



TESIS DOCTORAL

IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA ENZIMA
CLOROPLÁSTICA CON ACTIVIDAD
S-SULFOCISTEÍNA SINTASA
ESENCIAL PARA LA FUNCIÓN DEL
CLOROPLASTO EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

M^a Ángeles Bermúdez Alcántara
CSIC-Universidad de Sevilla



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Departamento de Bioquímica Vegetal y
Biología Molecular
CSIC-Universidad de Sevilla



Identificación de una nueva enzima cloroplástica con actividad S-Sulfocisteína sintasa esencial para la función del cloroplasto en *Arabidopsis thaliana*

Trabajo presentado para optar al grado de Doctora en Químicas
por la licenciada

M^a Ángeles Bermúdez Alcántara

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Luis C. Romero González
Investigador Científico CSIC

Dra. Cecilia Gotor Martínez
Investigadora Científica CSIC

TUTOR DE TESIS

Dr. Agustín Vioque Peña
Catedrático de la Universidad de Sevilla

¡GRACIAS!

Esta tesis se ha llevado a cabo en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis en CicCartuja, centro mixto formado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Universidad de Sevilla. Deseo agradecer a estas instituciones y a su personal los medios y el apoyo prestados para la realización de esta tesis. Este trabajo ha estado financiado por los proyectos de la Junta de Andalucía (P06-CVI-01737) y del MICINN (BIO2007-62770 y BIO2010-15201), así como por una beca pre-doctoral de Excelencia de la Junta de Andalucía para la realización de la tesis, y una beca de estancia corta EMBO.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Luis Carlos Romero González y la Dra. Cecilia Gotor Martínez, la confianza que depositaron en mí al proporcionarme la oportunidad de trabajar en su grupo, y por guiarme durante estos 4 años que ha durado la realización de mi tesis doctoral. Gracias por todos los consejos y enseñanzas durante este periodo, así como por la paciencia y esfuerzos depositados en esta tesis.

Al Dr. Philip Mullineaux quisiera agradecerle que me acogiese en su laboratorio durante los tres meses que estuve en la Universidad de Essex, así como por haberme ofrecido los medios necesarios para llevar a cabo la medida de los parámetros fotosintéticos mediante *Fluorimager* y para la realización de los modelados matemáticos de redes génicas.

También quisiera agradecer al Dr. Jeroni Galmés Galmés su colaboración en las medidas de parámetros fotosintéticos con el IRGA, y por sus consejos y ayuda en el laboratorio durante su breve estancia en el centro.

Sin la ayuda de las personas que componen los Servicios Técnicos del IBVF este trabajo no habría sido posible, así que quiero dar las gracias a Pablo, por cuidar mis plantitas en el invernadero y por echarme una mano con el IRGA; a Carlos, por enseñarme parte de sus conocimientos con el HPLC; a Alicia por ayudarme con el microscopio; y a Rocío, por toda su ayuda con la identificación de proteínas del análisis proteómico y por estar pendiente de la trampa iónica siempre que podía.

Quisiera dar las gracias a todos aquellos que han pertenecido al laboratorio 14. De los que ya no están, a Maica por su ayuda durante los primeros meses; a M^a Ángeles Páez, porque aunque coincidí muy poco tiempo con ella en el laboratorio, fue quien inició el trabajo con los mutantes insercionales; y a Gloria, por su ayuda y consejos con la trampa iónica. También a los que pasaron brevemente por aquí como Andrea, Estellita, Vania, Nando. Quiero agradecer a Irene sus buenos consejos y sus críticas constructivas durante estos años en el laboratorio, y por brindarme su “tercer ojo” para las correcciones. También quiero dar las gracias a los que se han incorporado recientemente al laboratorio. A Tania, Ana y Naza, gracias por prestarme vuestra ayuda cuando la he necesitado.

En especial, quiero dar las gracias a Inma y a Conso; A Inma, porque ya sabes que parte de esta tesis es también tuya y no hubiese sido posible sin tu ayuda y apoyo “logístico”. Gracias por haberme ayudado en todo lo que te ha sido posible de forma incondicional, tanto personal como profesionalmente, y por intentar siempre mostrarme la parte positiva de las cosas. Y a Conso, porque he tenido la gran suerte de que hayamos compartido todos estos años juntas. Gracias por haberme resuelto todas las dudas que me surgían sobre biología molecular y darme confianza en cada paso que daba; por haber celebrado juntas cada éxito o animarnos cuando los experimentos no salían del todo bien; y porque sin ti todo habría sido distinto.

En general, agradecer a todos los compañer@s de los demás laboratorios que me han ayudado en algún momento.

Parte de esta tesis también se ha realizado en la Universidad de Essex, en Colchester (UK), y durante ese periodo hice buenos amigos. Quiero agradecer a François la paciencia que tuvo conmigo cuando me intentaba explicar todo el proceso de creación de los modelos, y por los buenos ratos que pasamos. A Luke, por enseñarme cómo utilizar la mayor parte de los recursos de la universidad de Essex con una sonrisa. A Ramona, por estar siempre dispuesta a brindarme su ayuda y a darme su opinión científica sólo como ella sabe. Y como no, a Rebeca, por ser tan buena amiga, porque sin ti mi estancia allí no hubiese sido igual. Por ser mi compi de “zulo”, por preocuparte por mí y animarme durante los peores momentos, y por esos ratos de risas, capuchinos y galletas de chocolate. Porque juntas hemos intentamos sacar lo mejor de las costumbres inglesas, y nos hemos reído de las que no comprendíamos.

A mis amigos de siempre, Ana y Fran, Alejo y M^a Ángeles, Antonio y Mariola, Loli y Alfredo; y a sus retoños Javier, Miguel y Alejandra, a los que quiero mucho. Y también a los amigos que dejé en Tres Cantos: Esther, por haber sido tan buena amiga y cuidar de mí; a Jaime por compartir conmigo todo lo que sabes de LC/MS y por preocuparte de mí siempre; y a Ángel por ser tan buen compañero.

A mis padres, hermanos, hermana y cuñada, por emocionarse y celebrar cada uno de mis pequeños logros, por haber creído siempre en mis posibilidades aunque todavía no comprendan (y nos les culpo) a qué he dedicado todo este tiempo. A Javi y Montse, por preocuparse por mí trabajo y estar siempre pendientes de mí. A David, por ayudarme con los pequeños detalles de este trabajo y ofrecerme sus conocimientos informáticos. A Merchi, por alentarme siempre y darme su opinión. Y a Jesús, por darme su cariño y alegrarme los fines de semana con su sonrisa. Especialmente, quiero agradecer a mis padres el esfuerzo que han realizado para que yo haya podido llegar hasta aquí, y por servirme de apoyo y de ayuda constante.

A Loli y Paco, y el resto de mi familia política, por interesarse y preocuparse por mí. Y por último a ti, José Antonio (Pepe), aunque siento que no tengo suficientes palabras para agradecerte todo lo que haces por mí. Gracias por estar a mi lado apoyándome día a día, aconsejándome y animándome. Por hacerme feliz y por quererme tanto.

*A mi familia.
A Pepe.*

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | 7 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 12 |
| ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS | 14 |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 17 |
| 1. Metabolismo del azufre en organismos fotosintéticos..... | 19 |
| 1.1. Transporte de sulfato..... | 20 |
| 1.2. Activación de sulfato | 21 |
| 1.3. Reducción del sulfato activado a sulfuro | 22 |
| 1.4. Incorporación del azufre reducido a esqueletos carbonados..... | 23 |
| 1.5. Mecanismos de regulación de la biosíntesis de cisteína | 28 |
| 1.5.1. Factores ambientales y modulación intrínseca de señales | 28 |
| 1.5.2. Regulación del complejo cisteína sintasa..... | 31 |
| 2. Metabolismo del glutatión | 33 |
| 3. Fotosíntesis y regulación redox | 35 |
| 3.1. Modelos bioquímicos de fotosíntesis..... | 35 |
| 3.2. Transporte fotosintético de electrones | 40 |
| 3.3. Regulación redox en el estroma y lumen del cloroplasto | 42 |
| | |
| II. OBJETIVOS DE LA TESIS | 47 |
| | |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 51 |
| 1. Material biológico..... | 53 |
| 1.1. Bacterias..... | 53 |
| 1.2. Plantas | 53 |
| 1.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> | 53 |
| 1.2.2. Esterilización de semillas | 54 |

| | | |
|--------|---|----|
| 1.2.3. | Cultivo de plantas..... | 54 |
| 1.2.4. | Condiciones de cultivo | 55 |
| 2. | Tratamiento del material vegetal | 55 |
| 2.1. | Tratamiento con metales pesados | 55 |
| 2.2. | Tratamiento con luz de alta intensidad | 55 |
| 2.3. | Tratamiento de sequía..... | 55 |
| 3. | Parámetros fotosintéticos..... | 55 |
| 3.1. | Cuantificación de pigmentos fotosintéticos | 55 |
| 3.2. | Análisis de la eficiencia fotosintética | 56 |
| 3.2.1. | Cuantificación de la emisión de fluorescencia de clorofila <i>in vivo</i> mediante “ <i>Fluorimager</i> ” | 56 |
| 3.2.2. | Análisis fotosintético mediante intercambio de gases y fluorescencia de clorofila..... | 57 |
| 4. | Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos..... | 59 |
| 4.1. | Plásmidos utilizados..... | 59 |
| 4.2. | Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR..... | 59 |
| 4.3. | Electroforesis de DNA..... | 60 |
| 4.4. | Secuenciación de DNA..... | 60 |
| 4.5. | Extracción de RNA..... | 60 |
| 4.6. | Síntesis de cDNA..... | 61 |
| 4.7. | Análisis de RNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) | 61 |
| 4.8. | Análisis de perfiles transcripcionales mediante micromatrices de DNA..... | 62 |
| 5. | Aislamiento y análisis de proteínas | 62 |
| 5.1. | Extracción de proteínas..... | 62 |
| 5.1.1. | Extracción de proteínas de bacterias | 62 |
| 5.1.2. | Extracción de proteínas de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 63 |
| 5.1.3. | Aislamiento de cloroplastos y extracción de proteínas | 63 |
| 5.2. | Expresión de proteína en bacterias y purificación por cromatografía de afinidad..... | 64 |
| 5.3. | Detección inmunológica de proteínas mediante Western Blot..... | 65 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.4. | Análisis de proteínas mediante electroforesis bidimensional | 67 |
| 5.4.1. | Isoelectroenfoque (IEF)..... | 67 |
| 5.4.2. | Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) | 67 |
| 5.4.3. | Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas | 68 |
| 6. | Determinación de actividades enzimáticas | 68 |
| 6.1. | Actividad O-Acetilserina(tiol)lisa (OASTL) | 68 |
| 6.2. | Actividad S-Sulfocisteína sintasa (SSCS) | 69 |
| 6.3. | Actividad β -Cianoalanina sintasa (CAS)..... | 69 |
| 6.4. | Actividad L-Cisteína desulfhidrasa (LCD)..... | 70 |
| 7. | Análisis de metabolitos..... | 70 |
| 7.1. | Parámetros generales | 70 |
| 7.2. | Métodos de extracción para el análisis de metabolitos..... | 71 |
| 7.3. | Análisis de compuestos tiólicos | 72 |
| 7.3.1. | Extracción y determinación de tioles simples mediante HPLC/MS..... | 72 |
| 7.3.2. | Extracción y determinación tioles simples mediante HPLC/UV-V..... | 72 |
| 7.3.3. | Extracción y determinación de fitoquelatinas mediante HPLC/MS..... | 74 |
| 7.4. | Análisis de fitohormonas | 74 |
| 7.4.1. | Extracción y determinación de ácido salicílico..... | 74 |
| 7.4.2. | Extracción y determinación de ácido abscísico..... | 75 |
| 7.5. | Análisis de aminoácidos | 76 |
| 8. | Otros métodos..... | 77 |
| 8.1. | Métodos histoquímicos | 77 |
| 8.1.1. | Tinción con azul de nitrotetrazolio (NBT)..... | 77 |
| 8.1.2. | Tinción con 3,3'-Diaminobencidina (DAB) | 78 |
| 8.2. | Medición de la apertura estomática | 78 |
| 9. | Tratamiento de datos mediante análisis bioinformáticos..... | 78 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 9.1. | Modelado de redes transcripcionales | 78 |
| 9.2. | Análisis de componente principales (PCA) | 79 |
| 9.3. | Tratamiento estadístico de los datos | 80 |
| IV. | RESULTADOS | 81 |
| 1. | Caracterización de la proteína CS26 con actividad S-Sulfocisteína sintasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 83 |
| 1.1. | Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes OASTLs | 83 |
| 1.2. | Expresión de la proteína CS26 en <i>E. coli</i> y purificación de la proteína recombinante..... | 85 |
| 1.3. | Análisis enzimático de la proteína recombinante His-CS26..... | 87 |
| 1.4. | Caracterización del producto de la reacción catalizada por CS26 mediante LC/MS | 88 |
| 1.5. | Determinación de los parámetros cinéticos de la actividad S-Sulfocisteína sintasa | 91 |
| 1.6. | Análisis de la expresión de CS26 en distintos tejidos y estadios | 92 |
| 1.7. | Análisis <i>in silico</i> de ortólogos de CS26 en diferentes organismos | 93 |
| 1.8. | Determinación de la actividad S-Sulfocisteína sintasa en distintos organismos | 95 |
| 2. | Análisis de mutantes insercionales de T-DNA en los genes CS26 y OAS-B de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 96 |
| 2.1. | Identificación y caracterización de los mutantes | 96 |
| 2.2. | Análisis fenotípico de los mutantes <i>cs26</i> y <i>oas-b</i> en diferentes condiciones de crecimiento..... | 98 |
| 2.2.1. | Dependencia del fotoperiodo | 98 |
| 2.2.2. | Condiciones de sequía..... | 100 |
| 2.3. | Análisis bioquímico de los mutantes <i>cs26</i> y <i>oas-b</i> | 102 |
| 2.3.1. | Determinación de actividades enzimáticas y contenido de tioles | 102 |
| 2.3.2. | Detección de especies reactivas de oxígeno..... | 106 |
| 2.3.3. | Análisis de la expresión de la familia génica OASTL | 107 |
| 2.4. | Localización subcelular de CS26 en el cloroplasto de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 109 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 2.4.1. | Detección de la proteína CS26 en diferentes fracciones cloroplásticas | 109 |
| 2.4.2. | Determinación de la actividad S-Sulfocisteína sintasa en diferentes fracciones cloroplásticas | 112 |
| 2.4.3. | Análisis del perfil proteómico del lumen tilacoidal del mutante <i>cs26</i> | 113 |
| 3. | Análisis fotosintético del mutante <i>cs26</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 116 |
| 3.1. | Cuantificación de pigmentos | 116 |
| 3.2. | Análisis de la eficiencia fotosintética por emisión de fluorescencia | 118 |
| 3.3. | Análisis fotosintético mediante medidas de intercambio de gases y fluorescencia | 123 |
| 3.3.1. | Estimación de parámetros fotosintéticos a partir de curvas A_N-C_i | 126 |
| 3.3.2. | Curvas A_N-PAR , e integración del intercambio de gases <i>versus</i> fluorescencia | 131 |
| 4. | Análisis del perfil transcripcional del mutante <i>cs26</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .. | 134 |
| 4.1. | Análisis transcriptómico en diferentes regímenes lumínicos | 134 |
| 4.2. | Validación de resultados | 137 |
| 4.3. | Modelado de redes génicas | 138 |
| 4.3.1. | Modelado del perfil transcripcional en condiciones de ciclo largo | 139 |
| 4.3.2. | Modelado del perfil transcripcional en condiciones de ciclo corto | 146 |
| 5. | Análisis del perfil metabólico de los mutantes <i>cs26</i> y <i>oas-b</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 156 |
| 5.1. | Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción y separación de metabolitos | 156 |
| 5.1.1. | Puesta a punto del método de extracción: fase acuosa frente a fase orgánica, con columna cromatográfica no-polar | 156 |
| 5.1.2. | Puesta a punto del método de extracción: fase acuosa frente a fase orgánica, con columna cromatográfica polar | 159 |
| 5.2. | Análisis metabólico de las distintas líneas silvestre, <i>oas-b</i> y <i>cs26</i> | 161 |
| 5.2.1. | Análisis de componentes principales | 162 |
| 5.3. | Identificación, normalización y cuantificación de metabolitos específicos | 167 |

| | |
|--|-----|
| 5.3.1. Metabolitos azufrados | 167 |
| 5.3.2. Otros metabolitos de interés | 171 |
| 5.3.2.1. Análisis de aminoácidos | 171 |
| 5.3.2.2. Análisis de fitohormonas | 175 |
| 5.4. Determinación de metabolitos específicos en las líneas silvestre y mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 176 |
| V. DISCUSIÓN | 181 |
| VI. CONCLUSIONES | 195 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 199 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ruta de asimilación de sulfato y biosíntesis de cisteína en plantas. | 19 |
| Figura 2. Reacciones enzimáticas catalizadas por la serina acetiltransferasa (SAT) y O-acetiserina(tiol)liasa (OASTL). | 24 |
| Figura 3. Representación esquemática de la localización subcelular de las enzimas SAT y OASTL de <i>Arabidopsis</i> | 25 |
| Figura 4. Esquema de regulación del complejo cisteína sintasa como sensor del estado intracelular de sulfuro. | 32 |
| Figura 5. Curva ideal de respuesta de la tasa de asimilación a la concentración de CO ₂ intercelular (A) o al flujo de fotones fotosintéticos (B). | 37 |
| Figura 6. Ruta de transporte de electrones de la fotosíntesis oxigénica. | 40 |
| Figura 7. Mecanismo propuesto para la regulación mediada por luz en el estroma y lumen tilacoidal. | 45 |
| Figura 8. Alineamiento de la secuencia proteica de la isoforma mayoritaria citosólica OAS-A1 con las secuencias deducidas de las proteínas cloroplásticas CS26 y OAS-B. | 84 |
| Figura 9. Alineamiento parcial de las secuencias deducidas de aminoácidos de OAS-B y CS26 con las proteínas bacterianas. | 85 |
| Figura 10. Construcción pDEST17-CS26. | 86 |
| Figura 11. Análisis SDS-PAGE de la proteína recombinante His-CS26. | 87 |
| Figura 12. Espectro de masas de la molécula de S-sulfocisteína detectada en modo positivo mediante ionización por electrospray. | 89 |
| Figura 13. Patrón de fragmentación de muestras de S-sulfocisteína mediante ionización por electrospray en modo positivo. | 90 |
| Figura 14. Representación de las curvas Hanes-Woolf para los sustratos de la reacción. | 91 |
| Figura 15. Niveles de expresión relativa de CS26 en distintos estadios y tejidos mediante análisis de qPCR. | 93 |

| | |
|---|-----|
| Figura 16. Alineamiento parcial de secuencias de aminoácidos de varias proteínas ortólogas a CS26..... | 94 |
| Figura 17. Estructura genómica de <i>CS26</i> y <i>OAS-B</i> y localización de la inserción de T-DNA..... | 96 |
| Figura 18. Análisis RT-PCR de las plantas mutantes <i>cs26</i> y <i>oas-b</i> | 97 |
| Figura 19. Esquema ilustrativo de la construcción usada para la obtención de la línea complementada <i>cs26::P35S-CS26</i> y análisis mediante RT-PCR de la expresión del transcrito <i>CS26</i> en la línea complementada. | 97 |
| Figura 20. Características fenotípicas de la línea <i>cs26</i> | 98 |
| Figura 21. Fenotipo de los mutantes <i>cs26</i> y <i>oas-b</i> , así como de la línea complementada <i>cs26::P35S-CS26</i> | 100 |
| Figura 22. Respuesta a sequía de las líneas silvestre y mutante <i>cs26</i> | 101 |
| Figura 23. Apertura estomática en epidermis de hojas de plantas crecidas en condiciones de ciclo largo (A) y ciclo corto (B). | 102 |
| Figura 24. Actividad SSCS en extracto de hojas y extracto enriquecido en cloroplastos..... | 104 |
| Figura 25. Detección del metabolito S-sulfocisteína en cloroplastos. | 105 |
| Figura 26. Acumulación de especies reactivas de oxígeno en hojas del mutante <i>cs26</i> | 107 |
| Figura 27. Niveles de expresión relativa de la familia génica OASTL en plantas mutantes <i>cs26</i> | 108 |
| Figura 28. Niveles de expresión relativa de la familia génica OASTL en plantas mutantes <i>oas-b</i> | 109 |
| Figura 29. Localización de CS26 y OAS-B en cloroplastos de <i>Arabidopsis</i> | 111 |
| Figura 30. Actividad S-Sulfocisteína sintasa en fracción estromática y luminal de cloroplastos en ambos fotoperiodos. | 113 |
| Figura 31. Mapa proteómico del lumen cloroplástico de las líneas silvestre y <i>cs26</i> ... | 114 |
| Figura 32. Eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica del fotosistema II en plantas enteras. | 118 |

| | |
|--|-----|
| Figura 33. Imágenes de fluorescencia de la planta completa generada con “Fluorimager”..... | 120 |
| Figura 34. Parámetro F_v'/F_m' medido en silvestre y <i>cs26</i> aplicando distintas PPFD..... | 123 |
| Figura 35. Cálculo del producto ($\alpha \cdot \beta$) para la corrección en la tasa del transporte de electrones. | 124 |
| Figura 36. Curvas A_N-C_i y A_N-C_c para las líneas silvestre y <i>cs26</i> crecidas en ciclo largo (A y C) y en ciclo corto (B y D)..... | 127 |
| Figura 37. SDS-PAGE de extractos de hojas de plantas silvestre y <i>cs26</i> crecidas en los dos fotoperiodos y comparación con Rubisco purificada de <i>Arabidopsis</i> | 129 |
| Figura 38. Curvas obtenidas en respuesta a la luz para el análisis de las líneas silvestre y <i>cs26</i> en condiciones de ciclo largo..... | 132 |
| Figura 39. Categorías funcionales de procesos biológicos en los que se agrupan los genes que han modificado su expresión en <i>cs26</i> en condiciones de crecimiento de día largo (barras amarillas) o de día corto (barras azules)..... | 135 |
| Figura 40. Gráfico de dispersión XY de los perfiles transcripcionales del mutante <i>cs26</i> en distintas condiciones de fotoperiodo. | 136 |
| Figura 41. Diagrama de Venn de los perfiles transcripcionales del mutante <i>cs26</i> en los fotoperiodos de día largo y día corto. | 137 |
| Figura 42. Dendograma de la expresión de los genes desregulados en <i>cs26</i> en condiciones de día largo. | 140 |
| Figura 43. Dendograma de la expresión de los genes desregulados en <i>cs26</i> en condiciones de día largo obtenido después del análisis t-test con los tiempos 3, 4 y 5. | 141 |
| Figura 44. Categorías funcionales en las que se agrupan los genes que presentaron mayor cambio de expresión en el dendograma filtrado para el análisis de perfiles transcripcionales en condiciones de ciclo largo. | 142 |
| Figura 45. Patrón de co-regulación de los genes seleccionados con expresión alterada en <i>cs26</i> en condiciones de día largo tras el análisis TCAP-2. | 143 |

| | |
|---|-----|
| Figura 46. Modelo de redes génicas generado a partir del perfil transcripcional del mutante <i>cs26</i> en condiciones de ciclo largo. | 144 |
| Figura 47. Dendograma de la expresión de los genes desregulados en <i>cs26</i> en condiciones de día corto. | 147 |
| Figura 48. Dendograma de la expresión de los genes desregulados en <i>cs26</i> en condiciones de día corto obtenido después del análisis t-test con la respuesta temprana y tardía. | 148 |
| Figura 49. Categorías funcionales en las que se agrupan los genes que presentaron mayor cambio de expresión en el dendograma filtrado para el análisis de perfiles transcripcionales en condiciones de ciclo corto. | 149 |
| Figura 50. Modelo de redes génicas generado a partir del perfil transcripcional del mutante <i>cs26</i> en condiciones de ciclo corto y respuesta temprana..... | 150 |
| Figura 51. Modelo de redes génicas generado a partir del perfil transcripcional del mutante <i>cs26</i> en condiciones de ciclo corto y respuesta tardía. | 153 |
| Figura 52. Separación y detección de metabolitos mediante LC/MS utilizando una columna RF-C18. | 157 |
| Figura 53. Diagramas de Venn de los compuestos detectados por diferentes métodos (fase reversa). | 159 |
| Figura 54. Separación y detección de metabolitos mediante LC/MS utilizando una columna de fase normal HILIC. | 160 |
| Figura 55. Diagramas de Venn de los compuestos detectados por diferentes métodos (fase normal) | 161 |
| Figura 56. Diagrama de Venn de los perfiles metabólicos de las líneas silvestres y mutantes <i>cs26</i> y <i>oas-b</i> | 162 |
| Figura 57. Valores propios de los factores obtenidos tras el análisis de PCA en ciclo largo. | 163 |
| Figura 58. Análisis de PCA de los dos primeros componentes principales para ciclo largo. | 163 |
| Figura 59. Valores propios de los factores obtenidos tras el análisis de PCA en ciclo corto. | 164 |

| | |
|---|-----|
| Figura 60. Análisis de PCA de los dos primeros componentes principales para ciclo corto. | 165 |
| Figura 61. Valores propios de los factores obtenidos tras el análisis de PCA de los metabolitos de las distintas líneas en ambos ciclos, largo y corto..... | 165 |
| Figura 62. Análisis de PCA para los componentes principales F1, F2 (A) y F1, F3 (B)..... | 166 |
| Figura 63. Patrón de fragmentación de la molécula de glutatión reducido..... | 169 |
| Figura 64. Cromatograma de LC/MS de cada aminoácido en modo positivo. | 173 |
| Figura 65. Cromatogramas de LC/MS de distintas hormonas. | 175 |
| Figura 66. Contenido total de aminoácidos solubles en hojas de plantas crecidas en condiciones de día largo. | 177 |
| Figura 67. Contenido total de aminoácidos solubles en hojas de plantas crecidas en condiciones de día corto. | 178 |
| Figura 68. Contenido de ácido salicílico (A y B) y ácido abscísico (C y D) en extracto crudo de hojas de plantas crecidas en condiciones de ciclo largo y ciclo corto..... | 179 |
| Figura 69. Localización subcelular de las enzimas responsables de la biosíntesis de cisteína y S-sulfocisteína en el cloroplasto y citosol de <i>Arabidopsis</i> | 187 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Genes <i>SAT</i> y <i>OASTL</i> en el genoma de <i>A. thaliana</i> | 24 |
| Tabla 2. Líneas mutantes utilizadas en este trabajo..... | 54 |
| Tabla 3. Parámetros fotosintéticos utilizados en el estudio de la reacción fotoquímica del PSII mediante <i>Fluorimager</i> | 56 |
| Tabla 4. Parámetros fotosintéticos utilizados en el estudio del intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila del PSII mediante IRGA..... | 58 |
| Tabla 5. Gradiente de elución de HPLC/UV-V para la determinación de compuestos tiólicos..... | 73 |
| Tabla 6. Gradiente de elución de HPLC/MS para la determinación de fitoquelatinas..... | 74 |
| Tabla 7. Gradiente de elución de HPLC/MS para análisis de ácido salicílico..... | 75 |
| Tabla 8. Gradiente de elución de HPLC/MS para análisis de ácido abscísico..... | 76 |
| Tabla 9. Gradiente de elución de HPLC/MS para el análisis de aminoácidos..... | 77 |
| Tabla 10. Tabla de purificación de la proteína His-CS26 expresada en <i>E. coli</i> | 88 |
| Tabla 11. Actividad específica de la proteína recombinante His-CS26 utilizando distintos esqueletos carbonados como sustrato..... | 92 |
| Tabla 12. Ortólogos de la proteína CS26 en otros organismos..... | 94 |
| Tabla 13. Actividad SSCS en diferentes plantas..... | 95 |
| Tabla 14. Niveles de actividad enzimática y contenido de tioles en hojas..... | 103 |
| Tabla 15. Contenido de tioles presentes en extractos enriquecidos en cloroplastos... .. | 106 |
| Tabla 16. Cantidad de proteína CS26 en las fracciones de estroma y lumen de las líneas silvestre y <i>oas-b</i> | 112 |
| Tabla 17. Análisis mediante MALDI-TOF de los puntos analizados en el mapa proteómico del lumen de la línea silvestre y <i>cs26</i> | 115 |
| Tabla 18. Contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas..... | 117 |
| Tabla 19. Contenido de clorofila total y número de cloroplastos..... | 117 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 20. Parámetros fotosintéticos de fluorescencia obtenidos en plantas adaptadas a oscuridad. | 121 |
| Tabla 21. Parámetros fotosintéticos de las líneas silvestre y mutante <i>cs26</i> | 122 |
| Tabla 22. Parámetros obtenidos en plantas adaptadas a oscuridad. | 125 |
| Tabla 23. Parámetros fotosintéticos de las líneas silvestre y <i>cs26</i> crecidas en diferentes fotoperiodos. | 128 |
| Tabla 24. Concentración total de proteínas solubles y de Rubisco en extracto de hojas. | 130 |
| Tabla 25. Parámetros fotosintéticos obtenidos a partir de las curvas de luz en condiciones de día largo. | 133 |
| Tabla 26. Validación de los datos del estudio transcriptómico mediante qPCR. | 138 |
| Tabla 27. Anotación de los genes representados en el modelo generado para las condiciones de ciclo largo. | 145 |
| Tabla 28. Anotación de los genes representados en el modelo generado para las condiciones de ciclo corto y respuesta temprana. | 151 |
| Tabla 29. Anotación de los genes representados en el modelo generado para las condiciones de ciclo corto, respuesta tardía. | 154 |
| Tabla 30. Comparación de número de compuestos totales (T) y de máxima intensidad (M) detectados en plantas silvestres en función del método de extracción y la columna cromatográfica. | 158 |
| Tabla 31. Compuestos detectados e identificados mediante LC/MS. | 168 |
| Tabla 32. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de los compuestos azufrados analizados. | 170 |
| Tabla 33. Detección de fitoquelatinas durante varios días de tratamiento con CdCl ₂ | 171 |
| Tabla 34. Aminoácidos detectados e identificados mediante LC/MS. | 172 |
| Tabla 35. Hormonas detectadas e identificadas mediante LC/MS. | 176 |

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| γ-EC | γ -Glutamilcisteína |
| γ-ECS | γ -Glutamilcisteinil sintetasa |
| ABA | Ácido Abscísico |
| ADP | Adenosín-5'-difosfato |
| AMP | Adenosin-5'-monofosfato |
| AOA | Ácido aminooxiacético |
| APK | APS quinasa |
| APR | APS reductasa |
| APS | Adenosin-5'-fosfosulfato |
| ATP | Adenosin-5'-trifosfato |
| ATPS | ATP sulfurilasa |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| CaMV | Virus del mosaico de la coliflor |
| CAS | β -Cianoalanina sintasa |
| CEF | Transporte cíclico de electrones |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato |
| CHES | Ácido 2-(Ciclohexilamino)etanosulfónico |
| CoA | Coenzima A |
| Cys | Cisteína |
| DAB | 3,3'-Diaminobencidina |
| DNasa | Desoxirribonucleasa |
| dNTP | Desoxirribonucleoxin 5'-trifosfato |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EIC | Cromatograma del ion seleccionado |
| ETR | Tasa de transporte de electrones |
| Fd_{ox} | Ferredoxina oxidada |
| FDR | <i>"False Discovery Rate"</i> |
| Fd_{red} | Ferredoxina reducida |
| FNR | Ferredoxina NADP ⁺ reductasa |
| FTR | Ferredoxina tiorredoxina reductasa |
| FW | Peso fresco |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| GS | Glutación sintetasa |
| GSH | Glutación reducido |

| | |
|----------------|---|
| GSSG | Glutación oxidado |
| GST | Glutación S-transferasa |
| HEPES | Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico |
| hGSH | Homoglutación |
| HILIC | Cromatografía líquida de interacción hidrófila |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| Iso-PCs | Iso-fitoquelatinas |
| JA | Ácido jasmónico |
| LC | Cromatografía Líquida |
| LCD | L-Cisteína desulfhidrasa |
| LEF | Transporte lineal de electrones |
| LHCII | Complejo colector de luz II |
| m/z | Relación masa/carga |
| MALDI | Espectrometría de masas de desorción/ionización por laser asistida por matriz |
| mBrB | Monobromobimano |
| MeJA | Metil jasmónico |
| MES | Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico |
| MRM | Monitorización de reacciones múltiples |
| MS | Espectrometría de masas |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido |
| NBT | Azul de nitrotetrazolio |
| NN-DPDD | N,N-Dimetil-p-fenilendiamina dihidrocloruro |
| NPQ | Decaimiento no fotoquímico |
| OAS | O-Acetilserina |
| OASTL | O-Acetilserina(tiol)liasa |
| OPDA | Ácido 12-oxofitodienoico |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PAPS | 3'-Fosfoadenosín-5'-fosfosulfato |
| PAR | Radiación fotosintética activa |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PC | Fitoquelatina |
| PCA | Análisis de componentes principales |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PCS | Fitoquelatina sintasa |
| PLP | Piridoxal-5'-fosfato |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| PPase | Pirofosfatasa |

| | |
|--------------------------|---|
| PPFD | Densidad de flujo de fotones fotosintéticos |
| PPi | Pirofosfato inorgánico |
| PPi_{asa} | Peptidil-propil-cis-trans-isomerasa |
| PRX | Peroxirredoxina |
| PSI/PSII | Fotosistema I/Fotosistema II |
| Q_A | Plastoquinona primaria |
| Q_B | Plastoquinona secundaria |
| qPCR | PCR cuantitativa en tiempo real |
| RNasa | Ribonucleasa |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RuBP | Ribulosa bifosfato |
| SA | Ácido salicílico |
| SAT | Serina acetiltransferasa |
| SBP | Proteína de unión a sulfato |
| S-Cys | S-Sulfocisteína |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SiR | Sulfito reductasa |
| SSC | S-Sulfocisteína |
| SSCS | S-Sulfocisteína sintasa |
| TBE | Tampón Tris-borato/EDTA |
| TE | Tampón Tris/EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetra-metiletilendiamina |
| TOF | Tiempo de vuelo |
| Tr | Tiempo de retención en columna cromatográfica |
| Tris | Tris-(hidroximetil) aminometano |
| TRX | Tiorredoxina |
| TSBP | Proteínas de unión a tiosulfato |
| uma | Unidad de masa atómica |
| VBSSM | <i>“Variational Bayesian State Space Modelling”</i> |

I. INTRODUCCIÓN

1. Metabolismo del azufre en organismos fotosintéticos

El azufre está presente en la naturaleza tanto en formas orgánicas como inorgánicas. De las diferentes formas inorgánicas, la forma oxidada más común es el sulfato (SO_4^{2-}), que contiene un átomo de azufre con estado redox +6. Las plantas y los microorganismos son capaces de reducir el sulfato a sulfuro, e incorporarlo como tal a metabolitos orgánicos, mediante un proceso dependiente de energía. De esta forma, los organismos fotosintéticos sintetizan una amplia variedad de compuestos azufrados utilizando sulfato como principal fuente de S, estando presentes en la mayoría de los componentes que son esenciales para el mantenimiento de la célula. El azufre es así un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, constituyendo un 0,3-0,5 % de su materia seca.

La presencia de azufre en los vegetales es de trascendental importancia ya que se encuentra en los aminoácidos cisteína y metionina. La cisteína ocupa una posición central en el metabolismo primario y secundario de la planta debido a sus funciones bioquímicas. Es el primer compuesto orgánico con azufre reducido sintetizado en la planta a partir de la asimilación fotosintética del sulfato, así como el metabolito precursor de biomoléculas esenciales como vitaminas, cofactores, antioxidantes como el glutatión, y muchos compuestos de defensa que se forman en respuesta a diferentes estreses y que contienen motivos azufrados como grupo funcional, que derivan todos de la cisteína.

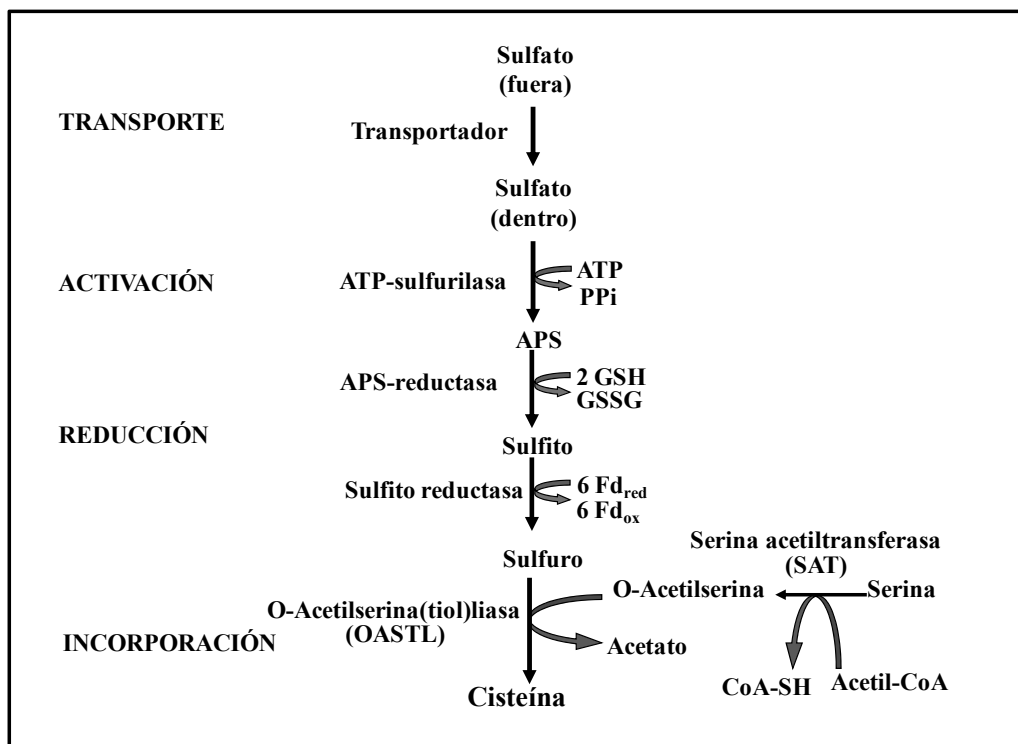


Figura 1. Ruta de asimilación de sulfato y biosíntesis de cisteína en plantas.

En el proceso de asimilación de sulfato y biosíntesis de cisteína se pueden distinguir cuatro etapas fundamentales: transporte de sulfato al interior celular, activación del sulfato, reducción del sulfato activado a sulfuro, e incorporación del azufre reducido a esqueletos carbonados para la biosíntesis de cisteína (Figura 1).

1.1. Transporte de sulfato

La captación de sulfato se realiza a través de las raíces y se distribuye a todas las partes de la planta. El transporte de sulfato a través de la membrana plasmática al interior de las células ocurre contra gradiente, ya que el potencial eléctrico intracelular es extremadamente negativo. Las plantas utilizan así un sistema de cotransportadores protón/sulfato que realizan el intercambio de 3 protones/1 sulfato para permitir la entrada de sulfato al interior celular, utilizándose el gradiente electroquímico establecido por la ATPasa de protones (Lass y Ullrich-Eberius, 1984). El transporte de sulfato al interior de las células es considerado como el paso más regulado de la ruta de asimilación de azufre en la planta (Vauclare *et al.*, 2002). De hecho, existen muchos pasos de transporte de sulfato que son independientes, pero que probablemente están regulados coordinadamente, y que ayudan a mantener los niveles de sulfato citoplasmático constantes, previniendo que se acumulen en exceso (Hawkesford y De Kok, 2006). Los transportadores de azufre están estructuralmente relacionados con la familia de transportadores de membrana, ya que poseen 12 dominios transmembranas en la zona central de la cadena polipeptídica conservado en todos los transportadores de sulfato (Smith *et al.*, 1995). Las diferencias en la afinidad por sulfato y las funciones de los mismos vienen dadas por divergencias en las secuencias de aminoácidos de los extremos amino y carboxi terminal (Vidmar *et al.*, 2000).

La familia de transportadores de sulfato en plantas está compuesta por 12-16 genes y puede ser clasificada en cuatro grupos funcionales distintos en función de la similitud en la secuencia peptídica, características bioquímicas y funciones fisiológicas (Takahashi, 2010). En *Arabidopsis* la familia de transportadores de sulfato está formada por 12 miembros. Los miembros del grupo SULTR1 son transportadores de alta afinidad, inducibles por deficiencia de sulfato y localizados en raíz y floema (Yoshimoto *et al.*, 2007; Barberon *et al.*, 2008). Se localizan predominantemente en los pelos radicales, epidermis de la raíz y células corticales (Takahashi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2002). *SULTR1;2* está considerado como el componente mayoritario, y *SULTR1;1* representa el componente más especializado para la captación de trazas de sulfato, ya que tiene un valor de K_m menor y se induce considerablemente en condiciones de limitación de azufre (Takahashi *et al.*, 2000; Yoshimoto *et al.*, 2002).

Los transportadores SULTR2 son de baja afinidad por sulfato y se localizan en tejidos vasculares, estando involucrados en el transporte a larga distancia. *SULTR2;1* se expresa en el cilindro central, y se induce considerablemente en condiciones de limitación de azufre, sugiriendo su posible papel en la translocación de sulfato desde raíces a brotes (Takahashi *et al.*, 2000).

Los transportadores pertenecientes al grupo 3 son los que han sido menos caracterizados y su actividad como transportador de sulfato aún no ha sido confirmada. La expresión de *SULTR3;1*, *3;2* y *3;3* está restringida a hojas, pero su localización subcelular, así como la función específica en procesos de transporte se desconoce (Buchner *et al.*, 2004).

Los transportadores de sulfato localizados en el tonoplasto, *SULTR4;1* y *4;2*, permiten el transporte de sulfato desde la vacuola al citosol (Kataoka *et al.*, 2004). La expresión de estos transportadores está inducida bajo condiciones de limitación de azufre (Hawkesford y De Kok, 2006), sugiriendo que el transporte del sulfato vacuolar se promueve cuando la demanda de sulfuro aumenta (Kataoka *et al.*, 2004).

Por último, los sistemas de transporte para la entrada de sulfato a los cloroplastos permanecen aún sin resolver. Se ha descrito que la entrada de sulfato compete con la translocación de fosfato y triosa-fosfato, aunque la interferencia parece que ocurre bajo concentraciones de sulfato muy elevadas (Gross *et al.*, 1990). La identificación de transportadores de sulfato en el cloroplasto de plantas y otros organismos es uno de los objetivos más importantes en la investigación del transporte de azufre (Lindberg y Melis, 2008).

1.2. Activación de sulfato

Una vez que el sulfato ha sido transportado al interior de la planta, éste puede ser almacenado en el interior de las vacuolas en las raíces y hojas, o ser utilizado como fuente de azufre en el proceso de asimilación, siendo las concentraciones de cisteína y glutatión las que parecen regular la cantidad de sulfato que se almacena o metaboliza (Bolchi *et al.*, 1999). El sulfato utilizado en el proceso de asimilación debe ser reducido hasta sulfito, siendo el potencial redox a pH 7,0 extremadamente negativo, $E^{\circ} [\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}] = -516 \text{ mV}$. Al no existir donadores fisiológicos de electrones con potenciales redox tan negativos no es posible una reducción directa del sulfato, por lo que, para superar esta barrera termodinámica, el sulfato inorgánico tiene que ser activado. La activación del sulfato está mediada por la enzima ATP sulfurilasa (ATPS, EC 2.7.7.4) en presencia de Mg^{+2} , obteniéndose como producto de la reacción APS, siendo éste la forma activa del sulfato, y pirofosfato. Esta enzima cataliza la hidrólisis entre los

fosfatos alfa y beta del ATP, y añade una molécula de sulfato al fosfato alfa, generándose así adenosin 5'-fosfosulfato (APS). Este enlace anhídrido fosfato-sulfato es de alta energía, y permite la reducción posterior del sulfato.

El equilibrio de la reacción de activación se ve desplazado hacia la formación de los sustratos debido a que ΔG^0 de la hidrólisis del enlace fosfato-sulfato del APS es considerablemente más alto (-19 kcal/mol) que la hidrólisis de los enlaces α - β del ATP (-10,7 kcal/mol) (Liu *et al.*, 1998). Por tanto, es necesario una actividad muy eficiente que mantenga los niveles de pirofosfato y APS a concentraciones muy bajas para favorecer la reacción hacia la dirección anabólica. Así, el PPI es hidrolizado mediante una pirofosfatasa y el APS puede ser utilizado en dos rutas, en la reducción del mismo hasta sulfito, mediante la APS reductasa (APR, EC 1.8.99.2), o bien en la fosforilación dependiente de ATP a través de la APS quinasa (APK, EC 2.7.1.25), generando 3'-fosfo adenosin-5'-fosfosulfato (PAPS). PAPS actúa como donador de sulfato, siendo el precursor de metabolitos secundarios sulfatados (tales como glucosinolatos o sulfolípidos) (Wittstock y Halkier, 2002).

En plantas, la enzima ATPS es un homotetrámero de 52-54 kDa cada monomero. En *Arabidopsis* existen 4 genes que codifican ATP sulfurilasas, de las cuales tres están localizadas en los cloroplastos, y una en el citosol (Rotte y Leustek, 2000). La actividad de las isoformas cloroplásticas decrece a medida que la hoja envejece, mientras que la actividad de la citosólica aumenta, sugiriendo que pueden tener funciones especializadas diferentes.

1.3. Reducción del sulfato activado a sulfuro

En todos los organismos fotosintéticos, la reducción de sulfato ocurre en los plastidios, con la excepción de *Euglena gracilis*, que localiza las enzimas necesarias para la reducción en la mitocondria (Patron *et al.*, 2008).

En *Arabidopsis*, la reducción del sulfato activado a sulfuro se realiza en dos pasos mediante las enzimas APS reductasa (APR) (EC 1.8.99.2.), que reduce el sulfato a sulfito, y la enzima sulfito reductasas (SiR) (EC 1.8.7.1.), capaz de reducir este sulfito a sulfuro. Ambas enzimas están localizadas en los plastidios de hojas y raíces. La APS reductasa es la única enzima no encontrada en enterobacterias, donde APS necesita ser activado a PAPS para la reducción a sulfito a través de la enzima PAPS reductasa.

