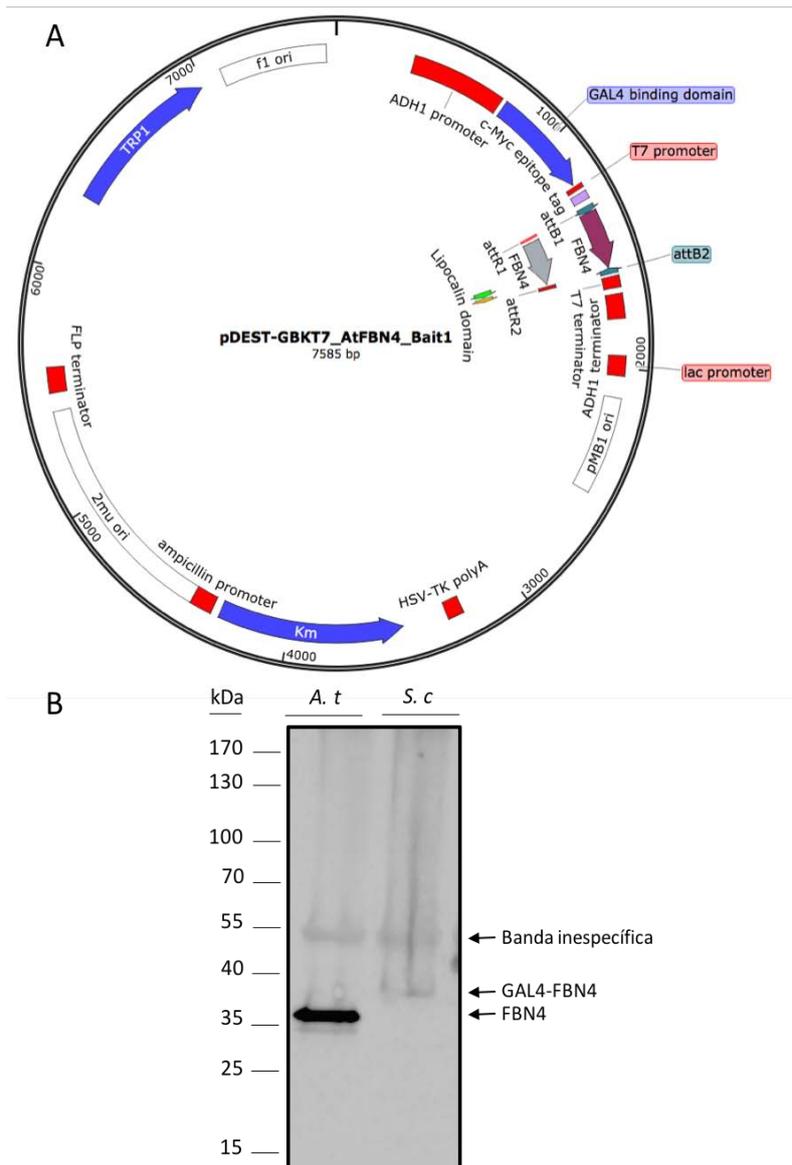


Figura 3.42: Estudio de la expresión de FBN4 en levadura. (A) Mapa del vector pDEST-GBKT7 tras insertarle el fragmento amino terminal de FBN4; empleado para realizar el ensayo de doble híbrido en levadura. (B) 30 µg de proteínas de cada fracción fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con el anticuerpo Anti-GAL4. A la izquierda se muestra la posición y masa molecular (kDa) de las proteínas empleadas como marcadores. *A. t* = *Arabidopsis thaliana*. *S. c* = *Saccharomyces cerevisiae*.

El escrutinio de la genoteca de *Arabidopsis* para la identificación de proteínas que interactúan con la parte amino terminal de FBN4 se realizó mediante conjugación de la estirpe Y187 (contiene la genoteca), con la estirpe Y2HGold (contiene la construcción de FBN4 usada como cebo). Los diploides resultantes de la conjugación se cuantificaron mediante diluciones seriadas de dicha conjugación, las cuales se sembraron en medios SD-Leu y SD-Trp para contabilizar el número de diploides (ver Materiales y Métodos). El número de cigotos obtenidos



Resultados

Capítulo II

fue de 3,8 millones aproximadamente, número que garantiza el escrutinio de varias copias completas del transcriptoma de *Arabidopsis*.

Las condiciones establecidas para seleccionar aquellos diploides que contuvieran una proteína que efectivamente interaccionara con FBN4 fueron los más exigentes ofrecidos por el sistema de doble híbrido empleado: debían ser protótrofos para histidina y adenina (además de leucina y triptófano previamente), ser resistentes al antibiótico aureobasidina y desarrollar color azul en placas de Petri que contuviesen X- α -Gal, esto último debido a la presencia de la actividad enzimática α -galactosidasa proporcionada por la activación del gen MEL1.

A los diploides encontrados se les amplificó por PCR el fragmento de cDNA de *Arabidopsis* presente en el vector pGADT7-RecAB, empleando oligonucleótidos específicos de este vector, los cuales se encuentran flanqueando el sitio de clonación del cDNA. Los fragmentos de cDNA obtenidos fueron enviados a secuenciar para identificar finalmente las proteínas que supuestamente interaccionaban con FBN4.

La mayor parte de los fragmentos obtenidos pertenecían a proteínas que no se encuentran en los cloroplastos y, por tanto, la interacción con FBN4 no podía ser genuina. Estos clones los descartamos y en la Tabla 3.2 aparecen aquellos cuya interacción sí podía serlo y requerían de análisis posteriores.

Código AGI	Nombre
At4g04020	FBN1a
At4g22240	FBN1b
At3g53470	Anotado como fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bifosfoglicerato
At2g39000	Anotado como GCN5-related n-acetyltransferase 4, GNAT4. Supuestamente involucrada en la acetilación N-terminal de proteínas
AtCg00470	Cadena épsilon de la ATP sintasa, atpE
At4g34290	Miembro de la superfamilia de proteínas con dominio SWIB/MDM2
At1g70760	NdhS
At5g03420	Proteína homóloga a "Protein target to starch", PTST3

Tabla 3.2: Proteínas que interaccionan con FBN4 mediante ensayo de doble híbrido. La tabla indica el código AGI de cada gen encontrado, así como su nombre y/o detalles que caractericen a dicho gen.



Los resultados que aparecen en Tabla 3.2 muestran que FBN4 interacciona con las FBN1s y con At3g53470, entre otras. Se ha visto en el apartado anterior que FBN4 no interacciona *in vivo* con las FBN1s mediante el sistema BiFC. Esta diferencia en los resultados es consecuencia de las diferencias entre los dos métodos empleados, puesto que no se tratan de métodos de estudio equivalentes. Se procederá a comprobar por otro método más, como es el ensayo de Co-IP.

3.2.8. Búsqueda de proteínas que interactúen con FBN4 mediante ensayo de Co-IP

Se usó un anticuerpo específico contra la proteína completa FBN4 (Anti-FBN4 Co-IP). Este anticuerpo es diferente al empleado previamente en los análisis de inmunoblots, el cual identificaba sólo a un polipéptido de FBN4. Como se ha comentado anteriormente, estos anticuerpos obtenidos contra fragmentos de la proteína no son adecuados para inmunoprecipitar al polipéptido, por lo que se procedió a obtener un nuevo anticuerpo contra la proteína FBN4 completa.

El ensayo comenzó con el aislamiento de cloroplastos de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* y, una vez aislados, se procedió a romperlos y separar las fracciones estromática y de membranas por ultracentrifugación. Se descartó la fracción estromática al no encontrarse FBN4 en este compartimento. Al igual que en el caso de la población de FBN2 asociada a membranas, se procedió a solubilizar FBN4 (y los complejos que pudiera estar formando con otras proteínas) mediante tratamiento de las membranas con Triton X-100. De esta forma se evita la coimmunoprecipitación de proteínas asociadas a PGs pero que no interactúan con FBN4. La concentración mínima de Tritón necesaria para solubilizar FBN4 se determinó en 0,1% (ver Figura 3.43).



Resultados
Capítulo II

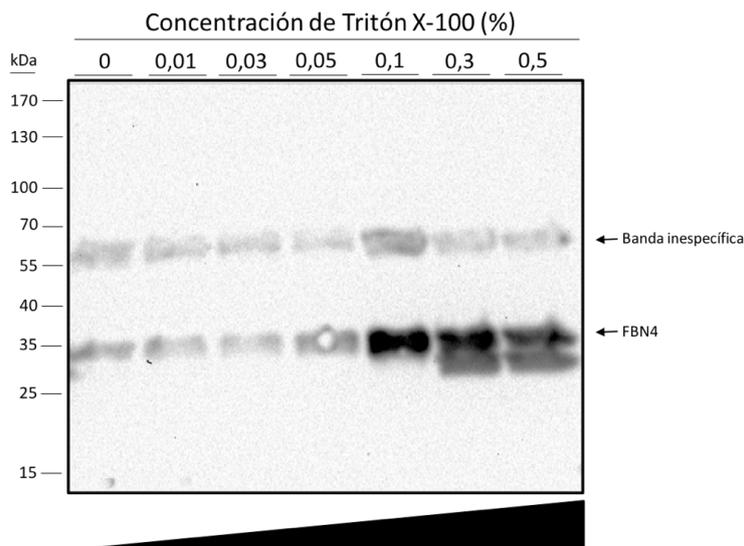


Figura 3.43: Estudio de la solubilización de FBN4 por el detergente Tritón X-100. Cloroplastos aislados de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* se rompieron e incubaron con cantidades crecientes (v/v) de Tritón X-100 a 4°C durante 30 min. Tras la incubación, las muestras fueron ultracentrifugadas a 100000 g y 4°C durante 1 hora y las proteínas de la fracción soluble fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con el anticuerpo primario Anti-FBN4. Los números hacen referencia al porcentaje de Tritón X-100 empleado en cada caso. A la izquierda se muestra la posición y masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores.

Tras la solubilización, se procedió al ensayo de Co-IP y la posterior precipitación con acetona (ver Materiales y Métodos) para concentrar y limpiar la fracción de proteínas. Por último, se analizó por espectrometría de masas en el Servicio de Proteómica del IBVF. Se llevó a cabo un análisis paralelo usando plantas del mutante *fnb4-1* para identificar a aquellas proteínas que coimmunoprecipitan de manera no específica. Se realizaron cuatro ensayos independientes de Co-IP. Las proteínas encontradas en todos los ensayos independientes se encuentran en la Tabla 3.3.

Código AGI	Nombre
At4g39730	Proteína 1 con dominio PLAT, PLAT1
At3g45140	LOX2
At4g03280	Subunidad de hierro-azufre del complejo del citocromo b ₆ f, PGR1
At5g42270	Metaloproteasa FTSH5 de zinc dependiente de ATP
At3g18890	Tic62
At2g22170	Proteína 2 con dominio PLAT, PLAT2

Tabla 3.3: Proteínas que coimmunoprecipitan con FBN4. La tabla indica el código AGI de cada gen encontrado, así como su nombre y/o detalles que caractericen a dicho gen. En negrita aparecen las proteínas asociadas a los plastoglobulos, descritas por Lundquist y cols (Lundquist *et al.*, 2012).



Como se puede comprobar, en el rastreo de proteínas que interaccionen con FBN4 mediante Co-IP tampoco aparecen aparecen tampoco las FBN1s ni la proteína del gen At3g53470.

3.2.9. Análisis de la interacción entre las proteínas FBN4 y la codificada por el gen At3g53470

At3g53470 es un gen que codifica para una proteína de unos 15,4 kDa de función desconocida (<http://ppdb.tc.cornell.edu>) y cuya información disponible proviene en su mayoría de predicciones informáticas. Se encuentra erróneamente anotada en la base de datos TAIR como una fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bifosfoglicerato. Se trata de una proteína localizada en la MT (Peltier *et al.*, 2004), que posee un dominio transmembrana en la región C-terminal entre los aminoácidos 114 y 132 de su secuencia (UNIPROT, <https://www.uniprot.org/uniprot/F4JAF4>) y cuyo gen se co-expresa con otros genes como At1g51400 (codifica para una proteína del PSII) o At4g23890 (codifica para la subunidad NdhS y con la que FBN4 interacciona mediante ensayo de doble híbrido). Toda esta información hacía pensar que podría estar involucrada de alguna manera con el aparato fotosintético de plantas.

Está bien conservada en plantas terrestres y no muestra similitud con otras proteínas ya caracterizadas. En *Arabidopsis* existe una sola copia del gen que la codifica y en su genoma no se encuentra otra isoforma u otro gen que muestre homología con él, suponiendo así una función importante y única. Por otro lado, no se encuentra en algas ni cianobacterias.

Todo ello la hacía una proteína muy interesante a la hora de ser caracterizada.

Para comprobar la interacción FBN4-At3g53470, se empleó el sistema BiFC tras clonar el cDNA de ambas en los vectores pXNGW y pXCGW y se expresaron de forma transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

En la Figura 3.44 se observa que la reconstrucción del fluoróforo no se está llevando a cabo, lo que indica que las proteínas FBN4 y At3g53470 no interaccionan *in vivo* mediante este método. Se decidió entonces seguir analizando esta última a pesar del resultado negativo observado en la Figura 3.44.



Resultados

Capítulo II

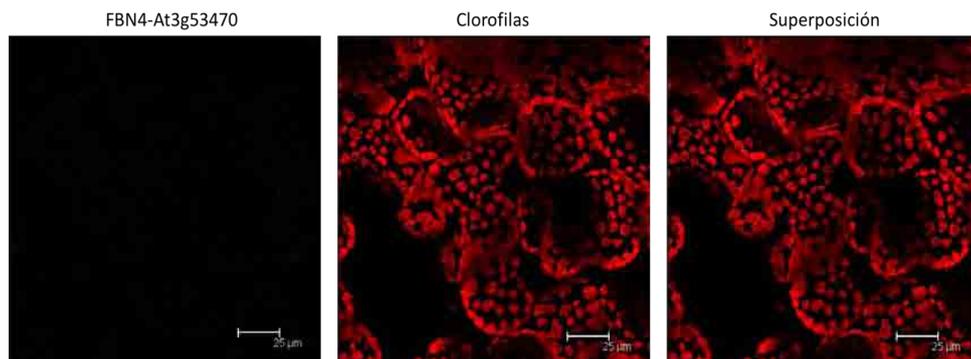


Figura 3.44: Estudio de la interacción *in vivo* entre FBN4 y At3g53470 mediante ensayo de BiFC. Los cDNAs que codifican para las proteínas completas de FBN4 y At3g53470 se fusionaron al extremo amino terminal de la YFP y al extremo carboxilo terminal de la CFP y se transformaron con ellas hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la fluorescencia de la YFP/CFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 25 μm .

Por un lado, se analizó la localización del péptido de fusión At3g53470-GFP mediante su expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* (Figura 3.45).

Por otro lado, se estudió el perfil de distribución de At3g53470 dentro de las MTs (Figura 3.46). Para ello, se aislaron cloroplastos de hojas de roseta de plantas WT de *A. thaliana* y, una vez aislados, se rompieron y se separaron las fracciones estromática y de membrana por ultracentrifugación. Se descartó la fracción estromática y la fracción de membrana se aplicó a un gradiente discontinuo de sacarosa para ser ultracentrifugada y separada en fracciones de 0,5 ml.

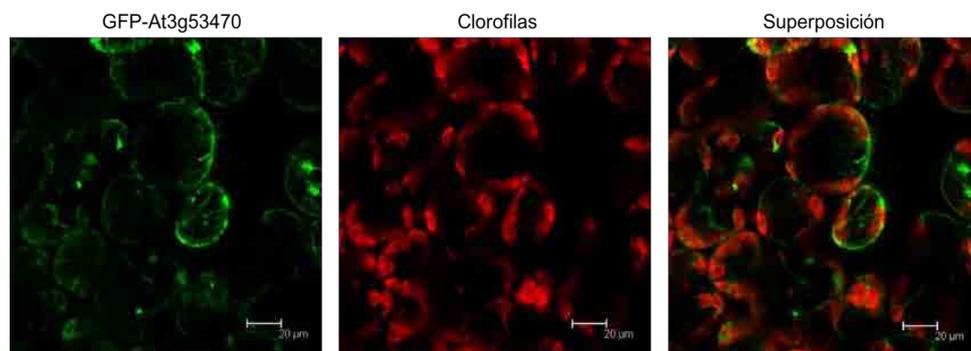


Figura 3.45: Localización sub-cloroplástica de la proteína codificada por el gen At3g53470 mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*. Se observan las imágenes tomadas mediante microscopía confocal de fluorescencia de la proteína codificada por el gen At3g53470 fusionada a la proteína testigo GFP. La construcción se expresó bajo el control del promotor constitutivo 35S. Se muestra la señal emitida por el péptido de fusión At3g53470-GFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 20 μm .



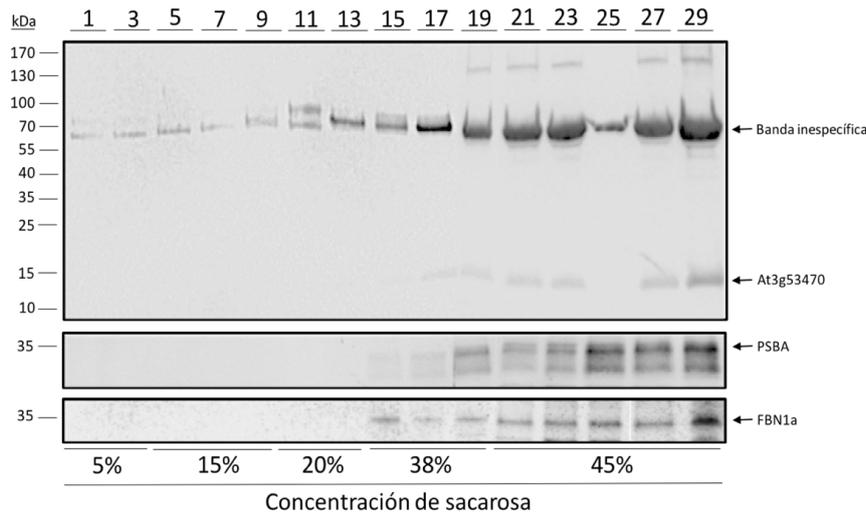


Figura 3.46: Estudio mediante inmunoblot del perfil de distribución de At3g53470 en MTs fraccionadas en gradiente discontinuo de sacarosa. Cloroplastos aislados de hojas de roseta de *Arabidopsis thaliana* se rompieron y la fracción de membranas se ultracentrifugó a 100000 g y 4°C durante 16 horas en gradiente discontinuo de sacarosa. Cantidades desconocidas de proteínas de las distintas fracciones fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE, transferidas a filtros de PVDF e hibridadas con los anticuerpos primarios Anti-Psba, Anti-FBN1a y Anti-Clon 18. Abajo se muestran los porcentajes de sacarosa correspondientes a cada fracción. A la izquierda se muestra la posición y la masa molecular (kDa) de las proteínas usadas como marcadores. Las flechas indican las bandas correspondientes a cada una de las proteínas reconocidas.

Los resultados mostrados en la Figura 3.45 indican que la fusión At3g53470-GFP no entra en los cloroplastos. Por algún motivo que desconocemos, la fusión C-terminal de GFP a la proteína At3g53470 impide que esta entre en el cloroplasto a pesar de tener una clara secuencia de tránsito al cloroplasto. Por el contrario, la Figura 3.46 indica que esta proteína tiene una localización tilacoidal, en concreto en aquellas zonas de las MTs donde se encuentra el PSII (su localización coincide con la de la proteína D1). Los resultados de localización obtenidos con la proteína de fusión At3g53470-GFP sugieren que la fusión At3g53470-cCFP tampoco entraría en el cloroplasto. En ese caso, los resultados negativos de los ensayos BiFC entre FBN4 y At3g53470 se deberían a que ambas proteínas se expresan en compartimentos diferentes en hojas de *N. benthamiana* y no podríamos concluir si ambas proteínas interactúan *in vivo*. Otras técnicas como ensayos de “pull-down” serán necesarias para corroborar si ambas proteínas interactúan efectivamente.

Continuando con la caracterización de la proteína At3g53470, se aislaron dos mutantes KO por inserción de T-DNA en el gen At3g53470. Estos mutantes son las líneas SALK_027037C y SALK_006686, ambas procedentes de las colecciones del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK. Las cuales presentan inserciones en el promotor del gen. Una vez aisladas líneas homocigotas para cada una de las inserciones, se comprobó que la proteína seguía



Resultados**Capítulo II**

sintetizándose en dichas líneas, indicando que las inserciones no impedían la traducción de la misma. No hemos encontrado ninguna otra inserción en el gen At3g53470 que nos permita obtener un mutante carente de esta proteína. El hecho de que no haya genes homólogos en *Arabidopsis* que puedan suplir su función y la ausencia de inserciones que eliminen la síntesis de esta proteína sugieren que dichos mutantes podrían ser letales.

La ausencia de mutantes carentes de la proteína At3g53470, así como la imposibilidad de estudiar esta proteína mediante expresión transitoria en *Nicotiana*, determinó que abandonáramos su estudio.

3.2.10. FBN4 no interviene en la protección frente a la aparición de especies reactivas del oxígeno (ROS)

El mutante *fbn4-1* no es capaz de aumentar sus niveles de antocianinas dependiente de estrés lumínico al encontrarse bajo estrés para paliar los efectos que dicho estrés le provoca a su aparato fotosintético. Los daños en el aparato fotosintético han sido observados como valores de F_v/F_m menores en hojas maduras de la línea mutante *fbn4-1* a 1 día de estrés. Además, Singh *et al.* (2010) vieron que el mutante “knock down” de FBN4 en *Malus domestica* era más sensible al daño oxidativo que el WT. Lo estudiaron mediante un ensayo de sensibilidad a MV. El MV produce ROS en los cloroplastos, concretamente puede producir O_2^- por oxidación por O_2 de radicales de MV. Estos radicales de MV se producen al ser el MV en vez de la ferredoxina quien preferencialmente acepte electrones del centro de reacción del PSI (Izawa, 1980). La consecuencia es la aparición de daño oxidativo. Todo ello hacía pensar que el mutante *fbn4-1* podría estar también produciendo ROS en el cloroplasto como los mutantes del subgrupo FBN1-2.

Para estudiar el contenido en H_2O_2 se llevó a cabo un ensayo de tinción con DAB. Se cultivaron plantas WT y del mutante *fbn4-1* durante 23 días en condiciones de DL, tras lo cual fueron sometidas a un estrés por ALF. Se tomaron 5 hojas de diferentes plantas a 0, 1 y 7 días de estrés.

No se observaron diferencias significativas entre *fbn4-1* y WT en la presencia de H_2O_2 en ninguna de las medidas analizadas (Figura 3.47). Esto parece indicar que FBN4 no interviene en los procesos de defensa frente a la aparición de H_2O_2 en condiciones de estrés por ALF.



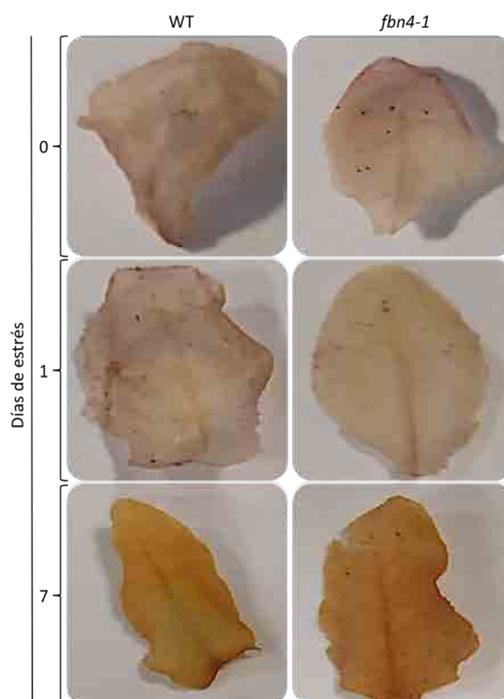


Figura 3.47: Determinación de la presencia de peróxido de hidrógeno mediante tinción con DAB en plantas WT y mutante *fbn4-1*. Las plantas fueron crecidas en DL durante 23 días. Posteriormente se les aplicó un estrés por ALF y se tomaron medidas a 0, 1 día y 7 días. Las imágenes escogidas son las más representativas de las 5 réplicas biológicas.

Para estudiar el contenido en O_2^- se llevó a cabo un ensayo de tinción con NBT, exactamente de la misma manera y en las mismas condiciones que en el ensayo de H_2O_2 .

Tampoco se observaron diferencias significativas entre *fbn4-1* y WT en la presencia de O_2^- en ninguna de las medidas analizadas (Figura 3.48). Esto parece indicar que FBN4 tampoco interviene en los procesos de defensa frente a la aparición de O_2^- en condiciones de estrés por ALF.



Resultados

Capítulo II



Figura 3.48: Determinación de la presencia de ión superóxido mediante tinción con NBT en plantas WT y mutante *fbn4-1*. Las plantas fueron crecidas en DC durante 23 días. Posteriormente se les aplicó un estrés por ALF y se tomaron medidas a 0, 1 día y 7 días. Las imágenes escogidas son las más representativas de las 5 réplicas biológicas.

Por último, se determinó el grado de peroxidación lipídica mediante la cuantificación de MDA.

Se crecieron plantas durante 24 días en CN de crecimiento y posteriormente se sometieron a un estrés por ALF de la misma forma y en las mismas condiciones que en los dos ensayos anteriores. La cuantificación de MDA se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos. Tal como se observa en la Figura 3.49, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de MDA entre la planta mutante y el WT tras siete días de estrés.

Los datos de tinción, junto con los de acumulación de MDA, indican que FBN4 no interviene en la protección de la planta frente a ROS producidos por estrés abiótico.



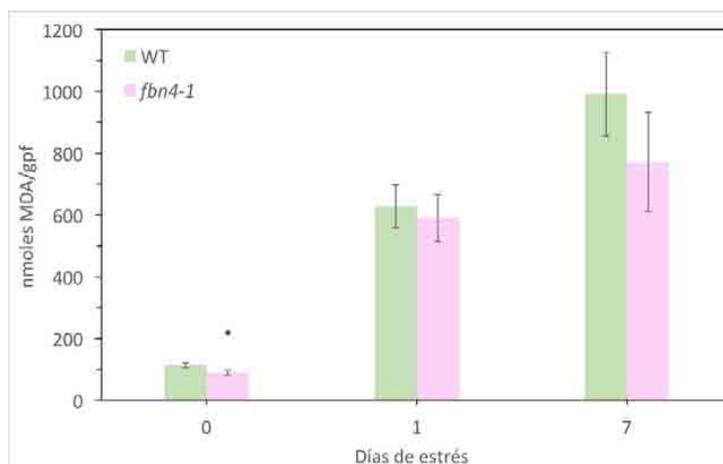


Figura 3.49: Determinación de los niveles de MDA en plantas WT y mutante *fbn4-1*. Las plantas fueron crecidas en CN durante 24 días. Posteriormente se sometieron a un estrés por ALF y se tomaron medidas a 0, 1 y 7 días. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) de 4 medidas. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$.

3.2.11. La ausencia de cuatro de las proteínas más abundantes de los PGs reduce drásticamente el número de estos en condiciones de estrés conjunto por alta intensidad lumínica y baja temperatura

Singh *et al.* (2010) también vieron que el número de PGs del cloroplasto del mutante KD *fbn4* se encontraba alterado en diferentes situaciones de estrés con respecto al WT. Como se ha comentado en la Introducción, en situaciones de estrés abiótico el número de PGs por cloroplasto y la cantidad de FBNs incrementan. Con objeto de evaluar el impacto sobre el número de PGs de la eliminación de varias FBNs, se decidió entonces obtener el doble mutante *fbn2-fbn4* y el cuádruple *fbn1a-fbn1b-fbn2-fbn4*. En este último mutante se eliminarían las FBNs más abundantes en los PGs.

En la Figura 3.50 se muestran los resultados de los ensayos de PCR empleados para identificar líneas mutantes homocigotas para ambas líneas mutantes.



Resultados Capítulo II

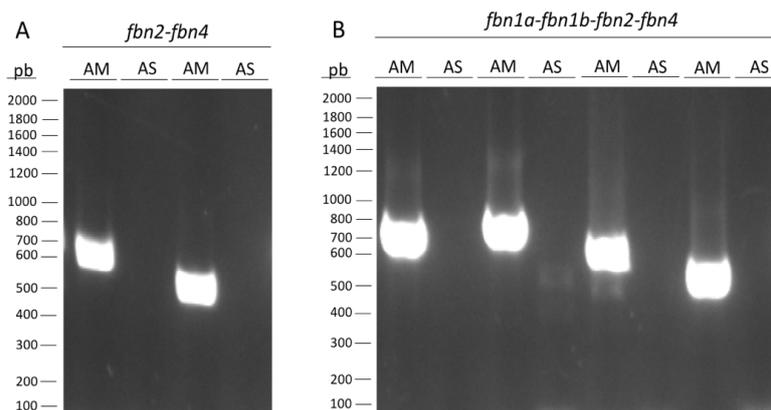


Figura 3.50: Resultados de los análisis mediante PCR de la inserción de T-DNA en el genoma de las líneas mutantes *fbn2-fbn4* (A) y *fbn1a-fbn1b-fbn2-fbn4* (B). Se muestran los resultados de amplificación de las inserciones de T-DNA en los genes FBN1a, FBN1b, FBN2 y FBN4. Para la identificación del alelo silvestre mediante PCR se utilizaron oligonucleótidos internos de cada gen y para el alelo mutante se usó uno de los oligonucleótidos del gen más otro propio de la inserción de T-DNA. Se muestra a la izquierda la posición de las diferentes bandas (en pb) del marcador de tamaño empleado.

A continuación, se analizó el número de PGs existentes en las diferentes líneas mutantes en condiciones de estrés por ALF. Para ello, se cultivaron las líneas bajo un fotoperiodo de DL durante 23 días y posteriormente se les aplicó un estrés por ALF durante 2 días. Tras esto, se tomaron muestras a 0 y 2 días de estrés como se indica en Materiales y Métodos y se observaron las mismas al TEM. Las Figuras 3.51 y 3.52 muestran algunos cloroplastos de los diferentes mutantes en CN o sometidos a estrés. Con objeto de poder hacer un análisis estadístico del número de PGs en los diferentes mutantes, se analizaron 50 cloroplastos por mutante y condición. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.53. El análisis mediante T-Student de los resultados obtenidos indican que en CN los mutantes *fbn2*, *fbn2-4* y *fbn1a-1b-2-4* muestran diferencias significativas con el WT con $p < 0,05$ (*fbn2*), $0,01$ (*fbn2-4*) o $0,005$ (*fbn1a-1b-2-4*). En plantas sometidas a estrés estas diferencias se acentúan y se observan en todos los mutantes, con un $p < 0,01$ (en mutantes *fbn1a-1b* y *fbn2*) o $p < 0,005$ (*fbn4*, *fbn2-4* y *fbn1a-1b-2-4*).



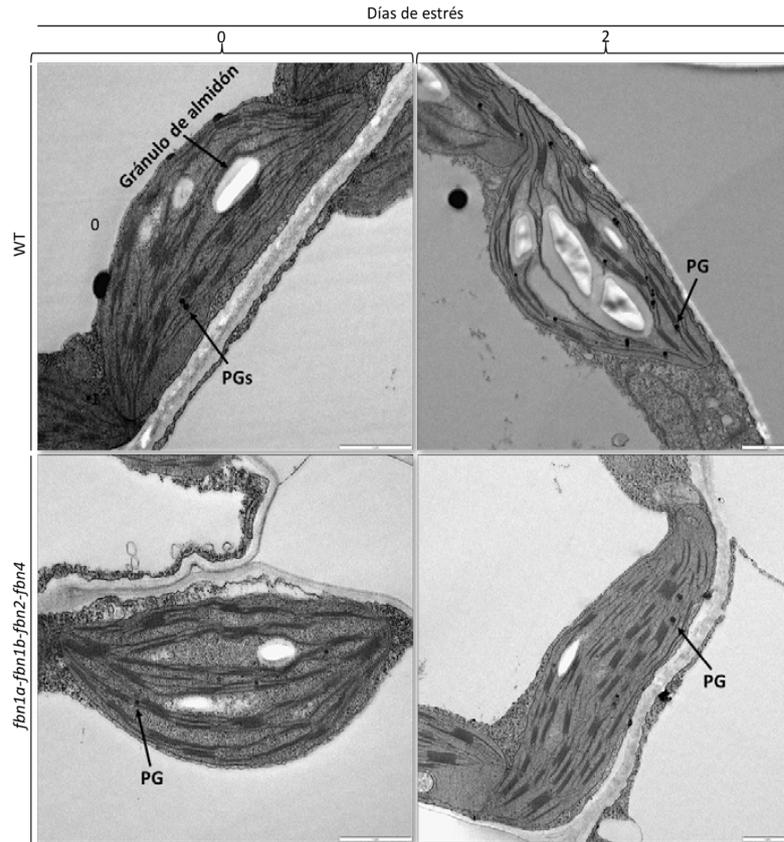


Figura 3.51: Análisis de cortes ultrafinos de cloroplastos en plantas WT y mutante *fbn1a-fbn1b-fbn2-fbn4*. Las plantas fueron cultivadas bajo un fotoperiodo de DL 23 días y posteriormente se sometieron a un estrés por ALF durante dos días. Las imágenes fueron obtenidas mediante TEM. La barra de la esquina inferior derecha indica el tamaño de 1 µm.