La APR está codificada por una pequeña familia multigénica en la mayoría de los organismos fotosintéticos, existiendo dos formas distintas (Patron *et al.*, 2008). Las enzimas APR de plantas y algas verdes presentan un dominio N-terminal responsable de

la reacción de reducción, homólogo al que presentan las PAPS reductasas de levaduras, hongos y bacterias, y un dominio C-terminal homólogo a las tiorredoxinas y glutarredoxinas, capaz de interactuar con el reductor glutatión (Bick y Leustek, 1998). El dominio N-terminal contiene una agrupación $[Fe_4S_4]$ como grupo prostético. Aunque las propiedades de estas agrupaciones sulfoféricas están bien descritas, su función exacta en el mecanismo de la reacción catalizada por la APR no se conoce con certeza. La otra forma existente de la enzima APR fue identificada inicialmente en el musgo *Physcomitrella patens* (Koprivova *et al.*, 2002). Esta enzima, denominada APR-B, no requiere la agrupación FeS para realizar su actividad, siendo la eficiencia catalítica menor, pero con una mayor estabilidad. Esta enzima se ha encontrado en diferentes especies de plantas y es la única isoforma presente en las microalgas marinas.

El sulfito producido por la APS reductasa en el cloroplasto es reducido a sulfuro mediante la transferencia de seis electrones en la reacción catalizada por la enzima sulfito reductasa, dependiente de ferredoxina como donador de electrones en plantas (EC 1.8.7.1). En organismos no fotosintéticos (EC 1.8.1.2.) la enzima es dependiente de NADPH (Leustek *et al.*, 2000; Nakayama *et al.*, 2000). Las sulfito reductasas son hemoproteínas homo-oligoméricas compuestas de 2 a 4 subunidades idénticas. Cada subunidad contiene un grupo sirohemo y un centro FeS como grupo prostético (Krueger y Siegel, 1982). En *Arabidopsis* sólo se ha identificado un gen que codifica para esta enzima. La supresión de esta proteína mediante mutagénesis resulta letal para la planta y la reducción en la cantidad de enzima compromete severamente el crecimiento de la planta (Khan *et al.*, 2010). Las secuencias de aminoácidos de las enzimas sulfito reductasas de plantas muestran una alta homología entre sí, pero divergen bastante de las sulfito reductasas de bacterias, manteniendo conservado el sitio de unión de la enzima al sirohemo y a la agrupación sulfoférica (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 1998).

1.4. Incorporación del azufre reducido a esqueletos carbonados

El sulfuro generado en la etapa anterior por la enzima sulfito reductasa es el sustrato para la biosíntesis de cisteína. Este sulfuro libre debe integrarse en un esqueleto carbonado mediante la acción sucesiva de dos enzimas denominadas serina acetiltransferasa (SAT, EC. 2.1.3.30.), y O-acetilserina(tiol)lisa (OASTL, EC. 4.2.99.8). En la primera reacción, la L-serina debe de ser activada previamente por la serina acetiltransferasa mediante acetilación, utilizando acetil-coenzima A para generar O-acetilserina. En un segundo paso, la O-acetilserina reacciona con el sulfuro para formar L-cisteína gracias a la acción de la OASTL (Figura 2). Las bacterias utilizan también esta ruta de dos pasos para sintetizar cisteína, mientras que la mayoría de los hongos generan metionina como primer compuesto orgánico azufrado. Las enzimas

SAT y OASTL en bacterias y plantas están asociadas formando un complejo hetero-oligomérico denominado cisteína sintasa (Saito, 2004; Wirtz y Hell, 2006).

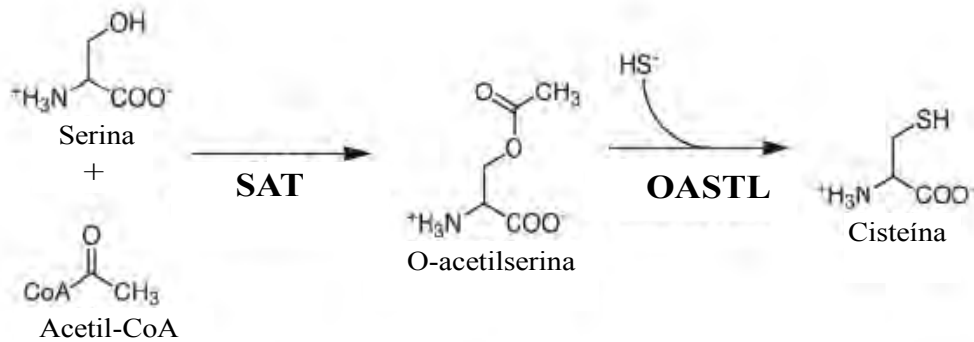


Figura 2. Reacciones enzimáticas catalizadas por la serina acetiltransferasa (SAT) y O-acetiserina(tiol)liasa (OASTL).

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado cinco genes *SAT* (Howarth *et al.*, 2003) y nueve genes *OASTL* (Wirtz *et al.*, 2004) (Tabla 1). En base a las características cinéticas y a la abundancia de los transcritos en *Arabidopsis*, las isoformas mayoritarias en el cloroplasto de *SAT* y *OASTL* son las isoformas codificadas por los genes *SAT53* y *OAS-B*. Las isoformas mayoritarias en el citosol responsables de la síntesis de cisteína en este compartimento son las codificadas por *SAT52* y *OAS-A1*. Por último, las isoformas codificadas por *SAT1* y *OAS-C* son las mayoritarias en la mitocondria (Jost *et al.*, 2000; Howarth *et al.*, 2003; Saito, 2004) (Figura 3).

Tabla 1. Genes *SAT* y *OASTL* en el genoma de *A. thaliana*

| Gen | Locus | Localización subcelular de la proteína |
|-----------------|-----------|--|
| <i>SAT 52</i> | At5g56760 | Citosólica |
| <i>SAT 53</i> | At1g55920 | Citosólica/plastídica |
| <i>SAT 1</i> | At3g13110 | Mitocondrial |
| <i>SAT 106</i> | At2g17640 | Citosólica |
| <i>SAT N</i> | At4g35640 | Citosólica |
| <i>OAS-A1</i> | At4g14880 | Citosólica |
| <i>OAS-A2</i> | At3g22460 | No se traduce |
| <i>OAS-B</i> | At2g43750 | Plastídica |
| <i>OAS-C</i> | At3g59760 | Mitocondrial |
| <i>ATCYS-C1</i> | At3g61440 | Mitocondrial |
| <i>ATCYS-D2</i> | At5g28020 | Citosólica |
| <i>ATCYS-D1</i> | At3g04940 | Citosólica |
| <i>DES1</i> | At5g28030 | Citosólica |
| <i>CS26</i> | At3g03630 | Plastídica |

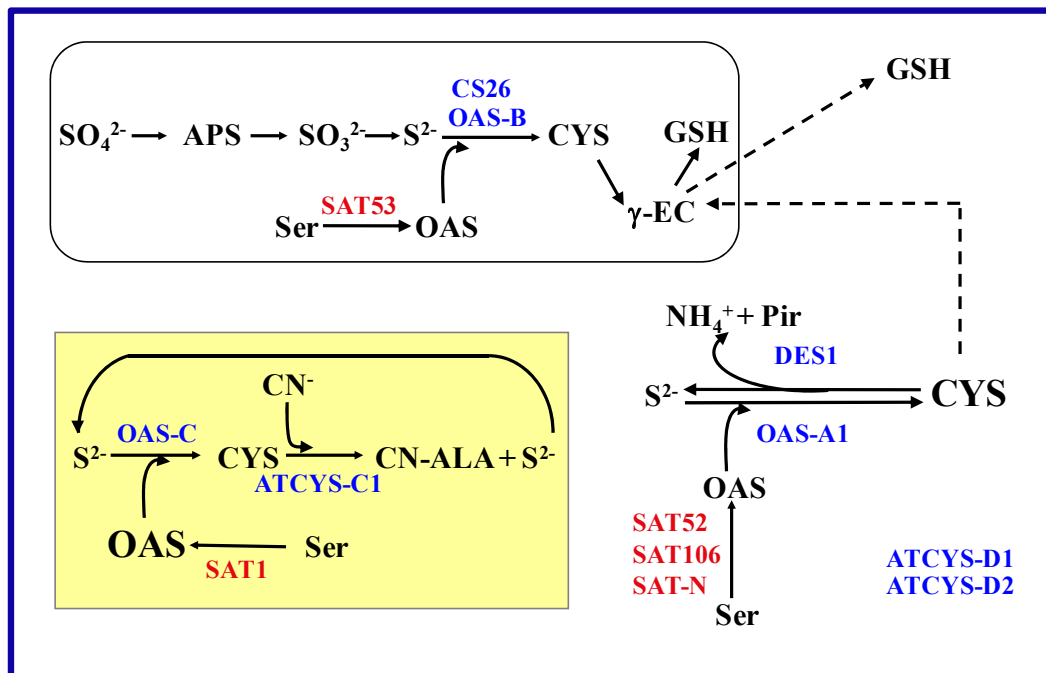


Figura 3. Representación esquemática de la localización subcelular de las enzimas SAT y OASTL de *Arabidopsis*.

Las SATs están representadas en rojo, mientras que las OASTLs están en azul. Los compartimentos verde y amarillo representan a los cloroplastos y las mitocondrias, respectivamente.

En bacterias tales como *E. coli* o *S. typhimurium*, la única enzima SAT está codificada por el gen *cysE*, mientras que los genes *cysK* y *cysM* codifican para las dos OASTL presentes, OASTL-A y OASTL-B, respectivamente (Hulanicka *et al.*, 1986; Bock y Bock, 1987; Byrne *et al.*, 1988). Las enzimas SAT y OASTL-A forman el complejo cisteína sintasa similar al descrito en plantas. Sin embargo, la isoforma OASTL-B no se asocia a ningún complejo enzimático. Ambas enzimas utilizan sulfuro como nucleófilo, pero la isoforma B posee como característica la habilidad de utilizar tiosulfato en lugar de sulfuro, permitiendo la producción de S-sulfocisteína, el cual es convertido a cisteína y sulfato espontáneamente (Hulanicka *et al.*, 1979; Nakamura *et al.*, 1984).

Estudios de comparación de secuencias de las enzimas SAT de bacterias y de plantas muestran una alta homología entre ellas, destacando dos dominios muy conservados. Uno de ellos está localizado en la zona central de la proteína, donde predominan estructuras α -hélices, y que parece estar involucrado en la interacción proteína-proteína entre las subunidades SAT. El otro dominio conservado está localizado en el C-terminal y es esencial para la catálisis y la interacción con OASTL, presentando una repetición en tándem de un hexapéptido muy conservado en la

estructura de las acetiltransferasas con estructura de hojas- β plegadas (Bogdanova y Hell, 1997; Wirtz *et al.*, 2001).

La enzima OASTL es un homodímero de 60-70 kDa que contiene como grupo prostético dos moléculas de piridoxal-5'-fosfato (PLP) por dímero. La comparación de las secuencias de aminoácidos muestra una alta homología entre las enzimas de plantas y de bacterias, conservándose en todas ellas la secuencia de aminoácidos del sitio activo TSGNT, loop formado por los residuos 74-78 en OAS-A1 de *Arabidopsis*, y el aminoácido lisina 46, involucrado en la unión al cofactor. Estudios de mutagénesis dirigida, análisis cinéticos y ensayos de unión a ligando han determinado el papel funcional de los residuos claves a nivel del sitio activo. Así, estos experimentos concluyen que la Asn⁷⁷ y la Gln¹⁴⁷ de la OAS-A1 de *Arabidopsis* son aminoácidos clave para la unión al sustrato OAS, mientras que la Thr⁷⁴ y la Ser⁷⁵ están involucrados en la incorporación de sulfuro para formar cisteína. El sitio de interacción con SAT está constituido por el loop β 8A- β 9A, estando muy conservado en plantas y bacterias (Bonner *et al.*, 2005).

Distintos análisis bioquímicos con enzimas recombinantes han mostrado que el complejo cisteína sintasa posee un peso molecular de aproximadamente 300 kDa, y que podría estar constituido por dos homodímeros de OASTL y una molécula homotetrámera de SAT (Droux *et al.*, 1998). Más tarde, mediante análisis de las estructuras cristalinas tridimensionales de SAT y OASTL obtenidos a partir de datos cristalográficos de las enzimas de bacterias y plantas, se ha propuesto una estructura tipo $\alpha_6\beta_4$ (α = SAT; β = OASTL) para las subunidades del complejo cisteína sintasa de plantas, constituido de esta forma por dos homodímeros de OASTL y un dímero de trímeros de SAT (Wirtz y Hell, 2006). Sin embargo, un estudio reciente contradictorio describe la estructura cuaternaria del complejo cisteína sintasa de la forma citosólica de soja como un trímero SAT que se une a tres dímeros OASTL, sugiriendo que existen diferencias específicas en la estructura del complejo que son dependientes de las isoformas y las especies (Kumaran *et al.*, 2009).

La formación de este complejo cisteína sintasa parece ser un mecanismo regulatorio de la síntesis de cisteína. En la célula, la concentración de la enzima OASTL es mayor que la de SAT (Droux *et al.*, 1998), siendo la enzima SAT activa solamente cuando forma parte del complejo, produciéndose así un aumento de su V_{\max} y su afinidad por los sustratos y, por tanto, obteniéndose un mayor rendimiento en la producción de OAS. Por otro lado, la enzima OASTL se inactiva cuando forma parte del complejo (Hindson y Shaw, 2003), y parece que actúa como regulador de la actividad SAT, modificando su estabilidad y propiedades catalíticas. La fracción OASTL libre es catalíticamente activa y, por tanto, responsable de la formación de

cisteína. Además, se ha demostrado que la actividad OASTL excede a la SAT en todos los compartimentos, indicando que la enzima SAT está en su totalidad formando el complejo cisteína sintasa junto con una pequeña fracción del total de actividad OASTL (Heeg *et al.*, 2008).

Estudios realizados en varios mutantes nulos de las diferentes isoformas mayoritarias SAT y OASTL han demostrado que OAS se sintetiza predominantemente en la mitocondria, y que es el citosol, y no el cloroplasto, el compartimento que más contribuye a la síntesis de cisteína por acción de la isoforma *OAS-A1*, representando el 44 % del total de actividad OASTL en hojas y el 80 % en raíces (Haas *et al.*, 2008; Heeg *et al.*, 2008; López-Martín *et al.*, 2008a; Watanabe *et al.*, 2008a; Watanabe *et al.*, 2008b). Estas observaciones se ajustan a la distribución de 125 μM de sulfuro y 9 μM de cisteína en el cloroplasto, y 55 μM de sulfuro y 332 μM de cisteína en el citosol de *Arabidopsis* (Krueger *et al.*, 2009). La importancia fisiológica de la producción de OAS por la SAT mitocondrial quedó demostrada cuando se realizaron estudios de silenciamiento de la expresión de este gen en *Arabidopsis*, obteniéndose un fenotipo de reducción del crecimiento severo y una disminución de los niveles de OAS en hojas (Haas *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008b). Además, es en este compartimento donde se detecta hasta un 80 % de la actividad SAT, y el que posee una menor actividad OASTL. La caracterización de los mutantes deficientes en las isoformas SAT citosólica y cloroplástica demostraron también que estas SAT no contribuyen significativamente a la biosíntesis de cisteína, reforzando la función de la SAT mitocondrial (Krueger *et al.*, 2009).

Teniendo todo esto en cuenta, estos estudios sugieren un escenario en la hoja donde el cloroplasto genera sulfuro a partir de la reducción del sulfato asimilado, la mitocondria proporciona la OAS y el citosol produce la mayor parte de la cisteína (Haas *et al.*, 2008; Heeg *et al.*, 2008; López-Martín *et al.*, 2008a; Watanabe *et al.*, 2008a; Watanabe *et al.*, 2008b; Krueger *et al.*, 2009). La cisteína parece ser un determinante importante de la capacidad antioxidante del citosol en *Arabidopsis*, tal y como se ha demostrado en el estudio de mutantes nulos de la isoforma mayoritaria *OAS-A1*, cuya deficiencia origina una importante perturbación de la homeostasis de H_2O_2 (López-Martín *et al.*, 2008a; López-Martín *et al.*, 2008b). Además de la actividad OASTL, se han atribuido otro tipo de funciones a algunas de las isoformas. Así, otra isoforma mayoritaria, ATCYS-C1, participa en la detoxificación de cianuro presentando actividad β -cianoalanina sintasa (Hatzfeld *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2003). Un estudio detallado de mutantes deficientes en ATCYS-C1 ha demostrado que esta actividad es esencial para mantener unos niveles bajos de cianuro para un correcto desarrollo de los pelos radicales (García *et al.*, 2010). Estudios recientes en otras enzimas originariamente descritas como OASTL han demostrado que poseen otras actividades

enzimáticas. Tal es el caso de DES1, que cataliza la desulfuración de cisteína en el citosol y por tanto posee actividad L-cisteína desulfhidrasa (EC 4.4.1.1), demostrándose su implicación en el mantenimiento de la homeostasis de cisteína (Alvarez *et al.*, 2010). Durante el trabajo de esta tesis se ha caracterizado la isoforma minoritaria cloroplástica CS26 y se ha demostrado que posee actividad S-sulfocisteína sintasa (Bermúdez *et al.*, 2010). Las isoformas minoritarias SATN, SAT106, ATCYS-D1 y ATCYS-D2 no han sido caracterizadas enzimáticamente hasta la fecha.

1.5. Mecanismos de regulación de la biosíntesis de cisteína

1.5.1. Factores ambientales y modulación intrínseca de señales

La captación y asimilación de sulfato están fuertemente reguladas en función de la demanda de azufre reducido de la planta. En la pasada década, estudios moleculares, particularmente de perfiles de expresión génica, han ayudado a elucidar la respuesta molecular y fisiológica del metabolismo del azufre de la planta a factores ambientales y a cambios en niveles de los intermediarios o productos de la ruta. La interconexión de la asimilación de sulfato con el metabolismo del carbono y del nitrógeno, así como el papel de la ruta en la respuesta a condiciones de estrés, está muy bien establecida (Bick *et al.*, 2001; Kopriva *et al.*, 2002; Loudet *et al.*, 2007; Koprivova *et al.*, 2008). De esta forma, en condiciones de limitación por nitrógeno, la captación de sulfato está fuertemente reducida, y se ve correlacionada con una bajada en la acumulación de los transcritos de *SULTRI;1* y *1;2* (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2004).

El control de la asimilación del azufre ocurre principalmente en los pasos del transporte de sulfato y reducción de APS, donde los niveles de los transcritos de los transportadores de sulfato y APR están estrictamente regulados por la disponibilidad de sulfato (Vauclare *et al.*, 2002; Yoshimoto *et al.*, 2007; Scheerer *et al.*, 2010). Además de la regulación transcripcional de los transportadores de sulfato y APR, la enzima sulfito reductasa y la SAT mitocondrial parecen tener un papel importante en el control del metabolismo del azufre, ya que una actividad inadecuada de las mismas conlleva defectos severos en el crecimiento de la planta (Yoshimoto *et al.*, 2007; Haas *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010). Aunque normalmente hay una buena correlación entre la regulación de los niveles de ARNm y las actividades de enzimas y transportadores de sulfato, muchos componentes del metabolismo del azufre están controlados además por intervención de otros tipos de regulaciones transcripcionales y postranscripcionales más complejas (Yoshimoto *et al.*, 2007; Koprivova *et al.*, 2008).

Existen muchos grupos de metabolitos a los que se les ha asignado un papel importante en la regulación de la asimilación de sulfato. La ruta está bajo el control

bioquímico de los productos e intermediarios de la reacción. Así, la inhibición por *feedback* del transporte de sulfato, APR, y γ -EC sintetasa mediante GSH es una parte integral del control de esta ruta (Lappartient *et al.*, 1999; Vauclare *et al.*, 2002; Hothorn *et al.*, 2006), mientras que OAS es un regulador positivo de la ruta (Neuenschwander *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1997; Koprivova *et al.*, 2008). OAS se acumula en condiciones de deficiencia de sulfuro y afecta a la expresión de los genes de los transportadores y APRs (Hirai *et al.*, 2003). Asimismo, la acumulación de OAS dispara una respuesta similar a aquella esperable por deficiencia en azufre en el medio (Ohkama-Ohtsu *et al.*, 2004). No obstante, la función de OAS como una señal general del estatus interno de azufre permanece sin resolver, a pesar de su aparente función en la disociación del complejo cisteína sintasa, como se describe a continuación.

La isoforma citosólica OAS-A1 es la más abundante en *Arabidopsis thaliana* (Barroso *et al.*, 1995). A nivel de tejido, la mayor expresión de este transcrito se da en los tricomas, incluso en un estadio temprano de desarrollo de las células del tricoma (Gotor *et al.*, 1997). Este hecho permite relacionar la función biológica de los tricomas con el metabolismo del sulfato, sugiriendo una función especializada de esta isoforma citosólica en los tricomas. Se ha demostrado que OAS-A1 tiene una función específica en la respuesta de defensa de la planta contra diferentes tipos de estrés tales como salinidad y la presencia de metales pesados (Barroso *et al.*, 1999; Dominguez-Solis *et al.*, 2001). Bajo condiciones de estrés por sal, existe una inducción de *OAS-A1* que es mediada por ABA, ya que la adición exógena de este compuesto al medio de cultivo mimetiza la respuesta de la planta inducida por presencia de sal; y la inducción del mRNA en plantas silvestres de *Arabidopsis* tratadas con sal no se observó en mutantes insensibles y deficientes de ABA (Barroso *et al.*, 1999). La sobreexpresión de este gen en levadura puede permitir el crecimiento de células de levadura a altas concentraciones de sal, sugiriendo que la proteína OAS-A1 en plantas es capaz de conferir tolerancia a sal y por tanto jugar un papel específico en la protección frente a salinidad (Romero *et al.*, 2001).

También se ha demostrado que esta proteína está involucrada en la respuesta de la planta a condiciones de estrés por metales, produciéndose una acumulación del transcrito y del contenido de GSH (Dominguez-Solis *et al.*, 2001). Estos resultados se correlacionan con el aumento de la biosíntesis de cisteína en estas condiciones de estrés requerido para la síntesis de GSH y fitoquelatinas. Las fitoquelatinas (PCs) son ligandos de alta afinidad por metales implicados en la detoxificación y tolerancia de los mismos. Las PCs forman una familia de estructuras con repeticiones crecientes (n) del dipéptido γ -Glu-Cys seguido por una Gly terminal, teniendo n un valor entre 2 y 11 (Zenk, 1996; Rauser, 1999). La sobreexpresión de *OAS-A1* en *Arabidopsis* resultó en plantas transgénicas con un aumento de la tolerancia a metales pesados, permitiendo a estas

plantas sobrevivir bajo condiciones de estrés severa por metales pesados, y demostrando que la disponibilidad de cisteína citosólica es un paso limitante para la síntesis de glutatión y fitoquelatinas bajo esta condición de estrés. La tolerancia al cadmio fue debida a un aumento de la acumulación de este metal en hojas, con los tricomas como localización principal de acumulación de metales pesados (Dominguez-Solis *et al.*, 2001; Dominguez-Solis *et al.*, 2004).

La caracterización del mutante de T-DNA *oas-1* no mostró diferencias fenotípicas bajo las condiciones de crecimiento estándar, pero mostró una sensibilidad severa a la presencia de metales pesados. La caracterización bioquímica del mutante reveló una fuerte reducción de la actividad OASTL total, y un descenso significativo del contenido de cisteína y GSH cuando se compararon con la línea silvestre. Sin embargo, los niveles de fitoquelatinas bajo condiciones de estrés por metal no se diferenciaron del contenido mostrado en la línea silvestre, sugiriendo que la hiper-sensibilidad a cadmio de este mutante podría estar relacionada con una respuesta de la planta más general (López-Martín *et al.*, 2008a).

En otros estudios se confirmó también que los genes de la familia SAT de *Arabidopsis thaliana* presentaron un aumento de los niveles de los transcritos en respuesta al tratamiento con cadmio. En concreto, la expresión de *SAT-53* mostró niveles de inducción elevados en hojas (Howarth *et al.*, 2003); y estos resultados pueden sugerir que isoformas específicas SAT junto con su pareja OASTL podrían tener un papel como mecanismo de defensa frente a estrés por metal. Sin embargo, la sobre-expresión del gen *SAT-52*, que codifica a la isoforma citosólica mayoritaria, y del gen *SAT-53*, que codifica a la isoforma SAT cloroplástica en *Arabidopsis*, dio como resultado la obtención de plantas transgénicas incapaces de crecer bajo condiciones de estrés severo por metales pesados, a diferencia de lo que ocurre con la OASTL citosólica (López-Martín *et al.*, 2005). Así, bajo condiciones de estrés por metales pesados un aumento de los niveles de las enzimas SAT citosólicas o cloroplásticas no provocó un aumento de la tolerancia de la planta de la magnitud observada con un aumento de OASTL en el citosol. Estos resultados parecen contradictorios al modelo actual, asumiendo que en la mayoría de los compartimentos celulares los niveles de enzima OASTL están en exceso de forma significativa respecto a los niveles de enzima SAT, siendo este último el paso limitante de la biosíntesis de cisteína.

Se ha descrito que algunas hormonas juegan un papel importante en la asimilación de sulfato. Esto es esperable para aquellas hormonas relacionadas con el estrés, tales como jasmonatos, ácido abscísico y sacililatos, así como compuestos que contienen azufre y que tienen una función importante en la defensa de la planta (Rausch y Wachter, 2005). De hecho, los jasmonatos coordinan la inducción de múltiples genes

de la asimilación de sulfato (Jost *et al.*, 2005; Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2005), ocurriendo también a la inversa, de forma que los genes involucrados en la síntesis de jasmonatos están inducidos cuando las plantas sufren limitación de azufre (Hirai *et al.*, 2003; Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003). El ácido abscísico induce específicamente la OASTL citosólica (Barroso *et al.*, 1999) pero reduce la actividad de APR mediante un mecanismo postranscripcional no descrito aún (Koprivova *et al.*, 2002), y tratamientos con salicilatos producen un aumento en los niveles de GSH (Fodor *et al.*, 1997). Además, tanto jasmonatos como salicilatos inducen la acumulación de ARNm y la actividad APR (Kopriva *et al.*, 2009). En el caso de las citoquinas, se ha descrito que reprimen la expresión de los genes que codifican los transportadores de sulfato de alta afinidad en raíces de *Arabidopsis* (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2003).

Se ha identificado en *Arabidopsis* elementos cis-reguladores involucrados en la regulación de la respuesta de la planta a la deficiencia de azufre (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2005). Uno de estos elementos con una secuencia de 16 pares de bases es bien conocido, y se le ha denominado elemento de respuesta de azufre (Todesco *et al.*). Está presente en los promotores *SULTR1;1*, así como en otros genes implicados en la ruta metabólica del sulfato (Davidian y Kopriva, 2010).

Uno de los reguladores transcripcionales más importantes para la captación de sulfato es SLIM1, que pertenece a un grupo de factores de transcripción insensibles a etileno (EIL: ethylene insensitive3-like). Sin embargo, su función parece ser específica a la respuesta a azufre (Maruyama-Nakashita *et al.*, 2006). Por otro lado, miR395 también está involucrado en la regulación del metabolismo del azufre, ya que se acumula bajo condiciones de limitación de azufre y tiene como dianas a tres isoformas de ATP sulfurilasas y *SULTR2;1*, conduciendo a la degradación postranscripcional de los transcritos de estos genes dianas (Jones-Rhoades y Bartel, 2004; Kawashima *et al.*, 2009; Liang y Yu, 2010).

Otros factores de transcripción que están involucrados con la biosíntesis de glucosinolatos son los MYB, y pueden estimular la expresión de enzimas de asimilación de azufre (APR y APS kinasa), aumentando así el suministro de los sustratos necesarios para la síntesis de glucosinolatos (Yatusevich *et al.*, 2010).

1.5.2. Regulación del complejo cisteína sintasa

El complejo cisteína sintasa de plantas y bacterias comparte muchas propiedades cinéticas y estructurales, pero parece que poseen diferentes funciones en cuanto a su regulación. En plantas, la coordinación adecuada del complejo cisteína sintasa es un punto de control importante de la ruta de asimilación de sulfato (Riemenschneider *et al.*,

2005). La formación del complejo es reversible y la interacción de las dos enzimas se ve fuertemente afectada por la concentración de OAS y sulfuro, de manera que el sulfuro induce su formación, mientras que OAS favorece la disociación (Figura 4). La estabilidad del complejo se mantiene gracias a que el sulfuro mantiene activa a la enzima SAT cuando forma parte del mismo, siempre que la disponibilidad de sulfato no sea limitante (Droux *et al.*, 1998; Wirtz y Hell, 2006).

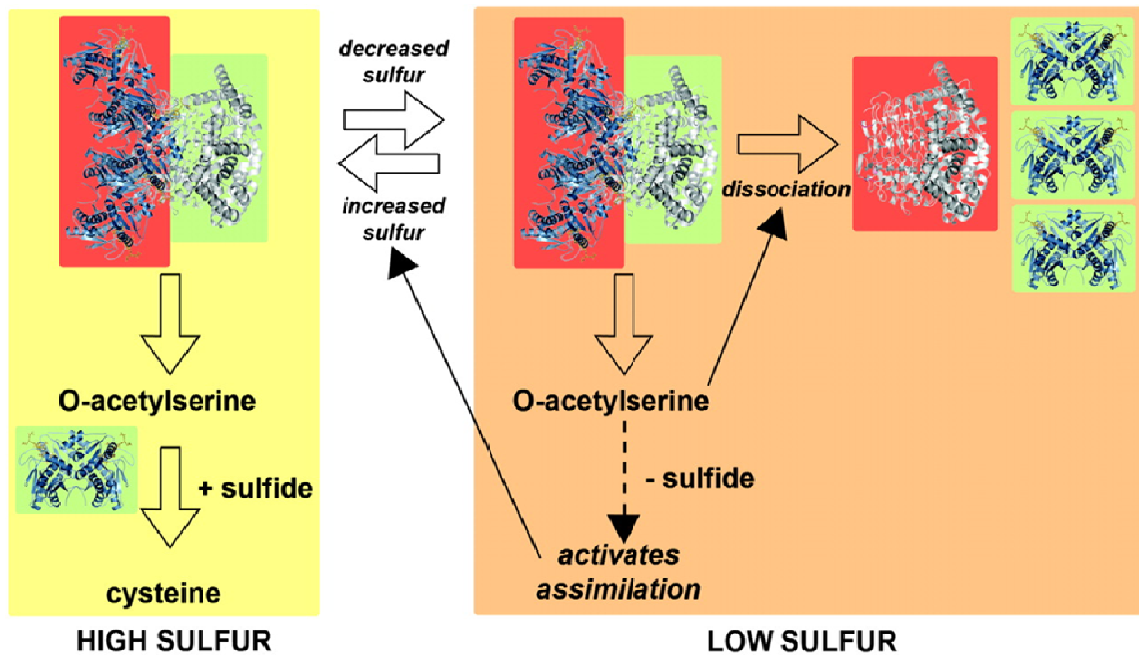


Figura 4. Esquema de regulación del complejo cisteína sintasa como sensor del estado intracelular de sulfuro.

En condiciones de suficiencia de sulfuro (recuadro amarillo), las enzimas SAT (representada en gris, fondo verde) y OASTL (representada en azul, fondo rojo) se asocian para formar el complejo, donde OASTL está inactiva. El exceso de OASTL (representada en azul, fondo verde) utiliza la OAS para generar cisteína. En condiciones de deficiencia de sulfuro (recuadro naranja) los niveles de OAS aumentan y disocian el complejo, reduciendo la actividad SAT (representada en gris, fondo rojo) (Yi *et al.*, 2010).

En condiciones de limitación de azufre, los niveles de sulfuro descienden y OAS se acumula, provocando la desestabilización y disociación del complejo en conjunción con una reducción de la actividad SAT. Además del control de la síntesis de cisteína mediante interacción proteína-proteína en el complejo cisteína sintasa, la OAS contribuye a la regulación transcripcional de la captación y reducción de sulfato, ya que reacciona con el sulfuro presente gracias a la OASTL libre, provocando un aumento de los niveles de cisteína y glutatión, los cuáles reprimen la expresión de enzimas de la asimilación de sulfato (Smith *et al.*, 1997; Koprivova *et al.*, 2000; Hirai *et al.*, 2003; Wirtz y Hell, 2006). Además, la forma citosólica SAT está regulada alostéricamente

mediante inhibición *feedback* por cisteína. Esta característica no se observa en las isoformas cloroplásticas y mitocondriales, que son insensibles a la cisteína (Saito *et al.*, 1995; Noji *et al.*, 1998).

Por tanto, en plantas, la formación del complejo cisteína sintasa proporciona un mecanismo efectivo para controlar los cambios a nivel celular y modular la producción de cisteína, actuando como sensor de la disponibilidad y del estado intracelular del sulfuro en la planta (Yi *et al.*, 2010). Sin embargo, en bacterias el complejo cisteína sintasa no posee una función regulatoria para SAT. Las diferencias funcionales del complejo en estos dos tipos de organismos pueden ser explicadas en función de la baja conservación de los residuos en el dominio C-terminal de SAT, los cuáles determinan en gran medida la inhibición por cisteína de SAT y las cinéticas de asociación en el complejo cisteína sintasa (Wirtz *et al.*, 2010).

2. Metabolismo del glutatión

El glutatión es un tripéptido que presenta la estructura γ -glutamil-L-cisteinil-L-glicina, y juega un papel muy importante en un amplio número de organismos. El glutatión es un compuesto casi ubicuo, aunque está ausente en algunos organismos que utilizan diferentes cofactores tiólicos tales como la coenzima A, micotiol y ergotioneína (Li *et al.*, 2003). Existen otros homólogos del glutatión en algunas plantas, especialmente en leguminosas, en los que la glicina de la región carboxi-terminal es reemplazada por otro aminoácido como puede ser β -alanina, dando origen al homoglutatión (Klapheck, 1988); serina, formándose el hidroximetilglutatión (Klapheck *et al.*, 1994); o glutamato generándose el γ -glutamilcisteinilglutámico (Meuwly *et al.*, 1993). Todas estas estructuras poseen un enlace- γ que confiere estabilidad y protección al tripéptido de ser degradado por aminopeptidasas (Sies, 1999). El homólogo más frecuente es el homoglutatión (hGSH), presente en leguminosas; el hidroximetilglutatión se encuentra principalmente en gramíneas, incluyendo el arroz, trigo y cebada (Okumura *et al.*, 2003); y el compuesto γ -glutamilcisteinilglutámico se encuentra principalmente en maíz (Meuwly *et al.*, 1993).

El glutatión existe como forma reducida (GSH) o bien como forma oxidada (GSSG), en la cual dos moléculas de glutatión están unidas vía puente disulfuro, con eliminación de dos protones y dos electrones. El potencial redox GSH/GSSG tiene un valor de -240 mV a un pH de 7,0 (Meyer y Hell, 2005). Este valor es muy similar a los valores que han sido determinados para muchas tiorredoxinas (desde -280 a 300 mV). Sin embargo, cuando GSSG se disocia mediante reducción generando dos moléculas de GSH, su influencia en el estado redox de la célula depende de la concentración total de glutatión y su ratio GSH/GSSG (Meyer y Hell, 2005; Mullineaux y Rausch, 2005).

En plantas, glutatión es el principal compuesto tiólico no proteico, estando presente en altas concentraciones (Noctor *et al.*, 2002). El contenido de GSH en el citosol de hojas de *Arabidopsis* es de 3-4 mM (Halliwell y Foyer, 1976; Meyer y Hell, 2005; Krueger *et al.*, 2009), mientras que en los cloroplastos el contenido se estima entre 1-4,5 mM (Noctor y Foyer, 1998). En un estudio reciente (Fernández-García *et al.*, 2009) se calculó que la mayor localización de acumulación de GSH se encuentra en los cloroplastos (62-75 % del total de GSH) comparado con el 15-25 % encontrado en las mitocondrias. Otros compartimentos tales como los peroxisomas y el núcleo tienen menor contenido de GSH (Zechmann *et al.*, 2008; Fernández-García *et al.*, 2009). Se ha determinado también que células específicas como los tricomas tienen un contenido muy elevado de glutatión de más de 300 veces superior a otras células epidérmicas, poniendo de manifiesto la importancia de los tricomas en la biosíntesis de glutatión y su posible función de sumideros en los procesos de detoxificación en los que está implicado esta molécula (Gutierrez-Alcala *et al.*, 2000).

Así, sus funciones esenciales están relacionadas con la protección y detoxificación de xenobióticos, protección frente a metales pesados, tolerancia a perturbaciones medioambientales que promueven estrés oxidativo, actúa como cofactor en diversos procesos metabólicos, y como forma de almacenamiento y de transporte del azufre reducido (Foyer *et al.*, 2001; Cobbett y Goldsbrough, 2002; Noctor *et al.*, 2002; Droux, 2004). Además, el glutatión participa en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (May *et al.*, 1998; Vernoux *et al.*, 2000; Meyer y Hell, 2005; Cairns *et al.*, 2006; Foyer y Noctor, 2011). Este tripéptido, que se encuentra en equilibrio con su forma oxidada, se ha considerado el determinante mayoritario de la homeostasis redox de la célula, actuando como antioxidante y manteniendo el balance redox celular. La función redox del GSH es una acción tan importante en la planta que el citosol y la mitocondria de *Arabidopsis* han desarrollado un sistema de reserva en caso de que la reducción de GSH sea insuficiente (Marty *et al.*, 2009).

La biosíntesis de glutatión tiene lugar a través de dos etapas enzimáticas sucesivas dependientes de ATP, catalizadas por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa (γ -ECS o GSH1, EC 6.3.2.2) y glutatión sintetasa (GSH2, EC 6.3.2.3), respectivamente. En la primera etapa se forma γ -glutamil-cisteína a partir de L-glutamato y L-cisteína, en presencia de ATP. En plantas, la enzima GSH1 contiene uno o dos puentes disulfuro que son inhibidos mediante reducción. La reducción de uno de los puentes, conservado en todas las especies de plantas, gobierna la transición de la forma monomérica a la dimérica, mientras que la reducción del segundo puente disulfuro, presente sólo en algunas especies de plantas incluyendo a las Brassicaceae, bloquea el acceso al sitio activo, disminuyendo la eficiencia catalítica (Jez *et al.*, 2004;

Hothorn *et al.*, 2006; Hicks *et al.*, 2007; Gromes *et al.*, 2008). En el segundo paso de la síntesis de GSH, una molécula de L-glicina se une al extremo carboxi-terminal del dipéptido para formar glutatión, también en presencia de ATP gracias a la acción de la GSH2. La enzima glutatión sintasa de *Arabidopsis thaliana* está formada por 480 aminoácidos, con una región rica en glicina protegiendo el sitio activo de la enzima (Wang y Oliver, 1997).

En *Arabidopsis*, ambas enzimas GSH1 y GSH2 están codificadas por una sola copia de genes nucleares (At4g23100 y At5g27380, respectivamente) (May *et al.*, 1998). El análisis de la localización de las proteínas mediante fusión con proteínas fluorescentes muestra que GSH1 está exclusivamente localizada en los cloroplastos, mientras que más del 90 % de GSH2 está localizada en el citosol y menos del 10 % en los cloroplastos. Estos datos indican que γ -EC es sintetizada en los cloroplastos, y que GSH puede ser sintetizado en ambos compartimentos, cloroplastos y citosol (Wachter *et al.*, 2005; Gromes *et al.*, 2008).

La producción de glutatión está regulada a múltiples niveles. La regulación de la biosíntesis de GSH depende de la asimilación de carbono, nitrógeno y azufre, así como la coordinación entre estas rutas de asimilación (Kopriva y Rennenberg, 2004), y se ve por tanto afectada por la disponibilidad de cisteína y de luz, ya que en oscuridad la disponibilidad de glicina está limitada (Buwalda, 1990; Noctor *et al.*, 1996; Creissen *et al.*, 1999). Los mecanismos que potencialmente controlan la biosíntesis de GSH incluyen, además de la regulación de la disponibilidad de los aminoácidos que lo constituyen, la regulación transcripcional de las enzimas GSH1 y GSH2, la regulación de las actividades de estas enzimas y el control de hormonas. Diversas evidencias indican también que en la regulación de la biosíntesis de GSH influyen todos aquellos mecanismos en los que sea requerida alguna de las diferentes funciones del glutatión (Kopriva y Rennenberg, 2004).

3. Fotosíntesis y regulación redox

3.1. Modelos bioquímicos de fotosíntesis

En el proceso de fotosíntesis, la energía de la luz absorbida por la planta se utiliza para producir materia orgánica mediante la reducción del CO₂ absorbido. El modelo usado con más frecuencia para la comprensión de cómo la fotosíntesis de las plantas C₃ responden a las perturbaciones es el modelo de Farquhar (Farquhar *et al.*, 1980). En este modelo, las reacciones bioquímicas de la fotosíntesis se consideran que se encuentran en uno de los dos estados de equilibrio (“*steady-states*”). En el primero, la velocidad de fotosíntesis puede predecirse gracias a las propiedades de la ribulosa 1,5-

bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), asumiendo condiciones de saturación del sustrato, RuBP. En este caso se dice que la fotosíntesis está limitada por la Rubisco y normalmente ocurre cuando la concentración de CO_2 es baja (Sharkey *et al.*, 2007). De igual modo, la velocidad de la fotosíntesis puede estar definida por la regeneración de RuBP, que dependerá del NADPH y del ATP generados a partir de la cadena de transporte electrónico fotosintético, aunque también puede depender de enzimas del ciclo de Calvin-Benson distintas de la Rubisco. En este segundo caso se dice que la fotosíntesis está limitada por la regeneración de RuBP y suele ocurrir a concentraciones altas de CO_2 .

Para una determinada concentración y grado de activación de la Rubisco, la disponibilidad de uno de los dos sustratos (CO_2 y RuBP) resultará limitante de la velocidad fotosintética. Así, a concentraciones bajas de CO_2 , la tasa de asimilación aumenta linealmente al hacerlo el CO_2 , estando limitada la fotosíntesis por la actividad de la Rubisco. A partir de una determinada concentración de CO_2 la velocidad de asimilación aumenta con éste sólo ligeramente, debiéndose este aumento a la inhibición gradual de la oxigenación. La figura 5A representa una curva ideal de la respuesta de la tasa de asimilación (A) a la concentración de CO_2 intercelular (C_i), y se denomina curva $A-C_i$. La parte inicial de la curva corresponde a bajas concentraciones C_i y presenta una respuesta lineal que es reflejo de la velocidad de carboxilación de la Rubisco. La ribulosa bifosfato presente en el cloroplasto excede los requerimientos de carboxilación y, por lo tanto es saturante. Esta parte refleja la cinética de primer orden de las reacciones de carboxilación catalizadas por la Rubisco. El valor de la ordenada en el origen es una estimación de la tasa de respiración. La intersección de la recta con el eje de abscisas corresponde al valor del punto de compensación Γ .

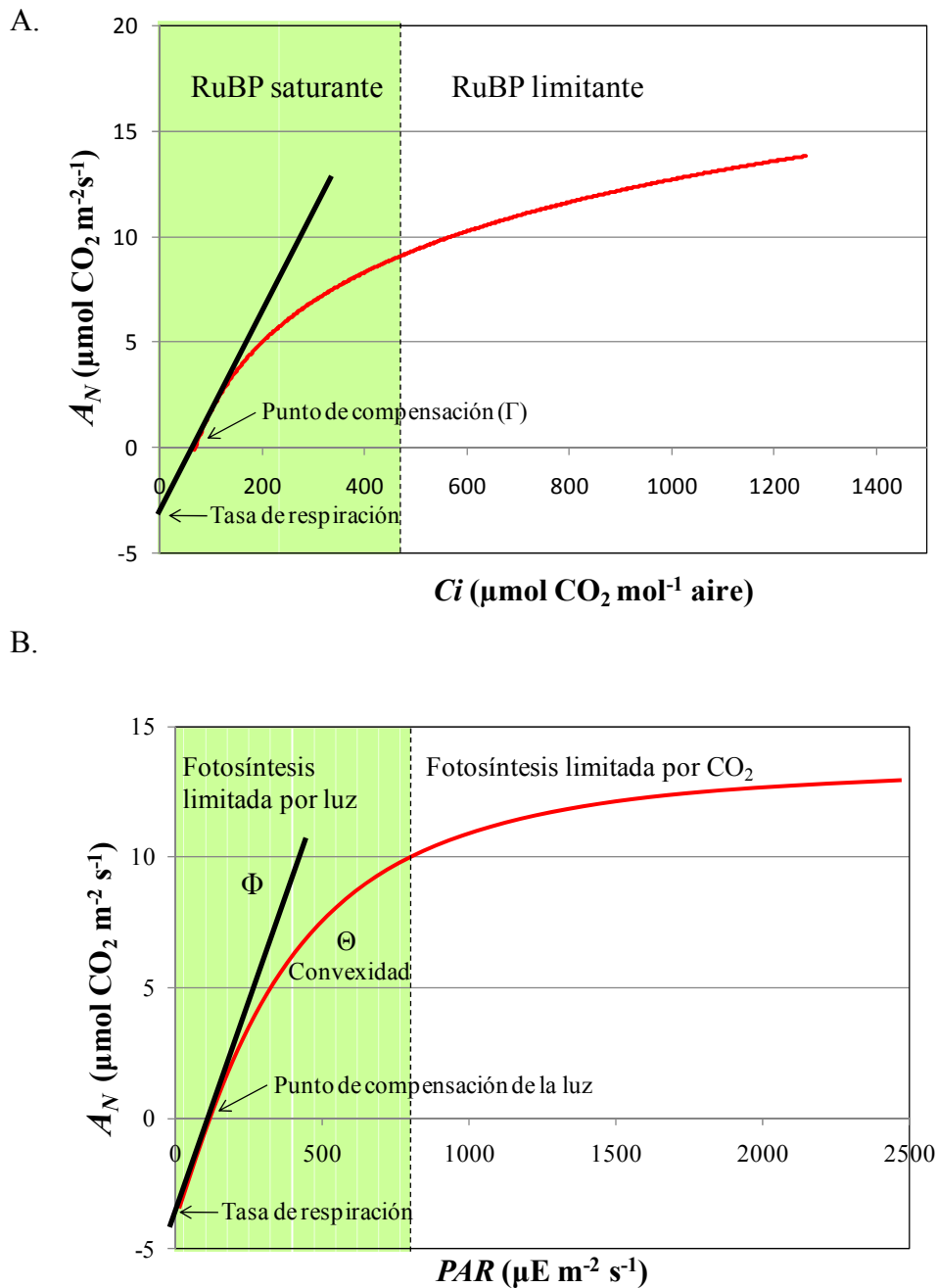


Figura 5. Curva ideal de respuesta de la tasa de asimilación a la concentración de CO_2 intercelular (A) o al flujo de fotones fotosintéticos (B).

Cuando la asimilación no está limitada por la Rubisco sino por la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato, la fotosíntesis está limitada por la luz y, por tanto, por la tasa de transporte de electrones J (ETR). La respuesta a la luz se caracteriza por una curva que presenta diferentes fases (Figura 5B) y se denominan curvas A - PAR (PAR : radiación fotosintéticamente activa). La fase inicial de la respuesta presenta un incremento lineal y la pendiente corresponde al máximo rendimiento cuántico de la fotosíntesis (Φ) es decir, a la fracción de fotones que inciden sobre la hoja que son

realmente aprovechados para generar el transporte de electrones. A continuación existe una fase de transición de la fotosíntesis saturada por la luz y en la que el CO₂ empieza a limitar la respuesta fotosintética.

Cuando la Rubisco cataliza la oxigenación de la ribulosa-1,5-bisfosfato, con un mol de oxígeno se liberan 0,5 moles de CO₂ (Farquhar y von Caemmerer, 1982), y la tasa de asimilación (A) se puede expresar matemáticamente como:

$$A = V_c - 0,5V_o - R_d \quad \text{Ec. 1}$$

donde V_c y V_o son las tasas de carboxilación y oxigenación respectivamente y R_d es la respiración mitocondrial en la luz. Esta ecuación se puede reescribir en función de la tasa de carboxilación como:

$$A = V_c \left(1 - 0,5 \frac{V_o}{V_c} \right) - R_d \quad \text{Ec. 2}$$

La relación entre la actividad oxigenasa y carboxilasa de la Rubisco se puede expresar como:

$$\phi = \frac{V_o}{V_c} = \frac{V_{o \max}}{V_{c \max}} \cdot \frac{O_i/K_o}{C_i/K_c} \quad \text{Ec. 3}$$

donde O_i y C_i son las concentraciones de O₂ y CO₂, y K_o y K_c son las constantes de Michaelis-Menten para el O₂ y CO₂, respectivamente.

Según la ecuación 2, en ausencia de respiración mitocondrial ($R_d = 0$), la tasa de asimilación fotosintética se hace nula cuando $V_o/V_c = 2$, y por tanto, teniendo en cuenta la ecuación 3, el punto de compensación del CO₂ en ausencia de respiración mitocondrial Γ^* viene dado como:

$$\Gamma^* = 0,5 \cdot \frac{V_{o \max}}{V_{c \max}} \cdot \frac{O_i/K_o}{K_c} \quad \text{Ec. 4}$$

De acuerdo con esto, la ecuación 1 puede reescribirse como:

$$A_c = V_c \left(1 - \frac{\Gamma^*}{C_i} \right) - R_d \quad \text{Ec. 5}$$

donde A_c es la tasa de asimilación fotosintética en RuBP saturante. Por último, si escribimos la velocidad de carboxilación de la Rubisco, asumiendo la cinética de Michaelis-Menten, en función de la velocidad máxima de carboxilación, la ecuación 5 quedaría como:

$$A_c = V_{c \max} \cdot \frac{(C_i - \Gamma^*)}{C_i + K_c \left(1 - \frac{O_i}{K_o} \right)} - R_d \quad \text{Ec. 6}$$

La ecuación 6 es la expresión de la tasa de asimilación de la fotosíntesis en condiciones de RuBP saturante (Figura 5A), donde la pendiente de la curva corresponde con la velocidad máxima de carboxilación, y la ordenada en el origen corresponde a la tasa de respiración mitocondrial.

La tasa de asimilación depende de la concentración de CO₂ en el cloroplasto (C_c) que, a menudo se asume que es igual a la concentración de CO₂ en el mesófilo (C_i), asunción que no tiene en cuenta la resistencia de transporte entre el mesófilo y el interior del cloroplasto. Para corregir esta resistencia, se ha propuesto el cálculo de los parámetros anteriores en base a curvas $A-C_c$, teniendo en cuenta la conductancia del mesófilo (g_m) (Harley *et al.*, 1992; Bernacchi *et al.*, 2002; Ethier y Livingstone, 2004).

En el caso de que la tasa de asimilación no esté limitada por la Rubisco sino por la regeneración de la ribulosa-1,5-bifosfato, la fotosíntesis está limitada por la luz y, por tanto, por la tasa de transporte de electrones J (ETR). La tasa de transporte de electrones J se expresa bajo la forma de una hipérbola no rectangular que puede escribirse según el modelo de Caemmerer (Von Caemmerer, 2000) como:

$$J = \frac{Q_{abs} + J_{max} - \sqrt{(Q_{abs} + J_{max})^2 - 4 \Theta Q_{abs} J_{max}}}{2\Theta} \quad \text{Ec. 7}$$

donde Θ representa la convexidad de la hipérbola, J_{max} es la tasa máxima de transporte de electrones y Q_{abs} representa la fracción máxima de cuantos incidentes que se absorben y utilizan en el transporte de electrones, que viene dada por la ecuación 8:

$$Q_{abs} = Q \cdot \alpha \cdot \phi_{PSII,max} \cdot \beta \quad \text{Ec. 8}$$

donde Q es el flujo de fotones absorbido por la hoja (la radiación incidente menos las fracciones reflejada y transmitida), α es la absorbancia de la hoja, Φ_{PSII} es el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II y β es la fracción de luz absorbida que alcanza el fotosistema II.

Una vez obtenido el valor de la tasa de transporte de electrones J , Farquhar y Von Caemmerer (Farquhar y Von Caemmerer, 1982) proponen calcular la tasa de regeneración de la RuBP (J') de la forma:

$$J' = \frac{J \cdot C_i}{\alpha C_i + \beta \Gamma^*} \quad \text{Ec. 9}$$

Si sustituimos la ecuación 9 por el valor de V_c en la ecuación 5, y reordenamos, obtenemos la expresión de la tasa de asimilación determinada por la tasa del transporte

de electrones (A_j) en condiciones de regeneración limitante de la RuBP (Figura 5B):

$$A_j = J \frac{C_i - \Gamma^*}{\alpha C_i + \beta \Gamma^*} - R_d \quad \text{Ec. 10}$$

3.2. Transporte fotosintético de electrones

El flujo de electrones fotosintético es conducido por dos reacciones fotoquímicas catalizadas por el PSII y PSI, que están unidos en serie por la cadena de transporte de electrones (Figura 6).

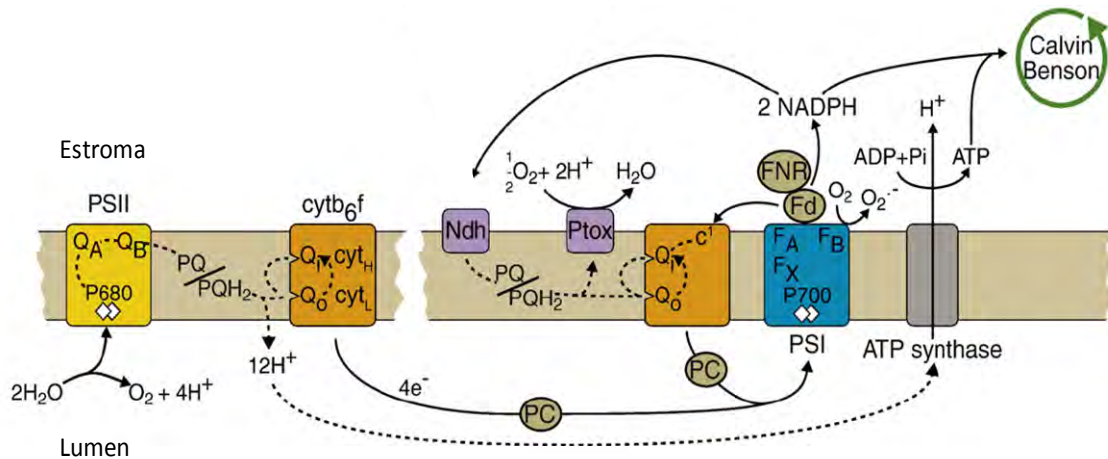


Figura 6. Ruta de transporte de electrones de la fotosíntesis oxigénica.

Se muestra el transporte de electrones con líneas de puntos, indicando la dirección del flujo con flechas (Rochaix, 2011).

La actividad fotoquímica del PSII crea una separación de carga a través de la membrana tilacoidal capaz de oxidar el agua con la consecuente disociación en protones y oxígeno en el lumen tilacoidal, y la reducción de los aceptores primarios de electrones del PSII (Q_A y Q_B) en el lado estromático de la membrana. Una vez que ha aceptado los dos electrones, Q_B es liberado del PSII al pool de plastoquinonas y al plastoquinol reducido del $Cytb_6f$. Este complejo actúa como una bomba de protones. La oxidación del plastoquinol libera dos protones en el lado del lumen y dos electrones, uno de los cuales es transferido a través del bajo potencial de la cadena a cyt_L y cyt_H en el complejo $Cytb_6f$, y finalmente a una quinona en el sitio Q_i para formar una semiquinona. La transferencia de electrones desde el $Cytb_6f$ al PSI es mediada por la plastocianina en el lumen tilacoidal. PSI actúa como un conductor de la luz mediante la oxidación de la plastocianina, transfiriendo los electrones a través de sus tres centros internos de $4Fe-4S$ a la ferredoxina. Por último, estos electrones pueden ser usados por la ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR) para producir NADPH, el cual, junto con el ATP generado por la ATP sintasa, permiten la asimilación de CO_2 a través del ciclo de

Calvin-Benson. Además, la ferredoxina dona los electrones a otras rutas tales como la transferencia de electrones cíclica, la asimilación de azufre y nitrógeno, y a las tiorredoxinas, que regulan la asimilación de carbono (Rochaix, 2011).

En los últimos años se han realizado avances en la comprensión de la composición, estructura, ensamblaje y regulación de los complejos fotosintéticos mayoritarios PSII y PSI, así como los sistemas de antenas asociados, *Cytb6f* y ATP sintasa. Estos contienen múltiples subunidades, pigmentos y cofactores redox que son sintetizados a través de la acción coordinada de los genomas nucleares y cloroplásticos. Este origen dual de las proteínas fotosintéticas necesita una red de regulación compleja para su expresión coordinada (Allen, 1993). La localización de estos dos sistemas en el mismo compartimento celular permite un ajuste rápido de la expresión de los genes a cambios medioambientales. Así, la expresión de genes involucrados en la fotosíntesis está regulada por muchos factores, y entre ellos, la luz es particularmente importante. Aunque la luz es esencial para la fotosíntesis, un exceso de la misma puede ser perjudicial cuando la luz absorbida excede la capacidad de la maquinaria fotosintética. Bajo estas condiciones, el exceso de fotones y electrones necesitan ser disipados para proteger el aparato fotosintético del daño inducido por luz. Esto ocurre a través de un proceso que se induce con rapidez denominado decaimiento no-fotoquímico o “*non-photochemical quenching*” (*NPQ*), en el cual el exceso de luz absorbida es disipado como calor (Niyogi, 1999). Además de este proceso, existen otros mecanismos de fotoprotección tales como enzimas y moléculas plastídicas antioxidantes, y procesos de reparación de la peroxidación lipídica y los daños en el PSII (Nixon *et al.*, 2010). En el otro extremo, bajo condiciones de poca luz, la maquinaria fotosintética se adapta para optimizar su rendimiento fotosintético.

Además del transporte lineal de electrones (LEF), el sistema puede realizar un transporte de electrones cíclico (CEF). En este caso, la ferredoxina reducida transfiere sus electrones de vuelta al pool de plastoquinonas a través del NADPH o directamente al complejo *Cytb6f*, provocando un flujo de electrones cíclico alrededor del PSI, acompañado de traslocación de protones y formación de ATP. La fijación de una molécula de CO₂, o lo que es lo mismo, un ciclo en la ruta de Calvin-Benson, consume 3 moléculas de ATP y 2 moléculas de NADPH. Sin embargo, el ratio ATP/NADPH es de 1,28 para LEF, no siendo suficiente para llevar a cabo el ciclo de Calvin (Joliot y Joliot, 2002). En las plantas C₃, el transporte de electrones cíclico es especialmente importante bajo condiciones de estrés tales como bajo CO₂, luz de alta intensidad, sequía, o durante la transición de oscuridad a luz. Bajo estas condiciones, el flujo de electrones cíclico permite la acidificación del lumen tilacoidal, que es requerido para la inducción de la síntesis de ATP y de la repuesta del decaimiento no fotoquímico (*NPQ*),

el cual reprime al PSII. El CEF es también importante cuando la fotorrespiración está inducida porque se requiere más ATP para la fijación de CO₂ bajo estas condiciones.

La deficiencia en el flujo de electrones cíclico provoca una menor acidificación del lumen y una disminución del *NPQ*. La sobre-reducción de la cadena de transporte de electrones puede parar este flujo de electrones porque bajo estas condiciones los electrones no tienen a dónde ir. En este caso, ocurre un flujo de electrones pseudo-cíclico en el cual la transferencia de electrones procede desde el agua hasta el PSI con el oxígeno molecular como alternativa actuando como aceptor de electrones. Este proceso es llamado reacción de Mehler y conduce a la creación de superóxido, que es convertido en peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa, y en agua y oxígeno por las peroxidasas y catalasas (ciclo de agua-agua). Este ciclo agua-agua fue propuesto para restablecer el equilibrio redox en condiciones de sobre-reducción (Ort y Baker, 2002).

Las condiciones limitantes de micronutrientes pueden afectar profundamente la transferencia de electrones fotosintéticos. Bajo limitación de azufre, las algas verdes reprimen la actividad del PSII y la evolución de oxígeno (Pollock *et al.*, 2005). Esto conduce a un estado anaeróbico en el cual las actividades del complejo *Cytb₆f* y PSI no disminuyen significativamente para así permitir a las células mantener la síntesis de ATP a través del transporte de electrones cíclico. Además, en condiciones limitantes de azufre aumenta la degradación de almidón, proteínas o lípidos, permitiendo así la producción de electrones que son direccionados al pool de plastoquinonas a través del complejo Ndh-2. Debido a que el ciclo Calvin-Benson, que actúa como el mayor sumidero de electrones, está reprimido bajo condiciones limitantes de sulfuro, esto puede generar un exceso de poder reductor y daño oxidativo.

Es importante resaltar que, además del transporte de electrones fotosintético, existen otras rutas que también proporcionan poder reductor a los plastidios y a la red tiol/disulfuro, como por ejemplo, la ruta de la pentosa fosfato oxidativa y la ruta malato/oxaloacetato a través de la membrana plastídica. Estas rutas son especialmente importantes en oscuridad y en plastos no fotosintéticos (Dietz y Pfannschmidt, 2011).

3.3. Regulación redox en el estroma y lumen del cloroplasto

El poder reductor generado por la cadena de transferencia de electrones fotosintético es utilizado tanto para llevar a cabo reacciones anabólicas del metabolismo como para generar sistemas antioxidantes en la célula (producción de antioxidantes solubles como ascorbato y glutatión) y sistemas regulatorios redox. Todos ellos están interconectados y forman parte de una red de procesos químicos de oxido-reducción.

En el estroma cloroplástico existen cuatro rutas importantes en cuanto a la regulación redox como son las que implican directamente a los donadores de electrones ferredoxina y NADPH, o los que implican proteínas reguladoras como los sistemas de tiorredoxinas (Trx), o el sistema glutatión/glutarredoxina (Dietz y Pfannschmidt, 2011).

Las tiorredoxinas son pequeñas oxidoreductasas muy abundantes de aproximadamente 12 kDa con un sitio activo conservado (W-C-G(P)-C) y una estructura tridimensional común. En *Arabidopsis* se han encontrado más de 20 genes que codifican tiorredoxinas. Basándose en su estructura, pueden ser clasificadas en seis clases: *Trx-h* (citosólica y parcialmente mitocondrial), *Trx-o* (mitocondrial), *Trx-f*, *-m*, *-x*, e *-y* (plastídicas) (Oelze *et al.*, 2008). Las tiorredoxinas son reducidas por enzimas específicas denominadas Fd-Trx-oxido-reductasa (FTR), catalizando la reducción de un grupo ditiol conservado en la Trx que es luego utilizado por la molécula de Trx para transferir el poder reductor a la proteína diana específica, funcionando como transmisores redox. Recientemente se ha identificado la proteína NTRC que actúa como tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH y que es esencial en el control redox en plastidios (Perez-Ruiz *et al.*, 2006; Michalska *et al.*, 2009).

Las tiorredoxinas reducen proteínas dianas a través de puentes difuluro y a menudo producen cambios en el estado de activación de estas proteínas (Lemaire *et al.*, 2007). En términos de la regulación redox celular, el sistema ferredoxina-tiorredoxina es el ejemplo clásico mejor estudiado de control de actividad enzimática dependiente de puentes de disulfuro. Existen al menos seis enzimas del ciclo de Calvin que han sido identificadas que se activan tras iluminación, incluida la Rubisco activasa. Dos tipos de Trx (*-f* y *-m*) han sido identificadas como reguladores clave de esta cascada de señalización por luz a través de un mecanismo que involucra la activación/desactivación de enzimas mediante intercambios tiol/disulfuro (Lemaire *et al.*, 2007).

Además de su papel como reguladores de procesos metabólicos ajustando el estado redox de las proteínas dianas, también participan en mecanismos de defensa antioxidantes como donadores de electrones a peroxirredoxinas (Prx). Las peroxirredoxinas son peroxidasas sin grupo hemo ubicuas localizadas en diferentes compartimentos celulares. En *Arabidopsis* existen 10 posibles genes que codifican para Prx, cuatro de las cuales se localizan en el cloroplasto (2-Cys Prx A y B, Prx Q y PrxII E) (Dietz, 2003). El centro catalítico de las Prx contiene un residuo cisteinil que reduce a diferentes peróxidos conduciendo a la formación de enlaces disulfuros intra- o intermolecular en la Prx o entre dos subunidades de Prx, excepto en el caso de 1-Cys Prx. Las tiorredoxinas y las glutaredoxinas reducen los tioles oxidados y así regenera la Prx activa. A parte de su papel como defensa antioxidante, también se ha sugerido que las Prx tienen un papel importante en la señalización redox (Dietz *et al.*, 2006).

La regulación redox del lumen tilacoidal muestra características opuestas al estroma cloroplástico que puede ser motivo de su origen evolutivo. El espacio intermembrana de la mitocondria y del lumen tilacoidal cloroplástico son descendientes evolutivos del espacio periplásmico de bacteria y por este motivo la oxidación de puentes disulfuros de los residuos de cisteína es utilizado como mecanismo para estabilizar el plegamiento de las proteínas y regular su función (Hermann *et al.*, 2009). Este proceso es opuesto a los otros compartimentos de las células eucarióticas como el estroma, que derivan del citosol bacteriano y que mantiene los residuos de cisteína principalmente reducidos.

El lumen tilacoidal contiene una gran variedad de proteínas entre las que se encuentran numerosas chaperonas e inmunofilinas con actividad PPIasa (peptidil-propil-cis-trans isomerasa). La primera inmunofilina cloroplástica identificada fue FKBP13 en plantas de haba (Luan *et al.*, 1994). Esta proteína fue después caracterizada bioquímicamente y genéticamente en *Arabidopsis* y en el lumen tilacoidal interacciona con la proteína de Rieske (Gupta *et al.*, 2002). La estructura tridimensional de AtFKBP13 revela un par de enlaces disulfuro únicos que están ausentes en los homólogos bacterianos y animales. Los experimentos revelan que las tiorredoxinas del cloroplasto (tipo *-m*) o de *E. coli* reducen específicamente ambos puentes disulfuro en concierto con la pérdida de actividad PPIasa. Estos resultados sugieren que la proteína luminal AtFKBP13 imita a su pareja estromática en la modulación tiol-redox. Sin embargo, el lumen difiere del estroma en el hecho fundamental de que la activación de las enzimas tiene lugar por oxidación en la luz (Figura 7) (Gopalan *et al.*, 2004; Buchanan y Luan, 2005).

Hasta la fecha no se han identificado en el lumen enzimas con actividad sulfidril oxidasas capaces de catalizar la oxidación de proteínas, aunque este proceso podría tener lugar de forma no enzimática e incontrolada debido a la alta concentración de oxígeno que se produce en el lumen durante la fotosíntesis.

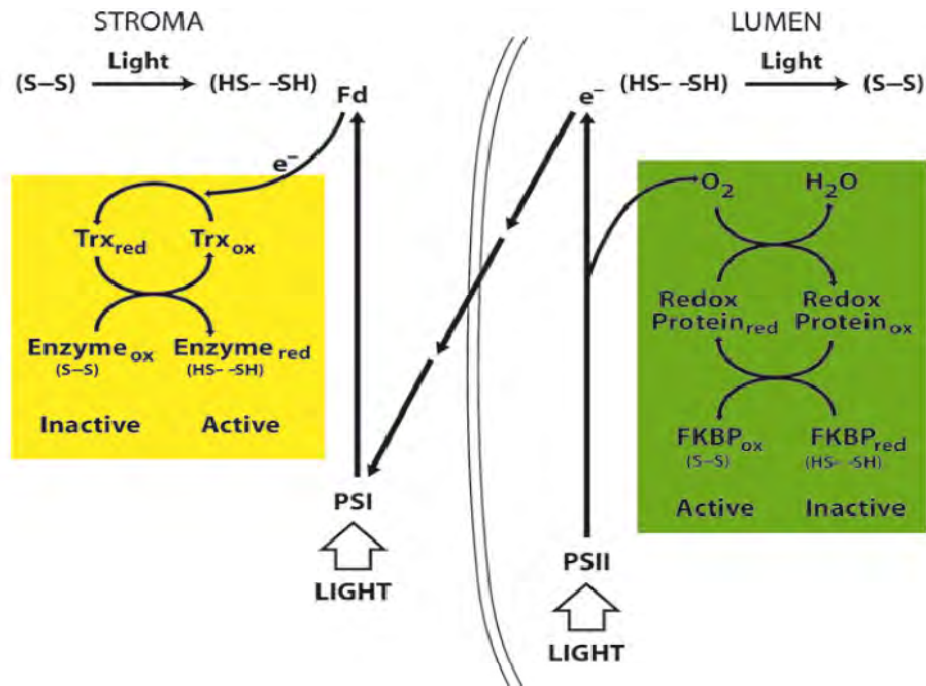


Figura 7. Mecanismo propuesto para la regulación mediada por luz en el estroma y lumen tilacoidal.

Trx: tiorredoxina; PSI: fotosistema I; PSII: fotosistema II; “Redox protein”: proteína no identificada hasta la fecha (Gopalan *et al.*, 2004).

Esta regulación funcional de proteínas por procesos de oxidación también tiene lugar en otras proteínas esenciales como la proteína quinasa STN7 de *Arabidopsis* o STT7 de *Chlamydomonas*. Esta proteína STN7/STT7 está asociada con la membrana tilacoidal y regula los niveles de fosforilación de las proteínas LHCII en respuesta a condiciones cambiantes de luz para ajustar la composición de los fotosistemas PSII y PSI. La actividad quinasa está regulada por el estado redox de los residuos de cisteína conservados en el extremo N-terminal de la proteína, que se localizan en el lado del lumen, siendo activa con los residuos oxidados e inactiva con los residuos reducidos (Lemeille *et al.*, 2009; Pesaresi *et al.*, 2009). Se ha propuesto que estos residuos de cisteína están implicados en la inactivación de las quinasas por un sistema de tiorredoxinas que transmita la señalización redox del estroma al lumen. En este proceso estarían implicadas posiblemente las proteínas tilacoidales CCDA y HCF164 (Puthiyaveetil *et al.*, 2011). La proteína HCF164 fue identificada como una proteína Trx-like anclada en la membrana tilacoidal que presenta su extremo catalítico en el lumen. HCF164 está relacionada con el ensamblaje del complejo *Cytb6f* (Lennartz *et al.*, 2001) y tiene como proteína diana a PsaN (subunidad N del PSI). CCDA es un homólogo de los transportadores procarióticos tiol-disulfuro y es imprescindible para una transferencia de electrones eficiente desde el estroma al lumen (Motohashi y

Hisabori, 2010). El modelo sugiere que CCDA recibe los electrones de la *Trx-m* estromática y los dona a HCF164 que reduce las proteínas diana en el lumen.

II. OBJETIVOS DE LA TESIS

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de las enzimas OASTL de *Arabidopsis thaliana*, con una mayor atención en las enzimas más abundantes y desde un punto de vista de su participación en la ruta primaria de asimilación de sulfato. Sin embargo, no se les había dado ninguna importancia a otras proteínas minoritarias de la misma familia que fueron identificadas por homología de secuencia y a las que se les asignaban funciones auxiliares. Entre estas proteínas minoritarias se encuentra CS26, que junto con la mayoritaria OAS-B, se localiza en los cloroplastos. El objetivo fundamental de la investigación a desarrollar durante la tesis constituyó el estudio detallado de CS26 y su comparación con OAS-B. Para ello se establecieron los objetivos concretos que se detallan a continuación:

1. Caracterización *in vitro* de la proteína CS26 de *Arabidopsis thaliana* mediante la expresión, purificación y análisis enzimático de la proteína recombinante His-CS26 y localización subcelular en cloroplastos.
2. Caracterización de mutantes insercionales de T-DNA en los genes *CS26* y *OAS-B* de *Arabidopsis thaliana* mediante análisis fenotípico, bioquímico, fotosintético, transcriptómico y metabolómico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Bacterias

Durante este trabajo, se han utilizado células competentes de *E. coli*, estirpe DH5 α , proporcionadas por el Servicio de Cultivos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

Para la transformación de las bacterias se añadió el DNA plasmídico (< 100 ng) sobre 200 μ L de células competentes descongeladas. La mezcla se incubó en hielo durante 30 min, para posteriormente someterla a choque térmico (90 s a 42 °C). A continuación, las células se recuperaron mediante incubación durante 1 h en medio LB, a 37 °C y con agitación. Finalmente, se sembraron placas de LB sólido [agar 1,5 % (p/v)] suplementadas con el antibiótico adecuado en cada caso y se incubaron a 37 °C hasta la aparición de los transformantes.

Por otra parte, se utilizaron células de *E. coli*, estirpe DB3.1, para la propagación de plásmidos de destino del kit de clonaje Gateway (Invitrogen); así como células “One Shot TOP10” incluidas en este mismo kit. En estos casos, la transformación de las bacterias se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la expresión de la proteína recombinante CS26 en bacterias, se utilizaron células de *E. coli* BL21 One Shot (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.2. Plantas

1.2.1. *Arabidopsis thaliana*

Para el desarrollo de esta tesis se han utilizado plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia, procedentes del European Arabidopsis Stock Centre (NASC, University of Nottingham, UK).

Por otra parte, se emplearon mutantes insercionales de T-DNA procedentes de las colecciones SALK (Salk Institute Genome Analysis Laboratory) y GABI-kat (German Plant Genome Research Program) obtenidas también a través del NASC (Tabla 2).

Tabla 2. Líneas mutantes utilizadas en este trabajo

| <i>Gen</i> | <i>Línea</i> | <i>Locus</i> | <i>Localización del T-DNA</i> | <i>Expresión</i> |
|-------------|--------------|--------------|-------------------------------|------------------|
| <i>CS26</i> | SALK_034133 | At3g03630 | Exón | Nula |
| <i>CS26</i> | GABI_376E08 | At3g03630 | Exón | Nula |
| <i>OASB</i> | SALK_021183 | At2g43750 | Intrón | Nula |
| <i>OASB</i> | GABI_684B07 | At2g43750 | Exón | Nula |

Por último, también se emplearon plantas complementadas del gen *CS26*. Dichas plantas fueron obtenidas con anterioridad en nuestro laboratorio. Para generar estas líneas la secuencia codificante completa de *CS26* se clóno en el vector pMDC32 con resistencia a higromicina (Curtis y Grossniklaus, 2003) utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen). De esta forma, en la construcción, *CS26* se encuentra bajo el control de un doble promotor CaMV35S.

1.2.2. Esterilización de semillas

En todos los casos, las semillas se lavaron con etanol al 70 % (v/v) durante 5 min, sometiéndolas a continuación a un segundo lavado de 20 min con una solución de NaClO al 20 % (v/v) y Tritón X-100 al 0,1 % (v/v). Por último, las semillas se enjuagaron con agua destilada (5-7 lavados) para eliminar los restos de NaClO y detergente. Para sincronizar su germinación, las semillas se estratificaron durante 24 h a 4 °C.

1.2.3. Cultivo de plantas

Para el cultivo *in vitro* se prepararon placas Petri con medio MS (0,5x) (Murashige y Skoog, 1962), pH 5,6-5,8; suplementadas con vitaminas Gamborg B5 (1x) (Sigma). Como gelificante se empleó agar al 0,8 % (p/v). Las vitaminas se añadieron tras el autoclavado para evitar su degradación. En el caso de los mutantes SALK, las placas se suplementaron con 30 mg/mL de kanamicina, y en el caso de los mutantes GABI con 7,5 mg/mL de sulfadiazina.

De forma rutinaria, también se cultivaron las plantas en sustrato vegetal como medio de siembra y fueron regadas con agua.

1.2.4. Condiciones de cultivo

En los ensayos de régimen de crecimiento de ciclo largo, las plantas se crecieron en cámaras de cultivo (Sanyo) con un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, manteniendo constante la temperatura (20 °C luz/ 18 °C oscuridad), la humedad relativa (70 %) y la intensidad lumínica (120-140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En los ensayos de régimen de ciclo corto, el fotoperiodo empleado fue de 8 h luz/ 16 h oscuridad, conservándose el resto de parámetros inalterados. En el caso de los ensayos de régimen de luz continua, el fotoperiodo empleado fue de 24 h luz, sin modificar el resto de parámetros.

2. Tratamiento del material vegetal

2.1. Tratamiento con metales pesados

El análisis de detección de fitoquelatinas se llevó a cabo en plantas de 3 semanas de crecimiento en tierra que se regaron con agua y CdCl_2 con una concentración final de 250 μM . Después de 3, 6, 10 y 13 días de tratamiento, se recogieron muestras para los análisis posteriores.

2.2. Tratamiento con luz de alta intensidad

Las plantas adultas crecidas en los fotoperiodos de día corto y día largo se expusieron bajo una lámpara de luz de alta intensidad con PPFD de $750 \pm 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a temperatura ambiente en las mismas cámaras de crecimiento donde se encontraban. La temperatura de las hojas debajo de la lámpara aumentó $\leq 5 \text{ }^\circ\text{C}$ en 1 h, correspondiente al máximo tiempo de exposición.

2.3. Tratamiento de sequía

El tratamiento de sequía se realizó en plantas adultas, tanto en condiciones de día largo como de día corto, durante un periodo de 13-18 días, respectivamente, en los que no se realizaba el riego, tras el cual las plantas son nuevamente regadas con agua.

3. Parámetros fotosintéticos

3.1. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos

Para la determinación de clorofila total en la fracción de los cloroplastos se preparó una dilución 1/100 en acetona a partir de la solución enriquecida de cloroplastos en la solución II (ver apartado 5.1.3), y se centrifugó a 2500 g durante 5 min. Para la

determinación en hojas, se extrajo 0,1 g de peso fresco de hojas con acetona. La densidad óptica se midió a 652 nm, considerando un coeficiente de extinción de 34,5 $\text{mg}^{-1}\text{mL}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El contenido de clorofila a/b y carotenoides se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en trabajos previos (Lichtenthaler, 1987).

3.2. Análisis de la eficiencia fotosintética

3.2.1. Cuantificación de la emisión de fluorescencia de clorofila *in vivo* mediante “Fluorimager”

Las imágenes de fluorescencia de clorofila en plantas enteras *in vivo* se obtuvieron mediante un “chlorophyll fluorescent imaging system” (Fluorimager, Technologica). Se aplicó un régimen programado de tiempos de exposición de luz actínica (150 y 800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), pulsos de luz saturada y periodos de oscuridad. Mediante el software se realizaron automáticamente el cálculo de los parámetros descritos en la Tabla 3 (Baker, 2008). qL fue calculado después de las medidas a partir de las imágenes obtenidas de Fq'/Fm' , Fo' , y F' .

Tabla 3. Parámetros fotosintéticos utilizados en el estudio de la reacción fotoquímica del PSII mediante Fluorimager.

PSII: Fotosistema II. Q_A : aceptor quinona primario del PSII.

| Parámetro | Definición | Relevancia Fisiológica |
|-------------------------------|--|--|
| F, F' | Emisión de fluorescencia de hojas adaptadas a la oscuridad o a la luz, respectivamente | Proporciona poca información |
| F_o, F_o' | Fluorescencia mínima de hojas adaptadas a la oscuridad y a la luz, respectivamente | Nivel de fluorescencia cuando Q_A está oxidada al máximo |
| F_m, F_m' | Fluorescencia máxima de hojas adaptadas a la oscuridad y a la luz, respectivamente | Nivel de fluorescencia cuando Q_A está reducida al máximo |
| F_v, F_v' | Fluorescencia variable de hojas adaptadas a la oscuridad y a la luz, respectivamente | Demuestra la capacidad del PSII de realizar la reacción fotoquímica |
| Fq' | Diferencia en fluorescencia entre Fm' y F' | Extinción de fluorescencia fotoquímica |
| Fv/Fm | Eficiencia cuántica máxima del PSII | Eficiencia máxima a la cual la luz absorbida por el PSII es usada para la reducción de Q_A |

| Parámetro | Definición | Relevancia Fisiológica |
|------------------|--|--|
| Fq'/Fm' | Eficiencia operativa del PSII | Estima la eficiencia a la cual la luz absorbida por el PSII es usada para la reducción de Q_A |
| Fv'/Fm' | Eficiencia máxima del PSII | Estimación de la eficiencia máxima de la reacción fotoquímica del PSII a una PPFD dada. Es la eficiencia de operación del PSII si todos los centros estuviesen abiertos (Q_A oxidada) |
| Fq'/Fv' | Factor de eficiencia del PSII | También llamada qP . Relaciona la eficiencia máxima del PSII con la eficiencia operativa del PSII |
| NPQ | Non-photochemical Quenching (decaimiento no fotoquímico) | Monitoriza la constante de velocidad aparente de pérdida de calor del PSII |
| qL | Fracción de centros del PSII que están "abiertos" | Estima la fracción de los centros abiertos del PSII (con Q_A oxidada) |

3.2.2. Análisis fotosintético mediante intercambio de gases y fluorescencia de clorofila

Para medir los parámetros de fluorescencia de clorofila también se utilizó un analizador de intercambio de gases “Li-6400 Infra Red Gas Analyzer” (Licor Inc.). Las hojas no escindidas de la planta fueron expuestas a PPF_D 750 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 45 minutos usando una fuente de luz blanca que incidía sobre un área total de 2 cm^2 . La temperatura de la cámara del IRGA se mantuvo constante a 22 °C. El programa utilizado para obtener las medidas de fluorescencia contenía un periodo de oscuridad de 20 minutos, seguido de periodos de luz actínica y de pulsos de luz saturados, tomándose medidas cada 2 minutos, durante 6 ciclos. El cálculo de los parámetros Fv'/Fm' , Fq'/Fm' , Fv'/Fm' , y NPQ se realizó automáticamente mediante el software de LICOR.

Los parámetros de intercambio de gases fueron determinados de forma simultánea con las medidas de fluorescencia de clorofila usando el mismo equipo Li-6400. Todas las medias fueron realizadas en la misma hoja a una temperatura de 22 °C usando una cámara de hoja de 2 cm^2 . Las curvas A_N-C_i fueron obtenidas en diferentes hojas de las líneas mutante y silvestre. En hojas adaptadas a la oscuridad, la fotosíntesis fue iniciada con una concentración de CO_2 (C_i) de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ y una PPF_D de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La cantidad de luz azul fue ajustada a 10 % de PPF_D para maximizar la apertura de los estomas. La temperatura de la cámara fue mantenida a 22 °C, con un

déficit de presión de vapor entre 1,2 y 1,8 kPa. Una vez que se alcanzó el equilibrio, se determinaron las curvas de respuesta a CO₂. Las medidas de intercambio de gases y fluorescencia se realizaron a 400 μmol CO₂ mol⁻¹ aire, y posteriormente la concentración de CO₂ se redujo secuencialmente hasta 50 μmol CO₂ mol⁻¹ aire. Una vez finalizadas las medidas a bajo CO₂ se retorno a 400 μmol CO₂ mol⁻¹ aire y se fue incrementando la concentración C_i secuencialmente hasta 1500 μmol mol⁻¹. La corrección de posibles fugas de la cámara de medida se realizó en tres curvas A_N-C_i, dos de ellas con la cámara vacía y una de ellas con hojas fotosintéticamente inactivas obtenidas por calentamiento a 100 °C hasta que no se observó fluorescencia en la hoja. En las curvas de luz (A_N-PAR), las hojas no escindidas de la planta fueron expuestas a un programa donde se utilizó diferentes intensidades lumínicas desde 0 a 2000 μmol m⁻² s⁻¹, a una temperatura constante de 22 °C y 400 μmol CO₂ mol⁻¹ aire. El cálculo de los parámetros de conductancia estomática, tasa fotosintética, C_i, F_v/F_m, F_q'/F_m', F_v'/F_m', NPQ, etc., se realizó automáticamente mediante el software de LICOR (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros fotosintéticos utilizados en el estudio del intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila del PSII mediante IRGA.

| Parámetro | Definición |
|--------------------------|---|
| A_N | Tasa fotosintética neta (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) o tasa neta de incorporación de CO ₂ |
| gs | Conductancia de CO ₂ estomática (mol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) |
| gm | Conductancia de CO ₂ del mesófilo (mol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹ bar ⁻¹) |
| E | Transpiración (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) |
| α | Absorbancia de la hoja |
| β | Refleja la distribución de los electrones entre cada uno de los fotosistemas PSI y PSII |
| C_i | Concentración de CO ₂ intercelular (μmol CO ₂ mol ⁻¹) |
| Ca | Concentración de CO ₂ ambiental (μmol CO ₂ mol ⁻¹) |
| Cc | Concentración de CO ₂ en el cloroplasto (μmol CO ₂ mol ⁻¹) |
| V_{c,max} | Velocidad máxima de carboxilación de la Rubisco (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) |
| J_{max} | Tasa de transporte de electrones máximo (μmol e ⁻ m ⁻² s ⁻¹) |

| Parámetro | Definición |
|-----------------------------|---|
| ETR | Tasa de transporte de electrones ($\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) |
| I^* | Punto de compensación de CO_2 en ausencia de respiración mitocondrial |
| R_{day} | Tasa de respiración mitocondrial ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) |
| Rendimiento cuántico | Concentración de CO_2 asimilado por cada mol de fotones de luz ($\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1} \text{hv}$) |
| PAR-abs | Radiación fotosintéticamente activa que es absorbida por la hoja ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) |
| PAR-abs/ETR | Concentración de fotones de luz necesarios para la conversión de 1 mol de electrones ($\text{mol E mol}^{-1} \text{e}^-$) |

4. Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos

4.1. Plásmidos utilizados

Se utilizó el vector de entrada Gateway (Invitrogen) pENTRY/D-TOPO para la clonación de la región codificante de la proteína madura CS26, y el vector de destino Gateway pDEST17, con resistencia a ampicilina, para la expresión en bacterias de la proteína recombinante con una cola de His en el extremo aminoteminal.

Para la generación de la línea complementada de CS26 se utilizó el plásmido pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003) compatible con la tecnología Gateway (Invitrogen), que permite que CS26 esté bajo el control de un doble promotor CAMV35S y confiere a las plantas resistencia a higromicina.

4.2. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

En general, para las reacciones en cadena de la polimerasa se empleó Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Siguiendo las indicaciones de la casa comercial, la mezcla de reacción contenía, además del DNA o cDNA molde, MgCl_2 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos directo y reverso 0,5 μM cada uno (Tabla S1), DNA polimerasa 2,5 U y el correspondiente tampón comercial 1x. Las condiciones de reacción constaron de una etapa inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguida de 30-35 ciclos sucesivos de desnaturalización (1 min, 94 °C), hibridación (1 min, 45-65 °C) y extensión (1 min, 72 °C), y una etapa final de elongación de 5 min a 72 °C.

4.3. Electroforesis de DNA

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 % (p/v) en tampón TBE (0,5x), teñidos con bromuro de etidio 1 µg/mL y separados electroforéticamente con una corriente eléctrica de 100 V. Las muestras se cargaron en presencia de tampón de carga.

Tampón de carga: Azul de bromofenol 0,25 % (p/v) y ficoll 15 % (p/v).

4.4. Secuenciación de DNA

Las secuenciaciones de DNA realizadas durante este trabajo se llevaron a cabo en el Servicio de Genómica de la empresa Newbiotechnic, S.A.

4.5. Extracción de RNA

El RNA total para RT-PCR y qPCR se aisló de hojas de *Arabidopsis* utilizando el kit comercial “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante. El DNA se eliminó mediante tratamiento en columna con DNasa I libre de RNasa (RNase-free DNase Set, Qiagen), según el protocolo recomendado por el kit.

Para los ensayos de hibridación con micromatrices de DNA, la extracción del RNA se realizó utilizando “Trizol Max Reagent” (Invitrogen). Brevemente, se homogeneizó el material triturado en N₂ líquido (50-100 mg) con 1 mL del reactivo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación se le añadió 200 µL de cloroformo y se centrifugó a 950 g durante 15 min a 4°C. Por último, el RNA se precipitó con isopropanol, y el precipitado se resuspendió en 100 µL de agua tratada con DEPC. A continuación, los RNAs aislados se sometieron a un último paso de limpieza con el kit “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen), tratándose posteriormente con DNasa libre de RNasa (“RNase-free DNase I Set”, Qiagen) según las indicaciones del fabricante.

Los RNAs se cuantificaron mediante la determinación de la absorbancia a 260 nm, a excepción de aquellos destinados al análisis por qRT-PCR y chips de DNA. En el primer caso, la calidad y concentración del RNA se determinó utilizando el sistema de electroforesis automatizada Experion (Bio-Rad). En el segundo, se empleó el Bioanalyzer 2100 (Agilent).

4.6. Síntesis de cDNA

Una vez aislado y cuantificado el RNA según se ha descrito con anterioridad, se procedió a la síntesis de cDNA mediante reacción de transcripción reversa con el kit “SuperScript™ First-Strand” (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se empleó oligo dT como cebador de la reacción.

4.7. Análisis de RNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Se analizó la expresión de distintos genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada gen utilizando los programas “Vector NTI Advance 10” (Invitrogen). Todos los oligos debían tener una T_m de 60 ± 1 °C, un contenido de G y C entre 40-50 % y dar lugar a un amplicón de 80-100 pb.

Para la reacción de qPCR se utilizó el kit “iQ SYBR Green Supermix” (Bio-Rad), usando un termociclador iQ™5 (Bio-Rad). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ L conteniendo: “iQ SYBR Green Supermix” 1x, oligonucleótidos directo y reverso 100 nM cada uno y cDNA 1 ng/ μ L. Se realizaron dos réplicas experimentales por muestra y tres réplicas biológicas independientes para cada condición. Previo a cada reacción de qPCR se analizó la integridad del cDNA, mediante esta misma técnica, utilizando parejas de oligonucleótidos diseñados en los extremos 5' y 3' del gen de expresión constitutiva *GADPH* (codifica la subunidad C de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) (Tabla S1).

El programa de PCR utilizado constaba de una etapa inicial de desnaturalización de 10 min a 95 °C, seguida de 45 ciclos sucesivos de desnaturalización (15 s, 95 °C) e hibridación (1 min, 60 °C). Para confirmar la presencia de un único producto de amplificación, así como la ausencia de dímeros de los oligonucleótidos, se analizaron las curvas de disociación de cada uno de los amplicones (55-90 °C, ΔT : 0,3 °C s⁻¹).

Los niveles de expresión de los distintos genes se calcularon mediante cuantificación relativa respecto a los valores obtenidos para la línea silvestre (calibrador). Se utilizó como control normalizador el gen *UBQ10* (que codifica la poliubiquitina 10) de expresión constitutiva en *A. thaliana*. Las veces de cambio para cada gen se calcularon mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

$$\begin{aligned}\Delta Ct (\text{muestra}) &= Ct (\text{muestra}) - Ct (\text{normalizador}) \\ \Delta Ct (\text{calibrador}) &= Ct (\text{calibrador}) - Ct (\text{normalizador}) \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct (\text{muestra}) - \Delta Ct (\text{calibrador}) \\ \text{Veces de cambio} &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

Los resultados obtenidos se presentan como el valor medio de las veces de cambio \pm desviación estándar.

4.8. Análisis de perfiles transcripcionales mediante micromatrices de DNA

Se analizaron los perfiles transcripcionales de hojas de plantas silvestres y mutantes *cs26* crecidas bajo las condiciones de regímenes de día largo y día corto. Se extrajo RNA de hojas utilizando el método del “Trizol Max Reagent” (apartado 4.5). Se realizaron tres réplicas biológicas independientes por línea y por condición.

La síntesis de cDNA, el marcaje de cRNA y la hibridación de los chips ATH1 de Affymetrix se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB, Madrid), utilizando los protocolos recomendados por Affymetrix. De igual manera, el análisis de los valores obtenidos se realizó en esta misma unidad, utilizando el software affyImGUI R (Wettenhall *et al.*, 2006).

Para la normalización de los datos se empleó el método RMA (“Robust Microarray Average”) (Irizarry *et al.*, 2003). El análisis estadístico de las diferencias de expresión génica se llevó a cabo siguiendo la metodología Limma (“Linear Models for Microarrays Data”), que forma parte del programa AffyImGUI. Los valores de P se corrigieron utilizando el método de Benjamini-Hochberg (Klipper-Aurbach *et al.*, 1995; Reiner *et al.*, 2003), considerándose estadísticamente significativos sólo aquellos que presentaban valores de FDR menores de 0,05. También se adoptó como valor de corte dos veces de cambio, así como $\lg \text{Señal} > 7$ para discriminar aquellos genes con la expresión alterada.

La clasificación de los genes en categorías funcionales se realizó utilizando el software Map-Man (<http://gabi.rzpd.de/projects/Map-Man/>) (Thimm *et al.*, 2004) y las bases de datos de TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) y de Bio-Array Resource (<http://bar.utoronto.ca/>).

5. Aislamiento y análisis de proteínas

5.1. Extracción de proteínas

5.1.1. Extracción de proteínas de bacterias

Los cultivos celulares se centrifugaron a 5000 g durante 5 min. El precipitado de células se resuspendió en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8 y las células se sonicaron aplicando 3 pulsos de 10 s, alternándolos con 10 s de descanso al 20 % de amplitud en

un sonicador Branson. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación durante 8 min a 5000 g, es usado como extracto crudo.