Resultados
Capítulo II

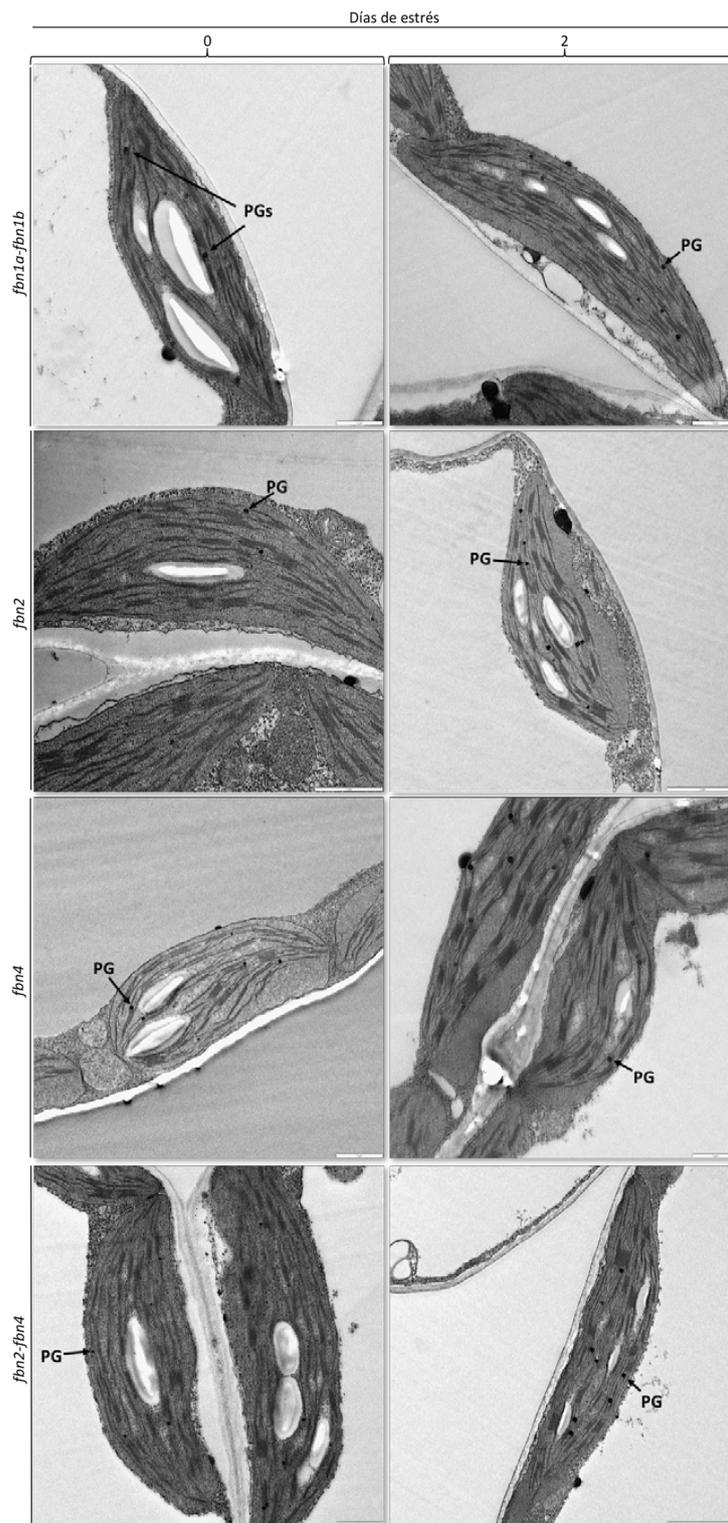


Figura 3.52: Análisis de cortes ultrafinos de cloroplastos en plantas WT y mutantes *fbn1a-fbn1b*, *fbn2*, *fbn4* y *fbn2-fbn4*. Las plantas fueron cultivadas bajo un fotoperiodo de DL durante 23 días y posteriormente se sometieron a un estrés por ALF durante dos días. Las imágenes fueron obtenidas mediante TEM. La barra de la esquina inferior derecha indica el tamaño de 1 o 2 μ m.



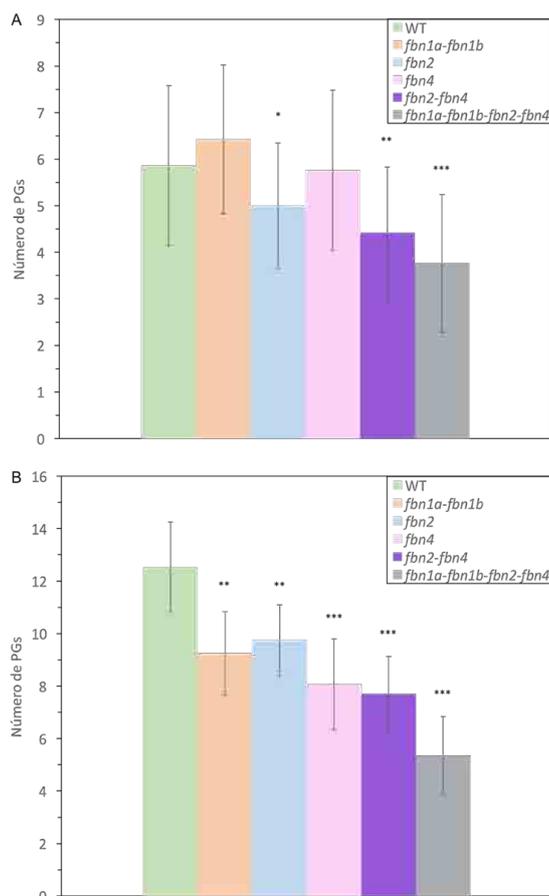


Figura 3.53: Análisis del número de PGs de cloroplastos en plantas WT y plantas de las distintas combinaciones de mutantes KO de FBN1-4. Las plantas fueron cultivadas bajo un fotoperiodo de DL durante 23 días y posteriormente se las sometió a un estrés por ALF durante dos días. A, análisis del número de PGs a 0 días de estrés. B, análisis del número de PGs a 2 días de estrés. Cada punto corresponde a la media (\pm desviación estándar) de 50 cloroplastos. *indica que hay diferencia significativa con respecto al WT mediante T-Student y con $p < 0,05$; ** con $p < 0,01$; *** con $p < 0,005$.

Los PGs son considerados osmiófilos debido a que los lípidos insaturados que contienen reducen el osmio (Padham *et al.*, 2007). Una reducción en la composición de lípidos insaturados se observaría como una reducción en el color de los PGs, pasando de un color oscuro a uno más claro. Este hecho no se observa en las Figuras 3.51 y 3.52, donde todos los PGs de todas las líneas analizadas poseen el mismo color oscuro.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

3.3. CAPÍTULO III

Caracterización de la proteína “Acclimation of photosynthesis to environment 1” (APE1)

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

3.3. Caracterización de la proteína “Acclimation of photosynthesis to environment 1”

(APE1)

Algunas de las proteínas identificadas en el ensayo de Co-IP con FBN2 podrían *a priori* afectar a la fotosíntesis, como por ejemplo FNR2 o NDC1, la cual está involucrada en la reducción de la población de PQs de los PGs (Piller *et al.*, 2011). Sin embargo, APE1 fue elegida para una posterior caracterización debido a que su ausencia altera la fluorescencia de las clorofilas y las respuestas de aclimatación de la planta a ambientes de crecimiento con alta intensidad lumínica (Walters *et al.*, 2003).

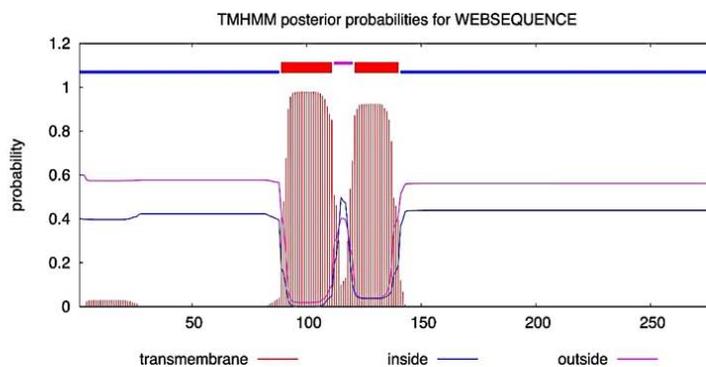
3.3.1. APE1 contiene dos dominios transmembrana

APE1 es una proteína plastídica que se encuentra muy conservada a lo largo de la evolución en todos los organismos fotosintéticos, desde cianobacterias a plantas superiores, siendo específica de este tipo de organismos (Figura 3.55). En *Arabidopsis*, existe una sola copia del gen que la codifica (At5g38660) y en su genoma no se encuentra otra isoforma u otro gen que muestre homología con él. La información sobre la proteína APE1 disponible en la web UNIPROT (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q2HIR7>) indica que contiene un solo dominio transmembrana. Entre los aminoácidos 94 y 118. Sin embargo, cuando se analiza la proteína APE1 de otras especies empleando un servidor de predicción de hélices transmembrana en proteínas (TMHMM, <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) los resultados obtenidos indican la presencia de dos dominios transmembrana. La Figura 3.54 (A) muestra este análisis de la proteína APE1 de *Glycine max*. Se observa la presencia de dos dominios transmembrana que incluyen los aminoácidos 89-111 y 121-140 de su secuencia aminoacídica. El mismo resultado se obtiene con las secuencias de otras especies como *Oryza sativa* o *Anabaena cylindrica*. Cuando se aplica este análisis a la proteína APE1 de *Arabidopsis*, los resultados indican la presencia de un dominio transmembrana entre los aminoácidos 96 y 118 (Figura 3.54, B). Este análisis también identifica otra región con alta probabilidad de ser dominio transmembrana pero que no llega al umbral establecido por el servidor para ser definida como tal. Esta región sólo se diferencia en un aminoácido del segundo dominio transmembrana de *Glycine max*, lo que sugiere que, efectivamente, la proteína APE1 de *Arabidopsis*, al igual que las proteínas ortólogas de otras especies, posee dos dominios transmembrana.



A APE1 de *Glycine max*

WEBSEQUENCE	TMHMM2.0	inside	1	88
WEBSEQUENCE	TMHMM2.0	TMhelix	89	111
WEBSEQUENCE	TMHMM2.0	outside	112	120
WEBSEQUENCE	TMHMM2.0	TMhelix	121	140
WEBSEQUENCE	TMHMM2.0	inside	141	278



B APE1 de *Arabidopsis thaliana*

WEBSEQUENCE	TMHMM2.0	inside	1	95
WEBSEQUENCE	TMHMM2.0	TMhelix	96	118
WEBSEQUENCE	TMHMM2.0	outside	119	286

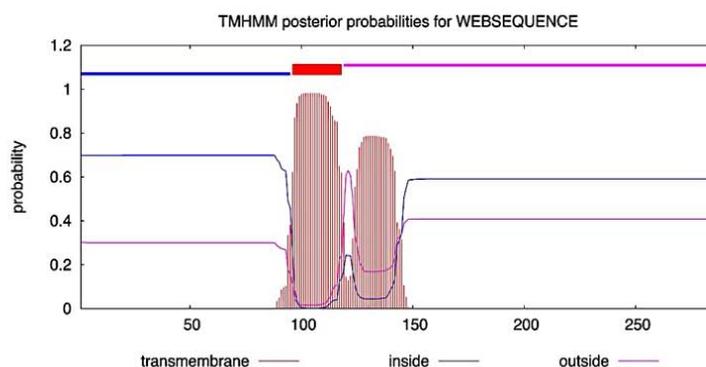


Figura 3.54: Predicción de la presencia de dominios transmembrana en APE1 de *Glycine max* (A) y *Arabidopsis thaliana* (B). Análisis de la secuencia de APE1 en *Glycine max* (A) y *Arabidopsis thaliana* (B) para estudiar la presencia de hélices transmembrana en esta proteína en diferentes especies. Se usó el servidor de predicción de hélices transmembrana de proteínas TMHMM (TMHMM Server v. 2.0, <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>).



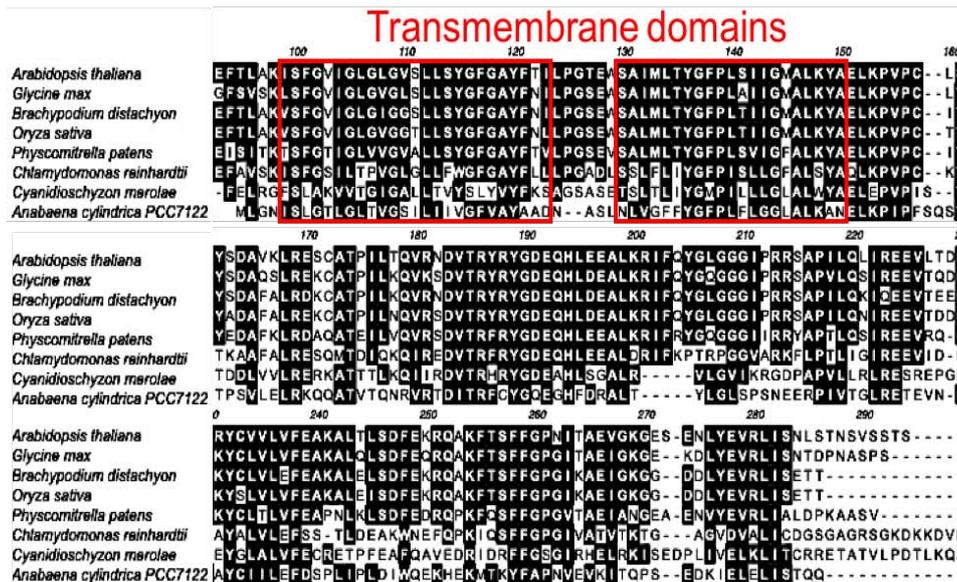


Figura 3.55: Alineamiento de ortólogos de APE1 de diferentes organismos fotosintéticos. Los organismos empleados en el análisis incluían plantas superiores como *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Brachypodium distachyon* y *Oryza sativa*; un musgo, *Physcomitrella patens*; un alga verde, *Chlamydomonas reinhardtii*; un alga roja, *Cyanidioschyzon merolae*; y una cianobacteria, *Anabaena cylindrica* PCC7122. Las cajas negras indican los aminoácidos conservados. Los dominios transmembrana predichos están delineados en rojo. Los primeros y últimos aminoácidos han sido eliminados para mostrar únicamente las partes conservadas. El alineamiento de secuencias fue llevado a cabo con ClustalW empleando el programa MacVector versión 17.

En la Figura 3.55 se puede observar que APE1 es una proteína muy bien conservada entre los organismos fotosintéticos, especialmente sus dos dominios transmembrana. Para realizar la imagen se han eliminado tanto los primeros residuos, que correspondían a los aminoácidos que conforman los CTP de los diferentes ortólogos, como los últimos residuos, pertenecientes a los últimos aminoácidos de la secuencia APE1 de *C. merolae*. Ambas zonas poseen un mal alineamiento. En el primer caso se debe a que los CTPs poseen una gran variabilidad en su composición aminoacídica y eso conlleva a un mal alineamiento en dichas secuencias (Lee and Hwang, 2018). En el segundo caso es debido simplemente a que la secuencia de *C. merolae* que se encuentra en las bases de datos posee un número de aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo terminal que no poseen el resto de secuencias analizadas.