5.1.2. Extracción de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*

De forma rutinaria, para la extracción de proteínas totales de hojas se trituró el material vegetal (aproximadamente 300 mg de hojas) con N₂ líquido y el material triturado se homogenizó en tampón de extracción (1,5 mL por gramo de tejido). El extracto crudo se obtuvo tras centrifugación durante 15 min a 21.400 g y 4 °C. Para las actividades enzimáticas OASTL y SSCS, se utilizó el tampón de extracción I. Para las actividades enzimáticas CAS y LCD se utilizó el tampón de extracción II.

Tampón de extracción I: Tampón fosfato 50 mM pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 µM PLP y 0.5 mM PMSF.

Tampón de extracción II: Tris-HCl 20 mM pH 8.

5.1.3. Aislamiento de cloroplastos y extracción de proteínas

La obtención de una preparación enriquecida en cloroplastos se realizó a partir de 20 g de hojas homogeneizadas en presencia de 170 mL de solución I. La suspensión obtenida se filtró por 4 capas de malla de nylon (20 µm) y se centrifugó durante 5 min a 4 °C y 1.000 g. A continuación, el precipitado se resuspendió en 6 mL de solución II. La integridad de los cloroplastos se comprobó por visualización en un microscopio óptico (Olympus BX60). Se determinó en cada caso la concentración de clorofila y el conteo de cloroplastos mediante una cámara de Neubauer. Para el análisis mediante LC/MS, la suspensión de cloroplastos se volvió a centrifugar durante 5 min a 4 °C y 1.000 g, y el precipitado se resuspendió en 1,5 mL de HCl 0,1 N y 0,1 % ácido fórmico, se centrifugó y se pasó a través de un filtro de 0,22 µm. Todo el proceso se llevó a cabo en frío.

Para el aislamiento del estroma y del lumen tilacoidal, el precipitado de cloroplastos se resuspendió en un medio hipotónico, y se incubó a 4 °C durante 2 h. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 7500 g. El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción estromática, siendo el precipitado la fracción correspondiente a los tilacoides. Este precipitado se resuspendió en un volumen de 7,5 mL de solución III y se centrifugó a 7500 g durante 15 min. Se realizó tres lavados consecutivos con esta solución III. A continuación, el precipitado se volvió a resuspender en 15 mL de solución IV, y se centrifugó a 7500 g durante 30 min. Se realizó dos lavados con la solución IV. Por último, se resuspendió en 10 mL de solución V, y se centrifugó a 7500 g durante 20 min. Se realizó dos lavados consecutivos con la solución V. El precipitado

con la fracción tilacoidal resultante se resuspendió en un volumen pequeño de solución V, y se realizó su rotura utilizando una prensa French a 900 psi. Se repitió el proceso tres veces. Seguidamente, se ultracentrifugó durante 12-14 h a 200.000 g y 2 °C. Se realizó una segunda ultracentrifugación del sobrenadante obtenido en el paso anterior bajo las mismas condiciones durante 1 h para eliminar posibles partículas residuales, siendo el sobrenadante final la fracción soluble del lumen.

En las fracciones de estroma y lumen, las proteínas se concentraron mediante precipitación con ácido tricloroacético. Así, se mezcló el volumen correspondiente a 200 µg de proteínas de extracto crudo con 0,1 volúmenes de ácido tricloroacético 100 % y se incubó durante 30 min en hielo. Tras centrifugar la muestra durante 20 min a 16.000 g, el precipitado se lavó con acetona y se volvió a centrifugar en las condiciones indicadas anteriormente. Por último, una vez seco, el precipitado se resuspendió en 100 µL de tampón de rehidratación para el análisis mediante electroforesis bidimensional, o en 50 µL de tampón de extracción III, para análisis mediante Western Blot. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4 °C.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) en todos los casos.

Solución I: Tricina-NaOH 20 mM, pH 8,4; sorbitol 300 mM, EDTA 10 mM, KCl 10 mM, BSA 0,25 % (p/v), ascorbato sódico 4,5 mM.

Solución II: Hepes-NaOH 20 mM, pH 7,8; sorbitol 300 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 2,5 mM y KCl 10 mM.

Medio hipotónico: Hepes-KOH 10 mM, pH 7,9, MgCl₂ 4 mM, cocktail de inhibidores de proteasas (Bio-Rad).

Solución III: Pirofosfato sódico 10 mM, pH 7,8.

Solución IV: Tricina 2 mM, pH 7,8, sacarosa 300 mM.

Solución V: Fosfato sódico 30 mM, pH 7,8, NaCl 50 mM, MgCl₂ 50 mM, sacarosa 100 mM.

Tampón de extracción III: Tris 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM

Tampón de rehidratación: Urea 8 M, CHAPS 2 % (v/v), DTT 50 mM, anfolitos Bio-Lytes 0,2 % (v/v) (Bio-Rad), pH 3-10 y trazas de azul de bromofenol.

5.2. Expresión de proteína en bacterias y purificación por cromatografía de afinidad

Para la expresión de la proteína CS26 en bacterias se transformaron células químicamente competentes BL21-AI One Shot (Invitrogen) con 5 µL de DNA del plásmido CS26-pDEST17 previamente descrito en el apartado 4.1, y se sembraron en placas que contenían 100 µg/mL ampicilina, incubándose durante toda la noche a 37 °C.

Una vez se obtuvieron las células transformadas, se inoculó 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) que contenía 100 µg/mL de ampicilina con una única colonia. Este pre-inóculo se incubó a 37 °C con agitación hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm entre 0,6 y 1,0. Este cultivo se utilizó para inocular medio LB fresco que contenía 100 µg/mL de ampicilina mediante dilución 1/20 del cultivo inicial, y se incubó a 28 °C con agitación. Cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica de 0,4 a 600 nm, se dividió en dos: a uno de ellos se le añadió L-arabinosa a una concentración final de 0,2 %, induciéndose así la expresión de la proteína. El otro cultivo se tomó como control no inducido. Se continuó la incubación a 28 °C con agitación, tomándose alícuotas de 500 µL a distintos tiempos de cada cultivo. Las alícuotas de 500 µL se centrifugaron y los precipitados se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % con SDS como se describe posteriormente, y posterior tinción para determinar el tiempo en el que la inducción de la proteína era máxima.

Una vez establecido el tiempo de inducción, se realizó la expresión en un volumen final de cultivo de 100 mL. A continuación, el cultivo de bacterias se centrifugó a 5000 g durante 5 min y se resuspendió en 8 mL de tampón Tris-HCl 20 mM. El extracto crudo de proteínas se obtuvo por sonicación del cultivo de bacterias, seguido de centrifugación durante 10 min a 4 °C.

La purificación de la proteína recombinante se llevó a cabo utilizando una columna con un relleno de Ni-NTA (Invitrogen), el cual está diseñado para la purificación de proteínas recombinantes con una cola de 6 histidinas, debido a su afinidad para unirse al níquel. Para poder preservar la actividad de la proteína, la purificación se realizó en un tampón en condiciones nativas siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto crudo obtenido (8 mL) se añadió a una columna que contenía 1,5 mL de resina Ni-NTA, y se incubó con agitación suave durante 1 h. Una vez transcurrido este tiempo, la resina se decantó mediante centrifugación a 800 g durante 1 min, y el sobrenadante se eliminó mediante aspiración. Se realizaron cuatro lavados de forma consecutiva con 8 mL de tampón de lavado. Por último, la proteína se eluyó con un tampón de elución. Se recolectaron fracciones de 1 mL y se analizaron mediante SDS-PAGE.

Tampón de lavado: NaH₂PO₄, 50 mM, pH 8; NaCl 100 mM, Imidazol 20 mM.

Tampón de elución: NaH₂PO₄, 50 mM, pH 8; NaCl 100 mM, Imidazol 250 mM.

5.3. Detección inmunológica de proteínas mediante Western Blot

Para la detección inmunológica de CS26 mediante Western Blot se utilizó un anticuerpo policlonal primario anti-CS26 de conejo obtenido a partir de preparaciones

purificadas de la proteína CS26 recombinante, y realizado por la empresa Biomedal S.L. Realizando diferentes ensayos con la proteína recombinante, se puso a punto el título adecuado y la fracción de IgG que mostraba mayor especificidad.

Las muestras de proteínas (50 µg) se mezclaron con tampón de carga, se desnaturalizaron a 100 °C durante 2 min y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % (p/v) con SDS; según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente.

Una vez separadas, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF (“Immun-Blot PVDF”, Bio-Rad) usando el sistema de transferencia “Nova-blot 2117 Multiphor semidry system” (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras finalizar la transferencia, la membrana se lavó durante 5 min con tampón PBS-Tween y se trató con solución de bloqueo durante 2 h. Una vez pasado este tiempo, la membrana se lavó tres veces durante 5 min con la solución PBS-Tween. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-CS26 de *A. thaliana* (1:30.000) en la solución de bloqueo durante 12 h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, la membrana se sometió de nuevo a 3 lavados de 5 min con la solución PBS-Tween. Seguidamente, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo, 1:10.000) conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) en la solución de bloqueo. Tras dos horas a temperatura ambiente, la membrana se sometió a 3 lavados de 5 min cada uno con la solución PBS-Tween. Todos los pasos anteriores se llevaron a cabo en agitación suave.

Por último, la membrana se incubó en la solución de revelado. Para ello, se utilizó el kit ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit (Amersham, GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La visualización de las bandas se llevó a cabo en un sistema de documentación de geles “Molecular Imager Gel Doc XR System” (BioRad).

Tampón de carga: Tris-HCl 60 mM, pH 6,8; glicerol 10% (v/v), SDS 2 % (p/v), β-mercaptoetanol 5 % (v/v) y azul de bromofenol 0,01 % (p/v).

Tampón de transferencia: Tris 2,5 mM, pH 8,0; glicina 19,2 mM, SDS 0,1 % y metanol 20 %.

Tampón PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4.

Solución de bloqueo: Leche en Polvo Desnatada 5 % (p/v) en PBS-T.

Solución PBS-Tween: Tampón PBS, Tween20 0,1 % (v/v).

5.4. Análisis de proteínas mediante electroforesis bidimensional

5.4.1. Isoelectroenfoque (IEF)

Para la separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico se utilizaron tiras “Ready Strip IPG2” (Bio-Rad) de 18 cm de longitud y con un rango no lineal de pH de 3 a 10. Todo el proceso se llevó a cabo en el sistema de isoelectroenfoque “Protean IEF Cell” (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante. Previo al uso del isoelectroenfoque, las tiras, en presencia de 200 µg proteína, se sometieron a rehidratación pasiva con tampón de rehidratación. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en 3 fases: S1: 250V, 15 min; S2: 10.000 V, 1 h y S3: 10.000 V, hasta alcanzar 40.000 V. La intensidad eléctrica se fijó a 50 µA/tira IPG2 para evitar el calentamiento del sistema.

Previo a la segunda dimensión, las tiras IPG2 se equilibraron para evitar la aparición de puntos difusos. El proceso constó de dos pasos: una primera etapa de reducción de los grupos sulfidrilos de las cisteínas (15 min, tampón de equilibrado I) y un segundo paso de alquilación de estos grupos, para evitar su posible oxidación a lo largo del proceso (15 min, tampón de equilibrado II). Por último, las tiras se lavaron con tampón de electroforesis.

Tampón de rehidratación: Urea 8 M, CHAPS 2 % (v/v), DTT 50 mM, anfolitos Bio-Lytes 0,2 % (v/v) (Bio-Rad), pH 3-10 NL y trazas de azul de bromofenol.

Tampón de equilibrado I: Tris-HCl 0,4 M, pH 8,8; urea 6 M, SDS 2 % (p/v), glicerol 20 % (v/v) y DTT 2 % (p/v).

Tampón de equilibrado II: Tris-HCl 0,4 M, pH 8,8; urea 6 M, SDS 2 % (p/v), iodoacetamida 2,5 % (p/v) y glicerol 20 % (v/v).

Tampón de electroforesis: Tris-HCl 25 mM, pH 8,3; glicina 0,2 M y SDS 0,1 % (p/v).

5.4.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La separación en la segunda dimensión se hizo en función de los pesos moleculares de las proteínas. Para ello, las tiras “Ready Strip IPG2” (Bio-Rad) procedentes del isoelectroenfoque se pusieron en horizontal sobre geles de poli(acrilamida) al 12 % (p/v) y SDS (Laemmli, 1970). Las tiras se fijaron a los geles con una solución de agarosa 0,5 % (p/v), Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,1 % (p/v) y trazas de azul de bromofenol. La electroforesis se llevó a cabo a 240 V y 35 mA/gel, durante 5 h. Para el proceso se utilizó un sistema “Protean II xi Cell” (Bio-Rad) con refrigeración por circulación de agua fría.

Para la visualización de las proteínas, los geles se tiñieron con nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por el comerciante, utilizándose el “SilverStaining kit

Protein” (HealthCare). A continuación, los geles se escanearon en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad). El análisis y cuantificación de las imágenes se realizó con ayuda del programa “PDQuest 2D Analysis software” (Bio-Rad).

Tampón de electroforesis: Tris-HCl 25 mM, pH 8,3; Gly 0,2 M y SDS 0,1 % (p/v).

5.4.3. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La identificación de proteínas se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Una vez identificados los puntos peptídicos de interés, se extrajeron de los geles con el sistema “ExQuest Spot Cutter” (Bio-Rad). Se eliminó el teñidor mediante incubación de las bandas en acetonitrilo durante 10 min y, por último, se secaron a vacío durante 15 min.

A continuación, se llevó a cabo la digestión triptica de las proteínas utilizando 15 µL de tampón de digestión. Tras 30 min de incubación a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadió 10 µL de NH₄HCO₃ 50 mM, manteniéndose durante 15 h a 37 °C. Trascurrido este tiempo, la reacción se paró por adición de 20 µL de TCA 0,5 % (v/v).

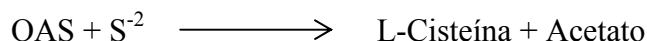
La huella dactilar peptídica se obtuvo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics). El análisis se llevó a cabo a partir de 0,5 µL de muestra, utilizando “Peptide Calibration Standard” (Bruker Daltonics) para la calibración externa y los productos de autodigestión con tripsina para la interna. Tanto la asignación de los picos como el procesado de datos se realizaron empleando el programa MASCOT (Matriz Science) y las bases de datos NCBI nr. Los parámetros de búsqueda incluyeron la carbamidometilación de cisteínas y la oxidación de metioninas.

Tampón de digestión: Tripsina 0,013 µg/µl y NH₄HCO₃ 50 mM; pH 7.8.

6. Determinación de actividades enzimáticas

6.1. Actividad O-Acetilserina(tiol)liasa (OASTL)

La enzima OASTL cataliza la reacción de producción de cisteína por incorporación de sulfuro al esqueleto carbonado de la O-acetilserina.



La medida de esta actividad enzimática se llevó a cabo por determinación colorimétrica de la cisteína producida en presencia de ninhidrina (Gaitonde, 1967).

Se añadió un volumen de extracto crudo equivalente a 100-200 µg de proteína total a la mezcla de reacción, con un volumen final de 900 µL. Tras un periodo de incubación de 10 min a 30 °C, la reacción se detuvo añadiendo 50 µL de ácido tricloroacético 20 % (v/v) (Barroso *et al.*, 1995).

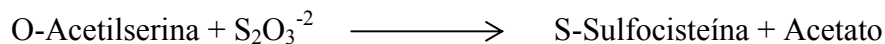
Para la determinación de L-cisteína formada, se añadió 0,2 mL de ácido acético glacial y 0,2 mL de reactivo de ninhidrina, a los 900 µL de mezcla procedente del paso anterior. Tras calentar a 100 °C durante 10 min, la mezcla se enfrió en un baño de agua y se le añadió 4,5 mL de etanol al 96 % (v/v). Por último, se midió la absorbancia a 560 nm ($\epsilon_{560\text{nm}} = 6,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de L-cisteína por minuto.

Mezcla de reacción: Tampón fosfato potásico 33 mM, pH 7,5; OAS 13 mM y Na₂S 6,7 mM.

Reactivo de ninhidrina: Ninhidrina 2,5 g/L, ácido acético 60 % (v/v) y HCl 40 % (v/v).

6.2. Actividad S-Sulfocisteína sintasa (SSCS)

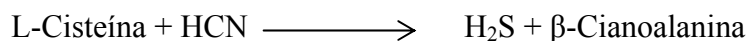
La actividad S-sulfocisteína sintasa se llevó a cabo mediante determinación colorimétrica de la desaparición de tiosulfato a 460 nm, debido a la formación de S-sulfocisteína en presencia de O-acetilserina. La reacción que cataliza la enzima es la siguiente:



La mezcla de reacción consistió en 200 µmoles de tampón Tris-HCl, pH 8,0, 15 µmoles de Na₂S₂O₃, 60 µmoles de O-acetilserina y la cantidad de enzima adecuada en un volumen total de 1,5 mL. Después de pre-incubar la muestra durante 30 s a 30 °C, la reacción se inició mediante la adición de O-acetilserina, y la mezcla de reacción se incubó a 30 °C durante 30 min. Se tomó 0,2 mL de la mezcla de reacción, a los cuales se adicionó 0,2 mL de etanol y 2 mL de agua. De la mezcla diluida, se utilizó 1 mL para la determinación colorimétrica mediante el método descrito por Sörbo (Sorbo, 1957), donde se mide el consumo de tiosulfato mediante la reducción de la absorbancia a 460 nm ($\epsilon_{460\text{nm}} = 1,55 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza el consumo de 1 µmol de tiosulfato por minuto.

6.3. Actividad β-Cianoalanina sintasa (CAS)

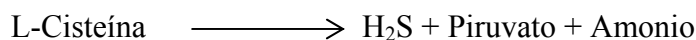
La actividad β-Cianoalanina sintasa se analizó por determinación colorimétrica de la formación de sulfhídrico (Papenbrock y Schmidt, 2000; Meyer *et al.*, 2003). La reacción que cataliza la enzima es la siguiente:



Para la determinación de la misma se utilizó un volumen final de ensayo de 1 mL, en los que se añaden 10 μmoles de KCN, 100 μmoles de Tris-HCl (pH 9), 0,8 μmoles de L-cisteína y la cantidad adecuada de la enzima. La mezcla de reacción se incubó durante 15 min a 30 °C. A continuación la reacción se detuvo con 100 μL de FeCl_2 30 mM y 100 μL de NN-DPDD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina dihidrocloruro) 20 mM (Riemenschneider *et al.*, 2005). Posteriormente, esta mezcla se incubó en oscuridad durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 21400 g, durante 5 min a temperatura ambiente y se midió la densidad óptica a 670 nm ($\epsilon_{670\text{nm}} = 15 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$). Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de sulfhídrico por minuto.

6.4. Actividad L-Cisteína desulfhidrasa (LCD)

En esta actividad se determina la formación de ácido sulfhídrico a partir de L-cisteína como en el caso de la actividad β -Cianoalanina sintasa (CAS). La reacción que cataliza la enzima es:



Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó un volumen final de ensayo de 1 mL, al que se añadió 100 μmoles de Tris-HCl (pH 9), 2,5 μmol de ditioneol, 1 μmol de L-cisteína y la cantidad adecuada de extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 15 min y se detuvo la reacción de la misma forma que la descrita anteriormente para la actividad CAS (Riemenschneider *et al.*, 2005).

La mezcla se incubó en oscuridad durante 20 min a temperatura ambiente, y transcurrido este tiempo, se centrifugó a 21400 g, durante 5 min. La formación de azul de metileno se determinó a 670 nm ($\epsilon_{670\text{nm}} = 15 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$). Una unidad de actividad L-Cisteína desulfhidrasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de sulfhídrico por minuto.

7. Análisis de metabolitos

7.1. Parámetros generales

La mayoría de los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas. El cromatógrafo de HPLC que se

usó fue un Ultimate 3000 (Dionex), acoplado a una trampa iónica Esquire 3000 con una fuente de ionización por electrospray (ESI) (Bruker Daltonics). Todo el sistema estuvo controlado por el paquete de software HyStar (versión 3.2, Bruker Daltonic) y los datos se procesaron con “Data Analysis Software” (versión 3.2, Bruker Daltonic).

Para optimizar la señal de los analitos a identificar en el espectrómetro de masas, se realizó inyección directa de una solución estándar del compuesto de interés, a una concentración de 200 μM mediante una jeringa Hamilton a un flujo de 240 $\mu\text{L/h}$. Los parámetros de voltaje utilizados en el caso de la inyección directa para la fuente ESI se determinaron como 10 V para el nebulizador, 5 L/min para el gas de secado y 300 °C para la temperatura del gas. En función de la característica química de cada compuesto, el análisis se llevó a cabo en modo positivo o negativo obteniéndose las especies $[\text{M} + \text{H}]^+$ o $[\text{M} - \text{H}]^-$. Una vez establecida la relación masa/carga del compuesto a estudiar, se aisló el analito de interés mediante MRM (Multiple Reaction Monitoring) y se obtuvo el patrón de fragmentación de cada compuesto aplicando un voltaje determinado (MS^2). A continuación, se aisló el fragmento más abundante y se volvió a aplicar un segundo voltaje para fragmentarlo de nuevo (MS^3). Se obtiene así un perfil de fragmentación característico para cada compuesto.

Una vez determinados los parámetros de identificación de cada analito en la trampa iónica, se procedió a su análisis separándolo previamente mediante un cromatógrafo líquido de alta resolución. Los valores de los parámetros para la fuente ESI en este caso fueron de 30 V para el nebulizador, 8 L/min para el gas de secado y 365 °C para la temperatura del gas. El método utilizado en cada caso fue dependiente del compuesto a analizar y se describe en los apartados referentes a cada uno de ellos. La cuantificación de cada metabolito se llevó a cabo realizando una recta de calibrado mediante integración de área a distintas concentraciones.

7.2. Métodos de extracción para el análisis de metabolitos

Para la extracción de los diferentes metabolitos se utilizó en todos los casos 100 mg de material vegetal, que se trituró con mortero y nitrógeno líquido y se homogeneizó en tampones de extracción acuoso (solución I) y orgánico (solución II).

Para aumentar la intensidad de la señal y el número de metabolitos detectables, se realizó la extracción y a continuación las muestras se concentraron mediante liofilización. Posteriormente las muestras se re-suspendieron en 250 μL de tampón de extracción acuoso (solución I) y orgánico (solución III).

Solución de extracción I: HCl 0,1 N y ácido fórmico 0,1 % en agua

Solución de extracción II: Mezcla compuesta por MeOH:H₂O:CHCl₃ (2,5:1:1)

Solución de extracción III: Acetonitrilo:H₂O (1:1) y 0,1 % ácido fórmico

7.3. Análisis de compuestos tiólicos

7.3.1. Extracción y determinación de tioles simples mediante HPLC/MS

Para la extracción de los compuestos azufrados de hojas en las distintas líneas de plantas, se recogió 100 mg de material vegetal y se homogeneizó con 250 µL de la solución de extracción I. A continuación las muestras se centrifugaron a máxima velocidad a 4 °C durante 15 min. El sobrenadante se filtró a través de filtros Millipore de 0,2 µm de poro, y las muestras se analizaron mediante HPLC/MS.

En este análisis se utilizó una columna en fase reversa (Acclaim 120 C18, 3 µm, 2,1x100 mm) y una pre-columna (Acclaim 120 C18, 5 µm, 2x10 mm). Como fases móviles se utilizaron ácido fórmico 0,1 % (fase A) y acetonitrilo (fase B). La temperatura del compartimento de columna se fijó en 25 °C y el flujo de las fases móviles se estableció en 0,250 mL/min. El rango en el que se realizó el barrido fue de 50-1500 m/z. El volumen de inyección de muestra fue de 5 µL.

Para la separación de los compuestos se fijó un gradiente lineal desde 0 a 10 % B (0-6 min). Después se aumentó la proporción de B hasta el 50 % durante 1 min, y se mantuvo hasta el minuto 10. A continuación, para regenerar la columna, se eluyó con un gradiente lineal hasta 0 % B, y se mantuvo hasta el minuto 15 (Rellan-Alvarez *et al.*, 2006). Los compuestos azufrados determinados fueron glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y γ -glutamilcisteína (γ -EC), con una relación masa/carga en modo positivo $[M + H]^+$ de 308, 613 y 251 respectivamente.

Solución de extracción I: HCl 0,1 N y ácido fórmico 0,1 % en agua.

7.3.2. Extracción y determinación tioles simples mediante HPLC/UV-V

La medida de L-cisteína y glutatión presentes en las plantas también se realizó mediante derivatización con monobromobimano (mBrB) y posterior separación mediante HPLC (Rauser *et al.*, 1991).

Para llevar a cabo la determinación, se homogeneizó el material vegetal triturado con solución de extracción (10 mL/g de tejido) y se recogió el sobrenadante tras centrifugación de las muestras (15 min, 21.400 g, 4 °C). Una vez obtenidos los extractos, se determinó el contenido total de L-cisteína y glutatión, así como la fracción de tioles que se encontraban en su forma reducida en la planta.

Para la cuantificación del contenido total de tioles fue necesaria una reducción de las muestras previa a su derivatización, debido a que parte de los tioles de la planta se encuentra en su forma oxidada y el mBrB sólo reacciona con grupos tiólicos reducidos. Para ello, se incubaron 120 μL de extracto durante 1 h en solución de reducción. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 330 μL . Una vez transcurrido este tiempo, se le añadió a la mezcla anterior 20 μL de mBrB 15 mM para la derivatización. Tras 15 min de incubación en oscuridad, la reacción se paró por adición de 250 μL de ácido metanosulfónico al 70 % (v/v). Para la determinación del contenido de tioles reducidos presentes en las muestras se obvió el paso de reducción. Una vez derivatizados, los compuestos tiólicos se separaron mediante HPLC siguiendo el protocolo previamente descrito (Newton *et al.*, 1981). El proceso se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido LaChrom Elite (VWR International), utilizando una columna de fase reversa RP-C18 (5 μm) (LiChrospher 100). Se inyectaron 30 μL de muestra derivatizada, fijándose el flujo de elución con los tampones A y B, a través de la columna a 1 mL/min y utilizando estándares comerciales (Sigma) de L-cisteína y GSH. El programa de elución utilizado se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Gradiente de elución de HPLC/UV-V para la determinación de compuestos tiólicos.

| Tiempo (min) | % Tampón B |
|--------------|------------|
| 0 | 10 |
| 20 | 13 |
| 21 | 100 |
| 25 | 100 |
| 26 | 10 |
| 35 | 10 |

Para la detección y cuantificación de los compuestos tiólicos se empleó un detector de fluorescencia Hitachi L-2485 (VWR International) (λ_{exc} : 360 nm, λ_{em} : 425 nm). El contenido en tioles oxidados presentes en la planta se calculó por diferencia entre el contenido total y el valor de la fracción reducida correspondiente.

Solución de extracción: HCl 0,1 M y EDTA 1 mM.

Solución de reducción: CHES 110 mM y NaBH_4 20 mM.

Tampón A: Ácido acético 0,25 % (v/v), pH 3,9.

Tampón B: Ácido acético 0,25 % (v/v) en metanol, pH 3,9.

7.3.3. Extracción y determinación de fitoquelatinas mediante HPLC/MS

La determinación del contenido de fitoquelatinas en plantas crecidas en día largo en presencia de cadmio se realizó mediante HPLC/MS. Para la cuantificación, se homogeneizaron 100 mg de material vegetal procedente de hojas de plantas, con 250 μ L de tampón de extracción consistente en HCl 0,1 N (0,1 % ácido fórmico). Las muestras se incubaron en hielo durante 15 min y los extractos se obtuvieron mediante centrifugación a 4 °C a máxima velocidad durante 15 min.

Para este análisis se utilizó una columna en fase reversa (Acclaim 120 C18, 3 μ m, 2,1x100 mm) y una pre-columna (Acclaim 120 C18, 5 μ m, 2x10 mm). Las fases móviles que se utilizaron fueron: ácido fórmico 0,1 % (fase A) y acetonitrilo (fase B). La temperatura del compartimento de columna se fijó en 25 °C y el flujo de las fases móviles se estableció en 0,250 mL/min. El rango en el que se realizó el barrido fue de 50-1500 m/z. El volumen de inyección de muestra fue de 5 μ L. El gradiente de elución utilizado se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Gradiente de elución de HPLC/MS para la determinación de fitoquelatinas.

| Tiempo (min) | % Fase B |
|--------------|----------|
| 0 | 0 |
| 10 | 0 |
| 50 | 60 |
| 53 | 60 |
| 56 | 0 |
| 70 | 0 |

7.4. Análisis de fitohormonas

7.4.1. Extracción y determinación de ácido salicílico

El contenido total de ácido salicílico de 100 mg de hojas se cuantificó mediante HPLC/MS, tal como lo describe Verberne (Verberne *et al.*, 2002). El material vegetal se pulverizó en nitrógeno líquido usando mortero, y se homogeneizó mediante adición de 500 μ L de metanol 90 %. Esta disolución se mezcló mediante vortex durante 1 min, se sonicó durante 5 min y seguidamente se centrifugó a 21400 g durante 5 min. El sobrenadante se recogió y el precipitado se re-suspendió en 250 μ L de metanol 100 %, volviendo a realizarse los pasos de sonicación y centrifugación. Los dos sobrenadantes obtenidos se combinaron, y se centrifugaron de nuevo, y la mezcla de metanol/agua se

evaporó utilizando un concentrador (SpeedVac). Antes de evaporar la muestra, se añadió 10 µL de NaOH 0,2 M para evitar una excesiva evaporación de la muestra.

Al residuo obtenido, se le añadió 250 µL de ácido tricloroacético (5 % en agua). Después de mezclar mediante vortex, se le adicionó 800 µL de etilacetato:ciclohexano (1:1, v/v), dando lugar a la separación de dos fases. La fase acuosa se sometió a hidrólisis ácida mediante adición de 300 µL de ácido clorhídrico 8 M. Para favorecer la hidrólisis, las muestras se calentaron a 80 °C durante 1 h. A continuación, se volvió a realizar la partición de fases, donde se tomó la fase orgánica. A esta fase se le añadió 60 µL de acetato sódico y se evaporó mediante el concentrador. El residuo final se disolvió en 200 µL de acetato sódico pH 5,5 (90 %) / metanol (10 %) y se analizó mediante HPLC-MS.

Para el análisis de ácido salicílico mediante HPLC-MS, se utilizó la columna de fase normal ZIC-HILIC (200 Å, 3,5 µm, 100x2,1 mm). La temperatura del compartimento de columna se fijó a 25 °C. Para las fases móviles se utilizaron acetato amónico 5 mM como fase acuosa (fase A) y acetonitrilo/ácido fórmico (0,1 %) como fase orgánica (fase B). El flujo se determinó a 0,2 mL/min. El gradiente de elución utilizado se muestra en la Tabla 7. El ácido salicílico se detectó en modo negativo, generándose una molécula desprotonada $[M - H]^-$ (m/z 137) con un tiempo de retención de 1,6 min.

Tabla 7. Gradiente de elución de HPLC/MS para análisis de ácido salicílico.

| Tiempo (min) | % Fase B |
|--------------|----------|
| 0 | 90 |
| 1 | 90 |
| 16 | 10 |
| 17 | 10 |
| 18 | 90 |
| 28 | 90 |

7.4.2. Extracción y determinación de ácido abscísico

El análisis de ácido abscísico se realizó mediante HPLC/MS siguiendo el protocolo descrito por Gómez-Cadenas (Gómez-Cadenas *et al.*, 2002) con algunas modificaciones. Para la cuantificación del ácido abscísico, se homogeneizaron 150 mg de material vegetal con nitrógeno líquido y mortero. Las muestras se extrajeron mediante adición de 500 µL de tampón de extracción, consistente en metanol al 10 %.

Los extractos se obtuvieron mediante centrifugación de las muestras durante 15 min a 21400 g a 4 °C. Antes de inyectarlas en el HPLC/MS, las muestras se filtraron a través de filtros Millipore de 0,2 µm de poro para eliminar posibles residuos sólidos.

Para el análisis de ácido salicílico mediante HPLC-MS, se utilizó la columna ZIC-HILIC (200 Å, 3,5 µm, 100x2,1 mm). La temperatura del compartimento de columna se fijó a 25 °C. El flujo se determinó a 0,2 mL/min. Las fases móviles que se utilizaron fueron acetato amónico 5 mM como fase acuosa (fase A) y acetonitrilo/ácido fórmico (0,1 %) como fase orgánica (fase B). El ácido abscísico se detectó en modo negativo, obteniéndose una molécula desprotonada $[M - H]^-$ (m/z 209) con un tiempo de retención de 1,8 min. El gradiente de elución utilizado se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Gradiente de elución de HPLC/MS para análisis de ácido abscísico.

| Tiempo (min) | % Fase B |
|--------------|----------|
| 0 | 90 |
| 1 | 90 |
| 16 | 10 |
| 17 | 10 |
| 18 | 90 |
| 28 | 90 |

7.5. Análisis de aminoácidos

El análisis de aminoácidos se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo de Gu (Gu *et al.*, 2007) con algunas modificaciones. Se tomó 100 mg de hojas, previamente triturado mediante mortero y con nitrógeno líquido, y se homogeneizó con 500 µL de HCl 0,1 N con 0,1% ácido fórmico. Las muestras se incubaron en hielo durante 15 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4 °C a 21400 g durante 15 min. Los extractos de hojas obtenidos se analizaron mediante HPLC/MS, teniendo en cuenta el tiempo de retención y la relación m/z para cada aminoácido, así como la recta de calibrado obtenida en cada caso.

Para poder determinar y cuantificar cada uno de los aminoácidos, primero se analizó una muestra comercial (Aminoacid standard H, Pierce) constituida por 17 aminoácidos, en 0,1 N HCl. Los aminoácidos que componían la muestra eran: L-alanina, L-arginina, L-ácido aspártico, L-cistina, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina y L-valina. Para los aminoácidos restantes (L-

hidroxiprolina, L-cisteína y L-glutamato) se prepararon distintas disoluciones por separado para cada uno de ellos a partir de compuestos sólidos comerciales. Se determinó el tiempo de retención para cada uno de ellos y se procedió a hacer una recta de calibrado para cada aminoácido.

Se eligió una columna en fase reversa (Acclaim 120 C18, 3 μm , 2,1x100 mm) y una pre-columna (Acclaim 120 C18, 5 μm , 2x10 mm). La temperatura del compartimento de columna se fijó a 30 °C. El volumen de inyección fue de 5 μL y la velocidad del flujo de las fases del HPLC se determinó a 0,3 mL/min. Las fases móviles que se utilizaron para este método fueron: ácido perfluoroheptanoico 1 mM (fase móvil A) y acetonitrilo (fase móvil B). El gradiente utilizado para separar los diferentes aminoácidos se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Gradiente de elución de HPLC/MS para el análisis de aminoácidos.

| Tiempo (min) | Fase móvil B |
|--------------|--------------|
| 0,0 | 2 |
| 0,1 | 20 |
| 2,3 | 40 |
| 4,0 | 40 |
| 4,1 | 2 |
| 6,0 | 2 |

Los espectros de masas se adquirieron usando ionización por electrospray en modo positivo. Se realizó un barrido desde 50-700 m/z, y se obtuvo un cromatograma para cada aminoácido mediante EIC ES+ (Extracted Ion Chromatogram) de los valores correspondientes a las especies $[\text{M} + \text{H}]^+$.

8. Otros métodos

8.1. Métodos histoquímicos

8.1.1. Tinción con azul de nitrotetrazolio (NBT)

La presencia de aniones superóxido (O_2^-) se detectó mediante tinción con NBT. Las hojas se sumergieron en solución de tinción durante 2 h en oscuridad. Trascorrido este tiempo, las hojas se lavaron con agua destilada y se fotografiaron con una cámara JVC GC-X3C. La acumulación de los aniones se observa por la aparición de precipitado azul oscuro.

Solución de tinción: Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5; NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM y NBT 0,5 mg/mL.

8.1.2. Tinción con 3,3'-Diaminobencidina (DAB)

La detección de H₂O₂ se realizó mediante tinción con DAB en hojas de plantas. Se realizó la tinción en hojas recién cortadas que se sumergieron durante 15 min en la solución I en oscuridad y con agitación, y se fijó con la solución II. Las hojas se fotografiaron usando una cámara JVC GC-X3C. Las zonas que contenían mayor contenido de H₂O₂ presentaban color amarillo.

Solución I: DAB 1 mg/mL en HCl 0,1 N.

Solución II: Mezcla de etanol:ácido láctico:glicerol 3:1:1 (v/v/v).

8.2. Medición de la apertura estomática

La medida de la apertura estomática se realizó en hojas de plantas en condiciones de crecimiento de día largo y día corto. Las hojas se incubaron en el tampón I durante 2 horas. A continuación, las hojas se volvieron a incubar en el tampón II (para favorecer la apertura de los estomas) y III (para favorecer el cierre). Una vez acabado el tiempo de incubación, se retiró la epidermis y se realizaron las medidas de la apertura estomática visualizándola mediante un microscopio óptico Olympus BX60. Las medidas de apertura se expresaron como el valor medio de 50 mediciones para cada línea.

Tampón de incubación I: MES-KOH 10 mM, pH6,5; KCl 10 mM; CaCl₂ 50 μM.

Tampón de incubación II: MES-KOH 10 mM, pH6,5; KCl 10 mM; CaCl₂ 5 mM.

Tampón de incubación III: KOH 10 mM, pH6,5; KCl 10 mM; CaCl₂ 50 μM, ácido abscísico 10 μM.

9. Tratamiento de datos mediante análisis bioinformáticos

9.1. Modelado de redes transcripcionales

Para la creación del modelado matemático de genes se utilizaron los datos obtenidos del análisis transcriptómico de las líneas silvestre y mutante *cs26* crecidas en día largo y en día corto. Este análisis fue llevado a cabo *in silico* con herramientas informáticas desarrolladas por las Universidades de Warwick, Essex y Exeter, en el proyecto PRESTA (Plant Responses to Environmental Stress in *Arabidopsis*). Además proporcionaron las bases de datos de los perfiles de expresión génica de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés por alta luminosidad en diferentes tiempos. Para la serie de tiempos se utilizó muestras de plantas expuestas a alta luminosidad, tomándose material cada 30 min durante 6 h, obteniéndose un total de 13 puntos.

Se utilizó una herramienta estadística llamada Smoothing Spline Cluster (Heard *et al.*, 2005) y se aplicó a los genes obtenidos del análisis transcriptómico que presentaron inducción o represión en la línea mutante *cs26*. Con estos datos, se generó un dendograma donde se representó los diferentes grupos de genes en función de su respuesta al estrés lumínico a lo largo de la serie de tiempos. El color rojo indicó una inducción en la expresión de los genes y, el color verde, una represión.

De los grupos obtenidos tras este análisis de conjunto, se aplicó un análisis t-test para obtener aquellos genes en los que se observó una respuesta de expresión máxima. A este segundo grupo de genes, se les volvió a aplicar el análisis SSC para corroborar la similitud de respuesta entre ellos, generándose un segundo dendograma.

A continuación, se aplicó el análisis TCAP-2 (Temporal Clustering by Affinity Propagation, version 2) (Kiddle *et al.*, 2010) a la selección de genes obtenida, donde se usó un algoritmo llamado AP (Affinity Propagation) (Frey y Dueck, 2007). Dicho algoritmo permitió agrupar de nuevo los genes en gráficos de perfiles de expresión a lo largo de las distintas series de tiempo, pudiéndose observar si dentro de un mismo cluster o grupo los genes quedan alineados con el patrón de expresión dominante, o si su respuesta se retrasa o se adelanta en el tiempo. En el siguiente paso, se tomó un máximo de 80 genes y se sometieron a un análisis VBSSM (Variational Bayesian State Space Modelling), que permitió determinar las interacciones entre los distintos genes (Beal *et al.*, 2005; Breeze *et al.*, 2011). Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa matemático Matlab (The MathWorks). Los datos obtenidos se visualizaron en el programa Cytoscape (Maere *et al.*, 2005), donde se generaron los esquemas de los modelos, restringiendo las interacciones entre genes a un mínimo de un 75 % de interacción.

9.2. Análisis de componente principales (PCA)

El análisis de componentes principales se realizó utilizando el programa Statgraphics Centurion XV. Este análisis se aplicó a los metabolitos obtenidos en la extracción y análisis de las muestras de hojas de plantas crecidas en condiciones de ciclo largo y ciclo corto mediante HPLC/MS, con el fin de reducir así la dimensionalidad de las muestras.

Los datos se sometieron primero a un test de Kruskal-Wallis para comprobar si había diferencias significativas entre las muestras. A continuación, se aplicó el análisis de PCA, teniendo en cuenta el tiempo de retención, la relación masa/carga, el área y la intensidad de señal de cada analito, obteniéndose un gráfico donde se representó los dos primeros componentes principales.

9.3. Tratamiento estadístico de los datos

De manera rutinaria, se realizó el análisis estadístico ANOVA de los datos utilizando el programa OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation).

IV. RESULTADOS

1. Caracterización de la proteína CS26 con actividad S-Sulfocisteína sintasa de *Arabidopsis thaliana*

1.1. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de diferentes OASTLs

La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las proteínas OAS-B y CS26 con la proteína citosólica, OAS-A1, determinó la existencia de péptidos tránsitos. En la figura 8 se muestra el alineamiento de secuencias, donde se observó una extensión en la región del C-terminal del péptido tránsito al cloroplasto en la proteína CS26 cuando se comparó con la proteína OAS-B. La predicción de los péptidos tránsito al cloroplasto se realizó con los programas TargetP y ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>), mostradas en la figura 8 con flechas rojas. Ambos programas predicen una longitud del péptido tránsito al cloroplasto de 84 aminoácidos para la proteína CS26, y de 58 aminoácidos para la proteína OAS-B. Esta extensión en el péptido tránsito de la proteína CS26 es compatible con un segundo péptido tránsito de la proteína al lumen cloroplástico

En el alineamiento se mostró también que las proteínas poseen residuos conservados esenciales para la interacción con el cofactor PLP, en base a la estructura cristalina de la OAS-A1 (Bonner et al, 2005). La interacción con PLP viene determinada por distintos aminoácidos: Lys⁴⁶, Gly¹⁸¹, Thr¹⁸², Gly¹⁸³, Thr¹⁸⁵, Hys¹⁵⁷ y Thr¹⁸⁵ en la secuencia de OAS-A1. Se observó que todos ellos están conservados en las dos isoformas cloroplásticas.

La interacción con el sustrato O-acetilserina viene determinada por los aminoácidos Asn⁷⁷ y Gln¹⁴⁷ (en OAS-A1) y un dominio de secuencia TSGNT, conservado en todas las enzimas y marcados con un cuadro rojo en la figura 8. Los residuos esenciales involucrados en la incorporación del otro sustrato, el sulfuro en el caso de las OASTL, son los aminoácidos Thr⁷⁴ y Ser⁷⁵ en este dominio (Bonner et al, 2005). Como se observa, en la proteína CS26 la serina no está conservada, estando sustituida por otra treonina.

La zona de interacción con la proteína SAT se encuentra marcada en azul en la figura 8. La proteína CS26 presenta varios cambios no conservativos a este nivel, con una delección de 10 aminoácidos, lo que indica que esta proteína no interacciona tan específicamente con las proteínas SAT como ha sido sugerido previamente (Heeg et al, 2008).

Resultados

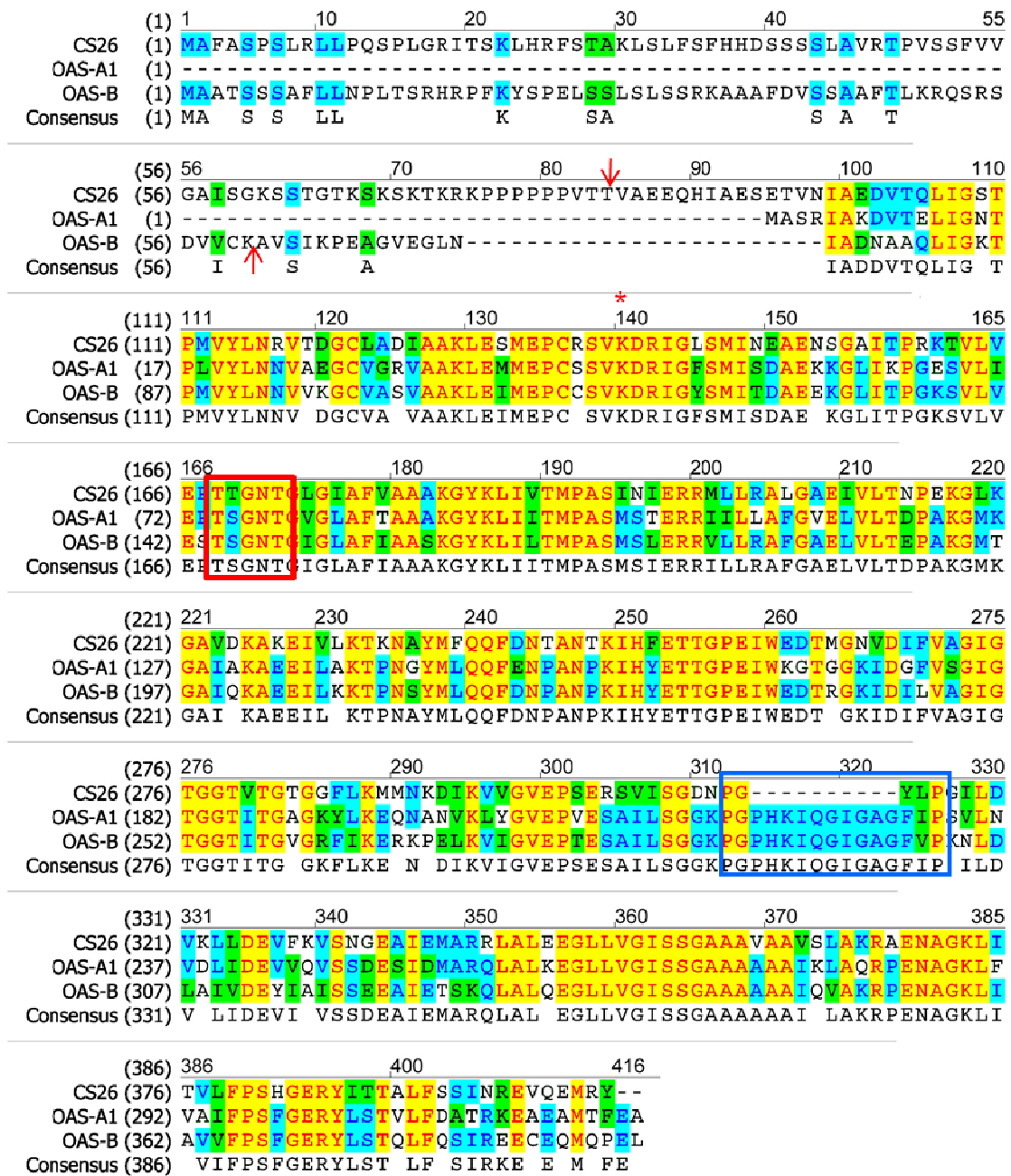


Figura 8. Alineamiento de la secuencia proteica de la isoforma mayoritaria citosólica OAS-A1 con las secuencias deducidas de las proteínas cloroplásticas CS26 y OAS-B.