En el análisis también se ha visto que APE1 se encuentra en una sola copia en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, no obteniéndose así alineamiento con ninguna otra proteína en dicho genoma.

3.3.2. APE1 interactuación *in vivo* con FBN2

La proteína APE1 coinmunoprecipitó con FBN2 en todos los ensayos realizados (ver apartado 3.1.9). Con objeto de corroborar la interacción FBN2/APE1 observada mediante



Resultados
Capítulo III

ensayo Co-IP, se empleó el ensayo BiFC. Para ello, los cDNAs de FBN2 y APE1 se clonaron en los vectores pXNGW y pXCGW y se expresaron de forma transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

En la Figura 3.56 se observa que efectivamente FBN2 y APE1 interaccionan *in vivo* y se detecta fluorescencia del fluoróforo reconstruido en todo el cloroplasto. Un patrón similar al obtenido al estudiar la interacción FBN2/FBN2 y característico del patrón de localización de FBN2.

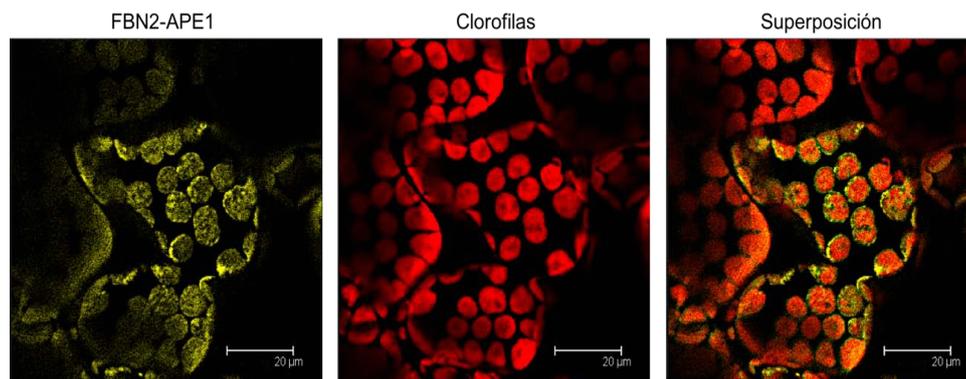


Figura 3.56: Estudio de la interacción *in vivo* entre FBN2 y APE1 mediante ensayo de BiFC. Los cDNAs que codifican para las proteínas completas de FBN2 y APE1 se fusionaron al extremo amino terminal de la YFP y al extremo carboxilo terminal de la CFP y se transformaron con ellas hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la fluorescencia de la YFP/CFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 20 μm.

Por otro lado, y debido a la relación de FBN2 con las FBN1s, se decidió comprobar si APE1 también interacciona con estas últimas por el mismo método (Figura 3.57), de la misma forma que las FBN1s interaccionan con AOS (Figura 3.28, B).

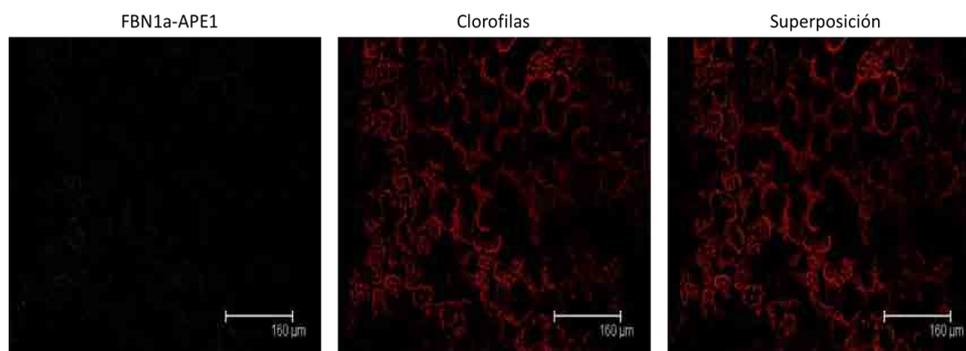


Figura 3.57: Estudio de la interacción *in vivo* entre FBN1b y APE1 mediante ensayo de BiFC. Los cDNAs que codifican para las proteínas completas de FBN1b y APE1 se fusionaron al extremo amino terminal de la YFP y al extremo carboxilo terminal de la CFP y se transformaron con ellas hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes muestran la fluorescencia de la YFP/CFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 160 μm.



En la Figura 3.57 se observa que APE1 no interacciona mediante ensayo de BiFC con las FBN1s.

3.3.3. Patrón de localización de APE1

Como se ha descrito previamente, APE1 es descrita como una proteína tilacoidal (Walters *et al.*, 2003) y que no ha sido localizada en los PGs en ninguno de los análisis proteómicos previos. Para comprobar esta predicción, se analizó la localización del péptido de fusión APE1-GFP mediante su expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* (Figura 3.58).

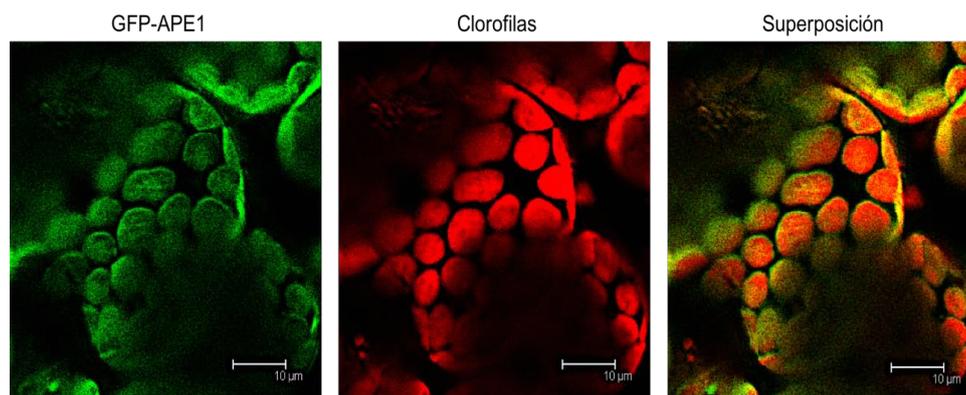


Figura 3.58: Localización sub-cloroplástica de la proteína APE1 mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*. Se observan las imágenes tomadas mediante microscopía confocal de fluorescencia de la proteína APE1 fusionada a la proteína marcadora GFP. La construcción se expresó bajo el control del promotor constitutivo 35S. Se muestra la señal emitida por el péptido de fusión APE1-GFP, la autofluorescencia de las clorofilas y la superposición de ambas imágenes. La barra blanca indica el tamaño de 10 µm.

El patrón de localización obtenido coincide con el de una proteína que se localiza de forma uniforme en todas las MTs.

3.3.4. Aislamiento de plantas mutantes homocigotas para el gen APE1

Con objeto de estudiar el fenotipo provocado por la ausencia de APE1, se procedió a aislar mutantes KO por inserción de T-DNA en el gen que la codifica (At5g38660). Se obtuvieron dos líneas independientes procedentes de las colecciones del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK y de GABI-KAT, líneas SALK_133182 y GABI_174C06 respectivamente. La línea SALK_133182 posee una inserción en el tercer intrón, mientras que la línea GABI_174C06 posee una inserción de T-DNA en el primer intrón del gen. Mediante PCR y usando DNA genómico extraído de las diferentes plantas, se seleccionaron aquellas homocigotas para cada una de las inserciones (Figura 3.59).



Resultados

Capítulo III

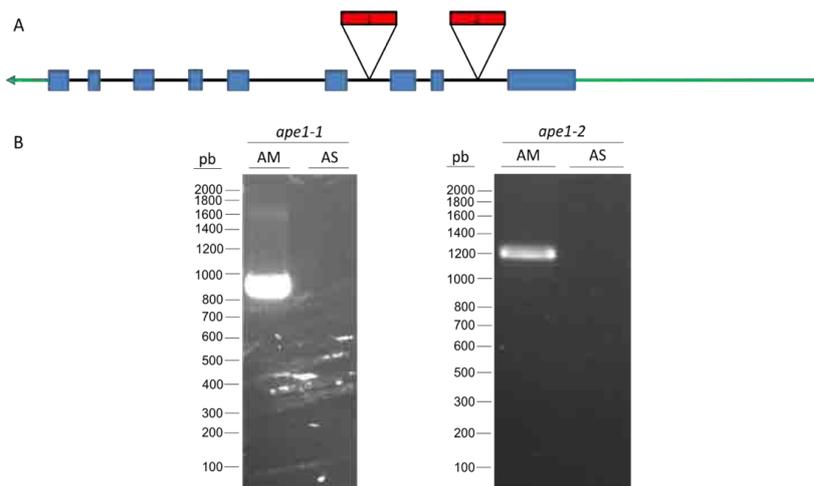


Figura 3.59: Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes *ape1-1* y *ape1-2* y resultados de los análisis mediante PCR de la inserción de T-DNA en el genoma de dichas líneas. Se muestran los sitios de inserción de T-DNA en el gen APE1 en las líneas mutantes 1, línea SALK_133182, y 2, GABI_174C06, (A) y los resultados de amplificación de sus correspondientes secuencias (B) en las líneas mutantes empleadas. Para la identificación del alelo silvestre mediante PCR se utilizaron oligonucleótidos internos de cada gen y para el alelo mutante se usó uno de los oligonucleótidos del gen más otro propio de la inserción de T-DNA. En A, las cajas azules representan los exones, las rayas negras muestran los intrones, las rayas verdes muestran las regiones UTR y las cajas rojas representan las inserciones de T-DNA. Para la identificación del alelo silvestre mediante PCR se utilizaron oligonucleótidos internos de cada gen y para el alelo mutante se usó uno de los oligonucleótidos del gen más otro propio de la inserción de T-DNA. En B, se muestra a la izquierda la posición de las diferentes bandas (en pb) del marcador de tamaño empleado.

A continuación, se obtuvieron anticuerpos específicos contra tres péptidos de la proteína:

1. Anti-APE1.1 (desde la posición 256 a la 269 de la secuencia de aminoácidos).
2. Anti-APE1.2 (desde la posición 173 a la 186).
3. Anti-APE1.3 (desde la posición 202 a la 215).

Sin embargo, ninguno de estos anticuerpos reconoció a la proteína APE1 en inmunoblots, por lo que no se pudieron usar para determinar la ausencia de APE1 en las líneas mutantes.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

4. DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

4. DISCUSIÓN

4.1. Subgrupo 1-2 de FBNs

Las FBNs del subgrupo 1-2 (FBN1a, -1b y 2) han sido las más estudiadas hasta la fecha. Dichos estudios se han realizado en diferentes especies como papa, pimiento, tabaco o *Arabidopsis* (Caplan *et al.*, 2009; Deruère *et al.*, 1994; Eymery, 1999; Gillet *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001; Laizet *et al.*, 2004; Leitner-Dagan *et al.*, 2006; Rey *et al.*, 2000; Shanmugabalaji *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2006). Estos análisis han llevado a sugerir que estas proteínas están implicadas en el mantenimiento estructural de los PGs, así como en la defensa de la planta frente a estreses abióticos (Singh y McNellis, 2011). Sin embargo, no se ha descrito ningún mecanismo por el que estas proteínas llevarían a cabo estas funciones. En *Arabidopsis* se ha estudiado el papel de estas FBNs mediante la técnica de RNAi, obteniéndose plantas transgénicas con niveles reducidos de estas tres proteínas (Youssef *et al.*, 2010). En estas plantas se observó una menor tasa de crecimiento que en el WT, así como una menor acumulación de antocianinas cuando las plantas se sometían a una combinación de estrés lumínico y por bajas temperaturas. Además, los autores de este trabajo describieron alteraciones en la estructura de las MTs y una disminución en la eficiencia máxima cuántica del PSII en plantas sometidas a dichos estreses. Las alteraciones en el crecimiento y la acumulación de antocianina revirtieron tras el tratamiento con jasmonato a las plantas transgénicas, por lo que los autores propusieron que la carencia de estas FBNs afecta a la síntesis de esta hormona (Youssef *et al.*, 2010). Este estudio puso de manifiesto el papel que algunas FBNs pueden tener en la síntesis de jasmonato. Sin embargo, tiene varias limitaciones: a) la técnica de RNAi empleada puede afectar a los niveles de otras FBNs debido a la similitud de secuencias entre ellas, b) este estudio no distingue entre las tres FBNs del subgrupo, asumiendo que las tres proteínas tienen el mismo papel y c) no propone ningún mecanismo de acción para las funciones de estas FBNs. El estudio desarrollado en esta Tesis ha tenido, como uno de sus objetivos, el dilucidar la función de cada uno de los miembros de este subgrupo de FBNs y proponer un mecanismo de acción que explique sus funciones. El patrón de localización de FBN2 representa la primera indicación de que esta FBN desempeña una función diferente a la de las FBN1s. La presencia de FBN2 en el estroma de los cloroplastos de *Arabidopsis* contradice el estudio realizado por Lundquist *et al.* (2012), que mostraba una ratio de abundancia PG/estroma para la proteína FBN2 de 1188, lo que indicaba que la mayor parte de la población de FBN2 se encontraba asociada a los PGs, y una ratio PG/tilacoides de 59, siendo entonces 59 veces más abundante en los PGs que en los tilacoides en general. La diferente metodología empleada, espectrometría de masas en el estudio llevado a cabo por Lundquist *et al.* (2012) y expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* junto con análisis por inmunoblot



Discusión

en esta Tesis, pueden explicar la discordancia entre ellos. El análisis de la presencia de FBN2 en las diferentes fracciones de MTs separadas en un gradiente discontinuo de sacarosa es interesante; pues indica que, además de la presencia de FBN2 en los PGs, está localizada también en otras zonas de las MTs coincidiendo con el PSII (coincide con la presencia de la proteína D1. Figura 3.4). Este resultado aumenta las posibles funciones de esta proteína.

La eliminación de FBN1s y/o de FBN2 no impide la acumulación de antocianinas inducida por alta intensidad lumínica, sino que la ralentiza. Y al cabo de unas tres semanas de estrés los niveles de antocianinas en las líneas mutantes son equiparables a los detectados en el WT (Figura 3.9). Esta alteración se revierte tras la adición de jasmonato a las plantas mutantes (Figura 3.10). Los estudios de Co-IP indican que FBN2 interacciona con la enzima que cataliza uno de los primeros pasos de la biosíntesis de jasmonato, la AOS. En algunos de los análisis por Co-IP también aparecieron las enzimas LOX2 y AOC. Los estudios de BiFC han corroborado la interacción entre FBN2 y AOS. Igualmente indican que AOS puede interactuar con FBN1s. LOX2, AOS y AOC catalizan los primeros pasos de la biosíntesis de ácido jasmónico en el cloroplasto: LOX2, junto con LOX3 y LOX4, interviene en la oxidación de los ácidos grasos 16:3 y 18:3 para que AOS y AOC los conviertan en OPDA; el OPDA es transportado al peroxisoma para que varios ciclos de β -oxidación lo transformen en la hormona jasmonato (Wasternack and Hause, 2013). AOS fue previamente declarada como parte del “core” de los PGs por algunos autores (Vidi *et al.*, 2006; Ytterberg *et al.*, 2006), pero descartada posteriormente debido a su distribución generalizada por diferentes fracciones de membrana cloroplástica y mostrar, por tanto, una ratio de abundancia entre el PG y otras partes del cloroplasto demasiado baja (Lundquist *et al.*, 2012). Lundquist *et al.* (2013) han demostrado que las enzimas localizadas en los plastos que intervienen en la síntesis de jasmonato (AOS, LOX2 y AOC), son reclutadas y transportadas a los PGs en condiciones de estrés. Por otro lado, recientemente se ha descubierto la existencia de un complejo en la envuelta del cloroplasto que contiene a estas enzimas (Pollmann *et al.*, 2019). Toda esta información sugiere la existencia de dos poblaciones distintas de estas tres enzimas, una asociada a los PGs y otra localizada en la envuelta del cloroplasto. FBN2 y las FBN1s mediarían la asociación de estas enzimas con los PGs, facilitando así el flujo de metabolitos a través de ellos. La acumulación ralentizada de antocianinas sería más evidente en plantas mutantes carentes de estas FBNs al enfrentarse a situaciones de estrés abiótico, una situación que incrementa el número de PGs en las células (van Wijk and Kessler, 2017) y la cantidad de FBNs presentes (Ytterberg *et al.*, 2006). El reclutamiento de las enzimas implicadas en la síntesis de jasmónico hacia los PGs se vería afectada por la eliminación de cualquiera de estas FBNs (FBN2 o FBN1s). Aun así, no se puede tampoco descontar que la interacción de estas



FBNs con las enzimas implicadas en la síntesis de ácido jasmónico module positivamente la actividad de las mismas.

La función de FBN2 y FBN1s en dicha síntesis no parece ser redundante, ya que se observa una alteración similar en los distintos mutantes del subgrupo FBN1-2 (*fbn1a-fbn1b*, *fbn2* y *fbn1a-fbn1b-fbn2*), lo que indicaría que tanto FBN1s como FBN2 son necesarias para este proceso y la eliminación de alguna de ellas altera la síntesis de ácido jasmónico en el cloroplasto. En este contexto, es interesante la interacción observada entre FBN2 y FBN1s (Figura 3.26). FBN1a y FBN1b son capaces de formar homodímeros y heterodímeros mediante interacción cabeza-cola (Gámez-Arjona *et al*, 2014a). Este mecanismo permite la formación de homo- o heterooligómeros formados por estas FBNs. Por otro lado, FBN2 es capaz de interactuar con otros polipéptidos de FBN2 (Figura 3.27). Sería interesante analizar si el mecanismo de interacción de FBN2 con FBN1s es del mismo tipo que el descrito entre las FBN1s, lo que permitiría la integración de FBN2 en los oligómeros antes mencionados. Todos estos datos sugieren la formación de una red en la superficie de los PGs gracias a las FBNs. Esta red sería necesaria para el reclutamiento de las enzimas implicadas en la síntesis de ácido jasmónico a los PGs, facilitando su función, de tal forma que la eliminación de alguna de estas FBNs alteraría este reclutamiento y afectaría a la tasa de síntesis de esta hormona en plantas estresadas.

La aparición de tejido necrótico en hojas completamente desarrolladas es otra de las alteraciones fenotípicas que se observan en los distintos mutantes de FBN2 y FBN1s. Dichas lesiones se hacen más abundantes en el mutante triple *fbn1a-fbn1b-fbn2* en comparación con sus líneas mutantes parentales *fbn1a-fbn1b* y *fbn2* (Figura 3.11). El análisis de los parámetros fotosintéticos del PSII en las hojas completamente desarrolladas de estas plantas mutantes cuando son expuestas a un estrés por ALF indica que el valor de F_v/F_m es más bajo en las líneas *fbn2* y *fbn1a-fbn1b* en comparación con la línea silvestre, e incluso más bajo en el triple mutante (Figura 3.12). La baja eficiencia del PSII en las distintas plantas mutantes podría estar provocando un incremento de los niveles de ROS, los cuales serían responsables de la aparición de muerte celular programada y, por ende, de la aparición de necrosis en los tejidos (Triantaphylidès *et al.*, 2008). Una de las consecuencias de la formación de ROS es la peroxidación lipídica (Montillet *et al.*, 2005) y, a su vez, la formación de MDA es un marcador de la peroxidación lipídica catalizada por la presencia de radicales libres al ser un producto de esta peroxidación (Farmer and Mueller, 2013). Los niveles de MDA fueron más altos en las líneas mutantes *fbn2* y *fbn1a-fbn1b* al compararlos con los niveles de plantas silvestres, mientras que en el mutante triple *fbn1a-fbn1b-fbn2* fue incluso mayor que en estas tres líneas de plantas (Figura 3.19). Estos resultados apoyan la idea anterior de que las lesiones (como aparición de tejido necrótico) en las diferentes líneas



Discusión

mutantes empleadas son una consecuencia de la formación de ROS provocada por una menor eficiencia del PSII en condiciones de estrés abiótico. La hipótesis de la existencia de daños provocados por un estrés oxidativo en las plantas mutantes sometidas a estrés ALF está apoyado por los resultados de tinción *in situ* para detectar la presencia de H_2O_2 y O_2^- (Figura 3.17 y Figura 3.18), que indican que los niveles de estos ROS son mayores en las plantas mutantes que en el WT cuando se someten a estrés ALF. A diferencia de lo que ocurre con la acumulación de antocianinas, la protección del PSII frente a un estrés por ALF llevada a cabo por las proteínas FBN2 y FBN1s parece ser aditiva, visto como una mayor cantidad de hojas completamente desarrolladas con lesiones en el mutante triple que en sus mutantes parentales. Además, los valores de F_v/F_m y la concentración de MDA son más bajo y más alto respectivamente en el mutante triple que en sus líneas parentales. Todos estos análisis sugieren que estas tres FBNs poseen cierta redundancia de función, concretamente en su función como protectores del PSII frente a este tipo de estrés, aunque tampoco se puede descartar que FBN2 por un lado y FBN1s por otro posean mecanismos de acción diferentes.

Los valores de F_v/F_m no son los únicos que se ven modificados en los mutantes analizados en condiciones de estrés abiótico. En las Figuras 3.14, 3.15 y 3.16 se puede observar cómo otros parámetros fotosintéticos como $\Phi(II)$, $\Phi(NPQ)$, $\Phi(NO)$, $1-qL$ también se ven afectados. Las diferencias en las líneas mutantes con respecto a la línea silvestre se van haciendo mayores conforme aumentan los días en condiciones de estrés por ALF. Además, estas diferencias también son mayores en el mutante triple que en sus parentales, en concordancia a lo observado para los valores de F_v/F_m . En ninguno de estos análisis se han observado alteraciones en las MTs, tal como sugieren Youssef *et al.* (2010) (Figuras 3.51 y 3.52). Esta diferencia podría ser debida a la técnica de RNAi empleada por Youssef *et al.* (2010), la cual podría afectar a la expresión de otras FBNs. Todas estas medidas han sido realizadas en hojas maduras completamente desarrolladas, ya que en hojas más jóvenes se detectaba aclimatación tras una semana de estrés. En hojas jóvenes en expansión, la aclimatación a una situación de estrés como la de alta luz se lleva a cabo incrementando la capacidad fotosintética mediante cambios en la morfología de la hoja (como cambios en el diámetro de vasos vasculares pequeños y en el grosor de la lámina). Esta aclimatación durante el desarrollo incluye también cambios en la fisiología del cloroplasto, como ajustes en la composición de los centros de reacción y las antenas colectoras de luz. Por el contrario, en hojas maduras, la adaptación a una situación de estrés por alta iluminación tiene lugar a través de la llamada aclimatación dinámica, que implica preferencialmente cambios en la fisiología del cloroplasto, sin cambios morfológicos (Álvarez-Fernández *et al.*, 2021). La ausencia de estas FBNs no parece afectar a la aclimatación durante el desarrollo, ya que las hojas



jóvenes de las diferentes líneas mutantes se aclimatan tras una semana de estrés, aunque sí afecta a la aclimatación dinámica experimentada por las hojas maduras completamente expandidas.

Los análisis de Co-IP de la población asociada a membranas de FBN2 indican que esta proteína no solo interacciona con AOS, sino que lo hace con varias proteínas más (Tabla 3.1). Algunas de estas proteínas, como FNR2, NDC1, NdhS o APE1, son proteínas íntimamente relacionadas con la fotosíntesis. Recientemente se ha descubierto que cambios en la abundancia relativa de proteínas como FNR2 o Tic62 (también encontrada mediante análisis de Co-IP con FBN2), entre otras, se correlaciona positivamente con cambios en la ratio de transferencia de electrones estimada del PSII y en la asimilación de CO₂ (Flannery *et al.*, 2021). Además, la mejora de la capacidad fotosintética en plantas crecidas en alta intensidad lumínica va en paralelo con el incremento del transporte cíclico de electrones, el cual se correlaciona positivamente con la abundancia del complejo de la NDH, FNR2 y Tic62, entre otras (Flannery *et al.*, 2021). Se puede especular con que, al igual que lo que ocurre con los genes implicados en la biosíntesis del ácido jasmónico, estas FBNs estarían facilitando el correcto posicionamiento de estas proteínas en los tilacoides. Por este mismo motivo, su eliminación conllevaría al malfuncionamiento de estas proteínas interactoras y provocaría diferentes efectos pleiotrópicos, entre los cuales se encontraría un mayor daño en el PSII o incluso una menor tasa de crecimiento cuando las tres proteínas son eliminadas (Figura 3.7) bajo un estrés por ALF. Se requieren futuros análisis para confirmar o descartar esta posibilidad.

Ambas poblaciones de FBN2 interactúan con las isoformas 1 y 2 de FBA. Estas proteínas provienen de la duplicación del mismo gen (Lu *et al.*, 2012). FBA es una enzima metabólica clave que lleva a cabo la conversión reversible de la fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) en fosfato dihidroxiacetona (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP) durante la glucólisis y la gluconeogénesis (Rutter, 1964; Ronimus y Morgan, 2003). En el Ciclo de Calvin-Benson-Bassham puede catalizar también la condensación de la sedoheptulosa-1,7-bisfosfato desde eritrosa-4-fosfato y GAP (Flechner *et al.*, 1994). Pertenecen a una amplia familia de proteínas en *Arabidopsis thaliana*, donde encontramos tres FBAs (1, 2 y 3) que se localizan en los plastos y cinco FBAs (4, 5, 6, 7 y 8) localizadas en el citoplasma. Como se ha comentado, FBN2 es capaz de interactuar con FBA1 y FBA2, mientras que para la población estromática de FBN2 son las únicas proteínas con las que interacciona. Ytterberg *et al.* (2006) encontraron estas proteínas en un análisis del proteoma de los PGs. Como no encontraron otros enzimas del ciclo Calvin-Benson-Bassham, sugirieron que estas aldolasas desempeñaban una función desconocida en el metabolismo/estructura de los PGs (Ytterberg *et al.*, 2006). Son necesarios más estudios para



Discusión

entender el significado fisiológico de la interacción de estas proteínas con FBN2. Como se ha comentado anteriormente, estas interacciones se dan tanto con la población de FBN2 asociada a las membranas como la que se encuentra soluble en el estroma del cloroplasto. Esta localización dual de FBN2 podría indicar la existencia de una modificación post-traduccional de la proteína. En este sentido, es interesante el trabajo de Lohscheider *et al.* (2016), el cual identificó dos péptidos fosforilados de la proteína FBN2. Sin embargo, en el mismo trabajo se identificaron cinco péptidos fosforilados de FBN4, la cual muestra exclusivamente una localización asociada a membranas (Lohscheider *et al.*, 2016), descartando que la fosforilación sea la causante de la localización dual de FBN2.

El número de PGs por cloroplasto varía en función de las condiciones ambientales o nutritivas de la planta. Así, se ha descrito que, en condiciones de estrés por ozono, el número total de PGs aumenta en la línea de plantas *fbn4* KD (Singh *et al.*, 2010); o que, en plantas expuestas a dos semanas de estrés por ALF, el número de PGs es menor en plantas mutantes KD FBN1-2 que en plantas WT (Youssef *et al.*, 2010). El número de PGs en los distintos mutantes KO de las FBNs (Figura 3.53) en condiciones de estrés por ALF es significativamente menor que el obtenido en plantas WT. Resulta muy interesante que también sea significativamente menor el número de PGs en CN de crecimiento en los distintos mutantes KO del gen FBN2 (*fbn2*, *fbn2-fbn4* y *fbn1a-fbn1b-fbn2-fbn4*). Aunque parece que todas las FBNs relacionadas con este análisis son importantes para establecer el número correcto de PGs por cloroplasto, FBN2 parece tener un papel central en este proceso debido a que la eliminación de la misma provoca que no se alcance el número correcto de estos suborgánulos. Se desconoce el procedimiento y los elementos involucrados en que se alcance un número determinado de PGs por cloroplasto, pero FBN2 parece estar implicada en dicho proceso. Parece también existir cierta redundancia de función con los genes FBN1s y FBN4 en este contexto, lo que explicaría el fenotipo aún más marcado del mutante KO FBN1-4. Por otro lado, estos resultados indican que la eliminación de las cuatro FBNs asociadas a los PGs más abundantes no impide la formación de estos suborgánulos, lo que relativiza el papel de estas proteínas en la formación y mantenimiento de la estructura de los PGs.

4.2. FBN4

Los análisis por inmunoblot de fracciones cloroplásticas y los estudios de localización de la proteína de fusión FBN4-GFP mediante microscopía confocal indican que FBN4, a diferencia de FBN2, se localiza exclusivamente en la fracción de membranas del cloroplasto. El análisis de



la localización de FBN4 en fracciones de las MTs separadas mediante ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (Figura 3.34) indica que, al igual que FBN2, esta FBN no se localizaría exclusivamente en PGs, sino que estaría presente también en fracciones de las MTs que contienen el PSII. Es interesante indicar que FBN2 y FBN4 muestran un patrón de localización en las MTs diferentes. Así, FBN2 presenta un máximo de localización en las fracciones 19-25 del gradiente, mientras FBN4 muestra ese máximo entre las fracciones 13-19. A su vez, ambas proteínas muestran un patrón muy diferente al de FBN1a, que ha sido considerada tradicionalmente como marcador de PGs. Estos resultados sugieren que la composición en FBNs entre los PGs es heterogénea.

El rastreo de proteínas que interaccionen con FBN4 mediante el ensayo de doble híbrido indicó que FBN4 interacciona con FBN1a. Sin embargo, los análisis de BiFC y de Co-IP sugieren que FBN4 no interacciona con FBN1a. Esta discordancia no es extraña al tratarse de técnicas muy diferentes. La alta frecuencia de falsos positivos en la técnica de doble híbrido y el hecho de que tanto la técnica de BiFC como la de Co-IP sean más fisiológicas que el ensayo de doble híbrido sugieren que, efectivamente, FBN4 no interacciona con FBN1a *in vivo*. Igualmente, los ensayos BiFC indican que FBN4 tampoco interacciona con FBN2 (Figura 3.40). Tampoco FBN4 interacciona con otro polipéptido FBN4 para formar dímeros, al contrario de lo que hemos comprobado para los miembros del subgrupo 1-2 (Figura 3.41). Estos resultados indican que FBN4 no formaría parte de la red de FBNs que rodearía a los PGs que hemos propuesto para los miembros del subgrupo 1-2. Además, sugiere que FBN4 tiene una función claramente diferenciada de la de los miembros de dicho subgrupo. Efectivamente, los análisis realizados en mutantes KO carentes de la proteína FBN4 indican que la eliminación de esta proteína no afecta a la síntesis de antocianinas inducida por estrés ALF (Figura 3.37). Tampoco afecta a la eficiencia cuántica máxima (Figura 3.38) o la aclimatación del PSII a la situación de estrés (Figura 3.39). A partir de estudios realizados en plantas transgénicas de manzano con niveles reducidos de FBN4 (obtenidos mediante la técnica de “knock down”) se ha sugerido que FBN4 interacciona con PQ a través de su dominio de tipo lipocalina. Las lipocalinas se caracterizan por tener un sitio de unión que interactúa con una gran variedad de moléculas pequeñas hidrófobas (Charron *et al.*, 2015; Schiefner and Skerra, 2015). En el caso de las FBNs de *Arabidopsis*, este dominio está presente exclusivamente en la FBN4. Se ha propuesto que la eliminación de FBN4 disminuye la cantidad de PQ acumulada en cloroplastos de manzano (Singh *et al.*, 2012). Este cambio en la cantidad de PQ presente en los PGs determinaría que estos suborgánulos mostraran una tinción por osmio diferente en los estudios por TEM de cortes de hojas. En nuestros análisis no hemos detectado un cambio en la tinción de PGs en mutantes de *Arabidopsis* carentes de FBN4 (Figuras



Discusión

3.51 y 3.52), sugiriendo que la eliminación de esta proteína en *Arabidopsis* no altera la composición de lípidos en los PGs.

Estudios de Co-IP empleando anticuerpos específicos contra FBN4 indican que FBN4 interacciona con PLAT1 y PLAT2. Análisis proteómicos indican que PLAT2 presenta una localización dual, en los PGs y en el retículo endoplasmático (Lundquist *et al.*, 2012), aunque se desconoce su función. PLAT1 es una proteína ubicuamente presente en monocotiledóneas y dicotiledóneas, aunque su función como proteína que interviene en condiciones de estrés es poco conocida. Se ha encontrado que esta proteína confiere resistencia a diferentes estreses abióticos como la baja temperatura, la sequía o la alta concentración salina. Además, parece ser un blanco recientemente descubierto de la vía de señalización del ácido abscísico, además de regular de alguna forma el crecimiento de la planta (Hyun *et al.*, 2014). Posteriores estudios son necesarios para determinar si la función de FBN4 se limita al transporte y acumulación de PQ, como se ha propuesto en manzano, o si desempeña un papel facilitando la localización en los PGs de otras proteínas como PLAT1 y 2.