El alineamiento se creó con el programa Vector NTI. Las flechas rojas indican la predicción del péptido tránsito de cada isoforma. El cuadro rojo indica el sitio activo de unión con OAS y sulfuro, y el azul la interacción con SAT. El asterisco rojo indica un residuo de lisina conservado de unión al piroxal-5'-fosfato. El fondo de color amarillo indica residuos idénticos, el color azul indica residuos consenso derivados de un bloque de residuos similares y el color verde indica residuos con cambios conservados respecto al bloque de residuos consenso en una posición dada.

En bacterias podemos encontrar los genes *cysK* y *cysM*, los cuales codifican para las enzimas OASTL y S-Sulfocisteína sintasa (SSCS), respectivamente. La comparación

de secuencias de las enzimas cloroplásticas CS26 y OAS-B con las bacterianas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium* mostraron que en CS26 existe una delección de 16 aminoácidos entre los dominios β 8A y β 9A comparado con las enzimas OASTL bacterianas, y que esta delección está también presente en las enzimas SSCS codificadas por los genes bacterianos *cysM*. Como se ha descrito anteriormente, esta región está involucrada en la interacción con la proteína SAT (Figura 9).



Figura 9. Alineamiento parcial de las secuencias deducidas de aminoácidos de OAS-B y CS26 con las proteínas bacterianas.

El alineamiento se realizó con el software Vector NTI por comparación con las proteínas codificadas por los genes *cysK* y *cysM* de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*. Las flechas azules muestran los dominios de las hojas- β deducidas de la estructura cristalina de la OASTL citosólica OAS-A1 de *Arabidopsis thaliana* (Bonner et al, 2005).

1.2. Expresión de la proteína CS26 en *E. coli* y purificación de la proteína recombinante

Con objeto de poder estudiar la proteína CS26 *in vitro*, se procedió a obtener la proteína recombinante en bacterias. Para ello se llevó a cabo la clonación del cDNA codificante de la proteína madura CS26 en el plásmido pDEST17 utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen) (Figura 10). En esta construcción el cDNA está bajo el promotor T7 y se genera una proteína con una cola de 6 histidinas en el extremo amino-terminal. En base a las predicciones del péptido tránsito mediante el programa TargetP y teniendo en cuenta la homología de la secuencia de aminoácidos con la proteína OAS-A1 (Figura 8), se consideró como proteína madura CS26 la proteína con una delección de 94 aminoácidos en el extremo N-terminal.

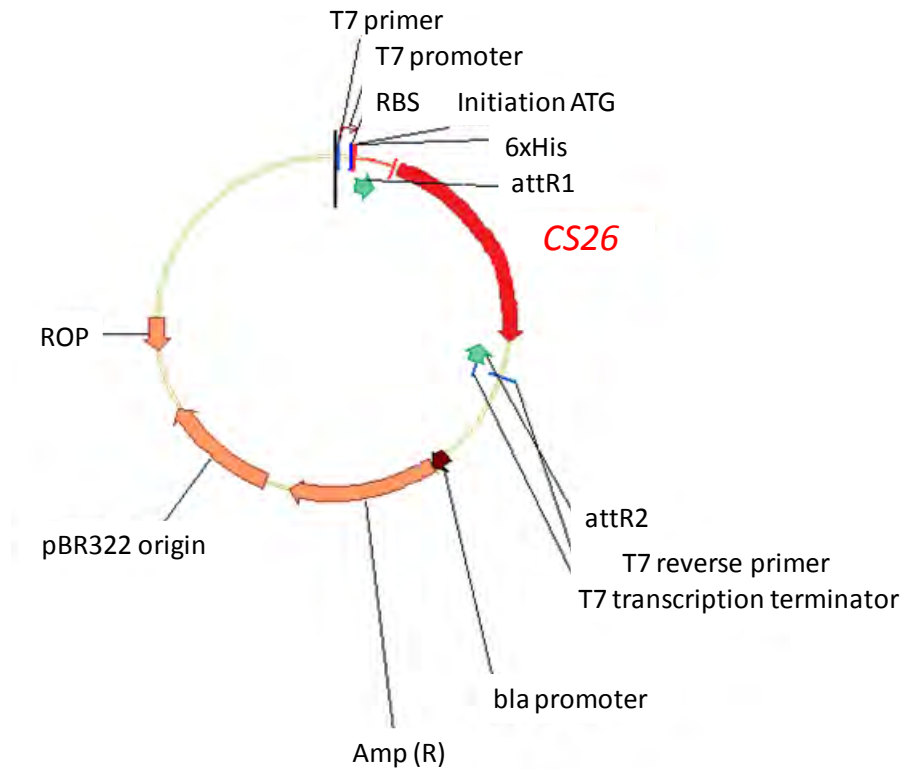


Figura 10. Construcción pDEST17-CS26.

El cDNA *CS26* dentro del vector de destino pDEST17 quedó flanqueado en el extremo 5' por una secuencia codificante de una cola de 6 histidinas y bajo el promotor T7 para su expresión.

Se secuenció parte de la construcción pDEST17-*CS26* para corroborar que el inserto se encontraba en fase con la secuencia codificante de la cola de histidinas y se transformaron las células BL21AI One Shot con esta construcción (Figura 10). En estas células se puede inducir la expresión del inserto clonado usando arabinosa, ya que contiene el gen de la T7 RNA polimerasa bajo el promotor araBAD regulado por arabinosa. De esta forma, la proteína *CS26* se expresó en *E.coli* mediante inducción por arabinosa, y se purificó mediante una columna de agarosa Ni-NTA, tal y como se ha descrito anteriormente en materiales y métodos. La proteína His-*CS26* tiene una alta afinidad al níquel, lo que permite ser retenida en la columna. Como tampón de elución se utilizó imidazol, el cual compete con las cadenas laterales de histidina, permitiendo así la elución de la proteína. La proteína recombinante *CS26* tiene un peso molecular de 36,4 kDa (Figura 11). De un cultivo bacteriano de 100 ml se obtuvo 0,12 mg de proteína recombinante pura con un rendimiento del 57 % (Tabla 10). La identificación de la proteína se confirmó mediante escisión de la banda correspondiente del gel de SDS-PAGE y análisis mediante MALDI-TOF.

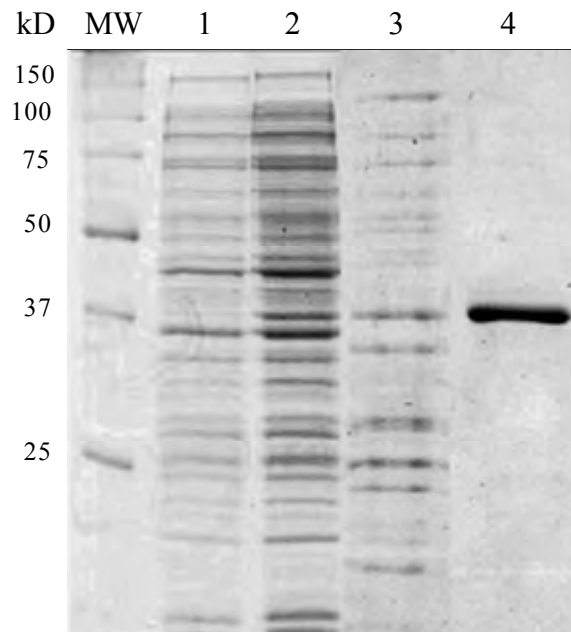


Figura 11. Análisis SDS-PAGE de la proteína recombinante His-CS26.

En los carriles 1 y 2 se muestran las proteínas totales de los cultivos de bacterias sin inducir e inducidos. En el carril 3 se muestra el extracto crudo de bacterias obtenido del cultivo inducido tras lisis celular. En el carril 4 se muestra la fracción eluída de la columna de Ni-NTA. MW indica los pesos moleculares de proteínas estándares.

1.3. Análisis enzimático de la proteína recombinante His-CS26

Para la determinación de la actividad de la proteína CS26, se llevaron a cabo ensayos de medida de diferentes actividades en el extracto crudo obtenido tras la inducción de bacterias con arabinosa, así como en la proteína purificada. Las actividades estudiadas fueron O-Acetilserina(tiol)liasa (OASTL), S-Sulfocisteína sintasa (SSCS), L-Cisteína desulfhidrasa (LCD) y β -Cianoalanina sintasa (CAS), y se procedió según lo descrito en materiales y métodos. La proteína recombinante no mostró actividad L-Cisteína desulfhidrasa ni β -Cianoalanina sintasa. Los valores de actividad OASTL y SSCS se muestran en la Tabla 10. Se observó actividad OASTL en el extracto crudo de bacterias, pero no en la proteína purificada. Esto pudo deberse a la actividad OASTL endógena de las bacterias *E. coli*, obteniéndose valores para esta actividad de forma residual en el extracto crudo de bacterias. En cuanto a la actividad SSCS, se observó actividad en el extracto crudo, siendo mucho más elevada en la proteína purificada, demostrando que la proteína CS26 es una S-Sulfocisteína sintasa, y no una OASTL.

Tabla 10. Tabla de purificación de la proteína His-CS26 expresada en *E. coli*.

| Paso de purificación | Proteína (mg) | Actividad Específica (U mg ⁻¹) | | Actividad Total (U) | | Factor de purificación | | Rendimiento (%) | |
|------------------------------|---------------|--|-------|---------------------|-------|------------------------|-------|-----------------|-------|
| | | SSCS | OASTL | SSCS | OASTL | SSCS | OASTL | SSCS | OASTL |
| Extracto Crudo | 4,00 | 0,60 | 0,32 | 2,39 | 1,25 | - | - | - | - |
| Cromatografía Ni-NTA-agarosa | 0,12 | 11,46 | 0 | 1,38 | 0 | 19,1 | 0 | 57,6 | 0 |

1.4. Caracterización del producto de la reacción catalizada por CS26 mediante LC/MS

El producto de la reacción producido por la enzima recombinante His-CS26 en presencia de tiosulfato y O-acetilserina fue identificado mediante HPLC/MS. El principal producto formado en la reacción enzimática fue una molécula con una relación masa/carga (m/z) de $201,9 \pm 0,1$, y cuyo espectro de masa coincide con el espectro obtenido de una muestra patrón de S-sulfocisteína (Figura 12). Los pequeños picos de m/z 202,9 y 203,9 corresponden a diferentes composiciones isotópicas de la molécula de S-sulfocisteína. La abundancia de estos picos también coinciden con la distribución isotópica esperada para una molécula con fórmula molecular $C_3H_7NO_5S_2$ (Figura 12A).

Aunque el espectro de masas del producto de la reacción coincidió exactamente con el espectro de las muestras patrón y teórica, se aisló el pico más abundante ($m/z = 201,9$) en la trampa iónica para analizar su patrón de fragmentación. El pico más abundante después de la fragmentación (MS^2) resultó un ion con m/z de $120,0 \pm 0,1$, consecuencia de la pérdida de un fragmento de SO_3 , formándose el radical de cisteína (Figura 13). Una segunda fragmentación (MS^3) de este ion de m/z 120,0 resultó en la formación de dos iones más con m/z de 92,2 y 74,2. El primero de ellos correspondió a una pérdida de CO, mientras que el segundo correspondió a una pérdida de $CO + H_2O$.

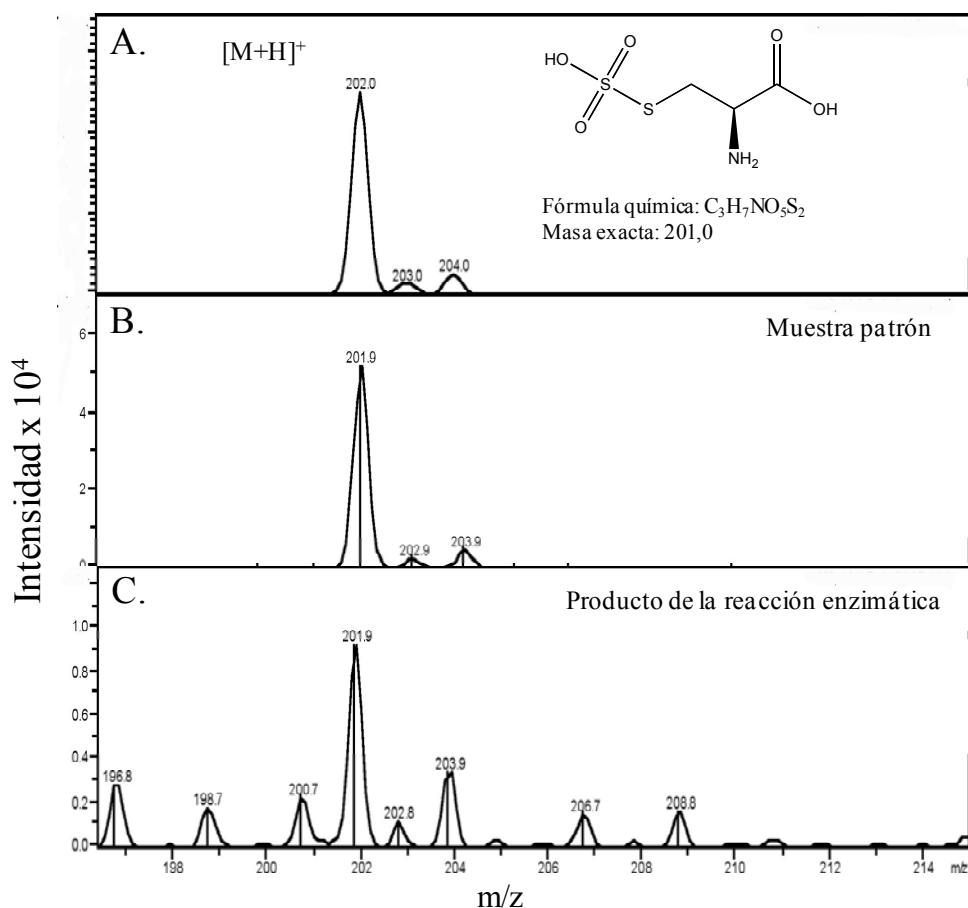


Figura 12. Espectro de masas de la molécula de S-sulfocisteína detectada en modo positivo mediante ionización por electrospray.

- (A) Espectro de masa teórica y estructura molecular de S-Cys.
- (B) Espectro de masas de una solución estándar de S-Cys.
- (C) Espectro de masa del producto de la reacción enzimática producido por la proteína recombinante His-CS26 usando como sustratos tiosulfato y OAS.

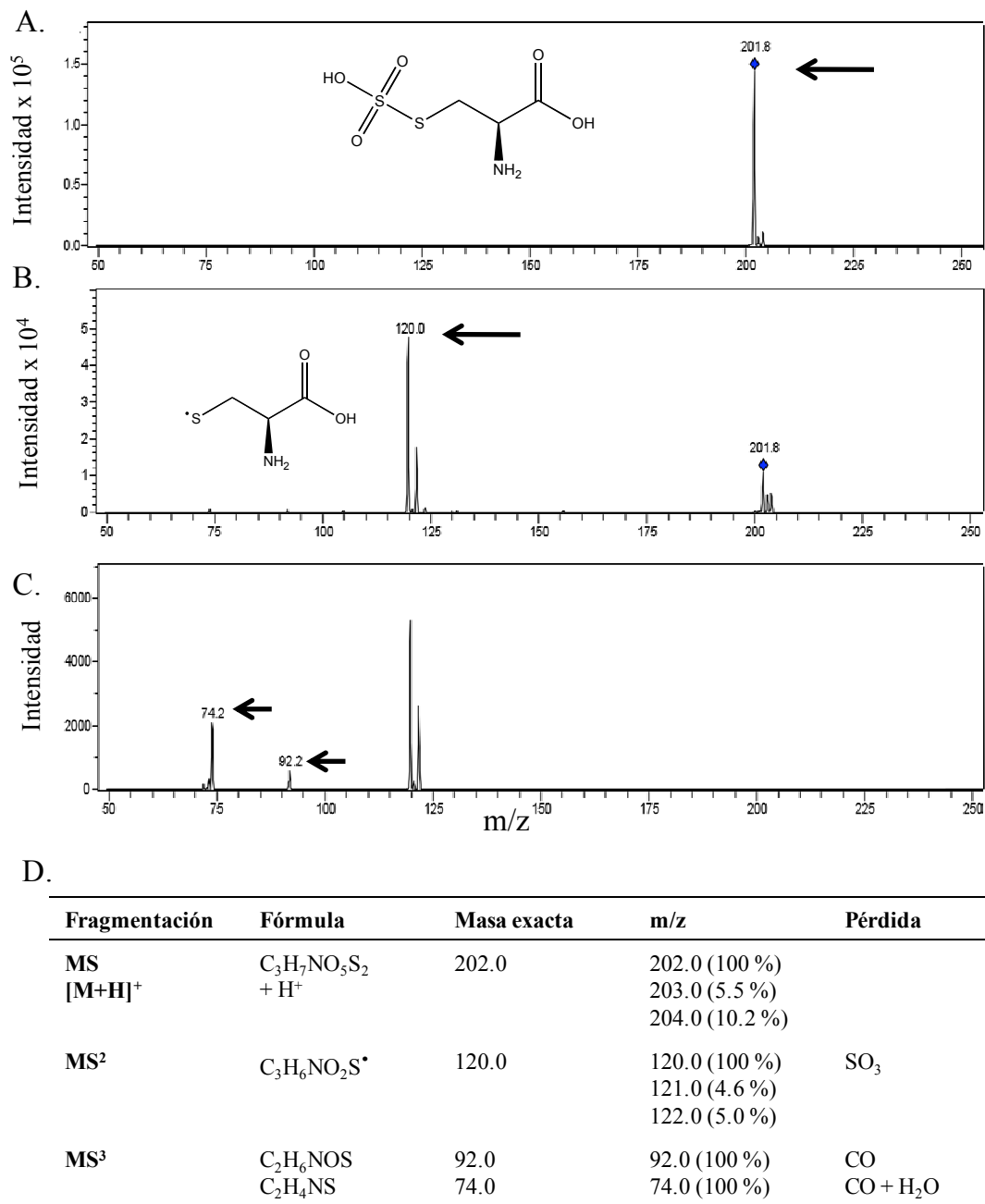


Figura 13. Patrón de fragmentación de muestras de S-sulfocisteína mediante ionización por electrospray en modo positivo.

- (A) Espectro de masas del ion S-sulfocisteína $[M+H]^+$ aislado en la trampa iónica.
- (B) Patrón de fragmentación MS^2 del ion parental 201,8.
- (C) Patrón de fragmentación MS^3 del ion parental 120,0.
- (D) Detalles de la ionización y fragmentación de S-Cys e identificación de los iones detectados.

1.5. Determinación de los parámetros cinéticos de la actividad S-Sulfocisteína sintasa

Los parámetros cinéticos de la proteína recombinante se determinaron utilizando las curvas de Hanes-Woolf (Figura 14). Los valores de K_m obtenidos para la O-acetilserina y tiosulfato fueron 0,46 mM y 0,93 mM, respectivamente. Comparando los datos obtenidos con los descritos en la bibliografía, se observó que CS26 tiene una mayor especificidad por los sustratos que las proteínas bacterianas con actividad SSCS (Nakamura *et al.*, 1984).

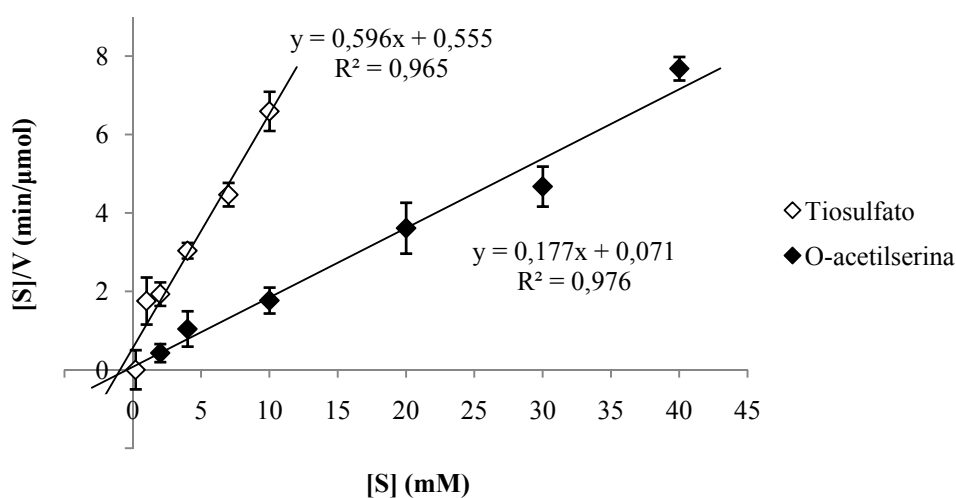


Figura 14. Representación de las curvas Hanes-Woolf para los sustratos de la reacción.

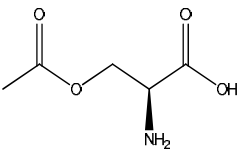
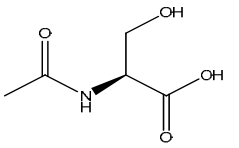
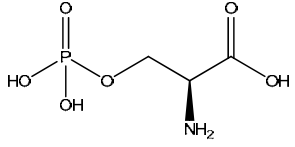
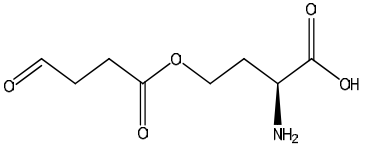
Se representó diferentes concentraciones de los sustratos frente al ratio “concentración de sustrato/velocidad inicial”. El corte con el eje x representa el valor de K_m , y la inversa de la pendiente representa V_{max} .

La dependencia de la enzima CS26 al cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) se determinó mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de la reacción SSCS por ácido aminooxiacético (AOA) 10mM, que es un inhibidor de enzimas dependientes de PLP (Rennenberg y Filner, 1982). Esta actividad se inhibió en torno a un 76 %, corroborando así el papel del PLP en la catálisis de la enzima.

Por último, para determinar la especificidad de la enzima por los distintos sustratos, se estudió la reacción utilizando diferentes esqueletos carbonados similares a O-acetilserina, que fueron N-acetilserina, O-fosfoferina y O-succinilhomoserina. Los resultados se pueden observar en la Tabla 11. La enzima es capaz de utilizar otros esqueletos distintos a la O-acetilserina, sin embargo los valores de actividad específica son menores con estos otros sustratos. En el caso de la O-fosfoferina la actividad es de

aproximadamente un 60 %, y en el caso de la N-acetilserina, de un 50 %, siendo tan sólo de un 17 % para la O-succinil-homoserina.

Tabla 11. Actividad específica de la proteína recombinante His-CS26 utilizando distintos esqueletos carbonados como sustrato.

| Esqueleto carbonado | Estructura química | AE (%) |
|-----------------------|--|--------|
| O-acetil-L-serina |  | 100 |
| N-acetil-L-serina |  | 49,2 |
| O-fosfo-L-serina |  | 60,9 |
| O-succinil-homoserina |  | 17,4 |

1.6. Análisis de la expresión de CS26 en distintos tejidos y estadios

Los niveles de expresión del gen *CS26* en plantas de *Arabidopsis* en los distintos tejidos y estadios de la planta se realizaron mediante análisis de qPCR. Los niveles de los transcritos se normalizaron usando el gen constitutivo *UBQ10*. Los resultados observados en la figura 15 mostraron que hay una mayor acumulación de transcrito *CS26* en las hojas en los estadios más jóvenes de la planta (estadio 1.07) (Boyes *et al.*, 2001), así como en los tejidos de tallo y flor (en el estadio 6.1 con el 10 % de las flores abiertas). Estos niveles disminuyen a medida que la planta se vuelve más longeva, siendo la acumulación del transcrito más baja en el estadio 8.0, cuando la planta está ya senescente.

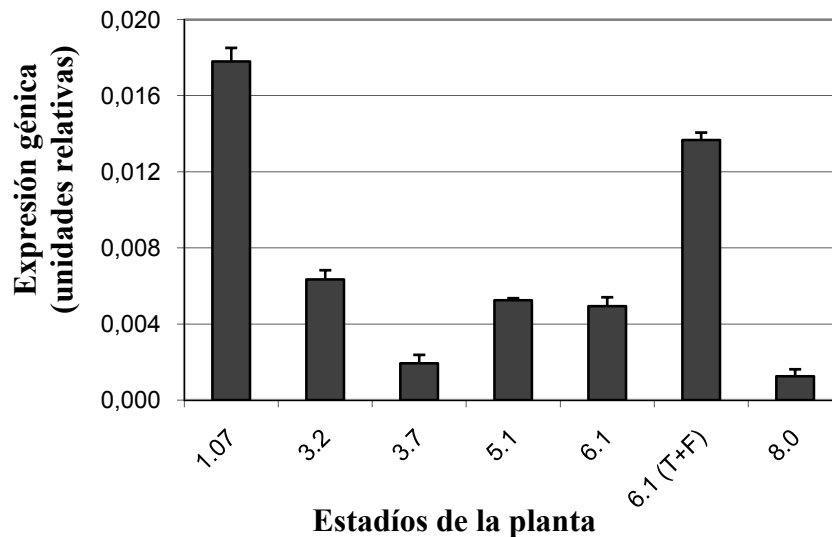


Figura 15. Niveles de expresión relativa de CS26 en distintos estadios y tejidos mediante análisis de qPCR.

Plantas silvestres de *Arabidopsis* se crecieron en sustrato vegetal en condiciones de día largo y a los estadios de crecimiento indicados se recogieron hojas de roseta y en el estadio 6.1 también tallo y flor (T+F) para el análisis qPCR. Los niveles de los transcritos se normalizaron usando el gen constitutivo *UBQ10* como control interno. Los datos mostrados corresponden a los valores medios \pm SD de tres análisis independientes.

1.7. Análisis *in silico* de ortólogos de CS26 en diferentes organismos

El estudio *in silico* de ortólogos de CS26 abarcó diferentes organismos tales como cianobacterias, algas y diferentes plantas. La búsqueda de ortólogos en cianobacterias se realizó en la base de datos Cyanobase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>) donde se recoge el genoma de más de 39 especies distintas. Se realizó un análisis de pBLAST de la proteína CS26 utilizando todos los organismos disponibles en la base de datos. Aunque aparecieron diferentes proteínas con un porcentaje de similitud elevado, ninguna de ellas presentó la delección de 13-16 aminoácidos característica de la secuencia de aminoácidos de la proteína CS26, presente en proteínas con actividad S-Sulfocisteína sintasa, y que las distingue de las OASTL verdaderas.

La búsqueda de ortólogos en plantas y en musgo se realizó gracias a las bases de datos de Phytozome v6.0 (www.phytozome.net), donde se recoge el genoma de 22 plantas superiores, y de PlantGDB (www.plantgdb.org), donde se recogen 25 genomas. De todos los ortólogos encontrados, hubo un gran número de proteínas que mostraron una similitud alta con CS26, pero sólo 10 presentaron la delección característica de las SSCS (Tabla 12).

Tabla 12. Ortólogos de la proteína CS26 en otros organismos.

| Organismo | Gen | ¿Presenta delección? | Similitud |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------|
| <i>Arabidopsis lyrata</i> | 927888 | Sí | 97,0 % |
| <i>Manihot esculenta</i> | Cassava14052 | Sí | 72,3 % |
| <i>Carica papaya</i> | Evm.model.supercontig_73.12 | Sí | 73,3 % |
| <i>Vitis vinifera</i> | GSVIVT00033683001 | Sí | 73,5 % |
| <i>Medicago truncatula</i> | Medtr7g103940.1 | Sí | 69,6 % |
| <i>Cucumis sativus</i> | Cucsa.33733.1 | Sí | 68,8 % |
| <i>Brachypodium distachyon</i> | Bradi2g53170.1 | Sí | 68,8 % |
| <i>Sorghum bicolor</i> | Sb03g037860.1 | Sí | 67,8 % |
| <i>Oryza sativa</i> | 13101.m06375 | Sí | 68,3 % |
| <i>Ricinus comunis</i> | 29818.m000394 | Sí | 66,8 % |
| <i>Physcomitrella patens</i> | 164579 | No | 66,6 % |
| <i>Physcomitrella patens</i> | 116788 | No | 66,6 % |
| <i>Vitis vinifera</i> | GSVIVT00031113001 | No | 62,9 % |
| <i>Mimulus guttatus</i> | mgf09622m | No | 63,6 % |
| <i>Ricinus comunis</i> | 30128.m008638 | No | 63,4 % |
| <i>Ricinus comunis</i> | 29747.m001062 | No | 71,0 % |
| <i>Glycine max</i> | GLYma07g32790.1 | No | 64,4 % |

En la alineación de las secuencias de aminoácidos de cada una de ellas, comparadas con las secuencias de las proteínas CS26 y OAS-B, podemos observar que la delección coincide con la que encontrábamos en CS26. Sólo en el caso de *Cucumis sativus* esta delección es un poco más pequeña de la esperada, con sólo 7 aminoácidos, tal y como se observa en la figura 16.

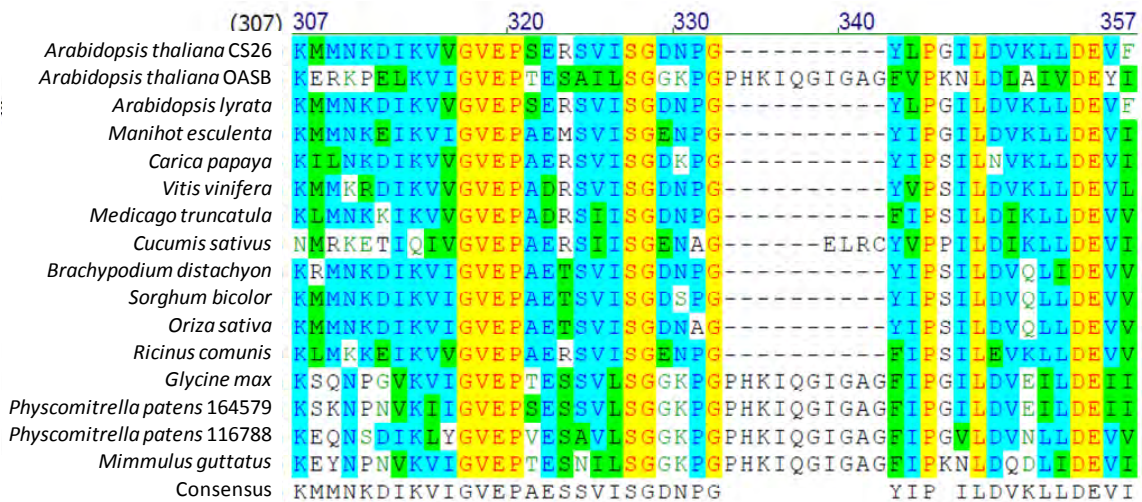


Figura 16. Alineamiento parcial de secuencias de aminoácidos de varias proteínas ortólogas a CS26.

El alineamiento se creó con el programa Vector NTI. El fondo de color amarillo indica residuos idénticos, el color azul indica residuos consenso derivados de un bloque de residuos similares y el color verde indica residuos con cambios conservados respecto al bloque de residuos consenso en una posición dada.

1.8. Determinación de la actividad S-Sulfocisteína sintasa en distintos organismos

Para corroborar la presencia y la actividad de la enzima S-Sulfocisteína sintasa en los organismos previamente descritos, se procedió a la determinación de la actividad SSCS en alguno de aquellos que presentaban la delección de 10 aminoácidos, así como en otros en los que no la presentaban, como control negativo.

En la cianobacteria *Synechocystis sp* PCC 6803 y el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* no se encontró actividad SSCS. En la Tabla 13 se muestran los datos de actividades determinadas en diferentes plantas. La medida de actividad SSCS se realizó inicialmente en extracto de hojas, no observándose actividad en ninguna de las plantas estudiadas. Puesto que en *Arabidopsis* los niveles de actividad SSCS son muy bajos y difícilmente detectables en un extracto total de hojas, procedimos a realizar las medidas de actividad en un extracto enriquecido de cloroplastos, tal y como se describe en materiales y métodos. Los organismos que mostraron actividad fueron *Brachypodium distachyon* y *Ricinus comunis*. En el análisis *in silico* previamente realizado se observó que ambos organismos tenían una proteína ortóloga a CS26 que presentaba la delección de aminoácidos entre los dominios β 8A y β 9A. Sin embargo, no se pudo determinar la actividad SSCS en *Oryza sativa* y *Medicago truncatula*, aun cuando estos organismos contenían una proteína similar a CS26. En *Glycine*, donde no se identificó un ortólogo con delección, no se observó actividad SSCS.

Tabla 13. Actividad SSCS en diferentes plantas.

Las distintas plantas fueron cedidas por diferentes grupos del IBVF. Las medidas se realizaron en extracto de hojas y de cloroplastos. Nd = No detectada. Los datos mostrados corresponden a valores medios \pm SD de tres análisis independientes.

| Organismo | Delección | Actividad SSCS | |
|--------------------------------|-----------|------------------------------|-------------------------------------|
| | | Extracto de hojas (mU/mg) | Extracto de cloroplastos (mU/mg) |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Sí | 6,9 \pm 0,5 | 84,7 \pm 2,6 |
| <i>Oryza sativa</i> | Sí | Nd | Nd |
| <i>Brachypodium distachyon</i> | Sí | Nd | 265 \pm 26 |
| <i>Ricinus comunis</i> | Sí | Nd | 112 \pm 19 |
| <i>Medicago truncatula</i> | Sí | Nd | Nd |
| <i>Glycine max</i> | No | Nd | Nd |

2. Análisis de mutantes insercionales de T-DNA en los genes *CS26* y *OAS-B* de *Arabidopsis thaliana*

2.1. Identificación y caracterización de los mutantes

A partir de los datos disponibles en TAIR (The Arabidopsis Information Resource, www.arabidopsis.org), se obtuvieron y analizaron plantas de las líneas mutantes GABI_376E08 y SALK_034133 para el gen *CS-26* y de las líneas mutantes GABI_684B07 y SALK_02183 para el gen *OAS-B* (Figura 17).

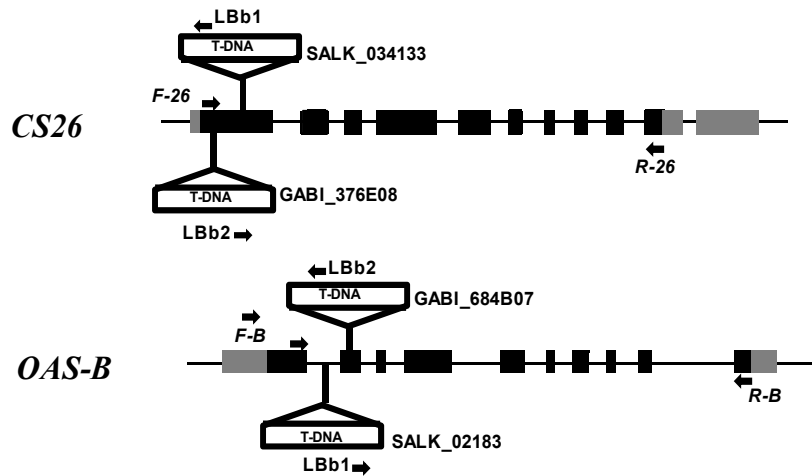


Figura 17. Estructura genómica de *CS26* y *OAS-B* y localización de la inserción de T-DNA.

Se muestra la organización genómica de los genes *CS26* (*At3g03630*) en los mutantes SALK_03413 y GABI_376E08, y *OAS-B* (*At2g43750*) en los mutantes de inserción de T-DNA GABI_684B07 y SALK_02183. *LBb1*, *LBb2*, *F-26*, *R-26*, *F-B* y *R-B* muestran la localización y dirección de los oligos utilizados en la búsqueda de plantas mutantes. La estructura de los genes y la región de T-DNA no están dibujadas a escala.

Mediante PCR se comprobó la localización, orientación del inserto de T-DNA y la posible homocigosis de la planta para la inserción, utilizando oligos específicos del T-DNA *LBb1* y *LBb2* y específicos de los genes *CS26* y *OAS-B*. Mediante análisis de RT-PCR de las plantas homocigotas se determinó que no existía amplificación para los mutantes insercionales en *CS26* con los oligos *F-26* y *R-26*, ni para los mutantes insercionales en *OAS-B* con los oligos *F-B* y *R-B*, sugiriendo que estos son mutantes nulos (knockouts) (Figura 18). Para el desarrollo posterior del trabajo de investigación se han seleccionado los mutantes SALK_034133 y GABI_684B07 a los que a partir de ahora se les denomina mutantes *cs26* y *oas-b*, respectivamente.

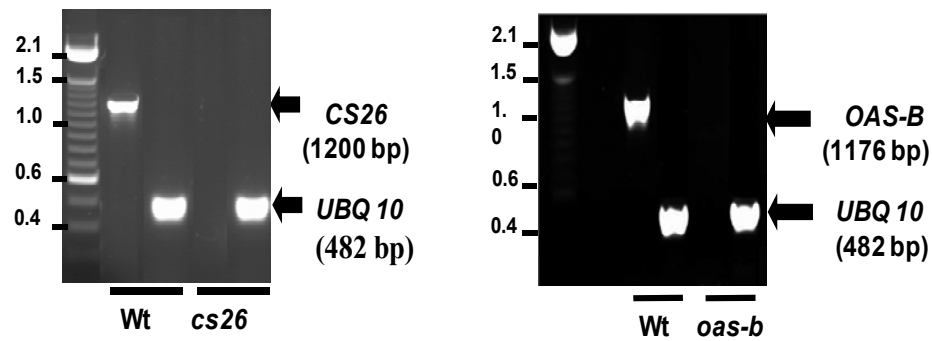


Figura 18. Análisis RT-PCR de las plantas mutantes *cs26* y *oas-b*.

Se preparó mRNA de hojas de plantas de dos semanas y se realizaron los análisis de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para *CS26* (F26/R26), *OAS-B* (F-B/R-B) y de *UBQ10* como gen constitutivo.

También se generó una línea complementada del mutante *cs26*, *cs26::P35S-CS26*, para comprobar la complementación de algunas características fenotípicas del mutante. Para ello, se amplificó por RT-PCR un fragmento de cDNA de 1215 pb que contenía la secuencia codificante completa de *cs26*, con una extensión en el extremo 5' de CACC, utilizando Profreading Platinum Pfx polimerasa (Invitrogen). El fragmento se clonó en el vector pENTRY/D-TOPO (Invitrogen) y luego fue transferido al vector pMDC32 (Curtis y Grossniklaus, 2003) utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen). La construcción final se introdujo en *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación, y éste posteriormente en las plantas mutantes *cs26*. Ésta línea complementada expresaba el gen *CS26* a unos niveles superiores a los obtenidos con la línea silvestre, probablemente porque *CS26* se encuentra bajo el control de un doble promotor 35S del CaMV (Figura 19).

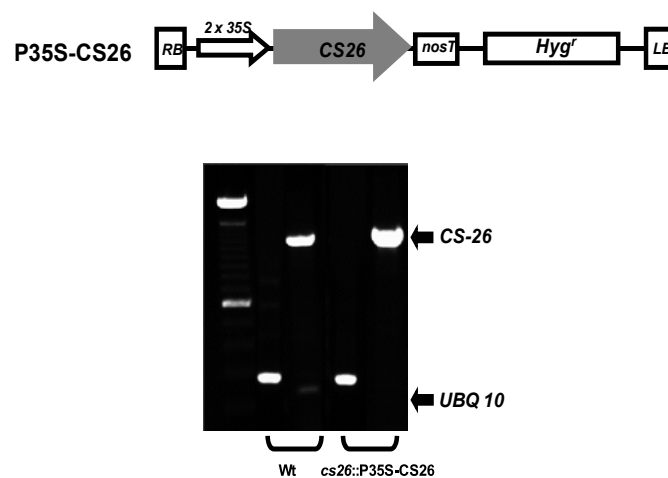


Figura 19. Esquema ilustrativo de la construcción usada para la obtención de la línea complementada *cs26::P35S-CS26* y análisis mediante RT-PCR de la expresión del transcrito *CS26* en la línea complementada.

2.2. Análisis fenotípico de los mutantes *cs26* y *oas-b* en diferentes condiciones de crecimiento

2.2.1. Dependencia del fotoperiodo

En condiciones normales de crecimiento de día largo (16 h luz / 8 h oscuridad), las plantas de la línea mutante *oas-b* no mostraron un fenotipo diferencial a la línea silvestre; sin embargo, las plantas de la línea mutante *cs26* crecidas también en condiciones de día largo mostraron una reducción significativa de su tamaño y hojas de color verde pálido (Figura 20A).

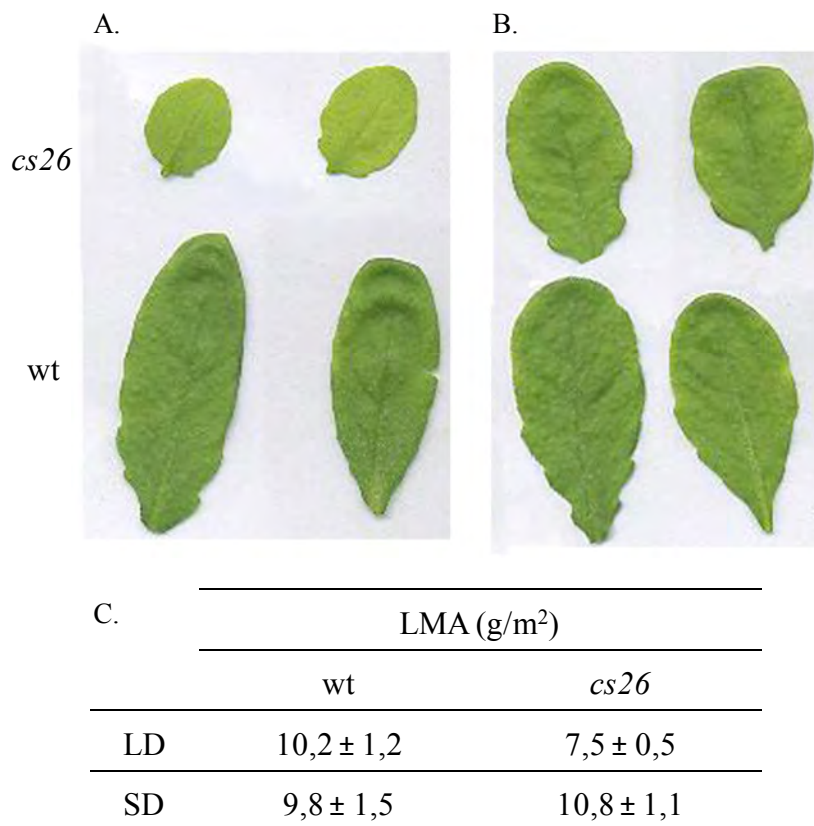


Figura 20. Características fenotípicas de la línea *cs26*.

A: Hojas de plantas crecidas en condiciones de día largo durante 3 semanas.

B: Hojas de plantas crecidas en condiciones de día corto durante 5 semanas.

C: Peso específico foliar (LMA) de cada línea. Se realizó el cálculo de las dos líneas para cada fotoperiodo utilizando cinco réplicas de hojas. LD: día largo, SD: día corto.

Se calculó el peso fresco de las plantas del mutante *cs26*, resultando que éste era sólo el 24 % del peso fresco total de las plantas de la línea silvestre en condiciones de ciclo largo. Además, se realizó el cálculo del peso específico foliar (proporción entre el

peso seco de la hoja y su área) de cada línea, siendo para *cs26* de aproximadamente un 75 % del correspondiente a la línea silvestre en ciclo largo (Figura 20C). En condiciones de ciclo corto (8 h luz / 16 h oscuridad) no hay diferencias significativas con respecto a silvestre. Para verificar que el fenotipo observado en la línea de *cs26* era debido sólo a la mutación del gen *CS26*, esta línea se complementó usando el fragmento completo de cDNA (descrito anteriormente), generándose la línea complementada *cs26::P35S-CS26*, recuperándose el fenotipo silvestre cuando se crecía en condiciones de día largo (Figura 21A).

Las características fenotípicas de las plantas mutantes *cs26* eran dependientes del régimen de luz. De este modo, cuando estas plantas crecían bajo un régimen de luz continua exhibían una mayor reducción en tamaño y una mayor palidez en el color de las hojas (Figura 21B). Sin embargo, en condiciones de fotoperiodo de día corto, el mutante *cs26* es fenotípicamente indistinguible de las plantas silvestres, de la línea complementada y del mutante *oas-b*. También se observó que las plantas mutantes crecidas en medio MS con sacarosa y fotoperiodo de día largo mostraron un fenotipo similar a las plantas de la línea silvestre.