4.3. APE1

La proteína APE1 se identificó en un rastreo realizado para encontrar mutantes con alteraciones en la fluorescencia del PSII al ser sometidos a un estrés lumínico (Walters *et al.*, 2003). El mutante carente de esta proteína muestra una menor eficiencia fotosintética que el WT en germínulas sometidas a una semana de estrés lumínico y por ese motivo se propuso que estaba afectado en la aclimatación de la fotosíntesis al entorno (Walters *et al.*, 2003). No se conocen más datos acerca de la función de esta proteína. Hemos comprobado que es una proteína presente exclusivamente en los organismos fotosintéticos, desde cianobacterias hasta plantas superiores, mostrando un alto grado de conservación. En el caso de *Arabidopsis*, APE1 está presente en una sola copia, sin isoformas o genes con secuencia similar. Este dato indica que no existen proteínas en *Arabidopsis* capaces de suplir la carencia de APE1 y el mutante simple *ape1* debería tener un fenotipo claro. Los análisis informáticos predicen la presencia de dos dominios transmembrana en la secuencia de APE1, apoyando la idea de la localización tilacoidal de la proteína. Además, los estudios de localización con la proteína de fusión APE1-GFP indican que esta se encuentra distribuida uniformemente en las MTs. Esta localización no es contradictoria con la interacción entre APE1 y FBN2 que hemos detectado mediante Co-IP y análisis BiFC, ya que hemos comprobado que FBN2 se localiza también en otras zonas de las MTs y no exclusivamente en los PGs. Además, esta interacción parece ser



específica de FBN2 y no es compartida con los otros miembros del subgrupo 1-2 de FBNs (Figura 3.57). La proteína APE1 es una de las 63 proteínas que se encontraron presentes en todos los organismos con fotosíntesis oxigénica (Mulkidjanian *et al.*, 2006), indicando que esta proteína desempeña una función básica en este tipo de fotosíntesis, independientemente de las particularidades de los aparatos fotosintéticos de estos organismos. Posteriores estudios de los mutantes *ape1* obtenidos están siendo llevado a cabo por el Grupo para determinar la función de esta proteína y su papel en la respuesta de la planta a estrés lumínico.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

5. CONCLUSIONES

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

5. CONCLUSIONES

- I. FBN2 presenta una localización dual, en el estroma del cloroplasto y asociada a las membranas tilacoidales.
- II. El estrés lumínico reduce el crecimiento del triple mutante *fbn1a-fbn1b-fbn2*.
- III. La acumulación de antocianinas inducida por estrés lumínico se ve retardada en los diferentes mutantes del subgrupo 1-2 de fibrilinas.
- IV. Las fibrilinas del subgrupo 1-2 interactúan con al menos una de las enzimas de la ruta de síntesis del jasmonato.
- V. Las proteínas del subgrupo FBN1-2 protegen al PSII en condiciones de estrés por ALF.
- VI. Nuestros datos sugieren la existencia de una red alrededor de los plastoglobulos constituida por oligómeros formados por las diferentes fibrilinas del subgrupo 1-2.
- VII. Proponemos que las fibrilinas del subgrupo 1-2 interactúan con diferentes proteínas permitiendo que estas se localicen asociadas a los plastoglobulos. La eliminación de estas fibrilinas provoca efectos pleiotrópicos debido al mal funcionamiento de dichas proteínas. Uno de estos fenotipos es el retraso en la acumulación de antocianinas provocado por el estrés lumínico debido a un defecto en la síntesis de jasmonato.
- VIII. Mutaciones en las proteínas del subgrupo FBN1-2 aumentan el estrés oxidativo mediado por ALF.
- IX. FBN4 se encuentra localizada exclusivamente asociada a las membranas tilacoidales, pero su máxima acumulación se da en zonas de las membranas diferentes a las de los miembros del subgrupo 1-2. Estos datos sugieren que los plastoglobulos son heterogéneos en cuanto a su contenido de fibrilinas.
- X. La eliminación de FBN4 en *Arabidopsis* no afecta a la tinción por osmio de los plastoglobulos, lo que sugiere que la composición lipídica de estos suborgánulos no se ve afectada.
- XI. FBN4 interactúa con varias proteínas, como PLAT1 y PLAT2. Posteriores estudios son necesarios para determinar la función de FBN4 en *Arabidopsis*.
- XII. La ausencia de cuatro de las proteínas más abundantes de los PGs reduce drásticamente el número de estos en condiciones de estrés por ALF. Sin embargo, los cloroplastos de estos mutantes siguen acumulando plastoglobulos, indicando que otros elementos intervienen en la formación y mantenimiento de la estructura de estos suborgánulos.
- XIII. La proteína APE1 interactúa *in vivo* con FBN2.



Conclusiones

- XIV. APE1 presenta dos dominios transmembrana. Son necesarios posteriores estudios para determinar la función de esta proteína en la aclimatación de la planta a un estrés lumínico.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008744e2100054558

CSV

GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

29/09/2021 13:35:05 Horario peninsular



GEISER-00e1-6fd4-b22e-45d4-a752-da51-84eb-5018

BIBLIOGRAFÍA

- Alboresi, A; Gerotto, C; Giacometti, GM; Bassi, R; Morosinotto, T. 2010. *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:11128–33
- Allen, JF; de Paula, WBM; Puthiyaveetil, S; Nield, J. 2011. A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends in Plant Science* 16:645–55
- Allorent, G; Tokutsu, R; Roach, T; Peers, G; Cardol, P; Girard-Bascou, J; Seigneurin-Berny, D; Petroutsos, D; Kuntz, M; Breyton, C; Franck, F; Wollman, FA; Niyogi, KK; Krieger-Liszkay, A; Minagawa, J; Finazzi, G. 2013. A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* 25:545–57
- Alonso, JM. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653–57
- Álvarez-Fernández, R; Penfold, CA; Gálvez-Valdivieso, G; Expósito-Rodríguez, M; Stallard, EJ; Bowden, L; Moore, JD; Mead, A; Davey, PA; Matthews, JSA; Beynon, J; Buchanan-Wollaston, V; Wild, DL; Lawson, T; Bechtold, U; Denby, KJ; Mullineaux, PM. 2021. Time-series transcriptomics reveals a *BBX32*-directed control of acclimation to high light in mature *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* doi:10.1111/tpj.15384
- Andersson, B; Anderson, JM. 1980. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 593:427–40
- Armbruster, U; Labs, M; Pribil, M; Viola, S; Xu, W; Scharfenberg, M; Hertle, AP; Rojahn, U; Jensen, PE; Rappaport, F; Joliot, P; Dörmann, P; Wanner, G; Leister, D. 2013. *Arabidopsis* curvature thylakoid1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature. *The Plant Cell* 25:2661–78
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase — a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85:235–41
- Asada, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601–39
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141:391–96
- Austin, JR; Staehelin, LA. 2011. Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography. *Plant Physiology* 155:1601–11
- Austin, JR; Frost, E; Vidi, PA; Kessler, F; Staehelin, LA. 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18:1693–1703
- Baker, NR. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annual Review of Plant Biology* 59:89–113
- Ballottari, M; Dall’Osto, L; Morosinotto, T; Bassi, R. 2007. Contrasting behavior of higher plant photosystems I and II antenna systems during acclimation. *Journal of Biological Chemistry* 282:8947–58



Bibliografía

- Benz, JP; Stengel, A; Lintala, M; Lee, YH; Weber, A; Philippar, K; Gügel, IL; Kaieda, S; Ikegami, T; Mulo, P; Soll, J; Bölter, B. 2009. Arabidopsis Tic62 and ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase form light-regulated complexes that are integrated into the chloroplast redox poise. *The Plant Cell* 21:3965-83
- Besagni, C; Kessler, F. 2013. A mechanism implicating plastoglobules in thylakoid disassembly during senescence and nitrogen starvation. *Planta* 237:463-70
- Besagni, C; Piller, LE; Brehelin, C. 2011. Preparation of plastoglobules from *Arabidopsis* plastids for proteomic analysis and other studies. *Methods in Molecular Biology* 775:223-39
- Bhuiyan, NH; Friso, G; Rowland, E; Majsec, K; van Wijk, KJ. 2016. The plastoglobule-localized metallopeptidase PGM48 is a positive regulator of senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 28:3020-37
- Bilger, W; Schreiber, U; Bock, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102:425-32
- Bouchnak, I; Brugière, S; Moyet, L; Le Gall, S; Salvi, D; Kuntz, M; Tardif, M; Rolland, N. 2019. Unraveling hidden components of the chloroplast envelope proteome: opportunities and limits of better MS sensitivity. *Molecular & Cellular Proteomics* 18:1285-1306
- Boyd, JS; Mittelmeier, TM; Lamb, MR; Dieckmann, CL. 2011. Thioredoxin-family protein EYE2 and Ser/Thr kinase EYE3 play interdependent roles in eyespot assembly. *Molecular Biology of the Cell* 22:1421-29
- Bréhélin, C; Kessler, F. 2008. The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks. *Photochemistry and Photobiology* 84:1388-94
- Bréhélin, C; Kessler, F; van Wijk, KJ. 2007. Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in Plant Science* 12:260-66
- Brooks, MD; Niyogi, KK. 2011. Use of a pulse-amplitude modulated chlorophyll fluorometer to study the efficiency of photosynthesis in *Arabidopsis* plants. *Methods in Molecular Biology* 775:299-10
- Buege, JA; Aust, SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52:302-10
- Caplan, JL; Zhu, X; Mamillapalli, P; Marathe, R; Anandalakshmi, R; Dinesh-Kumar, SP. 2009. Induced ER chaperones regulate a receptor-like kinase to mediate antiviral innate immune response in plants. *Cell Host & Microbe* 6:457-69
- Cazzaniga, S; Dall'Osto, L; Kong, SG; Wada, M; Bassi, R. 2013. Interaction between avoidance of photon absorption, excess energy dissipation and zeaxanthin synthesis against photooxidative stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 76:568-79
- Charrier, B; Champion, A; Henry, Y; Kreis, M. 2002. Expression profiling of the whole *Arabidopsis* shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiology* 130:577-90
- Charron, JBF; Oullet, F; Pelletier, M; Danyluk, J; Chauve, C; Sarhan, F. 2005. Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiology* 139:2017-28
- Chenna, R; Sugawara, H; Koike, T; López, R; Gibson, TJ; Higgins, DG; Thompson, JD. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research* 31:3497-00



- Clough, SJ; Bent, AF. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16:735-43
- Cunningham Jr, FX; Tice, AB; Pham, C; Gantt, E. 2010. Inactivation of genes encoding plastoglobulin-like proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 leads to a light-sensitive phenotype. *Journal of Bacteriology* 192:1700-09
- Czechowski, T; Bari, RP; Stitt, M; Scheible, WR; Udvardi, MK. 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *The Plant Journal* 38:366-79
- DalCorso, G; Pesaresi, P; Masiero, S; Aseeva, E; Schünemann, D; Finazzi, G; Joliot, P; Barbato, R; Leister, D. 2008. A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132:273-85
- Dall'Osto, L; Caffarri, S; Bassi, R. 2005. A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *The Plant Cell* 17:1217-32
- Dall'Osto, L; Cazzaniga, S; Wada, M; Bassi, R. 2014. On the origin of a slowly reversible fluorescence decay component in the *Arabidopsis npq4* mutant. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369:20130221
- Daum, B; Kühlbrandt, W. 2011. Electron tomography of plant thylakoid membranes. *Journal of Experimental Botany* 62:2393-2402
- Davidi, L; Shimoni, E; Khozin-Goldberg, I; Zamir, A; Pick, U. 2014. Origin of β -carotene-rich plastoglobuli in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 164:2139-56
- Davidi, L; Levin, Y; Ben-Dor, S; Pick, U. 2015. Proteome analysis of cytoplasmatic and plastidic β -carotene lipid droplets in *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 167:60-79
- Deruère, J; Römer, S; d'Harlingue, A; Backhaus, RA; Kuntz, M; Camara, B. 1994. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *The Plant Cell* 6:119-33
- Dietz, KJ; Turkan, I; Krieger-Liszka, A. 2016. Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling into and out of the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiology* 171:1541-50.
- Dorne, AJ; Joyard, J; Douce, R. 1990. Do thylakoids really contain phosphatidylcholine? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:71-74
- Douce, R; Joyard, J. 1996. Biosynthesis of thylakoid membrane lipids. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D.R. and Yocum, C.F., eds.), 69-101, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Early, KW; Haag, JR; Pontes, O; Opper, K; Juehne, T; Song, K; Pikaard, CS. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* 45:616-29
- Eberhard, S; Finazzi, G; Wollman, FA. 2008. The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics* 42:463-515
- Edge, R; McGarvey, DJ; Truscott, TG. 1997. The carotenoids as anti-oxidants — a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 41:189-200



Bibliografía

- Egea, I; Barsan, C; Bian, W; Purgatto, E; Latché, A; Chervin, C; Bouzayen, M; Pech, JC. 2010. Chromoplast differentiation: current status and perspectives. *Plant and Cell Physiology* 51:1601-11
- Emanuelsson, O; Nielsen, H; Brunak, S; von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300:1005–16
- Engel, BD; Achaffer, M; Kuhn Cuellar, L; Villa, E; Plitzko, JM; Baumeister, W. 2015. Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in-situ cryo-electron tomography. *eLife* 4:e04889
- Escoubas, JM; Lomas, M; LaRoche, J; Falkowski, PG. 1995. Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:10237–41
- Eymery, F; Rey, P. 1999. Immunocytolocalization of CDSP 32 and CDSP 34, two chloroplastic drought-induced stress proteins in *Solanum tuberosum* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 37:305-12
- Farmer, EE; Mueller, MJ. 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology* 64:429–50
- Fatihi, A; Latimer, S; Schmollinger, S; Block, A; Dussault, PH; Vermaas, WFJ; Merchant, SS; Basset, GJ. 2015. A dedicated type II NADPH dehydrogenase performs the penultimate step in the biosynthesis of vitamin K₁ in *Synechocystis* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27:1730-41
- Fedorova, E; Thompson, R; WhiteHead, LF; Maudoux, O; Udvardi, MK; Day, DA. 1999. Localization of H⁺-ATPases in soybean root nodules. *Planta* 209:25-32
- Flannery, SE; Hepworth, C; Wood, WHJ; Pastorelli, F; Hunter, CN; Dickman, MJ; Jackson, PJ; Johnson, MP. 2021. Developmental acclimation of the thylakoid proteome to light intensity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 105:223-44
- Flechner, A; Gross, W; Martin, W; Schnarrenberger, C. 1999. Chloroplast class I and class II aldolases are bifunctional for fructose-1,6-biphosphate and sedoheptulose-1,7-biphosphate cleavage in the Calvin cycle. *FEBS Letters* 447:200–2
- Foyer, CH; Descourvieres, P; Kunert, KJ. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment* 17:507–23
- Friso, G; Giacomelli, L; Ytterberg, AJ; Peltier, JB; Rudella, A; Sun, Q; van Wijk, KJ. 2004. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *The Plant Cell* 16:478-99
- Galetskiy, D; Susnea I; Reiser, V; Adamska, I; Przybylski, M. 2008. Structure and dynamics of photosystem II light-harvesting complex revealed by high-resolution FTICR mass spectrometric proteome analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 19 1004-13
- Gómez-Arjona, FM. 2013. Identificación de blancos biotecnológicos para la mejora de la producción de almidón en plantas. Tesis doctoral
- Gómez-Arjona, FM; de la Concepción, JC; Raynaud, S; Mérida, A. 2014a. *Arabidopsis thaliana* plastoglobule-associated fibrillin 1a interacts with fibrillin 1b in vivo. *FEBS Letters* 588:2800-04