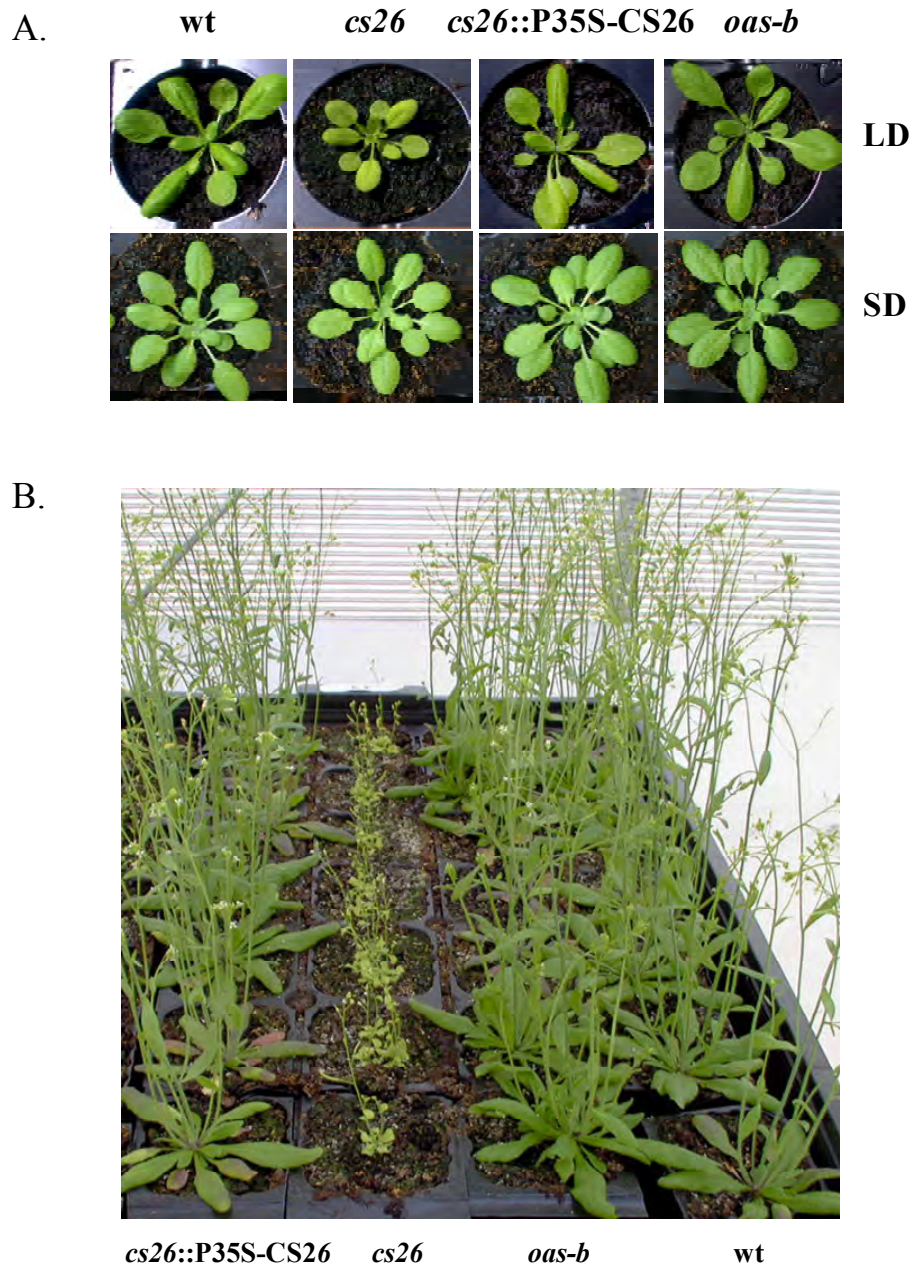


Figura 21. Fenotipo de los mutantes *cs26* y *oas-b*, así como de la línea complementada *cs26::P35S-CS26*.

A. Plantas crecidas en tierra en condiciones de día largo (LD) y día corto (SD) durante 3 y 4 semanas, respectivamente.

B. Plantas crecidas en tierra en condiciones de luz continua durante 4 semanas.

2.2.2. Condiciones de sequía

Las plantas de la línea mutante *cs26* crecidas en condiciones de día largo mostraron resistencia a desecación cuando éstas se dejaron de regar, en comparación con las plantas de la línea silvestre, observándose ya una diferencia significativa tras 8

días sin riego. Las plantas mutantes *oas-b* mostraron el mismo comportamiento que las silvestres. Cuando se vuelve a regar a los 13 días de sequía, donde ya se observan los síntomas de decaimiento y clorosis, las plantas *cs26* fueron capaces de recuperarse mostrando un aspecto sano, al contrario que las plantas de la línea silvestre (Figura 22A).

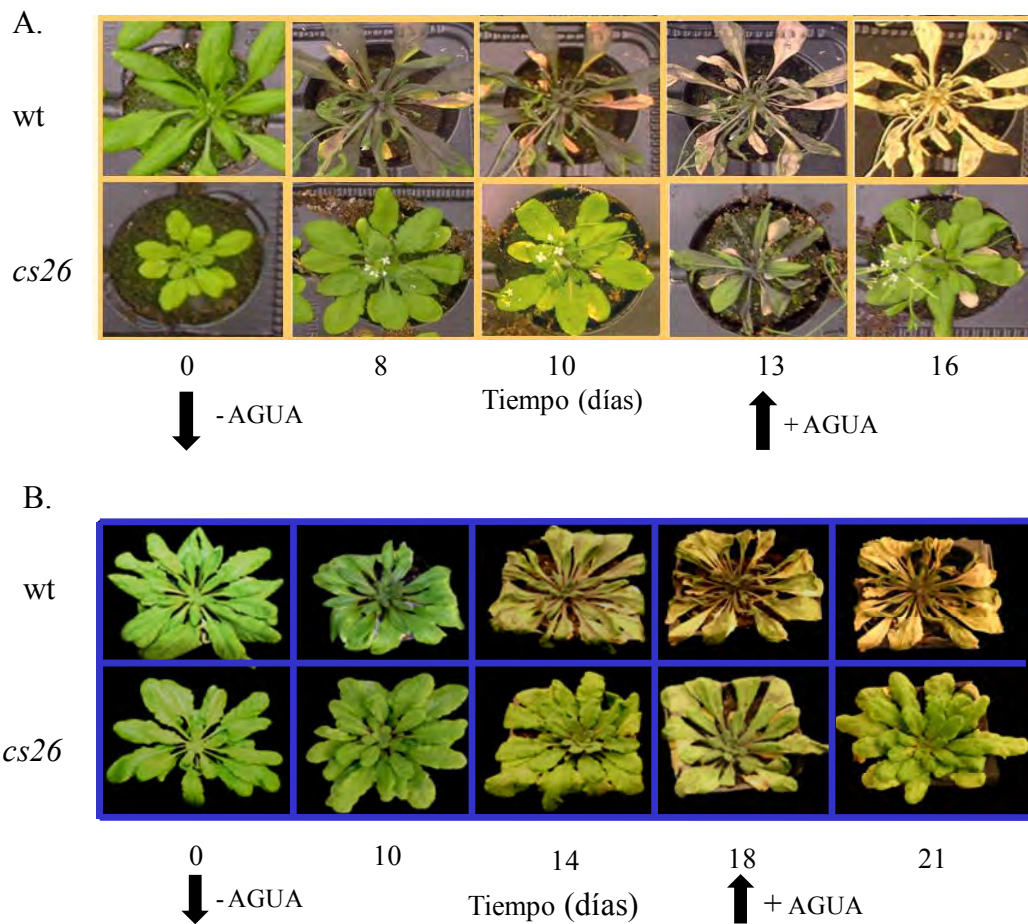


Figura 22. Respuesta a sequía de las líneas silvestre y mutante *cs26*.

A. Plantas crecidas en tierra en condiciones de día largo. Las plantas crecidas durante 3 semanas dejaron de regarse durante 13 días, a partir del cual volvieron a ser regadas.

B. Plantas crecidas en tierra en condiciones de día corto. Las plantas crecidas durante siete semanas dejaron de regarse durante 18 días, a partir del cual volvieron a ser regadas.

En condiciones de ciclo corto (Figura 22B) se observó un comportamiento similar, aunque menos acusado que en ciclo largo. Las plantas se dejaron de regar durante 18 días, observándose que el mutante *cs26* permanecía más saludable que la línea silvestre. Al igual que lo observado en ciclo largo, cuando se volvió a regar, se observó una recuperación de las plantas *cs26*, pero no de las silvestres. El mutante *oas-b* mostró el mismo comportamiento que la línea silvestre.

En relación con estos datos obtenidos, se estudió la apertura estomática en cada una de las líneas en condiciones de día largo y día corto. La apertura del poro está controlada por el estado de turgencia de las dos células guardas, que depende de factores ambientales (humedad, luz, CO₂), así como cambios hormonales en los niveles de ABA y auxinas (Roelfsema y Hedrich, 2005; Vavasseur y Raghavendra, 2005). Se determinó la apertura estomática de las hojas incubadas en presencia de diferentes estímulos: como estímulo de apertura de estomas se usó una solución que contenía cloruro de calcio y como estímulo de cierre de estomas se usó una solución que contenía ácido abscísico (ver materiales y métodos).

En condiciones de ciclo largo se observó que en las plantas de la línea mutante *cs26* la apertura estomática es significativamente menor que en el caso de las plantas de la línea silvestre tanto en presencia del estímulo de cierre, como con el de apertura, mientras que en condiciones de ciclo corto, no se observaron diferencias significativas (Figura 23). Estos datos parecen indicar que la resistencia a sequía de *cs26* en día largo puede ser debido a una menor apertura de los estomas.

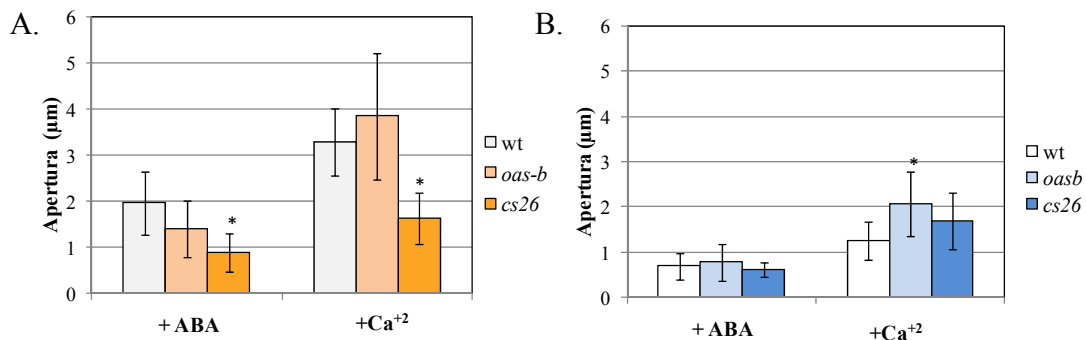


Figura 23. Apertura estomática en epidermis de hojas de plantas crecidas en condiciones de ciclo largo (A) y ciclo corto (B).

Las medidas se realizaron incubando las hojas en presencia de ácido abscísico, como estímulo de apertura, y en presencia de cloruro de calcio, como estímulo de cierre. Los valores son medias ± SD de 50 determinaciones. (*P < 0,05).

2.3. Análisis bioquímico de los mutantes *cs26* y *oas-b*

2.3.1. Determinación de actividades enzimáticas y contenido de tioles

Se midieron los niveles de actividad total OASTL y SSCS en extractos de hojas de plantas silvestres y mutantes *cs26* y *oasb*. La línea mutante *cs26* mostró el mismo nivel de actividad total OASTL en hojas que las plantas silvestres. Este resultado era esperable debido a la falta de actividad OASTL que exhibía la proteína recombinante CS26. La actividad SSCS en extracto crudo de hojas de plantas silvestres presentaban

unos niveles muy bajos, de dos órdenes de magnitud inferior a la actividad OASTL, no obteniéndose actividad en las plantas de la línea *cs26* (Tabla 14). También se analizó la actividad SSCS en la línea complementada *cs26::P35S-CS26*, obteniéndose un nivel de $37,4 \pm 1,51$ mU mg⁻¹, significativamente superior a la línea silvestre, quizás debido a una mayor expresión del transcrito bajo el doble promotor 35S. En el caso del mutante *oas-b*, la actividad enzimática OASTL disminuyó un 20 %; sin embargo, se detectó un aumento significativo de la actividad SSCS en este mutante (Tabla 14).

Por último, se comparó el contenido total de L-cisteína y glutatión en hojas. Los niveles de cisteína permanecieron inalterados, mientras que el contenido de glutatión es significativamente mayor en la línea *cs26*, no observándose diferencias significativas en el mutante *oas-b* (Tabla 14).

Tabla 14. Niveles de actividad enzimática y contenido de tioles en hojas.

La cuantificación de las actividades enzimáticas y el contenido de tioles se determinaron en hojas de la línea silvestre y los mutantes *cs26* y *oas-b* crecidas en tierra en condiciones de día largo. Los valores son medias \pm SD (N = 4). Los asteriscos indican que existe significancia estadística, **P < 0.01. nd, no detectable.

| Línea | Actividad OASTL (U/mg) | Actividad SSCS (mU/mg) | L-Cisteína (nmol/g FW) | Glutatión (nmol/g FW) |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| wt | $3,65 \pm 0,08$ | $6,9 \pm 0,5$ | $16,6 \pm 2,0$ | 257 ± 17 |
| <i>oas-b</i> | $2,92 \pm 0,05^{**}$ | $9,3 \pm 0,5^{**}$ | $16,3 \pm 1,8$ | 269 ± 15 |
| <i>cs26</i> | $3,36 \pm 0,04$ | nd | $17,9 \pm 1,6$ | $338 \pm 21^{**}$ |

Debido a los niveles tan reducidos de actividad SSCS en extractos de hojas, obtuvimos una preparación enriquecida de cloroplastos que reveló que la actividad SSCS en las plantas silvestres fue de $84,7 \pm 2,6$ mU/mg. Esta actividad es diez veces mayor que la encontrada en los extractos de hojas, sugiriendo que la localización de esta enzima es preferentemente cloroplástica (Figura 24). Al igual que en los extractos de hojas, no se encontró actividad en el extracto de cloroplastos aislados de la línea *cs26*. Esta actividad también se detectó en la línea *oas-b*, con un incremento en los valores de actividad con respecto a la línea silvestre en condiciones de ciclo largo, tal como se había observado en el extracto total de hojas.

Se realizó el mismo análisis en condiciones de crecimiento de ciclo corto, no observándose actividad SSCS en el mutante *cs26*. Se obtuvieron unos niveles en extracto de hojas un poco superiores a los encontrados en ciclo largo tanto en silvestre

como en *oas-b*. En cuanto a los valores encontrados en cloroplastos aislados, no existían diferencias significativas en la línea silvestre. Sin embargo, en el caso de la línea *oas-b*, la actividad SSCS disminuyó aproximadamente un 25 % con respecto a la encontrada en ciclo largo.

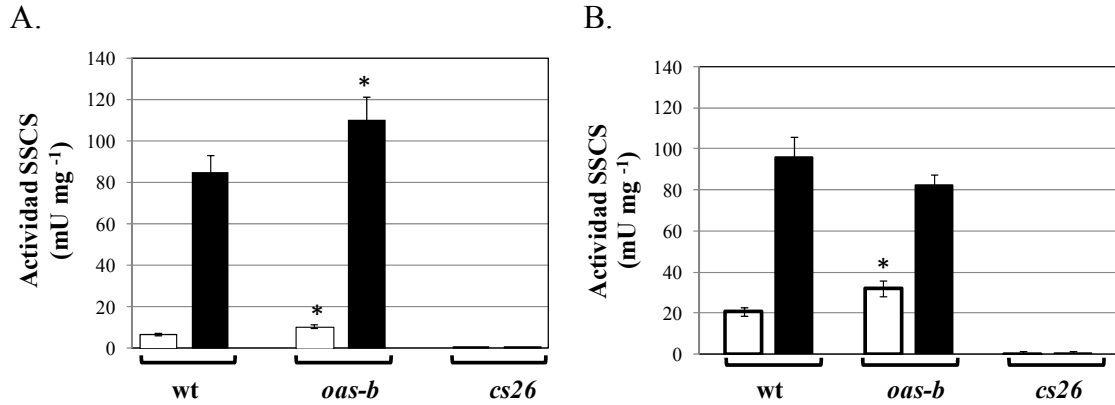


Figura 24. Actividad SSCS en extracto de hojas y extracto enriquecido en cloroplastos.

La actividad SSCS fue medida en extracto de hojas (columnas blancas) y en extracto enriquecidos en cloroplastos (columnas negras) de las líneas silvestre, *oas-b* y *cs26*, en condiciones de ciclo largo (A) y ciclo corto (B). Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones experimentales independientes. (*P < 0,05)

Para corroborar la actividad detectada en cloroplastos, estos extractos se analizaron mediante infusión directa en la trampa iónica para verificar la presencia del metabolito S-sulfocisteína. En la figura 25 se observa los espectros de masas detectados para cada una de las líneas para el compuesto S-sulfocisteína, con una relación m/z de 202. Se puso de manifiesto que en la línea mutante *cs26* no se hallaba presente la S-sulfocisteína, puesto que no se detectó el compuesto buscado con el patrón isotópico típico que presenta la S-sulfocisteína, mientras que para las otras dos líneas sí.

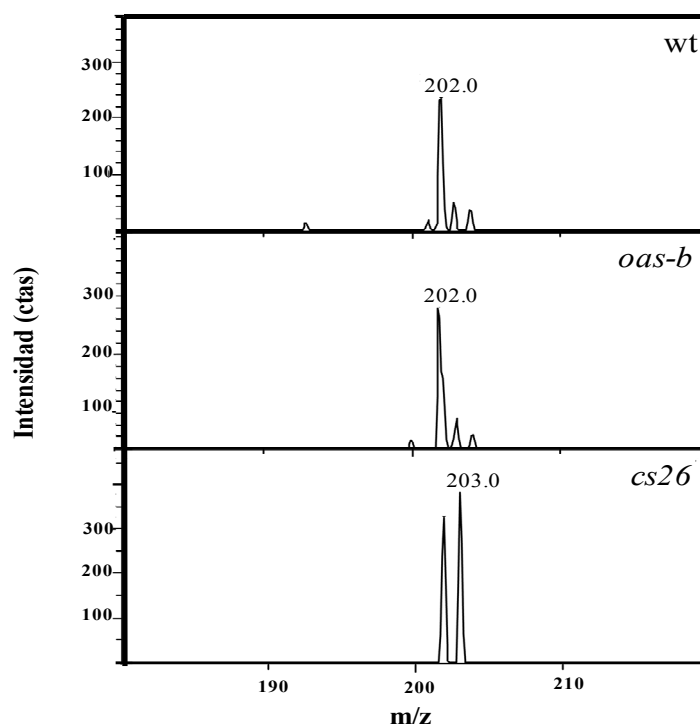


Figura 25. Detección del metabolito S-sulfocisteína en cloroplastos.

Se realizó infusión directa de los extractos enriquecidos en cloroplastos de las líneas silvestre y mutantes *oas-b* y *cs26*; y se registró el espectro de masas del ión con $m/z\ 202 \pm 1$ en la trampa iónica.

También se realizó el análisis del contenido de tioles en los extractos de cloroplastos. Mediante el análisis por HPLC-MS y HPLC-UV se mostró que existía una mayor concentración de glutatión reducido y cisteína, así como de γ -glutamyl-L-cisteína (γ -EC) en las plantas de la línea mutante *cs26* en condiciones de ciclo largo (Tabla 15). Como puede observarse, la mayor acumulación correspondió a glutatión reducido, que presentó valores que triplicaron el contenido detectado en la planta silvestre. También se realizó la medida de glutatión oxidado, y el valor obtenido fue también mayor en la línea mutante *cs26* al compararlos con el obtenido en la línea silvestre. En condiciones de ciclo corto, no fue posible la detección de cisteína y glutatión oxidado en ninguna de las líneas. Se observa que el contenido de glutatión reducido y γ -EC es considerablemente mayor en la línea del mutante *cs26*, llegando en ambos casos a duplicar los valores calculados en plantas silvestres.

En los extractos de cloroplastos del mutante *oas-b* se observó que, en condiciones de crecimiento de ciclo largo, presentó una reducción significativa del contenido de cisteína y γ -EC, así como de los niveles de glutatión oxidado. Sin embargo, los niveles de glutatión reducido son equiparables a los que muestra la línea silvestre. En condiciones de ciclo corto por el contrario, los niveles de glutatión reducido aumentaron considerablemente con respecto al silvestre, al igual que los

niveles de γ -EC, detectándose concentraciones que triplican los valores obtenidos con plantas silvestres, no pudiéndose detectar glutatión oxidado y cisteína.

Tabla 15. Contenido de tioles presentes en extractos enriquecidos en cloroplastos.

Se analizaron los compuestos tiólicos de extracto enriquecido en cloroplastos de plantas de las líneas silvestre, *cs26* y *oasb* crecidas en condiciones de ciclo largo y ciclo corto. Los valores son medias \pm SD (N = 3). Los asteriscos indican que existe significancia estadística, ** $P < 0.01$. nd, no detectable. ^a Método HPLC-MS, ^b Método HPLC-UV.

| Línea | Ciclo Largo | | | |
|--------------|--|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | γ -EC ^a (nmoles/mg) | GSH ^a (nmoles/mg) | GSSG ^a (nmoles/mg) | Cys ^b (nmoles/mg) |
| wt | 1,20 \pm 0,13 | 22 \pm 4 | 3,6 \pm 0,1 | 0,96 \pm 0,04 |
| <i>oas-b</i> | 0,38 \pm 0,01** | 21 \pm 4 | 2,4 \pm 0,2** | 0,60 \pm 0,06** |
| <i>cs26</i> | 1,40 \pm 0,19** | 80 \pm 16** | 4,5 \pm 0,5** | 1,21 \pm 0,04** |
| Línea | Ciclo Corto | | | |
| | γ -EC ^a (nmoles/mg) | GSH ^a (nmoles/mg) | GSSG ^a (nmoles/mg) | Cys ^b (nmoles/mg) |
| wt | 1,63 \pm 0,21 | 19,83 \pm 1,17 | nd | nd |
| <i>oas-b</i> | 5,04 \pm 0,14** | 72,39 \pm 2,00** | nd | nd |
| <i>cs26</i> | 3,41 \pm 0,51** | 44,77 \pm 2,25** | nd | nd |

2.3.2. Detección de especies reactivas de oxígeno

Debido a las características fenotípicas observadas en el mutante *cs26* en condiciones de día largo, se decidió analizar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La producción de superóxido se visualizó mediante tinción con NBT en hojas escindidas de plantas crecidas en ambos fotoperiodos. La aparición de una coloración azul oscuro reveló la acumulación de los aniones superóxidos en las hojas del mutante *cs26* comparadas con las de la línea silvestre en día largo (Figura 26). La detección de H_2O_2 se realizó mediante tinción con DAB en hojas escindidas de plantas de ambos fotoperiodos. Se observó una mayor acumulación de agua oxigenada en las plantas de la línea *cs26* detectada por la presencia de coloración amarillo-pardo distribuida de forma homogénea a lo largo de la hoja. Sin embargo, en condiciones de ciclo corto (figura 26, E-H) no se observa acumulación de especies reactivas de oxígeno en ninguna de las

líneas. El mutante *oas-b* tampoco presentaba acumulación de ROS en ninguna de las condiciones estudiadas, mostrando el mismo comportamiento que las plantas silvestres (datos no mostrados).

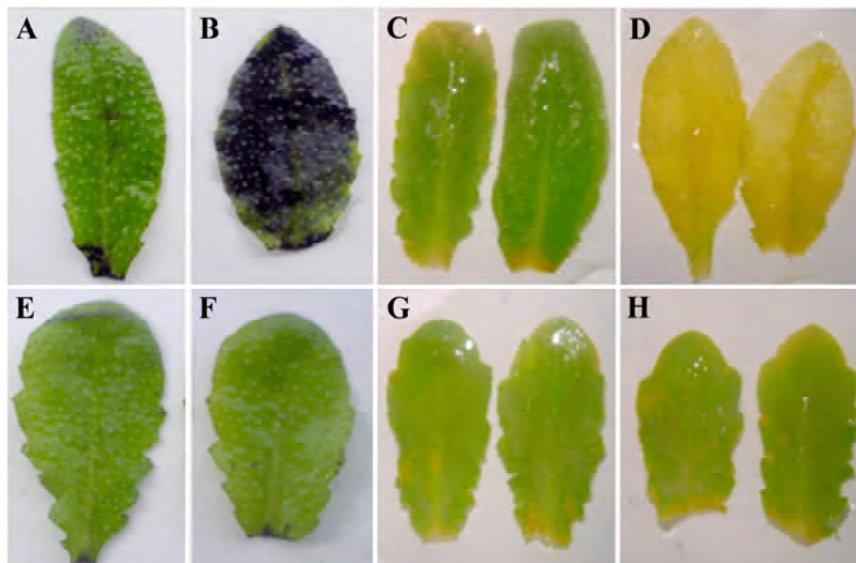


Figura 26. Acumulación de especies reactivas de oxígeno en hojas del mutante *cs26*.

(A) y (B): Detección histoquímica del anión radical superóxido en líneas silvestre y mutante *cs26*, respectivamente, en hojas de plantas crecidas tres semanas en condiciones de día largo, mediante tinción con NBT.

(C) y (D): Detección histoquímica de H_2O_2 en silvestre y mutante *cs26*, respectivamente, en hojas de plantas crecidas tres semanas en condiciones de día largo, mediante tinción con DAB.

(E)-(F): Detección histoquímica del radical superóxido en silvestre y mutante *cs26*, respectivamente, en hojas de plantas crecidas durante 5 semanas en condiciones de día corto.

(G)-(H): Detección histoquímica de H_2O_2 en silvestre y mutante *cs26*, respectivamente, en hojas de plantas crecidas durante 5 semanas en condiciones de día corto.

2.3.3. Análisis de la expresión de la familia génica OASTL

El análisis de la expresión de la familia génica OASTL en las líneas *cs26* y *oas-b* mediante qPCR se realizó en hojas de plantas crecidas en condiciones de día largo y de día corto.

Como se puede observar en la figura 27, existen cambios significativos ($\log_2 > 2$ ó $\log_2 < 0,5$) de algunos de los genes analizados. En el mutante *cs26* se observó que los genes *CYS-D2* y *OAS-C* estaban reprimido e inducido, respectivamente, de forma significativa, y que esta alteración era independiente del régimen lumínico. Se observó además una mayor alteración en los niveles de los transcritos de forma general en ciclo largo. Es interesante resaltar que el comportamiento de los genes *CYS-C1* y *CYS-D1* es

diferente según el régimen lumínico de crecimiento del mutante *cs26*, observándose una acumulación de transcrito en condiciones de ciclo largo, y reducción en día corto.

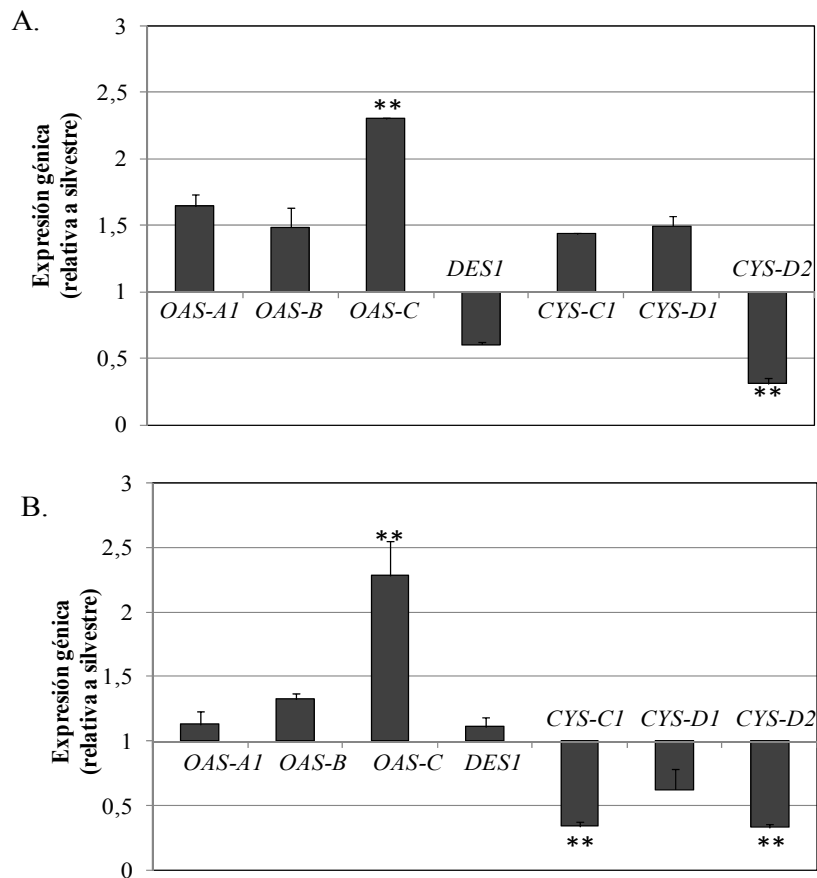


Figura 27. Niveles de expresión relativa de la familia génica OASTL en plantas mutantes *cs26*.

Análisis de la expresión de los genes *OAS-A1* (*At4g14880*), *OAS-B* (*At2g43750*), *OAS-C* (*At3g59760*), *DES1* (*At5g28030*), *CYS-C1* (*At3g61440*), *CYS-D1* (*At3g04940*), y *CYS-D2* (*At5g28020*) en hojas de plantas crecidas en condiciones de día largo (A) y día corto (B). Los niveles de los transcritos se normalizaron con el gen constitutivo *UBQ10*. Los datos corresponden a las medidas \pm SD de tres análisis independientes y representan los niveles de transcrito de cada gen en las plantas mutantes relativo a los niveles de transcrito en las plantas silvestres (** $P < 0,01$).

En cuanto a la línea *oas-b*, en condiciones de ciclo largo los genes *OAS-C* y *CS26* presentaron acumulación significativa de sus transcritos (Figura 28A). La inducción del gen *CS26* concuerda con los niveles de actividad SSCS encontrados en el análisis en extracto de hojas y cloroplastos antes mencionado, donde se observaba un aumento de actividad en esta línea. En condiciones de ciclo corto, los genes *OAS-C* y *CYS-D1* se encontraron inducidos, mientras que el resto de genes no varían significativamente (Figura 28B).

Por último, es interesante resaltar que el gen *OAS-C* se encontró inducido tanto en condiciones de día largo como de día corto, y en ambas líneas *cs26* y *oas-b*.

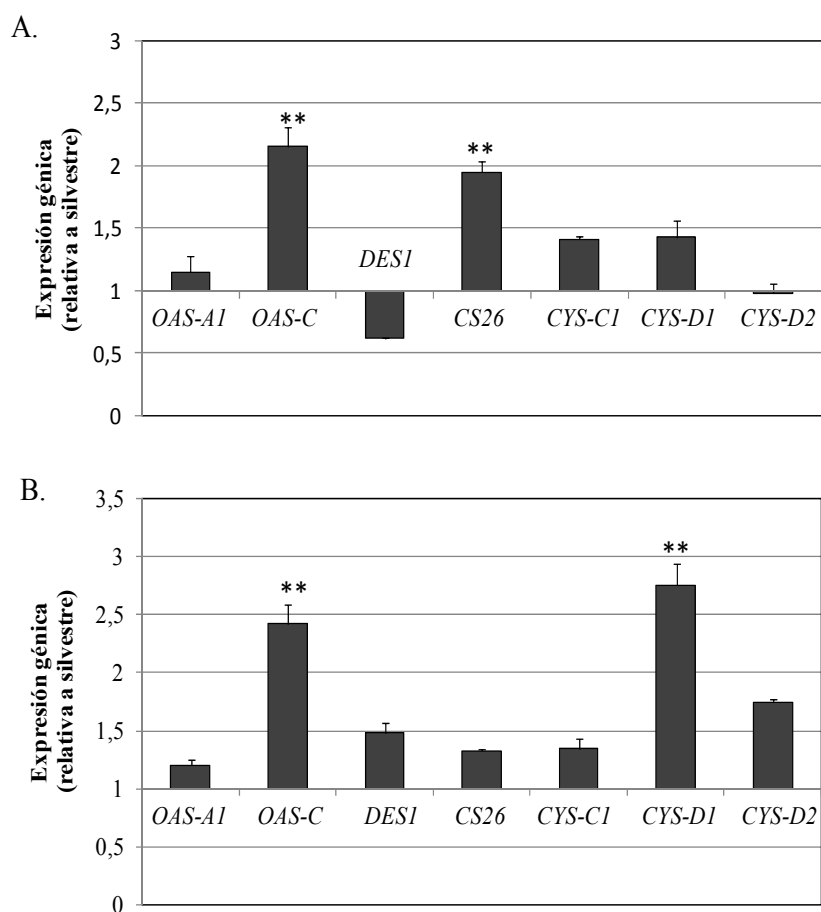


Figura 28. Niveles de expresión relativa de la familia génica OASTL en plantas mutantes *oas-b*.

Análisis de la expresión de los genes *OAS-A1* (*At4g14880*), *OAS-C* (*At3g59760*), *DES1* (*At5g28030*), *CS-26* (*At3g03630*), *CYS-C1* (*At3g61440*), *CYS-D1* (*At3g04940*), y *CYS-D2* (*At5g28020*) en hojas de plantas crecidas en condiciones de día largo (A) y día corto (B). Los niveles de los transcritos se normalizaron con el gen constitutivo *UBQ10*. Los datos corresponden a las medidas \pm SD de tres análisis independientes y representan los niveles de transcrito de cada gen en las plantas mutantes relativo a los niveles de transcrito en las plantas silvestres (** $P < 0,01$).

2.4. Localización subcelular de CS26 en el cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*

2.4.1. Detección de la proteína CS26 en diferentes fracciones cloroplásticas

La detección de la proteína CS26 se llevó a cabo mediante aislamiento de las fracciones de estroma y lumen, tal y como se describe en materiales y métodos, y posterior detección con anticuerpos policlonales anti-CS26 mediante análisis de Western Blot. Este anticuerpo policlonal se obtuvo a partir de preparaciones purificadas de la proteína CS26 recombinante. Utilizando diferentes ensayos con la proteína

recombinante, se puso a punto el título adecuado (1:30000) y la fracción IgG que mostraba mayor especificidad (extracción final).

A partir de 20 g de hojas de plantas se obtuvieron preparaciones proteicas de estroma y lumen siguiendo el protocolo descrito por Kieselbach (Kieselbach *et al.*, 1998). Puesto que previamente habíamos observado que los anticuerpos anti-CS26 reconocían otras proteínas OASTL como OAS-B debido a la alta homología de secuencia, obtuvimos preparaciones de estroma y lumen de plantas silvestres y plantas mutantes *oas-b* y *cs26*. De esta forma, por comparación de los resultados en las diferentes líneas podríamos identificar específicamente la banda correspondiente a la proteína CS26. Se realizó el análisis de la proteína por duplicado, de forma que una réplica se teñía con Coomassie y en la otra se realizaba el Western Blot utilizando los anticuerpos policlonales frente a la proteína recombinante CS26. En los geles teñidos correspondientes tanto a la fracción estromática y luminal, escindimos algunas bandas proteicas más abundantes para su identificación mediante MALDI-TOF. Como se observa en la figura 29, identificamos proteínas localizadas en el estroma y en el lumen en las fracciones respectivas, de forma que demostramos la alta pureza de las preparaciones obtenidas.

En la fracción estromática, los anticuerpos anti-CS26 reconocen diferentes proteínas, algunas de ellas están presentes en las tres líneas silvestre y mutantes *oas-b* y *cs26* y por tanto se consideran inespecíficas. Se observa una banda mayoritaria por debajo de 37 kDa que está ausente en el mutante *oas-b* y que corresponde, por tanto, a la proteína OAS-B debido a la reacción cruzada de los anticuerpos. El tamaño experimental calculado de 35,5 kDa coincide con el tamaño estimado de la proteína OAS-B madura que es de 35,4 kDa. Además, en la fracción de estroma, los anticuerpos reconocen una banda minoritaria por encima de 37 kDa que está presente en las fracciones de la línea silvestre y el mutante *oas-b*, pero que desaparece en el mutante *cs26* y que debe corresponder a la proteína CS26, con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa.

En el lumen, se observa una banda mayoritaria presente en las fracciones silvestres y mutante *oas-b* que no está presente en la fracción mutante *cs26*, así como una banda minoritaria de igual localización. Por tanto debe corresponder a la proteína CS26. En las fracciones de estroma y de lumen se observó una banda minoritaria correspondiente a CS26 con un peso aproximado de 40 kDa, que debe corresponder a una forma proteica no madura, con la pérdida del péptido tránsito al cloroplasto, o bien esta banda puede corresponder a una proteína con alguna modificación postraduccional. En la fracción del lumen tilacoidal, la otra banda de CS26 presentó un tamaño de 34,8 kDa, y la señal obtenida fue más intensa. Este tamaño de proteína coincide con el

tamaño teórico predicho por los programas TargetP y ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) de 34,1 kDa, y esta pérdida se debe al péptido de tránsito al lumen. Por lo tanto podemos concluir la localización de una pre-proteína CS26 de 40 kDa, y de una proteína madura CS26 en el lumen de 34,8 kDa, así como la localización exclusivamente estromática de OAS-B.

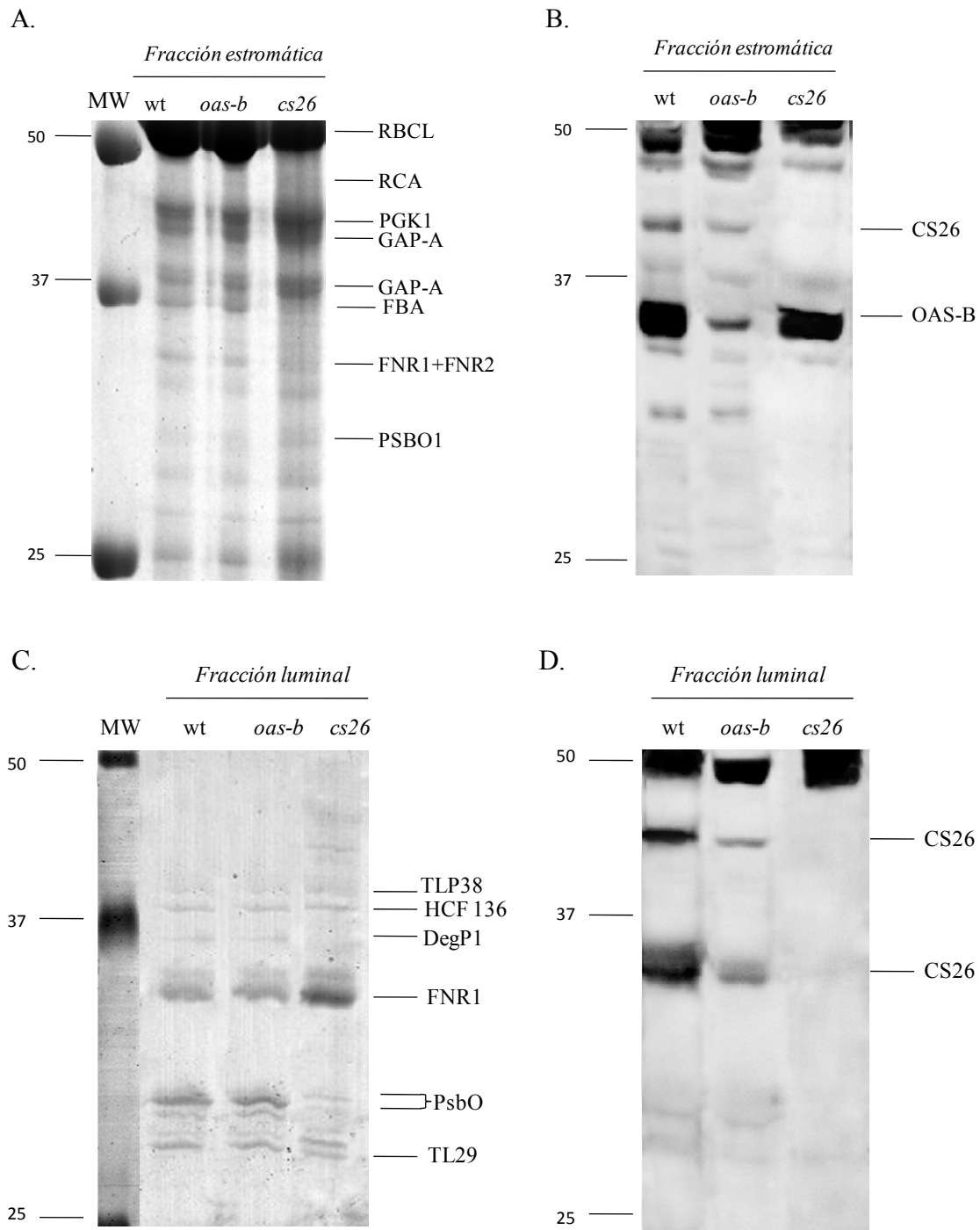


Figura 29. Localización de CS26 y OAS-B en cloroplastos de *Arabidopsis*.

A partir de 20 g de hojas de plantas silvestres, y mutantes *oas-b* y *cs26* crecidas durante 3 semanas en condiciones de día largo, se obtuvieron preparaciones proteicas de las fracciones estromáticas y

luminales de los cloroplastos aislados. Se sometieron a SDS-PAGE y una réplica se utilizó para detectar las proteínas mediante tinción con azul de Coomassie Brilliant Blue (A y C), y otra se sometió a análisis de Western Blot utilizando anticuerpos anti-CS26 (B y D). Las proteínas identificadas mediante MALDI-TOF son: RBCL (Rubisco Large Subunit), RCA (Rubisco Activase), GAP-A (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A subunit), PGK1 (phosphoglycerate kinase 1), FBA (fructose-bisphosphate aldolase, class I), FNR (Ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase), PSBO (Oxygen-evolving enhancer), TL29 (Ascorbate peroxidase 4), DegP1 (DEG Protease 1), HCF 136 (High chlorophyll fluorescence 136), TLP38 (Cyclophilin 38). Se señalan las bandas específicas de las proteínas OAS-B y CS26 detectadas por el anticuerpo. MW: patrones de peso molecular.

La concentración de proteína presente en cada una de las fracciones se calculó mediante titulación de la proteína CS26 con el software Quantity One (BioRad) a partir de concentraciones conocidas de la proteína recombinante, y se refirió a la cantidad de proteína total, determinada por el método de Bradford. Se observó que en el lumen había, aproximadamente, siete veces más cantidad de CS26 que en el estroma tanto en la línea silvestre como en *oas-b* (Tabla 16).

Tabla 16. Cantidad de proteína CS26 en las fracciones de estroma y lumen de las líneas silvestre y *oas-b*.

Se realizó una titulación de la concentración de CS26 en cada compartimento mediante SDS-PAGE y Western Blot.

| Línea | Fracción | Concentración estimada de CS26 (ng) | Concentración muestra total (ug) | Lumen/estroma |
|--------------|----------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------|
| Wt | Estroma | 3,2 | 100 | 6,8 |
| | Lumen | 6,5 | 30 | |
| <i>oas-b</i> | Estroma | 1,5 | 100 | 7,3 |
| | Lumen | 3,3 | 30 | |

2.4.2. Determinación de la actividad S-Sulfocisteína sintasa en diferentes fracciones cloroplásticas

Se determinó la actividad SSCS en extractos de estroma y lumen cloroplástico de plantas de las líneas silvestre y mutantes. La medida de actividad SSCS se realizó a partir de cloroplastos de hojas de plantas crecidas en ambos fotoperiodos, obteniéndose resultados similares para las líneas silvestre y *oas-b* en ambos; y no se detectó actividad en la línea mutante *cs26*. Los niveles de la actividad SSCS en el estroma de plantas silvestres y *oas-b* fueron muy pequeños comparados con los que se obtienen en la fracción luminal, que son tres órdenes de magnitud superiores en ambos fotoperiodos (Figura 30). Todos estos datos sugieren que la proteína CS26 detectada en el lumen con

un tamaño de 34,8 kDa es la activa. En ciclo corto, la actividad específica es ligeramente menor que en ciclo largo en las líneas silvestre y *oas-b*, concordando con los datos de expresión de *CS26* mostrados previamente en el mutante *oas-b*.

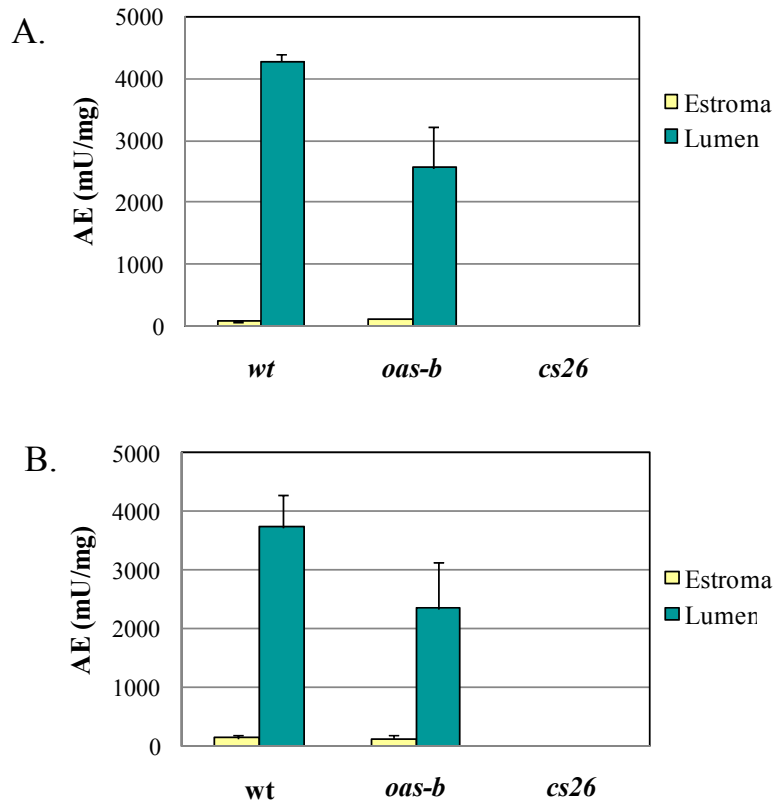


Figura 30. Actividad S-Sulfocisteína sintasa en fracción estromática y luminal de cloroplastos en ambos fotoperiodos.

Se determinó la actividad SSCS en extractos de estroma y lumen de plantas de las líneas silvestres y mutantes crecidas durante 3 semanas en ciclo largo (A) y durante 5 semanas en ciclo corto (B). No se detecta actividad en la línea del mutante *cs26*, y los valores observados en el estroma de silvestre y *oas-b* son muy bajos comparados con los que se obtienen en la fracción luminal.

2.4.3. Análisis del perfil proteómico del lumen tilacoidal del mutante *cs26*

Una vez localizada la proteína activa en la fracción luminal del cloroplasto, quisimos conocer si se observaban cambios significativos a nivel de proteína en este compartimento en ausencia de la misma. Para ello, tal y como se describe en materiales y métodos, se extrajeron las proteínas solubles del lumen de plantas silvestres y mutantes crecidas en condiciones de ciclo largo, y se separaron mediante 2D-PAGE. Éstas se visualizaron por tinción con plata y se cuantificaron con ayuda del programa informático PDQuest. Las imágenes representativas de los geles se muestran en la figura 31.

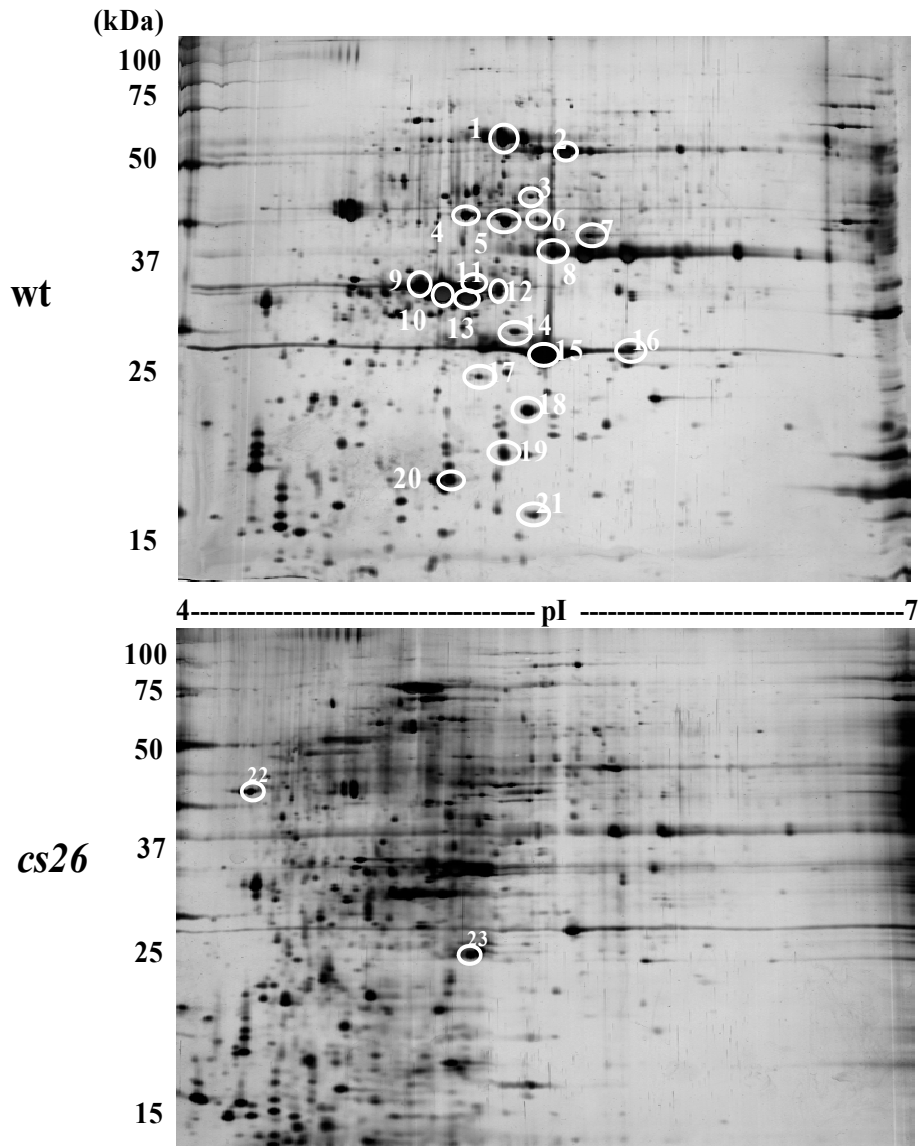


Figura 31. Mapa proteómico del lumen cloroplástico de las líneas silvestre y *cs26*.

Se muestran geles bidimensionales teñidos con plata de las proteínas luminales solubles de cloroplastos obtenidos de plantas crecidas en día largo durante 4 semanas. Se muestra mediante círculos las proteínas diferentes que han sido identificadas mediante MALDI-TOF.

Como se puede apreciar en la figura 31, existen diferencias significativas en cuanto al número de proteínas y la abundancia en ambas líneas. El análisis se restringió a aquellas proteínas que mostraban diferencias en su abundancia o que simplemente no aparecían en *cs26*. Estas proteínas se identificaron posteriormente mediante MALDI-TOF (Tabla 17). Además, casi todas las proteínas analizadas en la fracción luminal se identificaron como localizadas en el lumen, validándose así la pureza de la fracción luminal.

Tabla 17. Análisis mediante MALDI-TOF de los puntos analizados en el mapa proteómico del lumen de la línea silvestre y *cs26*.

En esta tabla se muestra la identificación, función y veces de cambio de las diferentes manchas proteicas aisladas.

| Punto | Nombre de la proteína | Gen | Función | Veces de cambio |
|---------|---|------------------------|---|------------------|
| 1 | ATP synthase CF1 α subunit (thylakoid membrane) | gi 7525018/ATCG00120 | Hydrogen ion transporting ATPase activity | 0.004 |
| 2 | ATP synthase CF1 β subunit (thylakoid membrane) | gi 7525040/ ATCG00480 | Hydrogen ion transmembrane transporter activity | 0 |
| 3 | C-terminal processing protease | gi 15236628/AT4G17740 | Serine-type peptidase activity / D1- processing protease | 0 |
| 4 | Cyclophilin/PPIase TLP38 | gi 42564190/AT3G15520 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity / immunophilin / protein folding | 0.14 |
| 5,6 | HCF136 (High chlorophyll fluorescence 136) | gi 15237225/AT5G23120 | Stability and/or assembly factor of photosystem II | 0.03 / 0 |
| 7 | DegP protease | gi 2565436/AT3G27925 | Trypsin-like serine protease | 0 |
| 8 | ATLFNR1 (LEAF FNR 1) (stroma /thylakoid membrane) | gi145334919/AT5G66190 | Ferredoxin:NADP(H) oxidoreductase / electron transporter | 0 |
| 9,10,11 | PSBO-1(Oxygen-evolving enhancer 33) | gi 15240013/ AT5G66570 | Oxygen evolving activity | 0.76 / 0-1/ 0.04 |
| 12,13 | PSBO-2 (Photosystem II subunit O-2) | gi 15230324/AT3G50820 | Oxygen evolving activity | 0 / 0-1 |
| 14 | Photosystem II reaction center PsbP family protein | gi 79325123/ AT4G15510 | Calcium ion binding | 0 |
| 15,16 | PSBP-1 (Oxygen-evolving enhancer protein 2) | gi 15222166/ AT1G06680 | Regulation of oxygen evolution | 0-1 / 0 |
| 17 | AAA-type ATPase family protein (localization?) | gi 18398708/ AT2G18330 | ATPase activity | 0 |
| 18 | Immunophilin/FKBP-type PPIase | gi 15224305/ AT2G43560 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity / protein folding | 0.01 |
| 19 | Thylakoid lumenal 17.9 kDa protein | gi 15234798/ AT4G24930 | Unknown | 0.03 |
| 20 | Thylakoid lumenal 17.4 kDa protein | gi 30696347 /AT5G53490 | Unknown | 0.01 |
| 21 | Thylakoid lumenal 15 kDa protein | gi 18406661/ AT2G44920 | Unknown | 0 |
| 22 | Plastid-lipid associated protein PAP (thylakoid membrane) | gi 15227428/ AT2G35490 | Structural molecule activity | 111.68 |
| 23 | Peptidase C1A papain family protein (endomembrane system) | gi 18396939/ AT1G29080 | Cysteine-type peptidase activity | ∞ |

A pesar de todos los esfuerzos, fue imposible identificar la proteína CS26 en la fracción luminal del proteoma de la línea silvestre. Sin embargo, se observó una fuerte alteración en muchas de las proteínas del lumen del mutante *cs26* cuando se comparó con silvestre. Las proteínas con dominio Pbsb-P, las subunidades extrínsecas al fotosistema II, la proteína HCF136, ciclofilinas y la isomerasa tipo peptidil-propil cistras FKB, proteasas DegP y D1, y las subunidades α y β de la proteína tilacoidal periférica ATP sintasas CF1 mostraron una represión fuerte en el mutante *cs26*. Proteínas asociada a lípidos plastídicos localizados en membrana tilacoidal (At2g35490) y una peptidasa tipo cisteína C1A (At2g29080) se mostraron muy inducidas en el mutante. Estos resultados demuestran que la deficiencia de CS26 en el lumen tiene un gran impacto en la estabilidad de numerosas proteínas luminales.

3. Análisis fotosintético del mutante *cs26* de *Arabidopsis thaliana*

El fenotipo mostrado por las plantas de la línea mutante *cs26* sugiere un posible defecto en el proceso fotosintético bajo las condiciones de crecimiento de día largo. Para investigar esta posibilidad, se realizó la medida del contenido de pigmentos y la actividad fotosintética en las líneas silvestre y *cs26*, así como la determinación de los parámetros fotosintéticos más relevantes.

3.1. Cuantificación de pigmentos

El análisis de pigmentos incluyó la medida de clorofilas *a* y *b*, así como de carotenoides. Este análisis reveló una reducción del 34 % y 38 % del contenido en clorofilas *a* y *b*, respectivamente, en las plantas de la línea *cs26* con respecto a plantas de la línea silvestre crecidas en condiciones de día largo (Tabla 18). Estos datos se calcularon en base al peso fresco. También se observó una reducción en el contenido de carotenoides en el mutante *cs26*. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en las plantas de la línea *oas-b* con respecto a la línea silvestre.

Por el contrario, cuando se realizó la cuantificación de pigmentos fotosintéticos en plantas crecidas en condiciones de día corto, no se observaron diferencias significativas en ninguna de las líneas.

Tabla 18. Contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas.

Las clorofilas a y b, así como el contenido de carotenos se midieron en extracto de acetona de hojas de plantas crecidas en condiciones de ciclo largo durante 4 semanas. Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes. Los asteriscos indican significancia estadística de $**P < 0,01$.

| Línea | Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g}/\text{mg}$ FW) | Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g}/\text{mg}$ FW) | Carotenos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ FW) |
|-------------|---|---|--|
| wt | $0,80 \pm 0,05$ | $0,29 \pm 0,02$ | $0,16 \pm 0,002$ |
| <i>cs26</i> | $0,53 \pm 0,03^{**}$ | $0,18 \pm 0,002^{**}$ | $0,12 \pm 0,004^{**}$ |

También se determinó el contenido total de clorofila en una fracción enriquecida en cloroplastos de las tres líneas antes mencionadas, donde se volvió a observar una reducción bastante importante en el caso de la línea *cs26* en condiciones de ciclo largo (Tabla 19). El número de cloroplastos se visualizó en un microscopio óptico con una cámara Neubauer, observándose que también había una menor cantidad de cloroplastos en el extracto de *cs26* en condiciones de ciclo largo. En condiciones de ciclo corto, la cuantificación de clorofila total no se ve alterada en ninguna de las dos líneas mutantes. Sin embargo, hay una reducción significativa del número de cloroplastos en la línea *cs26*, aunque no es tan drástica como en condiciones de crecimiento de ciclo largo. En el caso del mutante *oas-b*, en condiciones de ciclo largo no se apreciaron diferencias significativas con respecto a la línea silvestre, mientras que en ciclo corto se observó una reducción del número de cloroplastos, aunque la cantidad de clorofila permaneció inalterada.

Tabla 19. Contenido de clorofila total y número de cloroplastos.

La cantidad de clorofila se midió en extracto de acetona de cloroplastos de hojas de plantas crecidas en condiciones de ciclo largo durante 4 semanas, y ciclo corto durante 6 semanas. Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes. Los asteriscos indican significancia estadística de $**P < 0,01$.

| Línea | Ciclo Largo | | Ciclo Corto | |
|--------------|--|--|--|--|
| | Clorofila (mg / mL) | N° Cloroplastos ($\times 10^8$) (cloroplastos / g FW) | Clorofila (mg / mL) | N° Cloroplastos ($\times 10^8$) (cloroplastos / g FW) |
| wt | $0,94 \pm 0,05$ | $2,57 \pm 0,10$ | $1,42 \pm 0,10$ | $1,88 \pm 0,20$ |
| <i>cs-26</i> | $0,41 \pm 0,01^{**}$ | $1,10 \pm 0,10^{**}$ | $1,38 \pm 0,05$ | $1,55 \pm 0,40$ |

3.2. Análisis de la eficiencia fotosintética por emisión de fluorescencia

La eficiencia fotosintética del mutante *cs26* se determinó mediante la medida de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *in vivo* en plantas enteras en condiciones de crecimiento de día largo y día corto. Las imágenes de fluorescencia de clorofila se obtuvieron mediante un sistema de “Fluorimager chlorophyll fluorescent imaging system” (Technologica), por aplicación de un régimen programado de tiempos de exposición de luz actínica, pulsos de luz saturada y periodos de oscuridad (ver materiales y métodos).

Las mediciones se realizaron con plantas tratadas con luz de alta intensidad ($750 \pm 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 1 hora, y plantas control no tratadas. Los resultados mostraron que en las condiciones control (sin estar sometidas a luz de alta intensidad) las plantas mutantes *cs26* presentaron una reducción significativa de F_v/F_m en ambas condiciones de crecimiento cuando se comparaban con la línea silvestre, siendo más acusada esta reducción cuando las plantas se crecieron en condiciones de ciclo largo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el mutante *cs26* cuando se trataba con luz de alta intensidad durante 1 hora, con respecto a las plantas control de dicho mutante (Figura 32).

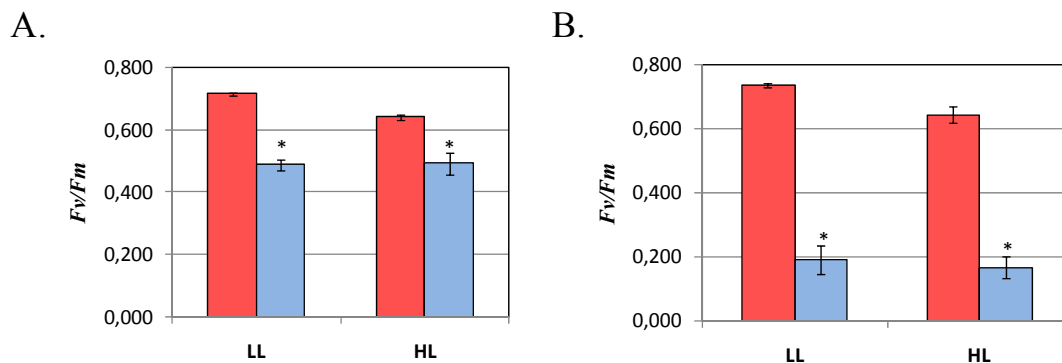


Figura 32. Eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica del fotosistema II en plantas enteras.

Se muestran los valores obtenidos para el parámetro F_v/F_m de plantas de las líneas silvestre (rojo) y mutante *cs26* (azul) en condiciones de crecimiento de ciclo corto (A) y ciclo largo (B). LL=plantas control, HL=Plantas tratadas durante 1 h con luz de alta intensidad. Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes (**P < 0,01).

Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre las plantas *cs26* control y las tratadas con luz de alta luminosidad, se procedió a realizar un estudio en el que las plantas inicialmente adaptadas a la oscuridad se expusieron en el “Fluorimager” a pulsos de luz actínica de una intensidad lumínica baja similar a la

utilizada en condiciones de crecimiento en las cámaras ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y otra alta ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Las imágenes obtenidas que permiten representar F_v/F_m de plantas adaptadas a la oscuridad se muestran en la figura 33 (A y B). Este parámetro fotosintético se define como la eficiencia cuántica máxima de la reacción fotoquímica del PSII, y se refiere a la eficiencia máxima a la cual la luz absorbida por el PSII es usada para la reducción de Q_A . En la figura 33A se puede apreciar que, en condiciones de ciclo corto, las hojas jóvenes de las plantas de la línea mutante *cs26* presentaron menor F_v/F_m que las hojas más viejas. Este hecho es interesante, ya que se ha descrito que la mayor actividad fotosintética en una planta silvestre ocurre en las hojas más jóvenes, y que esta actividad va decayendo a medida que la hoja envejece (Stessman *et al.*, 2002). Sin embargo, en el caso del mutante *cs26* parece estar ocurriendo exactamente lo contrario en ciclo corto. En condiciones de ciclo largo, las plantas *cs26* presentan unos niveles muy reducidos de F_v/F_m en todas las hojas.

También se muestran las imágenes obtenidas para el decaimiento no fotoquímico (NPQ) tras incidir con una luz actínica a PPDF de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 33, C y D) y $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 33, E y F). Se observó que los valores de NPQ son más bajos en las hojas más jóvenes de la planta en el mutante *cs26* en ciclo corto en ambos pulsos de luz, similares a los obtenidos en todas las hojas de plantas silvestres. Por tanto, en las hojas jóvenes donde existe menor actividad fotosintética (menor F_v/F_m) se produce también una menor disipación de la energía de excitación en forma de calor, indicando que no hay disipación de la energía pero que tampoco se está usando para la reacción fotoquímica. En ciclo largo y en ambos pulsos de luz, los valores de NPQ en el mutante son mayores que en silvestre, indicando disipación térmica en este caso, aunque tal y como se observó previamente, en el centro de la roseta también se puede apreciar niveles menores de NPQ .

Como se comentó anteriormente, hay una reducción del valor F_v/F_m de plantas adaptadas a la oscuridad en la línea *cs26*, siendo la reducción de aproximadamente un 74 % en ciclo largo, y de un 32 % en ciclo corto, con respecto a la línea silvestre (Tabla 20). Un análisis más detallado de los valores de F_o y F_m nos corroboró que el mutante *cs26* sufre una importante fotoinhibición. Esto queda de manifiesto por los altos valores obtenidos para F_o en ciclo largo, que es indicativo de una menor concentración de clorofilas acopladas o de daños en el aparato fotosintético. En ciclo corto también se observa un aumento en la fluorescencia F_o , y al separar los valores entre hojas centrales y exteriores se confirmó que las centrales tenían valores de F_o mucho más elevados.

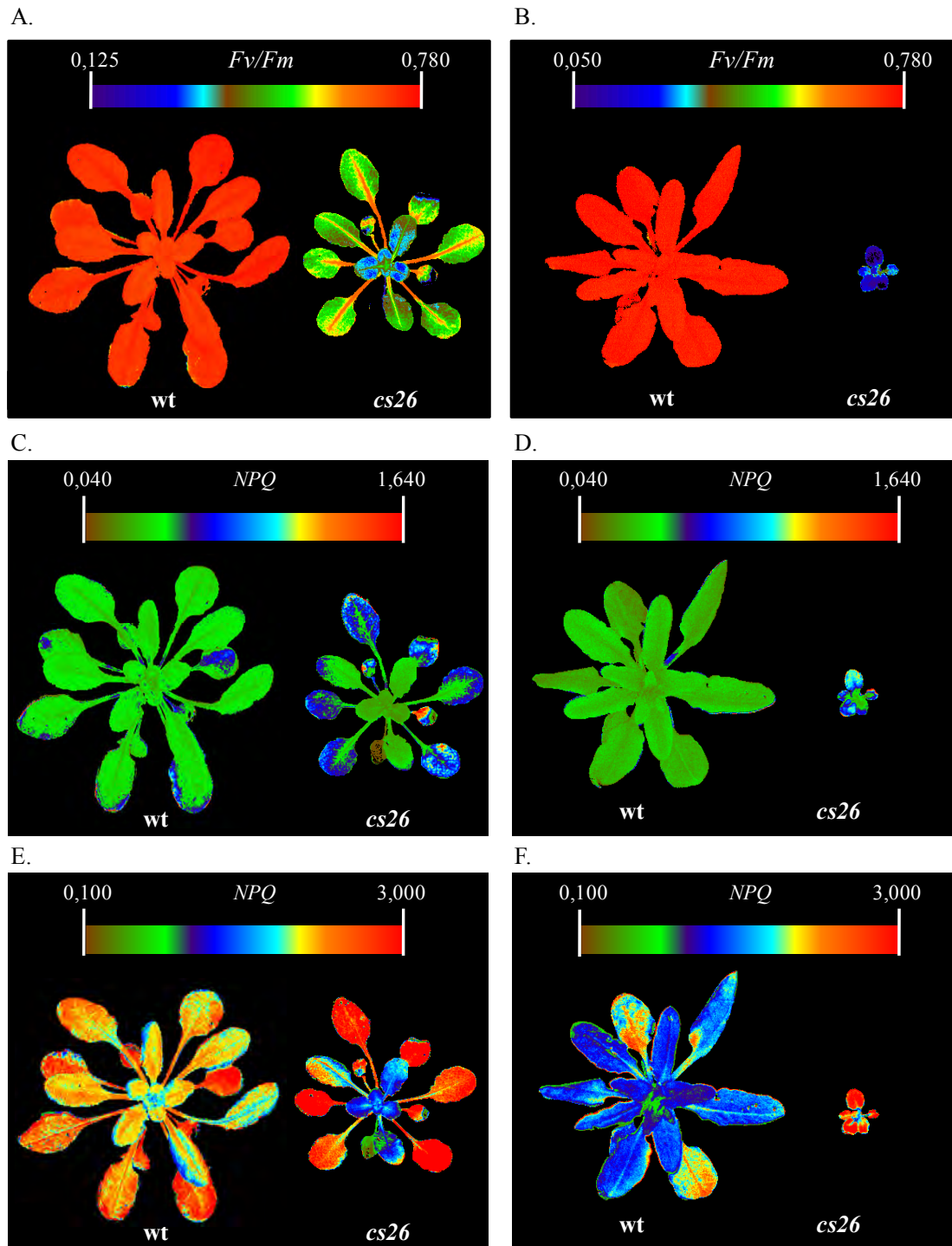


Figura 33. Imágenes de fluorescencia de la planta completa generada con “Fluorimager”.

Se muestran los valores de Fv/Fm para las líneas de plantas silvestre y *cs26* crecidas en condiciones de día corto (A) y día largo (B), y los valores de NPQ correspondientes a pulsos de luz con PPFD de crecimiento $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en plantas crecidas en día corto (C) y día largo (D), y los valores de NPQ correspondiente a PPFD saturada de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en plantas crecidas en día corto (E) y día largo (F).

Tabla 20. Parámetros fotosintéticos de fluorescencia obtenidos en plantas adaptadas a oscuridad.

Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes. Los asteriscos indican significancia estadística, **P < 0,01.

| | | F_o | F_m | F_v/F_m |
|--------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|
| Ciclo Largo | wt | 11 \pm 1 | 41 \pm 2 | 0,736 \pm 0,006 |
| | cs26 | 52 \pm 11** | 63 \pm 16** | 0,192 \pm 0,046** |
| Ciclo Corto | wt | 31 \pm 1 | 109 \pm 3 | 0,716 \pm 0,005 |
| | cs26 | 62 \pm 5** | 118 \pm 6** | 0,488 \pm 0,016** |
| | cs26-Jóvenes | 89 \pm 2** | 138 \pm 4** | 0,378 \pm 0,003 |
| | cs26-Adultas | 58 \pm 8** | 115 \pm 7** | 0,508 \pm 0,030** |

El resto de parámetros fotosintéticos obtenidos se muestran en la Tabla 21. Las medidas de la eficiencia operativa Fq'/F_m' confirmaron que el mutante presentó en ambas condiciones de crecimiento una reducción con respecto a la línea silvestre. Este parámetro estima la eficiencia a la cual la luz absorbida por el PSII es usada para la reducción de Q_A . El parámetro qL nos da una idea de la fracción de los centros abiertos del PSII (con Q_A oxidada). Se observó que en el mutante este valor es más elevado en cualquiera de las condiciones estudiadas, siendo más acusado en el caso de las plantas crecidas en ciclo largo.

El parámetro qP relaciona la eficiencia máxima del PSII con la eficiencia operativa del PSII. En todos los casos este parámetro se mantiene prácticamente constante en silvestre y *cs26*, siendo un poco mayor para *cs26* en ciclo corto a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabla 21. Parámetros fotosintéticos de las líneas silvestre y mutante *cs26*.

Las medidas se realizaron en plantas enteras crecidas en ciclo corto y ciclo largo tras incidir con luz a PPFD 150 y 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes. Los asteriscos indican significancia estadística, $^{**}P < 0,01$.

| <i>Ciclo Largo</i> | | | | |
|--------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|
| Parámetro | 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | | 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | |
| | wt | <i>cs26</i> | wt | <i>cs26</i> |
| <i>Fq'/Fm'</i> | 0,439 \pm 0,024 | 0,202 \pm 0,002 ^{**} | 0,314 \pm 0,007 | 0,135 \pm 0,001 ^{**} |
| <i>qP</i> | 0,649 \pm 0,036 | 0,611 \pm 0,001 | 0,592 \pm 0,015 | 0,435 \pm 0,038 |
| <i>NPQ</i> | 0,138 \pm 0,008 | 0,481 \pm 0,020 ^{**} | 0,620 \pm 0,019 | 0,915 \pm 0,051 ^{**} |
| <i>Fv'/Fm'</i> | 0,675 \pm 0,002 | 0,306 \pm 0,005 ^{**} | 0,529 \pm 0,004 | 0,331 \pm 0,021 ^{**} |
| <i>qL</i> | 0,526 \pm 0,038 | 1,252 \pm 0,005 ^{**} | 0,824 \pm 0,035 | 1,531 \pm 0,010 ^{**} |
| <i>Ciclo Corto</i> | | | | |
| Parámetro | 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | | 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ | |
| | wt | <i>cs26</i> | wt | <i>cs26</i> |
| <i>Fq'/Fm'</i> | 0,375 \pm 0,013 | 0,286 \pm 0,117 | 0,255 \pm 0,006 | 0,182 \pm 0,001 ^{**} |
| <i>qP</i> | 0,587 \pm 0,017 | 0,734 \pm 0,001 ^{**} | 0,577 \pm 0,023 | 0,515 \pm 0,006 |
| <i>NPQ</i> | 0,172 \pm 0,017 | 0,493 \pm 0,029 ^{**} | 0,879 \pm 0,041 | 1,012 \pm 0,020 ^{**} |
| <i>Fv'/Fm'</i> | 0,639 \pm 0,007 | 0,403 \pm 0,002 ^{**} | 0,454 \pm 0,004 | 0,441 \pm 0,002 |
| <i>qL</i> | 0,527 \pm 0,021 | 1,001 \pm 0,012 ^{**} | 0,672 \pm 0,042 | 0,760 \pm 0,011 |

Por último, el parámetro *Fv'/Fm'* definido como la eficiencia operativa obtenida del PSII si todos los centros estuviesen abiertos (Q_A oxidada), estima la eficiencia máxima de la reacción fotoquímica del PSII a una PPFd dada, y en nuestro caso se midió en plantas sometidas a 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a 800 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plantas de la línea *cs26* mostraron una reducción en este parámetro cuando se sometieron a luz de baja intensidad (150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) comparadas con las plantas de la línea silvestre crecidas tanto en día largo como corto. Cuando se trataron con luz de alta luminosidad (800 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ambas líneas mostraron la misma eficiencia máxima cuando las plantas se habían crecido en día corto, pero no en día largo. Lo más llamativo fue que el mutante *cs26* presentó valores similares de eficiencia en todas las condiciones, mientras que el silvestre mostró una mayor eficiencia cuando se expuso a una luz de menor intensidad

(Figura 34). Esto puede indicar que, probablemente, los centros de reacción en el mutante estén dañados, ya que la máxima eficiencia operativa del PSII para reducir a la Q_A es muy baja en condiciones de luz no saturante.

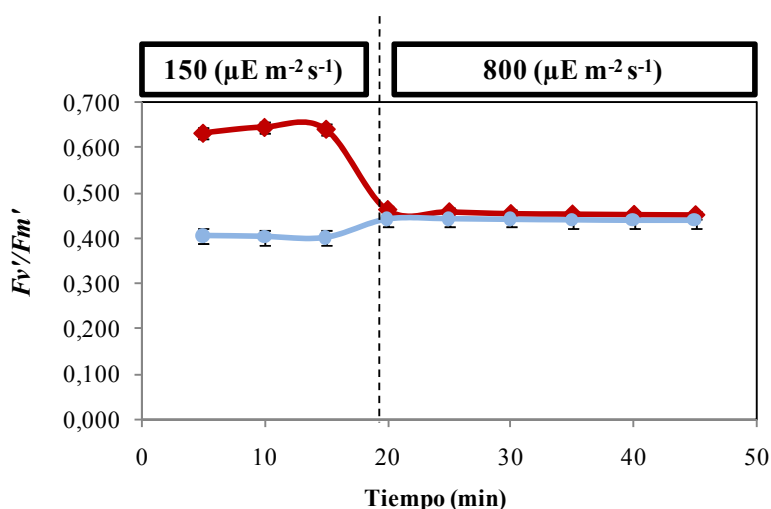


Figura 34. Parámetro F_v'/F_m' medido en silvestre y *cs26* aplicando distintas PPFD.

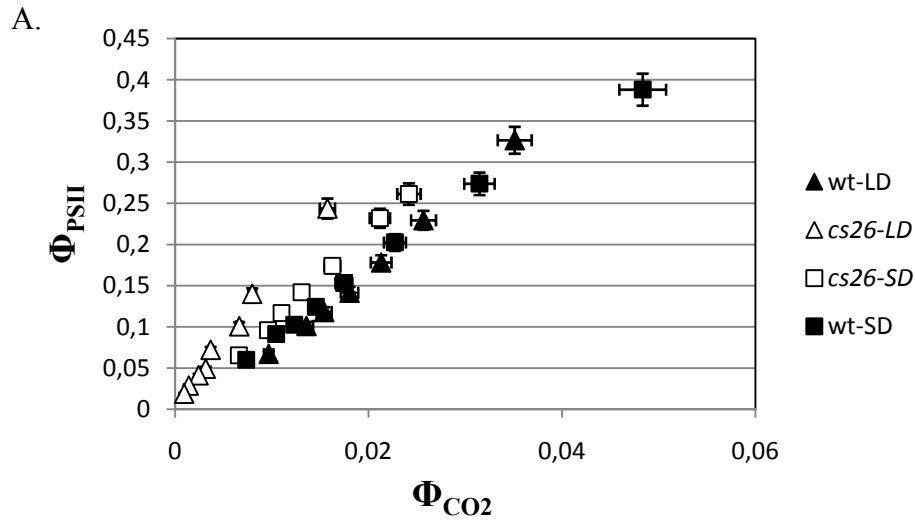
En la izquierda de la gráfica se representa los valores obtenidos cuando PPFD fue de $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y en la derecha cuando se sometió a $800 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La línea silvestre está representada en rojo, mientras que la línea mutante está representada en azul.

3.3. Análisis fotosintético mediante medidas de intercambio de gases y fluorescencia

Siguiendo los modelos bioquímicos de fotosíntesis descritos en la introducción se procedió a determinar los parámetros fotosintéticos del mutante *cs26* en comparación con la línea silvestre en fotoperiodo de día largo y corto. Además, debido a las diferencias fenotípicas del mutante *cs26* con respecto a la línea silvestre en condiciones de fotoperiodo de día largo y corto fue necesario varios cálculos previos para realizar una serie de correcciones y determinar de forma precisa los parámetros fotosintéticos.

El producto de los parámetros ($\alpha \cdot \beta$), siendo α la absorbancia de la hoja y β la fracción de luz absorbida que alcanza el PSII, se calculó a partir de la pendiente de la recta de la relación entre Φ_{PSII} (eficiencia fotosintética del PSII) y Φ_{CO_2} (eficiencia cuántica aparente) obtenida en condiciones de ausencia de fotorrespiración, en una atmósfera que contiene menos del 1% de O_2 (Figura 35A) y variando la intensidad de luz según el método previamente descrito (Warren y Dreyer, 2006). Debido a las diferencias en la concentración de clorofila que existen en las líneas silvestres y *cs26*, se decidió realizar esta corrección para cada genotipo y cada fotoperiodo (diferenciando entre día largo y día corto). Se realizaron tres réplicas, y se determinó el valor medio (Figura 35B). El menor valor del producto ($\alpha \cdot \beta$) en el mutante *cs26* crecido en día

largo se corresponde con el menor tamaño de hoja, de peso específico foliar y de contenido en pigmentos determinado en la línea mutante.



B.

| | $(\alpha \cdot \beta)$ | |
|----|------------------------|---------------|
| | wt | cs26 |
| LD | 0,365 ± 0,007 | 0,267 ± 0,015 |
| SD | 0,470 ± 0,013 | 0,419 ± 0,019 |

Figura 35. Cálculo para la corrección en la tasa del transporte de electrones.

A. Relación entre la Φ_{PSII} (eficiencia fotosintética del PSII) y Φ_{CO_2} (eficiencia cuántica aparente) obtenido en condiciones de ausencia de fotorrespiración, en una atmósfera que contiene menos del 1% de O_2 .

B. Cálculo del producto $(\alpha \cdot \beta)$ para cada genotipo y fotoperiodo.

Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes. LD: condiciones de día largo, SD: condiciones de día corto.

Para poder realizar una completa parametrización de la fotosíntesis, fue necesario el cálculo previo de otros dos parámetros mediante diferentes análisis: el punto de compensación de CO_2 en ausencia de respiración mitocondrial (Γ^*) y la tasa de respiración mitocondrial en luz (R_{day}).

El punto de compensación de CO_2 en ausencia de respiración mitocondrial (Γ^*) viene determinado por las propiedades catalíticas de la Rubisco y es un indicativo de la especificidad de la Rubisco por el CO_2 respecto al O_2 . Sin embargo, como no se ha descrito el factor de especificidad de la Rubisco ($S_{c/o}$) para *Arabidopsis in vitro*, tuvimos que estimar Γ^* mediante el método de Laisk (Boron *et al.*, 1977; Laisk, 1997) tal como lo describe Caemmerer (Von Caemmerer, 2000), midiéndose en la línea silvestre. El método de Laisk no da exactamente Γ^* , sino C_i^* , de forma que $\Gamma^* = C_i^* + R_{day}/g_m$,

siendo g_m la conductancia del mesófilo al CO_2 . Puesto que la contribución del término R_{day}/g_m es muy pequeña, se utilizó este valor C_i^* como aproximación del punto de compensación de CO_2 cloroplástico, de acuerdo con Warren y Dreyer (Warren y Dreyer, 2006).

Para el cálculo de C_i^* , se realizaron curvas A_N-C_i (asimilación fotosintética neta frente a concentración intercelular de CO_2) a tres intensidades diferentes de luz (50, 150 y $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y a seis diferentes concentraciones de CO_2 desde 50 a $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$. El punto de intersección de las tres curvas A_N-C_i se utilizó para el cálculo de C_i^* (valor en el eje x). Se realizaron cuatro réplicas, obteniéndose un valor para C_i^* (22°C) = $41,2 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$. Con este valor de C_i^* ($\cong \Gamma^*$) se estimó para la Rubisco de *Arabidopsis* un valor de $S_{c/o} = 94$, (teniendo en cuenta que $\Gamma^* = (0,5 \cdot [O_2]) / S_{c/o}$).

Los parámetros que intervienen en los modelos de fotosíntesis tienen una fuerte dependencia de la temperatura. Los valores indicados anteriormente están calculados a 22°C que son las condiciones de crecimiento de las plantas. Aplicando la misma dependencia de la temperatura que la descrita para *Nicotiana tabacum* por Bernacchi (Bernacchi *et al.*, 2001), se calculó el valor de C_i^* a 25°C , obteniéndose un valor C_i^* (25°C) = $46,4 \mu\text{mol CO}_2/\text{mol aire}$ ($S_{c/o} = 84$), similares a los valores descritos para *Arabidopsis* a 25°C , C_i^* (25°C) = $49 \mu\text{mol CO}_2/\text{mol aire}$ ($S_{c/o} = 79,7$) (Flexas *et al.*, 2007).

Para calcular la tasa de respiración mitocondrial en luz se determinó como $R_{dark}/2$, siendo R_{dark} la tasa de respiración mitocondrial en oscuridad. Por tanto, se midió R_{dark} para todos los genotipos y fotoperiodos, realizando 4 réplicas sobre plantas adaptadas al menos 30 min en oscuridad. Los valores obtenidos de R_{dark} , $g_{s,dark}$ (conductancia estomática) se recogen en la Tabla 22.

Tabla 22. Parámetros obtenidos en plantas adaptadas a oscuridad.

Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes. LD: condiciones de día largo, SD: condiciones de día corto. (* $P < 0,05$). R_{dark} : tasa de respiración mitocondrial en oscuridad; $g_{s,dark}$: conductancia estomática en condiciones de oscuridad.

| | | R_{dark} ($\mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}$) | $g_{s,dark}$ ($\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}$) |
|-----------|-------------|--|---|
| LD | wt | $-1,01 \pm 0,25$ | $0,27 \pm 0,13$ |
| | cs26 | $-1,77 \pm 0,33^*$ | $0,44 \pm 0,32^*$ |
| SD | wt | $-0,56 \pm 0,29$ | $0,05 \pm 0,01$ |
| | cs26 | $-0,58 \pm 0,10$ | $0,08 \pm 0,02$ |

El valor de la tasa de respiración en oscuridad disminuyó en ambos genotipos al pasar de las condiciones de crecimiento de día largo a día corto. Esta disminución fue esperable, debido a la menor producción de azúcares, y a un crecimiento más lento. Sin embargo, es interesante resaltar que la respiración en el mutante *cs26* fue mayor que en la línea silvestre en condiciones de ciclo largo.

3.3.1. Estimación de parámetros fotosintéticos a partir de curvas A_N-C_i

Una vez calculados Γ^* y R_{day} , se procede a determinar los valores de g_m (conductancia del mesófilo) y C_c (concentración cloroplástica de CO_2), y así poder estimar $V_{c,\text{max}}$ (velocidad máxima de carboxilación) y J_{max} (tasa máxima del transporte de electrones). Se decidió usar 2 modelos, el de Harley basado en C_c (Harley *et al.*, 1992) y el de Ethier y Livingston, basado en C_i (concentración intercelular) (Ethier y Livingstone, 2004). Ambos modelos dieron valores muy similares de $V_{c,\text{max}}$ y J_{max} (Tabla 23).

Las curvas obtenidas se muestran en la figura 36. Las diferencias obtenidas entre ambas curvas se ha discutido previamente en la bibliografía, siendo más adecuado el cálculo en base a C_c , en vez de C_i (Flexas *et al.*, 2006). En ambas representaciones se observó que la línea *cs26* mostró una menor pendiente inicial que la línea silvestre en día largo. En condiciones de ciclo corto, no se observan diferencias significativas.

Las pendientes iniciales obtenidas en las curvas A_N-C_c en ambas líneas no difieren mucho de las obtenidas en las curvas A_N-C_i , sin embargo, existen diferencias en cuanto a la concentración máxima de C_c obtenida en ciclo corto, siendo de un 1,5 veces mayor en la línea *cs26* ($539 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$) con respecto a silvestre ($351 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$).

Finalmente, los parámetros fotosintéticos calculados se muestran en la Tabla 23. De manera general cabe indicar que se observaron en la mayoría de los casos diferencias más significativas entre la línea silvestre y el mutante cuando las plantas se crecían en condiciones de día largo.

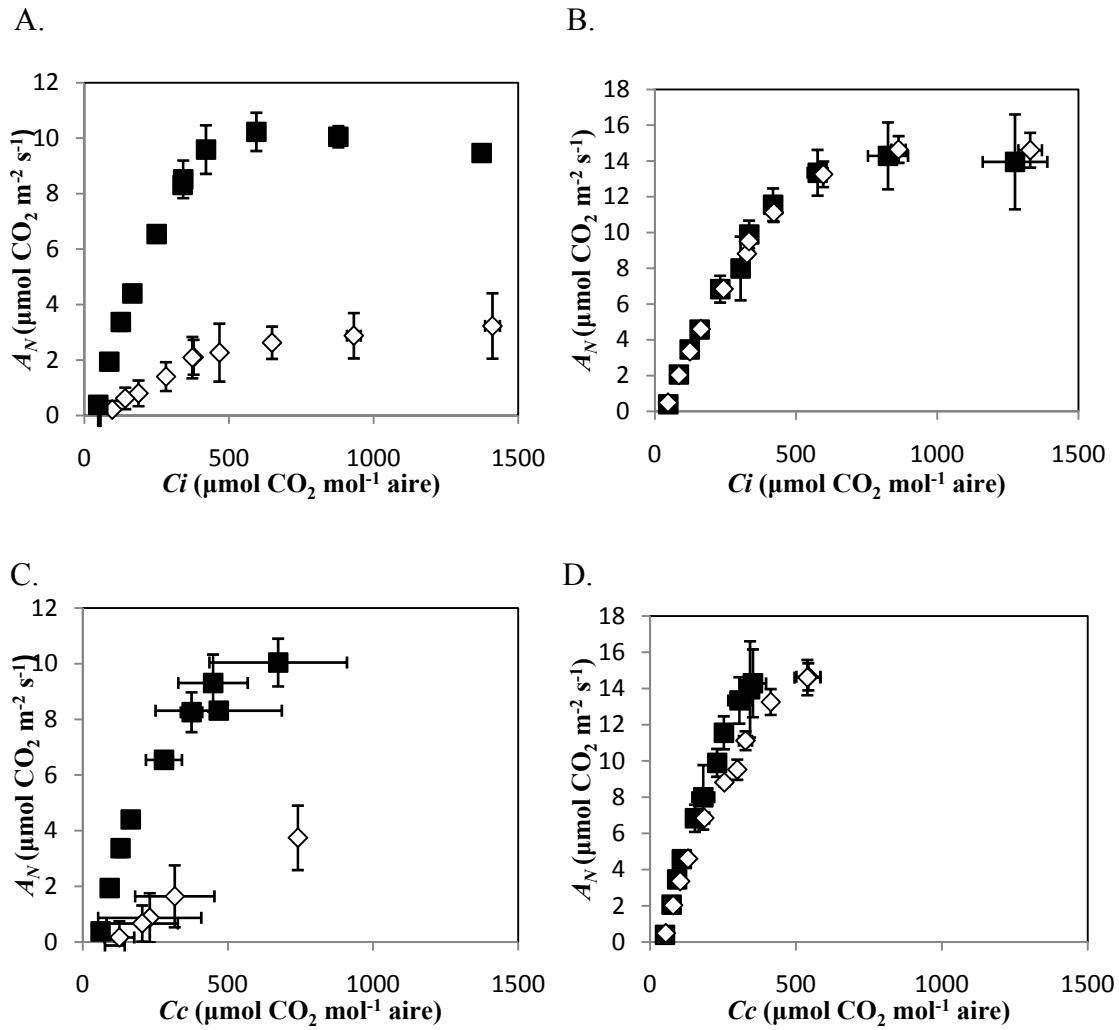


Figura 36. Curvas A_N - C_i y A_N - C_c para las líneas silvestre y *cs26* crecidas en ciclo largo (A y C) y en ciclo corto (B y D).

Los cuadrados negros representan a la línea silvestre, mientras que los rombos blancos representan a *cs26*. Se representa el valor medio \pm SD de seis determinaciones independientes.

Tabla 23. Parámetros fotosintéticos de las líneas silvestre y cs26 crecidas en diferentes fotoperiodos.

A. Análisis obtenido aplicando el método de Ethier basado en C_i . B. Análisis obtenido aplicando el método de Harley basado en C_c . C. Parámetros comunes obtenidos a partir de las curvas A_N-C_i . Los valores son medias \pm SD de seis determinaciones independientes.

A.

| <i>Método Ethier</i> | Ciclo largo | | Ciclo corto | |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | wt | cs26 | wt | cs26 |
| $V_{c,max}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 25,62 \pm 1,67 | 7,29 \pm 1,06 | 41,28 \pm 4,28 | 29,10 \pm 2,36 |
| J_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 49,57 \pm 2,27 | 15,44 \pm 1,14 | 70,05 \pm 7,71 | 68,50 \pm 3,98 |
| <i>Pto compensación CO₂</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$) | 37,78 \pm 1,58 | 106,4 \pm 14,76 | 37,55 \pm 0,57 | 33,90 \pm 1,92 |
| <i>Tasa fotorrespiración</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 1,63 \pm 0,07 | 1,20 \pm 0,30 | 1,63 \pm 0,17 | 1,37 \pm 0,16 |
| J_{max}/V_{max} | 1,94 \pm 0,05 | 1,82 \pm 0,59 | 1,72 \pm 0,37 | 2,36 \pm 0,23 |
| <i>gm</i> ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 1,000 \pm 0,001 | 0,031 \pm 0,009 | 0,107 \pm 0,008 | 0,320 \pm 0,14 |

B.

| <i>Método Harley</i> | Ciclo largo | | Ciclo corto | |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | wt | cs26 | wt | cs26 |
| $V_{c,max}$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 24,61 \pm 2,59 | 8,97 \pm 2,25 | 41,03 \pm 5,02 | 31,58 \pm 1,43 |
| J_{max} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | 48,61 \pm 2,54 | 17,27 \pm 5,09 | 80,72 \pm 12,05 | 74,89 \pm 4,77 |
| <i>Pto compensación CO₂</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ aire}$) | 51,01 \pm 2,60 | 119,03 \pm 10,00 | 42,80 \pm 1,58 | 42,02 \pm 1,60 |
| <i>Tasa fotorrespiración</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 2,75 \pm 0,08 | 1,13 \pm 0,10 | 3,07 \pm 0,22 | 2,72 \pm 0,11 |
| J_{max}/V_{max} | 1,98 \pm 0,17 | 1,94 \pm 0,39 | 1,96 \pm 0,07 | 2,37 \pm 0,09 |
| <i>gm</i> ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 0,420 \pm 0,090 | 0,0001 \pm 0,007 | 0,082 \pm 0,048 | 0,140 \pm 0,050 |

C.

| | Ciclo largo | | Ciclo corto | |
|---|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| | wt | cs26 | wt | cs26 |
| A_{400} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 8,32 \pm 0,28 | 1,89 \pm 0,33 | 11,56 \pm 0,91 | 11,12 \pm 0,52 |
| A_{1500} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 9,47 \pm 0,15 | 2,55 \pm 0,54 | 13,95 \pm 2,65 | 14,60 \pm 0,97 |
| <i>gs400</i> ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 0,20 \pm 0,07 | 0,18 \pm 0,08 | 0,174 \pm 0,007 | 0,176 \pm 0,018 |
| <i>gs1500</i> ($\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 0,12 \pm 0,04 | 0,05 \pm 0,02 | 0,115 \pm 0,040 | 0,116 \pm 0,040 |
| <i>A400 / gs400</i> | 41,60 \pm 0,54 | 10,50 \pm 0,64 | 66,58 \pm 5,80 | 63,28 \pm 3,84 |
| <i>A1500 / gs1500</i> | 78,92 \pm 0,90 | 51,02 \pm 0,46 | 121,30 \pm 9,90 | 125,86 \pm 8,55 |

Se observó que *cs26* presenta una menor $V_{c,max}$ (velocidad máxima de carboxilación) que es más significativa en condiciones de fotoperiodo de día largo, con

una disminución de aproximadamente un 64 %. Esta disminución se encontró tanto utilizando el método de Ethier como el de Harley, y puede ser debida a que *cs26* posea una menor concentración de la enzima Rubisco, o a una menor activación de la enzima. En día corto, también se observó una disminución en $V_{c,max}$, pero menos acusada, de aproximadamente un 23 % calculado para las curvas A_N-C_i , y de un 30 % para las curvas A_N-C_c .