- Gámez-Arjona, FM, Raynaud, S; Ragel, P; Mérida, A. 2014b. Starch synthase 4 is located in the thylakoid membrane and interacts with plastoglobule-associated proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 80:305-16
- Garab, G. 2014. Hierarchical organization and structural flexibility of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837:481-94
- Gaude, N; Bréhélin, C; Tischendorf, G; Kessler, F; Dörmann, P. 2007. Nitrogen deficiency in *Arabidopsis* affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *The Plant Journal* 49: 729-39
- Gerotto, C; Alboresi, A; Meneghesso, A; Jokel, M; Suorsa, M; Aro, EM; Tomas, M. 2016. Flavodiiron proteins act as safety valve for electrons in *Physcomitrella patens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113:12322-27
- Gietz, RD; Woods, RA. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* 350:87-96
- Gillet, B; Beyly, A; Peltier, G; Rey, P. 1998. Molecular characterization of CDSP34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination. *The Plant Journal* 16:257-62
- Ginzinger, DG. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30:503-12
- González-Jorge, S; Ha, SH; Magallanes-Lundback, M; Gilliland, LU; Zhou, A; Lipka, AE; Nguyen, YN; Angelovici, R; Lin, H; Cepela, J; Little, H; Buell, CR; Gore, MA, DellaPenna, D. 2013. Carotenoid cleavage dioxygenase 4 is a negative regulator of β -carotene content in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell* 25:4812-26
- Gould, KS; McKelvie, J; Markham, KR. 2002. Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell & Environment* 25:1261-69
- Govindjee. 2004. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basics and history. In chlorophyll a fluorescence: a probe of photosynthesis, de Papageorgiou, GC, Govindjee, pp 2-42: Kluwer Academic Publishers
- Haferkamp, S; Haase, W; van Amerongen, H; Kirchhoff, H. 2010. Efficient light harvesting by photosystem II requires an optimized protein packing density in grana thylakoids. *Journal of Biological Chemistry* 285:17020-28
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166:557-80
- Hansmann, P; Stitte, P. 1982. Composition and molecular structure of chromoplast globules of *Viola tricolor*. *Plant Cell Reports* 1:111-14
- Heber, U; Walker, D. 1992. Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiology* 100:1621-26
- Hernández-Pinzón, I; Ross, JHE; Barnes, KA; Damant, AP; Murphy, DJ. 1999. Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus*. *Planta* 208:588-98
- Hertle, AP; Blunder, T; Wunder, T; Pesaresi, P; Pribil, M; Armbruster, U; Leister, D. 2013. PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Molecular Cell* 49:511-23



Bibliografía

- Hohmann-Marriott, MF; Blankenship, RE. 2011. Evolution of photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 62:515–48.
- Hood, EE; Gelvin, SB; Melchers, LS; Hoekema, A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2:208-18
- Hörtensteiner, S. 2013. Update on the biochemistry of chlorophyll breakdown. *Plant Molecular Biology* 82:505-17
- Huang, FC; Molnár, P; Schwab, W. 2009. Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *Journal of Experimental Botany* 60:3011-22
- Hyun, TK; van der Graaff, E; Albacete, A; Eom, SH; Grobkinsky, DK; Böhm, H; Janschek, U; Rim, Y; Ali, WW; Kim, SY, Roitsch, T. 2014. The *Arabidopsis* PLAT Domain Protein1 Is critically involved in abiotic stress tolerance. *PLOS ONE* 9: e112946
- Izawa, S. 1980. Acceptors and donors for chloroplast electron transport. *Methods in Enzymology* 69:413-34
- Järvi, S; Gollan, P; Aro, EM. 2013. Understanding the roles of the thylakoid lumen in photosynthesis regulation. *Frontiers in Plant Science* 4:434
- Järvi, S.; Suorsa, M; Aro, EM. 2015. Photosystem II repair in plant chloroplasts—Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1847:900–09
- Jöet, T; Cournac, L; Peltier, G; Havaux, M. 2002. Cyclic electron flow around photosystem I in C₃plants. *In vivo* control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiology* 128:760–69
- Jokel, M; Kosourov, S; Battchikova, N; Tsygankov, AA; Aro, EM, Allahverdiyeva, Y. 2015. *Chlamydomonas* flavodiiron proteins facilitate acclimation to anoxia during sulfur deprivation. *Plant and Cell Physiology* 56:1598–1607
- Joliot, PA; Finazzi, G. 2010. Proton equilibration in the chloroplast modulates multiphasic kinetics of nonphotochemical quenching of fluorescence in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:12728–33
- Kahlau, S; Bock, R. 2008. Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *The Plant Cell* 20:856-74
- Karpowicz, SJ; Prochnik, SE; Grossman, AR; Merchant, SS. 2011. The GreenCut2 resource, a phylogenomically derived inventory of proteins specific to the plant lineage. *Journal of Biological Chemistry* 286:21427:39
- Kaup, MT; Froese, CD; Thompson, J. 2002. A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiology* 129:1616-26
- Katz, A; Jiménez, C; Pick, U. 1995. Isolation and characterization of a protein associated with carotene globules in the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology* 108:1657-64
- Kelly, AA; Feussner, I. 2016. Oil is on the agenda: lipid turnover in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1861:1253-68
- Kessler, F; Schnell, D; Blobel, G. 1999. Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 208:107-13



- Kieselbach, T; Schröder, WP. 2003. The proteome of the chloroplast lumen of higher plants. *Photosynthesis Research* 78:249–64
- Kim, EH; Lee, Y; Kim, HU. 2015. Fibrillin 5 is essential for plastoquinone-9 biosynthesis by binding to solanesyl diphosphate synthases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27: 2956-71
- Kim, HU; Wu, SSH; Ratnayake, C; Huang, AHC. 2001. *Brassica rapa* has three genes that encode proteins associated with different neutral lipids in plastids of specific tissues. *Plant Physiology* 126:330-41
- Kim, JG; Li, X; Roden, JA; Taylor, KW; Aakre, CD; Su, B; Lalonde, S; Kirik, A; Chen, Y; Baranage, G; McLane, H; Martin, GB; Mudgett, MB. 2009. *Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-Triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TFT1. *The Plant Cell* 21:1305-23
- Kirchhoff, H. 2019. Chloroplast ultrastructure in plants. *New Phytologist* 223:565-74
- Kleinboelting, N; Huep, G; Kloetgen, A; Viehoveer, P; Weisshaar, B. 2012. GABI-Kat SimpleSearch: New features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* 40:1211-15
- Kobayashi, N; DellaPenna, D. 2008. Tocopherol metabolism, oxidation and recycling under high light stress in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 55:607-18
- Kobayashi, K; Wada, H. 2016. Role of lipids in chloroplast biogenesis. *Subcellular Biochemistry* 86:103–25
- Koochak, H; Puthiyaveetil, S; Mullendore, DL; Li, M; Kirchhoff, H. 2019. The structural and functional domains of plant thylakoid membranes. *The Plant Journal* 97:412-29
- Knoth, R; Hansmann, P; Sitte, P. 1986. Chromoplasts of *Palisota barteri*, and the molecular structure of chromoplasts tubules. *Planta* 168:167-74
- Krahmer, J; Goralogia, GS; Kubota, A; Zardilis, A; Johnson, RS; Song, YH; MacCoss, MJ; Le Bihan, T; Halliday, KJ; Imaizumi, T; Millar, AJ. 2018. *FEBS Letters* 593:319-33
- Krause, G; Somersalo, S; Zumbusch, E; Weyers, B; Laasch, H. 1990. On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts. Relationship between changes in fluorescence and activity of photosystem II. *Journal of Plant Physiology* 136:472–79
- Kreimer, G. 2009. The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Current Genetics* 55:19-43
- Krieger-Liszka, A; Trebst, A. 2006. Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany* 57:1677–84
- Kruk, J; Jemiola-Rzemińska, M; Burda, K; Schmid, GH; Strzalka, K. 2003. Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenillipids in thylakoid membranes. *Biochemistry* 42:8501-05
- Kruk, J; Szymańska, R; Nowicka, B; Dłużewska, J. 2016. Function of isoprenoid quinones and chromanols during oxidative stress in plants. *New Biotechnology* 33:636-43
- Ksas, B; Becuwe, N; Chevalier, A; Havaux, M. 2015. Plant tolerance to excess light energy and photooxidative damage relies on plastoquinone biosynthesis. *Scientific Reports* 5:10919



Bibliografía

- Kytridis, VP; Manetas, Y. 2006. Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential *in vivo* antioxidants: evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. *Journal of Experimental Botany* 57:2203-10
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-85
- Laizet, Y; Pontier, D; Mache, R; Kuntz, M. 2004. Subfamily organization and phylogenetic origin of genes encoding plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type. *Journal of Genome Science and Technology* 3:19-28
- Lee, DW; Hwang, I. 2018. Evolution and design principles of the diverse Chloroplast Transit Peptides. *Molecules and Cells* 41:161-67
- Lee, K; Lehmann, M; Paul, MV; Wang, L; Luckner, M; Wanner, G; Geigenberger, P; Leister, D; Kleine, T. 2019. Lack of fibrillin6 in *Arabidopsis thaliana* affects light acclimation and sulfate metabolism. *New Phytologist* doi: 10.1111/nph.16246
- Leitner-Dagan, Y; Ovadis, M; Shklarman, E; Elad, Y; David, DR; Vainstein, A. 2006. Expression and functional analyses of the plastid lipid-associated protein CHRC suggest its role in chromoplastogenesis and stress. *Plant Physiology* 142:233-44
- Li, XP; Björkman, O; Shih, C; Grossman, AR; Rosenquist, M; Jansson, S; Niyogi, KK. 2000. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403:391-95
- Li, XP; Gilmore, AM; Niyogi, KK. 2002. Molecular and global time-resolved analysis of a psbS gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* 277:33590-97
- Lichtenthaler, HK. 2012. Plastoglobuli, thylakoids, chloroplast structure and development of plastids. In *Plastid development in leaves during growth and senescence*, ed. KKB Biswal, UC Biswal, pp. 337-61. *Advances in Photosynthesis and Respiration* 36. Berlin: Springer
- Lichtenthaler, HK; Buschmann, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: JohnWiley & Sons, Inc.
- Lippold, F; vom Dorp, K; Abraham, M; Hözl, G; Wewer, V; Yilmaz, JL; Lager, I; Montandon, C; Besagni, C; Kessler, F; Stymne, S; Dörmann, P. 2012. Fatty acid phytyl ester synthesis in chloroplasts of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24:2001-14
- Liu, L. 2016. Ultramicroscopy reveals that senescence induces in-situ and vacuolar degradation of plastoglobules in aging watermelon leaves. *Micron* 46:43-50
- Liu, L; Shao, Z; Zhang, M; Wang, Q. 2015. Regulation of carotenoid metabolism in tomato. *Molecular Plant* 8:28-39
- Liu, Z; Yan, H; Wang, K; Kuang, T; Zhang, J; Gui, L; An, X; Chang, W. 2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428:287-92
- Livak, KJ; Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, California)* 25:402-08
- Lohmann, A; Schöttler, Ma; Bréhélin, C; Kessler, F; Bock, R; Cahoon, EB; Dörmann, P. 2006. Deficiency in Phylloquinone (Vitamin K₁) Methylation affects prenyl quinone



- distribution, photosystem I abundance, and anthocyanin accumulation in the *Arabidopsis AtmenG* mutant. *Journal of Biological Chemistry* 281:40461-72
- Lohscheider, JN; Friso, G; van Wijk, KJ. 2016. Phosphorylation of plastoglobular proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 67:3975-84
- Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-75
- Lu, W; Tang, X; Huo, Y; Xu, R; Qi, S; Huang, J; Zheng, C; W, C. 2012. Identification and characterization of fructose 1,6-biphosphate aldolase genes in *Arabidopsis* reveal a gene family with diverse responses to abiotic stresses. *Gene* 503:65-74
- Lucas, MM; Van de Sype, G; Hérouart, D; Hernández, MJ; Puppo, A; de Felipe, MR. 1998. Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate root nodules. *Protoplasma* 204:61-70
- Lundquist, PK; Davis, JI; van Wijk, KJ. 2012b. ABC1K atypical kinases in plants: filling the organellar kinase void. *Trends in Plant Sciences* 17:546-55
- Lundquist, PK; Poliakov, A; Bhuiyan, NH; Zybailov, B; Sun, Q; van Wijk, KJ. 2012a. The functional network of the *Arabidopsis* plastoglobule proteome based on quantitative proteomics and genome-wide coexpression analysis. *Plant Physiology* 158:1172-92
- Lundquist, PK; Ploliakov, A; Giacomelli, L; Friso, G; Appel, M; McQuinn, RP; Krasnoff, SB; Rowland, E; Ponnala, L; Sun, Q; van Wijk, KJ. 2013. Loss of plastoglobule kinases ABC1K1 and ABC1K3 causes conditional degreening, modified prenyl-lipids, and recruitment of the jasmonic acid pathway. *The Plant Cell* 25:1818-39
- Malnoë, A; Schultink, A; Shahrasbi, S; Rumeau, D; Havaux, M; Niyogi, KK. 2018. The plastid lipocalin LCNP is required for sustained photoprotective energy dissipation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 30:196-208
- Marillonnet, S; Thoeringer, C; Kandzia, R; Klimyuk, V; Gleba, Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology* 23:718-23
- Martinis, J; Glauser, G; Valimareanu, S; Kessler, F. 2013. A chloroplast ABC1-like kinase regulates vitamin E metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162:652-62
- Mattanovich, D; Rücker, F; Machado AC; Laimer, M; Tegner, F; Steinkellner, H; Himmler, G; Katinger, H. 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by electroporation. *Nucleic Acids Research* 17:6747
- Maxwell, K; Johnson, GN. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659-68
- Merchant, SS; Prochnik, SE; Vallon, O; Harris, EH; Karpowicz, SJ; et al. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245-50
- Michaeli, S; Honig, A; Levanony, H; Peled-Zehavi, H; Galili, G. 2014. *Arabidopsis* ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *The Plant Cell* 26:4084-4101
- Mizusawa, N; Wada, H. 2011. The role of lipids in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817:194–208



Bibliografía

- Moejes, FW; Matuszyńska, A; Adhikari, K; Bassi, R; Cariti, F; Cogne, G; Dikaos, I; Falciatore, A; Finazzi, G; Flori, S; Goldschmidt-Clermont, M; Magni, S; Maguire, J; Le Monnier, A; Müller, K; Poolman, M; Singh, D; Spelberg, S; Stella, GR; Succurro, A; Taddei, L; Urbain, B; Villanova, V; Zabke, C; Ebenhöf, O. 2017. A systems-wide understanding of photosynthetic acclimation in algae and higher plants. *Journal of Experimental Botany* 68:2667–81
- Monte, E; Ludevid, D; Prat, S. 1999. Leaf C40.4: a carotenoid-associated protein involved in the modulation of photosynthetic efficiency? *The Plant Journal* 19:399-410
- Montillet, JL; Chamnongpol, S; Rustérucci, C; Dat, J; van de Cotte, B; Agnel, JP; Battesti, C; Inzé, D; Van Breusegem, F; Triantaphylidès, C. 2005. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* 138:1516–26
- Mulkidjanian, AY; Koonin, EV; Makarova, KS; Mekhedov, SL; Sorokin, A; Wolf, YI, Dufresne, A; Partensky, F; Burd, H; Kaznadzey, D; Haselkorn, R; Galperin, MY. 2006. The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:13126-31
- Müller, P; Li, XP, Niyogi, KK. 2001. Non-Photochemical Quenching. A response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* 125: 1558-66
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473-97
- Murata, N; Takahashi, S; Nishiyama, Y; Allakhverdiev, SI. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767:414–21
- Mustárdy, L; Garab, G. 2003. Granum revisited. A three-dimensional model—where things fall into place. *Trends in Plant Science* 8:117–22
- Mustárdy, L; Jánossy, AG. 1979. Evidence of helical thylakoid arrangement by scanning electron microscopy. *Plant Science Letters* 16:281–84
- Mullineaux, CW. 2005. Function and evolution of grana. *Trends in Plant Science* 10:521–25
- Nakagawa, T; Ishiguro, S; Kimura, T. 2009. Gateway vectors for plant transformation. *Plant Biotechnology* 26:275-84
- Neely, WC; Martin, JM; Barker, SA. 1988. Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. *Photochemistry and Photobiology* 48:423–28
- Neill, SO; Gould, KS. 2003. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* 30:865-73
- Neill, SO; Gould, KS; Kilmartin, PA. 2002. Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant, Cell & Environment* 25:539-47
- Nelson, N; Yocum, CF. 2006. Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology* 57:521-65
- Nierzwicki-Bauer, SA; Balkwill, DL; Stevens Jr, SE. 1983. Three-dimensional ultrastructure of a unicellular cyanobacterium. *Journal of Cell Biology* 97:713-22
- Nilkens, M; Kress, E; Lambrev, P; Miloslavina, Y; Müller, M; Holzwarth, AR; Jahns, P. 2010. Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-



- photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797:466–75
- Niyogi, KK. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 3:455–60
- Padham, AK; Hopkins, MT; Wang, T-W, McNamara, LM; Lo, M; Richardson, LGL; Smith, MD; Taylor, CA; Thompson, JE. 2007. Characterization of a plastid triacylglycerol lipase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143:1372-84
- Páli, T; Garab, G; Horváth, LI; Kóta, Z. 2003. Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60:1591–1606
- Peers, G; Truong, TB; Ostendorf, E; Busch, A; Elrad, D; Grossman, AR; Hippler, M; Niyogi, KK. 2009. An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462:518–21
- Peltier, JB; Emanuelsson, O; Kalume, DE; Ytterberg, J; Friso, G; Rudella, A; Liberles, DA; Söderberg, L; Roepstorff, P; von Heijne, G; van Wijk, KJ. 2002. Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *The Plant Cell* 14:211–36
- Peltier, JB; Ytterberg, AJ; Sun, Q; van Wijk, KJ. 2004. New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *The Journal of Biological Chemistry* 279:49367-83
- Peramuna, A; Summers, ML. 2014. Composition and occurrence of lipid droplets in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. *Archives of Microbiology* 196:881-90
- Pfannschmidt, T; Nilsson, A; Tullberg, A; Link, G; Allen, JF. 1999. Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB Life* 48:271–76
- Piller, LE; Besagni, C; Ksas, B; Rumeau, D; Bréhélin, C; Glauser, G; Kessler, F; Havaux, M. 2011. Chloroplast lipid droplet type II NAD(P)H quinone oxidoreductase is essential for prenylquinone metabolism and vitamin K1 accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:14354-59
- Pinnola, A; Bassi, R. 2018. Molecular mechanisms involved in plant photoprotection. *Biochemical Society Transactions* 46:467-82
- Pollmann, S; Springer, A; Rustgi, S; von Wettstein, D; Kang, C; Reinbothe, C; Reinbothe, S. 2019. Substrate channeling in oxylipin biosynthesis through a protein complex in the plastid envelope of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 70:1483-95
- Poon, WW; Davis, DE; Ha, HT; Jonassen, T; Rather, PN, Clarke, CF. 2000. Identification of *Escherichia coli* *ubiB*, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis. *Journal of bacteriology* 182:5139-46
- Porfirova, S; Bergmüller, E; Tropf, S; Lemke, R; Dörmann, P. 2002. Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:12495-00
- Porra, RJ; Thompson, WA; Kriedemann, PE. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975:384-94



Bibliografía

- Pozueta-Romero, J; Houlné, G; Schantz, R. 1998. Identification of a short interspersed repetitive element in partially spliced transcripts of the bell pepper (*Capsicum annuum*) PAP gene: new evolutionary and regulatory aspects on plant tRNA-related SINEs. *Gene* 214:51-58
- Pozueta-Romero, J; Rafia, F; Houlné, G; Cheniclet, C; Carde, JP; Schantz, ML; Schantz, R. 1997. A ubiquitous plant housekeeping gene, PAP, encodes a major protein component of bell pepper chromoplasts. *Plant Physiology* 115:1185-94
- Prasil, O; Adir, N; Ohad, I. 1992. Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. In *The photosystems: structure, function and molecular biology* (Barber, J; ed.), 295–348, Elsevier
- Pribil, M; Sandoval-Ibáñez, O; Xu, W; Sharma, A; Labs, M; Liu, Q; Galgenmüller, C; Schneider, T; Wessels, M; Matsubara, S; Jansson, S; Wanner, G; Leister, D. 2018. Fine-tuning of photosynthesis requires curvature thylakoid1-mediated thylakoid plasticity. *Plant Physiology* 176:2351-64
- Qin, XC; Suga, M; Kuang, TY; Shen, JR. 2015. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCl supercomplex. *Science* 348:989–95
- Rast, A; Heinz, S; Nickelsen, J. 2015. Biogenesis of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1847: 821-30
- Rey, P; Gillet, B; Römer, S; Eymery, F; Massimino, J; Peltier, G; Kuntz, M. 2000. Over-Expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *The Plant Journal* 21:483-94
- Reynolds, ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17:208-12
- Rinnan, R; Holopainen, T. 2004. Ozone effects on the ultrastructure of peatland plants: *Sphagnum* mosses, *Vaccinium oxycoccus*, *Andromeda polifolia* and *Eriophorum vaginatum*. *Annals of Botany* 94:623-34
- Rolland, N; Bouchnak, I; Moyet, L; Salvi, D; Kuntz, M. 2018. The main functions of plastids. In: Maréchal E. (eds) *Plastids. Methods in Molecular Biology*, vol 1829. Humana Press, New York, NY
- Ronimus, RS; Morgan, HW. 2003. Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea* 1:199-221
- Rossignol, P; Collier, S; Bush, M; Shaw, P; Doonan, JH. 2007. *Arabidopsis* POT1A interacts with TERT-V(18), an N-terminal splicing variant of telomerase. *Journal of Cell Science* 120:3678-87
- Rudella, A; Friso, G; Alonso, JM; Ecker, JR; van Wijk, KJ. 2006. Downregulation of ClpR2 leads to reduced accumulation of the ClpPRS protease complex and defects in chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18:1704-21
- Rutter, WJ. 1964. Evolution of aldolase. *Federation Proceedings* 23:1248-57
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sambrook, J; Russell, DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York



- Schelbert, S; Aubry, S; Burla, B; Agne, B; Kessler, F; Krupinska, K; Hörtensteiner, S. 2009. Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21:767-85
- Schiefner, A; Skerra, A. 2015. The menagerie of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds. *Accounts of Chemical Research* 48:976-85
- Schmidt, M; Geßner, G; Luff, M; Heiland, I; Wagner, V; Kaminski, M; Geimer, S; Eitzinger, N; Reißerweber, T; Voytsekh, O; Fiedler, M; Mittag, M; Kreimer, G. 2006. Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements. *The Plant Cell* 18:1908-30
- Sessions, A; Burke, E; Presting, G; Aux, G; McElver, J; Patton, D; Dietrich, B; Ho, P; Bacwaden, J; Ko, C; Clarke, JD; Cotton, D; Bullis, D; Snell, J; Miguel, T; Hutchison, D; Kimmerly, B; Mitzel, T; Katagiri, F; Glazebrook, J; Law, M; Goff, SA. 2002. A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *The Plant Cell* 14:2985-94
- Shanmugabalaji, V; Besagni, C; Piller, LE; Douet, V; Ruf, S; Bock, R; Kessler, F. 2013. Dual targeting of a mature plastoglobulin/fibrillin fusion protein to chloroplast plastoglobules and thylakoids in transplastomic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 81:13-25
- Shao, L; Shu, Z; Peng, CL; Wang, XJ; Lin, ZF. 2007. Antioxidation of anthocyanins in photosynthesis under high temperature stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 49:1341-51
- Simkin, AJ; Gaffé, J; Alcaraz, JP; Carde, JP; Bramley, PM; Fraser, PD; Kuntz, M. 2007. Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochemistry* 68:1545-56
- Simkin, AJ; Moreau, H; Kuntz, M; Pagny, G; Lin, C; Tanksley, S; McCarthy, J. 2008. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. *Journal of Plant Physiology* 165:1087-1106
- Singh, DK; Laremore, TN; Smith, PB; Maximova, SN. 2012. Knockdown of fibrillin4 gene expression in apple decreases plastoglobule plastoquinone content. *PLOS ONE* 7:e47547
- Singh, DK; Maximova, SN; Jensen, PJ; Lehman, BL; Ngugi, HK; McNellis, TW. 2010. Fibrillin 4 is required for plastoglobule development and stress resistance in apple and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 154:1281-93
- Singh, DK; McNellis, TW. 2011. Fibrillin protein function: the tip of the iceberg? *Trends in Plant Science* 154:1281-93
- Smirnoff, N; Arnaud, D. 2018. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist* 221:1197-1214
- Spurr, AR. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26:31-43
- Staehelin, LA. 1986. Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. In: Staehelin LA, Arntzen CJ, eds. *Photosynthesis III, encyclopedia of plant physiology, vol. 19*. Berlin, Germany: Springer, 1-84
- Steyn, WJ; Wand, SJE; Holcroft, DM; Jacobs, G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155:349-61



Bibliografía

- Sundqvist, C; Dahlin, C. 1997. With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes. *Physiologia Plantarum* 100:748-59
- Suorsa, M; Järvi, S; Grieco, M; Nurmi, M; Pietrzykowska, M; Rantala, M; Kangasjärvi, S; Paakkari, V; Tikkanen, M; Jansson, S; Aro, EM. 2012. Proton gradient regulation 5 is essential for proper acclimation of *Arabidopsis* photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. *The Plant Cell* 24:2934-48
- Szymańska, R; Kruk, J. Plastoquinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to high light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastochromanol by tocopherol cyclase. *Plant and Cell Physiology*. 207:25-36
- Tamura, K; MEGA4: Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-99
- Tauche, A; Krause-Buchholz, U; Rödel, G. 2008. Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the molecular organization of O-methylase Coq3p depends on Abc1p/Coq8p. *FEMS Yeast Research* 8:1263-75
- Tevini, M; Steinmüller, D. 1985. Composition and function of plastoglobuli. II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence. *Planta* 163:91-96
- Thomas, H; Huang, L; Young, M; Ougham, H. 2009. Evolution of plant senescence. *BMC Evolutionary Biology* 9:163
- Tjellström, H; Strawsine, M; Ohlrogge, JB. 2015. Tracking synthesis and turnover of triacylglycerol in leaves. *Journal of Experimental Botany* 66:1453-61
- Tjus, SE; Møller, BL; Scheller, HV. 1998. Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiology* 116:755-64
- Tjus, SE; Scheller, HV, Andersson, B; Møller, BL. 2001. Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiology* 125:2007-15
- Triantaphylidès, C; Krischke, M; Hoerberichts, FA; Ksas, B; Gresser, G; Havaux, M; Van Breusegem, F; Mueller, MJ. 2008. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiology* 148:960-68
- Tsuda, T; Shiga, K; Ohshima, K; Kawakishi, S; Osawa, T. 1996. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochemical Pharmacology* 52:1033-39
- Umena, Y; Kawakami, K; Shen, JR; Kamiya, N. 2011. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473:55-60
- Usadel, B; Obayashi, T; Mutwil, M; Giorgi, FM; Bassel, GW; Tanimoto, M; Chow, A; Steinhauser, D; Persson, S; Provart, NJ. 2009. Co-expression tools for plant biology: Opportunities for hypothesis generation and caveats. *Plant, Cell & Environment* 32:1633-51
- Vainstein, A; Halevy, AH; Smirra, I; Vishnevetsky, M. 1994. Chromoplast biogenesis in *Cucumis sativus* corollas (rapid effect of gibberellin A3 on the accumulation of a chromoplast-specific carotenoid-associated protein). *Plant Physiology* 104:321-26
- van de Meene, AM; Hohmann-Marriott, MF; Vermaas, WFJ; Roberson, RW. 2006. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Archives of Microbiology* 184:259-70



- van Doorn, WG; Prisa, D. 2014. Lipid globules on the plastid surface in *Iris* tepal epidermis cells during tepal maturation and senescence. *Journal of Plant Physiology* 171:1714-21
- van Wijk, KJ. 2004. Plastid proteomics. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:963-77
- van Wijk, KJ; Kessler, F. 2017. Plastoglobuli: plastid microcompartments with Integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation. *Annual Review of Plant Biology* 68:253-89
- Vidi, PA; Kanwischer, M; Baginsky, S; Austin, JR, Csucs, G; Dörmann, P; Kessler, F; Bréhélin, C. 2006. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry* 281: 11225-34
- Vidi, Pa; Kessler, F; Bréhélin, C. 2007. Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC Biotechnology* 7:4
- Vishnevetsky, M; Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins.
- Vom Dorp, K, Hözl, G; Plohm, C; Eisenhut, M, Abraham, M; Weber, APM, Hanson, AD; Dörmann, P. 2015. Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27:2846-59
- Vothknecht, UC; Westhoff, P. 2001. Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1541:91-101
- Vowinckel, J; Capuano, F; Campbell, K, Deery, MJ; Lilley, KS; Ralser, M. 2014. The beauty of being (label)-free: sample preparation methods for SWATH-MS and next-generation targeted proteomics. *F1000Research* 2:272
- Walters, RG; Shephard, F; Rogers, JJM; Rolfe, SA; Horton, P. 2003. Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. *Plant Physiology* 131:472-81
- Wasternack, C; Hause, B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany* 111:1021-58
- Wasternack, C; Song, S. 2017. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany* 68: 1303-21
- Wessel, D; Flügge, UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry* 138:141-43
- Winkenbach, F; Falk, H; Liedvogel, B; Sitte, P. 1976. Chromoplasts of *Tropaeolum majus* L: isolation and characterization of lipoprotein elements. *Planta* 128:23-28
- Wood, DW; Setubal, JC; Kaul, R; Monks, DE; Kitajima, J; Okura, VK; Zhou, Y; Chen, L; Wood, GE; Almeida, NF Jr.; Woo, L; Chen, Y; Paulsen, IT; Eisen, JA; Karp, PD; Bovee, D Sr.; Chapman, P; Clendenning, J; Deatherage, G; Gillet, W; Grant, C; Kutuyavin, T; Levy, R; Li, MJ; McClelland, E; Palmieri, A; Raymond, C; Rouse, G; Saenphimmachak, C; Wu, Z; Romero, P; Gordon, D; Zhang, S; Yoo, H; Tao, Y; Biddle, P; Jung, M; Krespan, W; Perry, M; Gordon-Kamm, B; Liao, L; Kim, S; Hendrick, C; Zhao, ZY; Dolan, M; Chumley, F; Tingey, SV; Tomb, JF; Gordon, MP; Olson, MV; Nester, EW. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294:2317-23
- Wuttke, HG. 1976. Chromoplasts in *Rosa rugosa*: development and chemical characterization of tubular elements. *Zeitschrift für Naturforschung* 31:456-60



Bibliografía

- Xie, LX; Hsieh, EJ; Watanabe, S; Allan, CM; Chen, JY; Tran, UC; Clarke, CF. 2011. Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast coq8 mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1811:348-60
- Xu, DQ; Chen, Y; Chen, GY. Light-harvesting regulation from leaf to molecule with the emphasis on rapid changes in antenna size. 2015. *Photosynthesis Research* 124:137-58
- Xu, Z; Mahmood, K; Rothstein, SJ. 2017. ROS induces anthocyanin production via late biosynthetic genes and anthocyanin deficiency confers the hypersensitivity to ROS-generating stresses in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* 58:1364-77
- Yadav, DK; Kruk, J; Sinha, RK; Pospíšil, P. 2010. Singlet oxygen scavenging activity of plastoquinol in photosystem II of higher plants: electron paramagnetic resonance spin-trapping study. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797:1807–11
- Yamamoto, H; Peng, L; Fukao, Y; Shikanai, T. 2011. An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23:1480–93
- Yang, Y; Sulpice, R; Himmelbach, A; Meinhard, M; Christmann, A; Grill, E. 2006. Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:6061-66
- Youssef, A; Laizet, Y; Block, MA, Maréchal, E; Alcaraz, JP; Larson TR; Pontier, D; Gaffé, J; Kuntz, M. 2010. Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. *The Plant Journal* 61:436-45
- Ytterberg, AJ; JB, Wijk, KJ van. 2006. Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiology* 140:984-97
- Zbierzak, AM; Kanwischer, M; Wille, C; Vidi, PA; Giavalisco, P; Lohmann, A; Briesen, I; Porfirova, S; Bréhélin, C; Kessler, F; Dörmann, P. 2010. Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochemical Journal* 425:389-99
- Zybailov, B; Friso, G; Kim, J; Rudella, A; Ramírez Rodríguez, V; Asakura, Y; Sun, Q; van Wijk, KJ. 2009. Large scale comparative proteomics of a chloroplast Clp protease mutant reveals folding stress, altered protein homeostasis, and feedback regulation of metabolism. *Molecular & Cellular Proteomics* 8:1789-1810