Para comprobar la cantidad de Rubisco total presente en cada genotipo, se realizó un extracto de hojas de ambas líneas crecidas en los dos fotoperiodos y se determinó la concentración de proteínas solubles totales, así como la concentración de Rubisco presente en cada línea a partir de una titulación con proteína purificada mediante SDS-PAGE (Figura 37). Estos resultados mostraron que en la línea *cs26* hay una significativa menor concentración de proteína Rubisco referida a proteína total que en silvestre en ciclo largo, siendo sólo del 37 % (Tabla 24). En condiciones de ciclo corto, la concentración de Rubisco es más similar a la obtenida en la línea silvestre, siendo de aproximadamente un 90 %.

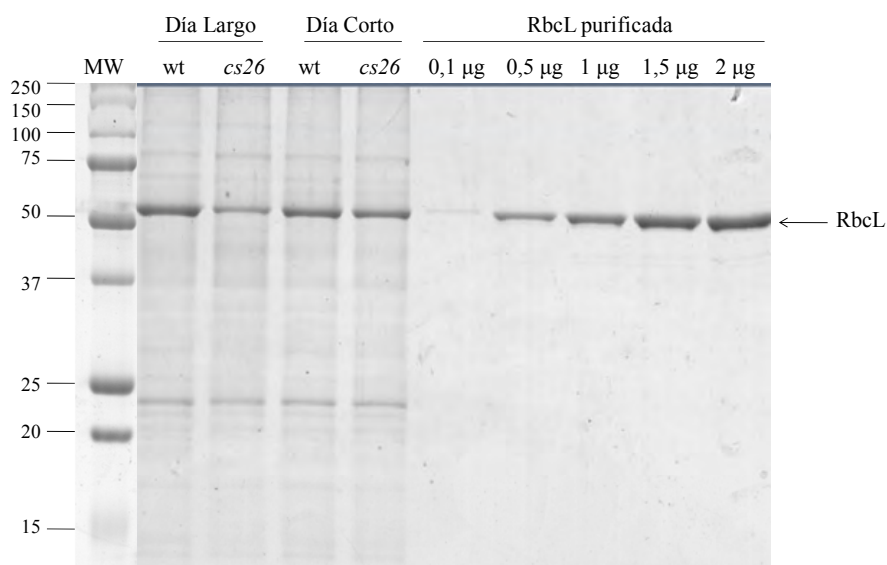


Figura 37. SDS-PAGE de extractos de hojas de plantas silvestre y *cs26* crecidas en los dos fotoperiodos y comparación con Rubisco purificada de *Arabidopsis*.

Se cargó 5 µg de proteínas totales en cada carril. También se muestra una titulación de la proteína Rubisco pura desde 0,1 a 2 µg, cedida por el Dr. Galmés. Se cuantificó la banda correspondiente a la Rubisco mediante el programa QuantityOne; RbcL: Subunidad grande de la Rubisco. Se muestra un gel representativo teñido con coomassie.

Tabla 24. Concentración total de proteínas solubles y de Rubisco en extracto de hojas.

[TPS]: Concentración total de proteínas solubles; LD: condiciones de crecimiento de día largo; SD: condiciones de crecimiento de día corto. Los valores son medias \pm SD de tres determinaciones independientes (*P < 0,05).

| | [TPS] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | | [Rubisco] ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) | | [Rubisco] / [TPS] | |
|-------------|-------------------------------------|-----------------|---|-----------------|-------------------|-----------------|
| | LD | SD | LD | SD | LD | SD |
| wt | 4,00 \pm 0,28 | 4,17 \pm 0,02 | 1,06 \pm 0,05 | 0,85 \pm 0,02 | 0,27 \pm 0,02 | 0,20 \pm 0,01 |
| cs26 | 3,10 \pm 0,07* | 3,87 \pm 0,12 | 0,31 \pm 0,01* | 0,72 \pm 0,13 | 0,10 \pm 0,01* | 0,18 \pm 0,03 |

También se calculó el punto de compensación de CO₂ (Tabla 23), que se define como la concentración de CO₂ a la cual se igualan las velocidades de fotosíntesis y de respiración, y por tanto a la que la cantidad neta de CO₂ fijado (y liberado) es cero. Por debajo del punto de compensación la planta libera más carbono del que fija y hay fotorrespiración neta. Por encima existe fotosíntesis neta. En el caso de la línea silvestre, el punto de compensación de CO₂ en día largo y día corto no experimentó ninguna variación y fue de aproximadamente 38 $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol aire}$ por el método de Ethier; según el método de Harley este valor fue de 51 y 43 $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol aire}$ en día largo y día corto, respectivamente, indicando que la enzima permite fijar el carbono cuando la concentración de CO₂ es baja. Para la línea mutante *cs26* se obtuvieron diferencias importantes en condiciones de día largo, siendo el punto de compensación de 106 $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol aire}$ (método de Ethier) y de 119 $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol aire}$ (método de Harley), mientras que para ciclo corto fue similar al valor obtenido con la línea silvestre (34 y 42 $\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol aire}$, respectivamente). Estos datos indican que el mutante *cs26*, en día largo, necesita una mayor concentración de CO₂ para poder fijar el carbono satisfactoriamente y mostrar una tasa neta de fotosíntesis.

La tasa de fotorrespiración se define como la liberación de CO₂, dependiente de luz, debido a la descarboxilación oxidativa del glicolato en el proceso fotorrespiratorio. Este punto se calculó como la intersección de la curva de CO₂ en el eje de ordenadas por extrapolación, obteniéndose valores muy similares, siendo algo menor, aunque no significativamente, en el caso de *cs26* en condiciones de día corto (Tabla 23). En condiciones de día largo se determinaron tasas de fotorrespiración inferiores en el mutante, fundamentalmente cuando se utilizó el método de cálculo de Harley, siendo un 74 % (método Ethier) y 41 % (método Harley) de las correspondientes tasas de fotorrespiración calculados en la línea silvestre.

Por otro lado, podemos observar que la conductancia estomática (g_s) medida a una concentración de CO_2 de $400 \mu\text{mol CO}_2/\text{mol aire}$ es independiente del genotipo y régimen lumínico empleado, con un valor de aproximadamente $0,18 \text{ mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 23, C). Sin embargo, el ratio A / g_s (relación entre la fotosíntesis y la conductancia estomática), que nos permite determinar la eficiencia intrínseca en el uso del agua, indica que en el caso de *cs26* en ciclo largo este valor es casi tres veces menor que en silvestre, no habiendo diferencias para ambas líneas en ciclo corto. Este parámetro indica hasta qué punto un cierre estomático es correcto para un nivel de fijación de carbono dado. En este caso, *cs26* en ciclo largo es menos eficiente pero no debido a una mayor conductancia estomática que implicaría una mayor apertura, sino a una menor tasa fotosintética a igualdad de g_s . A una concentración de CO_2 de $1500 \mu\text{mol CO}_2 / \text{mol aire}$, tanto la conductancia estomática como la tasa fotosintética son significativamente inferiores en el mutante *cs26* en condiciones de ciclo largo, mientras que en ciclo corto no muestran diferencias con la estirpe silvestre.

Otro de los parámetros calculados fue la capacidad máxima para el transporte de electrones (J_{max}) obtenido a partir de las curvas $A-C_i$ (modelo de Ethier) y $A-C_c$ (modelo de Harley) a concentraciones elevadas de CO_2 (Tabla 23). Se observó que en ciclo largo el valor de J_{max} para la línea mutante fue menor (31 % con respecto a silvestre según el método de Ethier, y 36 % según el método de Harley). Sin embargo, el ratio J_{max}/V_{max} permaneció constante en ambas líneas en ciclo largo, siendo algo mayor para *cs26* en ciclo corto. Este aumento se debe a una menor $V_{c,max}$ en *cs26*, indicando que la capacidad máxima para el transporte de electrones queda restaurada a niveles similares a los obtenidos con la línea silvestre cuando cambiamos de fotoperiodo, pero que la velocidad de carboxilación es menor, debido a una menor concentración de la proteína Rubisco, tal y como habíamos descrito antes.

Podemos concluir que la línea mutante posee una menor conductancia del mesófilo en condiciones de día largo, siendo prácticamente cero cuando se utiliza el método de Ethier, indicando que en este fotoperiodo el transporte de CO_2 no se está realizando de forma efectiva hacia el interior del cloroplasto, probablemente debido a daños en la estructura de las membranas del mismo.

3.3.2. Curvas A_N -PAR, e integración del intercambio de gases versus fluorescencia

Las curvas de fotosíntesis en respuesta a la luz (A_N -PAR) se obtuvieron variando la intensidad de luz con la que se incide a la hoja (PPFD), y midiendo la tasa fotosintética en cada uno de estos puntos. Estas curvas (Figura 38) se realizaron con plantas crecidas en condiciones de día largo y fueron también corregidas a partir de los valores antes definidos, obteniéndose los parámetros recogidos en la Tabla 25.

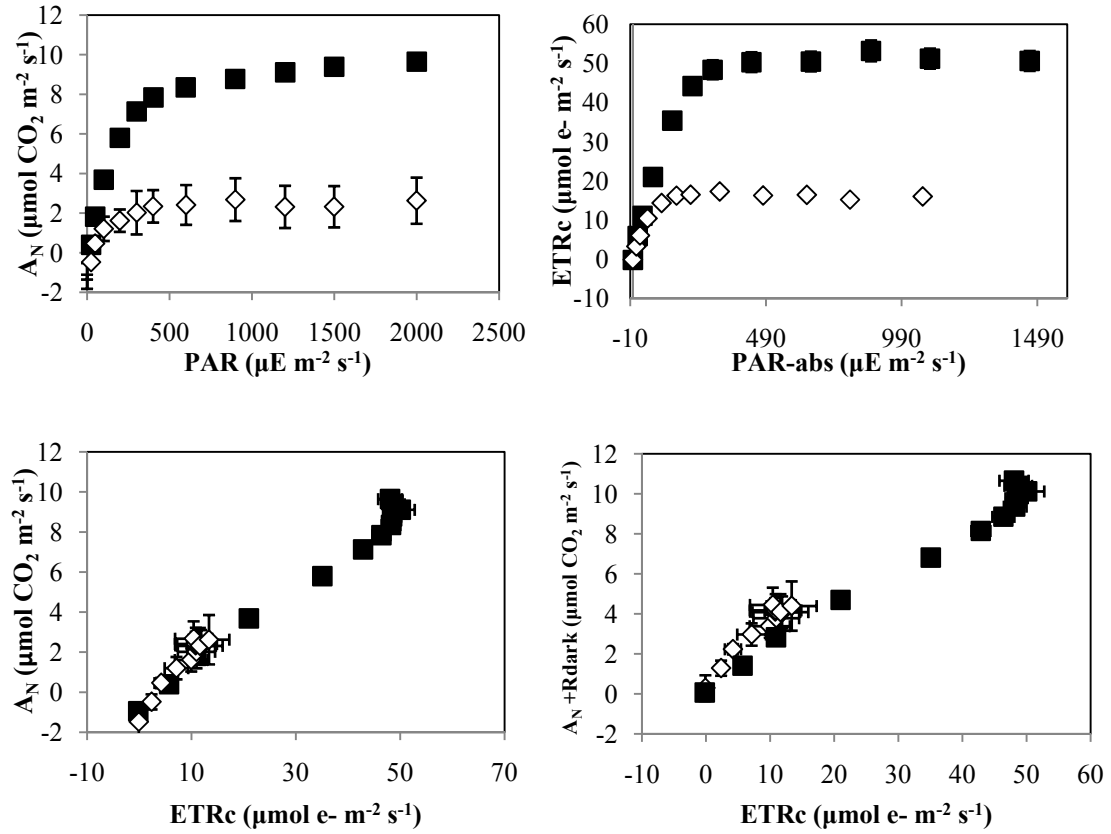


Figura 38. Curvas obtenidas en respuesta a la luz para el análisis de las líneas silvestre y *cs26* en condiciones de ciclo largo.

Los cuadrados negros representan a la línea silvestre, mientras que los rombos blancos representan a *cs26*. Se representa el valor medio \pm SD de seis determinaciones. ETR_c : tasa de transporte electrónico corregido. R_{dark} : tasa de respiración mitocondrial en oscuridad. PAR_{Abs} : Radiación fotosintéticamente activa que es absorbida por la hoja.

Tabla 25. Parámetros fotosintéticos obtenidos a partir de las curvas de luz en condiciones de día largo.

Se representa el valor medio \pm SD de seis determinaciones. A: Tasa fotosintética; ETR: Tasa de transporte electrónico corregido; NPQ: decaimiento no-fotoquímico.

| | wt | cs26 |
|---|------------------|------------------|
| A_{150} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 3,69 \pm 0,37 | 1,21 \pm 0,56 |
| A_{2000} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 9,65 \pm 0,24 | 2,30 \pm 0,90 |
| ETR_{150} ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 20,99 \pm 0,79 | 7,12 \pm 2,25 |
| ETR_{2000} ($\mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 48,06 \pm 2,27 | 12,91 \pm 3,93 |
| ETR / A_{150} ($\text{mol e}^- / \text{mol CO}_2$) | 5,72 \pm 0,37 | 6,37 \pm 1,42 |
| ETR / A_{2000} ($\text{mol e}^- / \text{mol CO}_2$) | 4,98 \pm 0,14 | 5,90 \pm 1,26 |
| Pto inflexión curva ($\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 533 \pm 25 | 234 \pm 56 |
| Pto y cuando $x=0$ ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 0,82 \pm 0,31 | 1,23 \pm 0,49 |
| Pto compensación luz ($\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 15,42 \pm 6,56 | 51,33 \pm 7,22 |
| Rendimiento cuántico ($\text{mol CO}_2 / \text{mol hv}$) | 0,06 \pm 0,004 | 0,04 \pm 0,002 |
| 1/Rendimiento cuántico ($\text{mol hv} / \text{mol CO}_2$) | 16,26 \pm 1,05 | 23,60 \pm 1,43 |
| NPQ_{150} | 0,18 \pm 0,02 | 0,01 \pm 0,31 |
| NPQ_{2000} | 1,17 \pm 0,20 | 2,41 \pm 1,00 |
| PAR_{abs} / ETR ($\text{mol hv} / \text{mol e}^-$) | 3,50 \pm 0,14 | 7,78 \pm 0,94 |

Uno de los parámetros obtenidos a partir de estas curvas es el punto de compensación por luz, referido como el punto de corte de la curva $A - PAR$ con el eje de las abscisas, y se define como el punto de intensidad lumínica al cual las velocidades de fotosíntesis y respiración se igualan. En condiciones de ciclo largo, este punto es de 51 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para la línea mutante *cs26*, mientras que para la línea silvestre es de 15 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y por tanto es 3,4 veces mayor en el mutante.

Se define el rendimiento cuántico como la cantidad de CO_2 asimilado por cada mol de fotones de luz. La eficiencia en el uso de la luz, entendida como la necesidad de absorción de fotones para la asimilación de carbono, puede calcularse a partir de la inversa del rendimiento cuántico ($\text{mol hv absorbido} / \text{mol CO}_2$ fijado) mediante las curvas $A-PAR_{abs}$, obteniéndose PAR_{abs} a partir del valor de $(\alpha \cdot \beta)$ y considerando β constante e igual a 0,5. Para la línea mutante *cs26* se obtuvo un valor de 23,6 $\text{mol hv} / \text{mol CO}_2$ mientras que para silvestre fue de 16,2 $\text{mol hv} / \text{mol CO}_2$, y por tanto, la eficiencia en el uso de la luz en el mutante es 1,5 veces menor que en la línea silvestre. Esto podría ser debido a una mayor fotorrespiración y/o a una menor derivación de electrones a la reacción fotoquímica. Como hemos visto anteriormente, la fotorrespiración no parece verse afectada en el mutante, por lo que parece más lógico pensar que sea debido a que hay menos electrones destinados a realizar el proceso

fotoquímico. Esto se comprobó gracias al cálculo de la relación PAR_{abs} / ETR , donde se obtuvo que para la línea silvestre este valor es de 3,50 mol $h\nu$ / mol e^- , mientras que para *cs26* fue del doble (7,78 mol $h\nu$ / mol e^-), es decir, que se necesitan el doble de fotones para realizar la conversión a 1 mol de electrones.

Por otro lado, los valores de la razón ETR / A , que indica los moles de electrones necesarios implicados en la fijación de CO_2 , son mayores en *cs26* (aproximadamente de un 11 % a una intensidad lumínica de 150 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ y un 18 % a intensidad lumínica de 2000 $\mu E m^{-2} s^{-1}$), indicando que se necesitan más electrones para la carboxilación tanto en equilibrio como en condiciones de luz saturante.

Por tanto se puede concluir que las plantas de la línea mutante *cs26* absorben menos cantidad de luz, probablemente también debido a una menor concentración de clorofilas. De la que absorbe, menos fotones son destinados a convertirse en electrones, y de estos electrones, hay una porción menor que son destinados a la carboxilación. Es interesante el hecho que de *NPQ* no esté especialmente activada en condiciones de luz no saturante en el mutante *cs26*, al menos para intentar compensar lo dicho anteriormente, lo cual sugiere inevitablemente que este exceso de electrones derivan en la formación de especies reactivas de oxígeno.

4. Análisis del perfil transcripcional del mutante *cs26* de *Arabidopsis thaliana*

4.1. Análisis transcriptómico en diferentes regímenes lumínicos

Inicialmente, el perfil de expresión génica se obtuvo mediante hibridación de micromatrices de DNA ATH1 de Affymetrix con RNA total procedente de hojas de plantas crecidas durante tres semanas en condiciones de día largo. Para obtener datos representativos de las distintas líneas se analizaron 3 réplicas biológicas independientes de cada uno de los genotipos. Los resultados se muestran como el promedio del \log_2 de las veces de cambio de la expresión de los genes en el mutante con respecto a silvestre. De esta manera, un valor positivo indicará una mayor expresión del gen, mientras que valores negativos implican una represión del gen en el mutante, siempre en relación al silvestre.

El análisis se restringió a aquellos genes que presentaban un valor de cambio mayor o igual a 2 en su expresión y que, a su vez, eran estadísticamente significativos (valor de $FDR \leq 0,05$) y con una intensidad de señal $Lg(\text{señal}) > 7$ (Figura 39A). Bajo estas condiciones se identificaron 743 genes que variaron su expresión en condiciones de ciclo largo en el mutante *cs26*, de los cuales, 372 genes mostraron una expresión reducida, y 371 mostraron una mayor expresión que en silvestre (Tabla S2). Los 743

genes se clasificaron en 11 categorías funcionales basados en la clasificación de Gene Ontology incluida en las bases de datos de The Arabidopsis Information Resource (<http://www.arabidopsis.org>), así como el programa informático Map-Man (<http://mapman.gabipd.org>).

Los datos obtenidos de este análisis revelaron que los genes con expresión alterada en el mutante *cs26* en día largo se distribuían en un amplio rango de funciones biológicas, aunque las categorías más abundantes correspondían a proteínas que responden a estímulos bióticos o abióticos (Figura 40). En este grupo se incluyeron *COR15A*, *COR15B*, *COR78* y *COR414-TM*, los cuatro genes que presentaron una mayor represión en el mutante *cs26*, y que están relacionados con la aclimatación al frío. Por otro lado, los genes que presentaron una mayor expresión con respecto al silvestre fueron la oxidorreductasa *2OG-Fe(II)* oxigenasa, *CATION EXCHANGER3 (CAX3)*, *PATHOGENESIS-RELATED GENE1 (PRI)*, y otros genes relacionados mayormente con la respuesta al estrés biótico. En general, el perfil transcripcional del mutante *cs26* indica que la mutación provoca un efecto pleiotrópico en muchos procesos metabólicos y celulares.

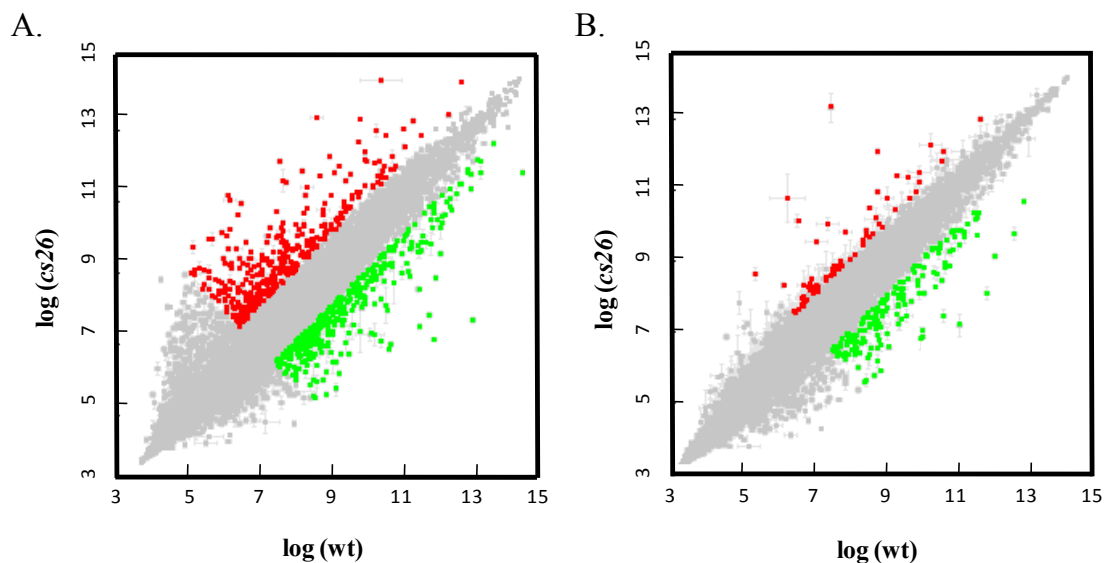


Figura 39. Gráfico de dispersión XY de los perfiles transcripcionales del mutante *cs26* en distintas condiciones de fotoperiodo.

Perfil obtenido bajo condiciones de ciclo largo (A) y condiciones de ciclo corto (B) del mutante *cs26* comparado con la línea silvestre. El análisis se restringió a aquellos genes que presentaban un valor de cambio mayor o igual a 2 en su expresión, valor de $FDR \leq 0,05$ e intensidad de señal $Lg(\text{señal}) > 7$. Se observó un mayor número de genes alterados en condiciones de ciclo largo. Los puntos rojos representan los genes inducidos, y los puntos verdes, los genes reprimidos.

Para aislar los efectos producidos por la mutación de los efectos producidos por el estrés oxidativo generado en día largo, se obtuvieron los perfiles transcripcionales de las plantas silvestre y *cs26* en condiciones de día corto utilizando hojas de plantas crecidas durante 5 semanas, en condiciones idénticas de crecimiento en las que no se detectaba acumulación de ROS en las hojas (Figura 26). Los datos normalizados de las réplicas mostraron una expresión diferencial de 251 genes en el mutante *cs26*, de los cuales 171 genes tuvieron una expresión reducida, y 79 genes una expresión inducida (Tabla S3), siendo las veces de cambio mayor de 2 veces, con $FDR < 0,05$ y una restricción de intensidad de señal de $Lg(\text{señal}) > 7$ (Figura 39B). Por tanto, la alteración de expresión génica en plantas crecidas en día corto se reduce considerablemente cuando se compara con el fotoperiodo de día largo. Los datos transcripcionales del mutante crecido en condiciones de ciclo corto muestran también una distribución en un amplio rango de funciones biológicas, siendo una de las categorías más abundantes la de respuesta a estímulos abióticos y bióticos (Figura 40).

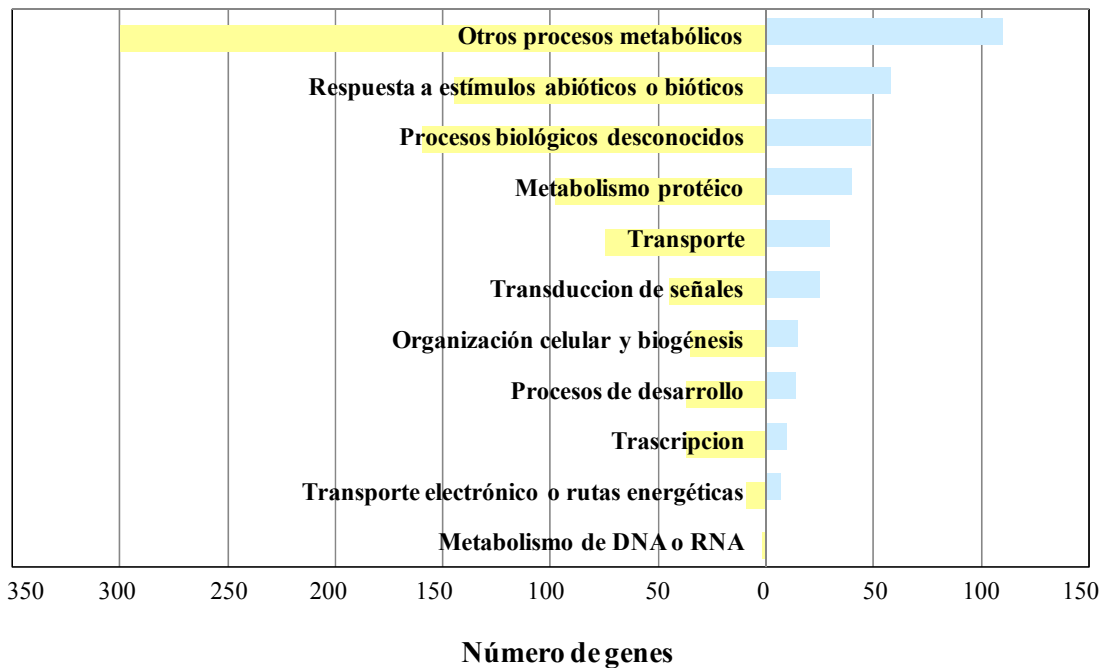


Figura 40. Categorías funcionales de procesos biológicos en los que se agrupan los genes que han modificado su expresión en *cs26* en condiciones de crecimiento de día largo (barras amarillas) o de día corto (barras azules).

El diagrama de Venn de los perfiles transcripcionales de día corto y día largo muestra 112 genes comunes, nueve de los cuales estuvieron inducidos y seis reprimidos en ambos perfiles (Figura 41). Los nueve genes que presentaron mayor expresión en ambos perfiles coinciden con los genes más inducidos en las condiciones de crecimiento de día corto. En estas condiciones de día corto, muchos de los genes inducidos fueron

codificados para el genoma cloroplástico, tales como *RBCL* (subunidad grande de la Rubisco; AtCg00490), *ACCD* (subunidad β del complejo acetil-CoA carboxilasa, AtCg00500), *RPL20* (proteína ribosomal cloroplástica L20; AtCg00660), *RPS15* (proteína ribosomal cloroplástica S15; AtCg01120) y *PSAI* (subunidad I del fotosistema I; AtCg00510). También se encuentran inducidos de forma significativa en ambos fotoperiodos muchos genes que responden a estrés biótico, tales como *PLANT DEFENSIN 1.2* y *1.2B* (At5g44420 y At2g26020).

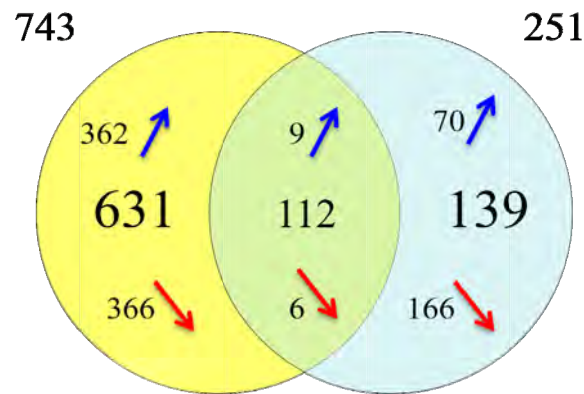


Figura 41. Diagrama de Venn de los perfiles transcripcionales del mutante *cs26* en los fotoperiodos de día largo y día corto.

Se muestra el número de genes que cambian su expresión en el mutante *cs26* comparado con las plantas silvestres en condiciones de día largo (círculo amarillo) y día corto (círculo azul). La intersección (área verde) muestra el número de genes que son comunes en ambos perfiles. Las flechas azules muestran el número de genes que están inducidos, mientras que las flechas rojas expresan el número de genes reprimidos.

Un aspecto interesante a destacar es que mucho de los genes que presentaron una mayor expresión en el mutante bajo las condiciones de crecimiento de día largo fueron luego los que más se reprimieron en condiciones de día corto, tales como *PRI*, *2OG-Fe (II) oxigenasa* y *CAX3*.

4.2. Validación de resultados

Para validar los resultados obtenidos en el estudio transcriptómico se seleccionó un conjunto de 18 genes desregulados y se analizó su patrón de expresión mediante qPCR (Tabla 26). Todos los genes seleccionados sin excepción mostraron el mismo patrón de regulación cuando fueron analizados tanto por microarray como por qPCR, aunque se observaban algunas discrepancias cuantitativas.

Tabla 26. Validación de los datos del estudio transcriptómico mediante qPCR.

Se seleccionaron 18 genes que tenían inducida o reprimida su expresión en condiciones de crecimiento de día corto (A) y en día largo (B).

| Ciclo Corto | | |
|----------------|--|--|
| Gen | Lg ₂ (veces cambio) qPCR | Lg ₂ (veces cambio) Microarray |
| <i>RBCL</i> | 1,90 | 58,59 |
| <i>ACCD</i> | 6,29 | 22,64 |
| <i>PDF1.2A</i> | 3,26 | 11,98 |
| <i>RPL20</i> | 1,78 | 6,22 |
| <i>BGLU25</i> | 4,63 | 9,99 |
| <i>ELIP2</i> | 3,30 | 4,46 |
| <i>PR1</i> | -4,64 | -14,27 |
| <i>PNP-A</i> | -3,64 | -9,68 |
| <i>CHIT</i> | -3,84 | -15,29 |
| <i>2OG-Fe</i> | -0,79 | -8,37 |
| <i>VSP2</i> | -1,18 | -4,77 |
| <i>PR2</i> | -2,47 | -8,11 |

| Ciclo Largo | | |
|------------------|--|--|
| Gen | Lg ₂ (veces cambio) qPCR | Lg ₂ (veces cambio) Microarray |
| <i>2OG-Fe</i> | 5,28 | 33,10 |
| <i>ATCAX3</i> | 5,08 | 28,76 |
| <i>PR1</i> | 6,69 | 25,90 |
| <i>RBCL</i> | 2,88 | 15,43 |
| <i>PNP-A</i> | 4,46 | 25,59 |
| <i>Cor15A</i> | -13,3 | -43,59 |
| <i>Cor15B</i> | -5,64 | -29,89 |
| <i>Cor78</i> | -4,64 | -17,23 |
| <i>RD20</i> | -1,18 | -11,19 |
| <i>JRZ-Cor13</i> | -16,3 | -9,28 |

4.3. Modelado de redes génicas

Con objeto de identificar las posibles funciones o rutas en las que está implicada la proteína CS26, se realizó un análisis *in silico* con herramientas informáticas desarrolladas por las Universidades de Warwick, Essex y Exeter, en el proyecto PRESTA (Plant Responses to Environmental Stress in *Arabidopsis*) utilizando los datos obtenidos del análisis transcriptómico de las líneas silvestre y mutante *cs26* crecidas en

día largo y en día corto. Esta plataforma PRESTA proporcionó la base de datos de los perfiles de expresión génica de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de estrés por alta luminosidad a diferentes tiempos. Para la creación de estos perfiles, se habían utilizado previamente muestras de plantas expuestas a alta luminosidad, tomándose material cada 30 min durante 6 h, obteniéndose un total de 13 puntos, empezando en el punto 1 que corresponde a 0 minutos de exposición, siendo el punto 2 correspondiente a 30 minutos de exposición; el punto 3 correspondiente a 1 hora; y así hasta el punto 13, correspondiente a 6 horas de exposición. También se tomaron los mismos puntos para las plantas controles no expuestas a alta luminosidad.

El análisis que se realizó fue simplemente un metaanálisis donde se observa la expresión y correulación de los genes cuando se someten a estrés por luz de alta luminosidad. Estos datos permitieron modelar la respuesta de varios grupos de genes a este estrés, así como sus factores de transcripción asociados.

En este estudio, los modelos matemáticos se desarrollaron a partir de los datos obtenidos del análisis transcriptómico para el mutante *cs26* durante las condiciones de crecimiento de día largo y día corto, no siendo necesario obtener un nuevo perfil transcripcional con plantas sometidas a estrés por alta luminosidad, ya que como se ha descrito anteriormente, la mutación crea un efecto en la eficiencia fotosintética del mutante similar a la esperada si se le aplica este tipo de estrés.

4.3.1. Modelado del perfil transcripcional en condiciones de ciclo largo

Los genes desregulados en el análisis transcripcional realizado en plantas crecidas en día largo se sometieron a un análisis estadístico denominado *SplineCluster* (Heard et al., 2005), donde fueron agrupados en función de su expresión a lo largo de la serie de tiempos, generando un dendograma donde se puede visualizar la respuesta de los genes al estrés provocado.

En este dendograma se representó la expresión de los genes de cada microarray realizado en condiciones controles (variable 1) y su expresión en condiciones de estrés por alta luminosidad (variable 2). El color rojo indicó una inducción en la expresión de los genes y, el color verde, una represión. En la figura 42 se muestran los datos obtenidos de los microarrays realizados a lo largo de la serie de 13 puntos.

En esta primera agrupación aparecen un gran número de genes que respondían al estrés por alta luminosidad, formándose 22 grupos. En ellos se observó una respuesta temprana al estrés, ya que la mayoría de los genes cambiaba su expresión con respecto al control en los primeros puntos de la serie. En la figura 42 se puede observar que los

genes pertenecientes a los grupos 11, 12, 13 y 15 cambiaron su expresión con respecto a las condiciones control (se mostraron reprimidos) a partir del punto número 3 de la serie, que corresponde a 1 h de exposición de luz de alta intensidad. De forma similar, se observó que los genes pertenecientes a los grupos 17, 18 y 22 cambiaron también su expresión en los últimos puntos de las series de tiempo, pero de forma menos drástica.

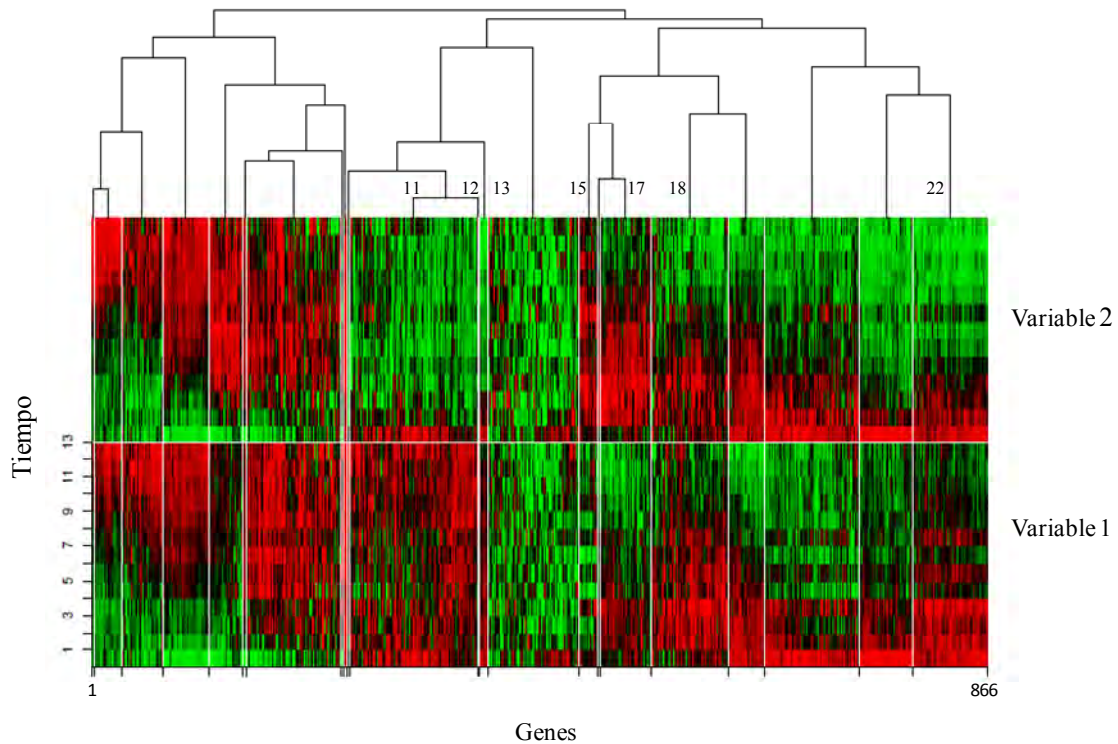


Figura 42. Dendrograma de la expresión de los genes desregulados en *cs26* en condiciones de día largo.

La variable 1 representa la expresión en condiciones control, la variable 2 representa la expresión en condiciones de estrés de alta luminosidad. Se generaron 22 grupos. Los grupos 11, 12, 13 y 15 mostraron diferencia en la expresión en los primeros puntos de la serie de tiempos. Los 17, 18 y 22 mostraron diferencia en la expresión en los últimos puntos de la serie de tiempos. Color rojo: inducción; color verde: represión.

De los grupos obtenidos tras este análisis de conjunto, se aplicó un análisis t-test para obtener aquellos genes en los que se observó una respuesta de expresión máxima. A este segundo grupo de genes, se les volvió a aplicar el software *SplineCluster* para corroborar la similitud de respuesta entre ellos, generándose un segundo dendrograma. Se realizó esta segunda agrupación con los datos de la serie de puntos de tiempo de exposición luminosa 3, 4 y 5. Los 293 genes obtenidos tras la segunda comprobación con este software se agruparon en 17 grupos (Figura 43). Los grupos 10, 11, 15, 16, 17 mostraron diferencia en su expresión con respecto al control. En todos ellos se observa

una represión de la expresión en condiciones de estrés por alta luminosidad. Por otro lado, los grupos 12 y 13 se mostraron inducidos, con respecto a las condiciones control.

El análisis de grupos funcionales realizado sobre estos genes se dividió en 23 categorías (Figura 44). Las categorías más importantes fueron las relacionadas con proteínas, señalización, estrés y RNA. Entre los genes incluidos en la categoría de proteínas se pudo destacar la existencia de 7 genes relacionados con la modificación postraduccional, entre ellos el gen *SKI3* que corresponde a una serina/treonina quinasa relacionado con la respuesta a estrés salino, *WNK1*, que también es una serina/treonina quinasa cuyo transcrito está regulado por ritmo circadiano. También encontramos en este grupo al gen *PHOT2* (FOTOTROPIN 2), que actúa como receptor de luz azul. Otros de los genes encontrados en este grupo codifican proteínas del tipo dedos de cinc (C₂H₄-type RING).

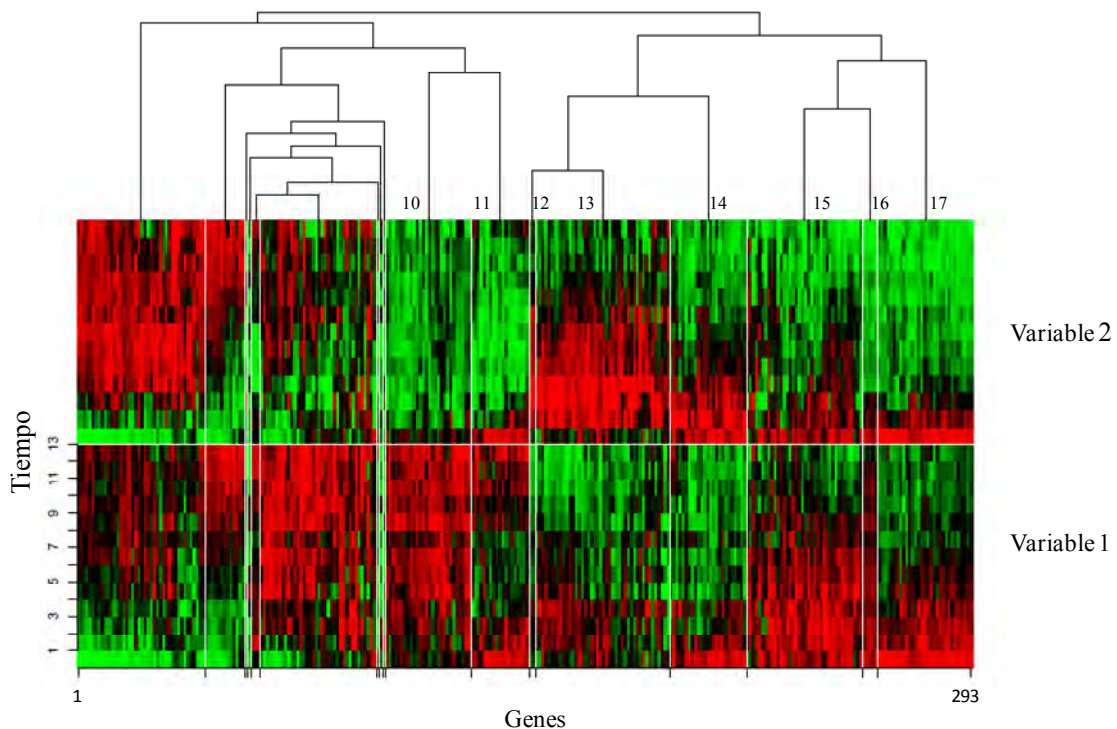


Figura 43. Dendrograma de la expresión de los genes desregulados en *cs26* en condiciones de día largo obtenido después del análisis t-test con las series 3, 4 y 5.

La variable 1 representa la expresión en condiciones control, la variable 2 representa la expresión en condiciones de estrés. Se generaron 17 grupos. Los grupos 10, 11, 15, 16 y 17 se mostraron reprimidos con respecto al control, mientras que los grupos 12 y 13 se mostraron inducidos. Color rojo: inducción; color verde: represión.

En el grupo de señalización se encontraron genes relacionados con la señalización por luz y calcio. En el caso de la luz, *PHYA* (PHYTOCHROME A), *PIF4* (PHYTOCHROME INTERACTION FACTOR 4) y *NPH3* (PHOTOTROPIC-

RESPONSIVE PROTEIN) se encuentran reprimidos. De los 5 genes de señalización por calcio, el más interesante fue *RD20* (RESPONSIVE TO DESSICATION 20), ya que en el análisis transcriptómico se encuentra reprimido respecto al silvestre -11,19 veces, y cuya expresión es inducida por ABA. En la categoría de estrés se encontraron *PDF1.2A*, *ADRI* (ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1), *ADRI-Like1*, *APG6* (homólogo cloroplástico de *HSP101*), *ATERDJ3B* (asociado a respuesta inmune) y *SAG20* (asociado a senescencia y respuesta a hongos).

En el grupo de RNA se encontró 11 genes que codificaban para distintos factores de transcripción, incluyendo tres factores MyB (*MYB28*, *MEE3*, *At3g13040*), dos factores C2C2(Zn) (*CDF3* y otro no conocido del tipo *CO-Like* (*At1g68520*)) y un factor de tipo GOLDEN2-Like (*GLK1*). Destacar también que en la categoría de fotosíntesis encontramos 5 genes, cuatro de ellos relacionados con el complejo de antenas del PSII (*LHCB2.1*, *LHCB2.2*, *LHCB2.4*, *LHCB4.2*) y una proteína quinasa (*At4g02630*). Todos ellos se encuentran reprimidos en el análisis.

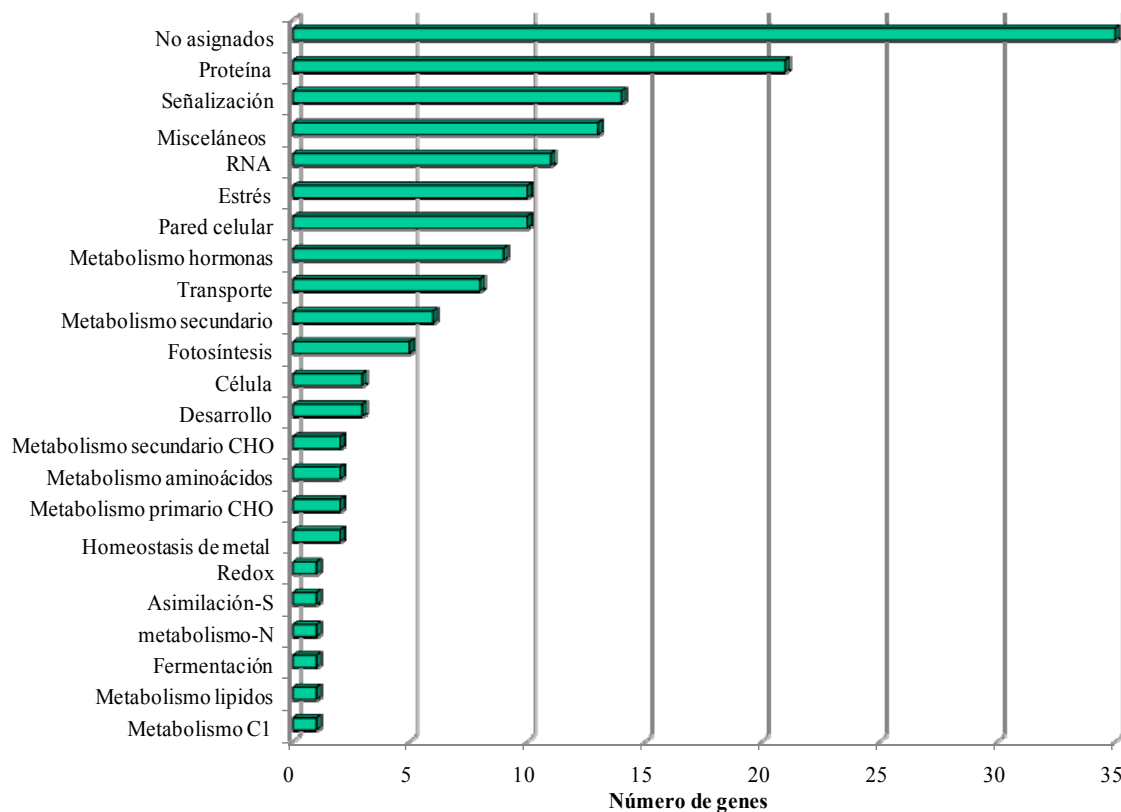


Figura 44. Categorías funcionales en las que se agrupan los genes que presentaron mayor cambio de expresión en el dendograma filtrado para el análisis de perfiles transcripcionales en condiciones de ciclo largo.

Una vez obtenidos estos datos, se aplicó el análisis TCAP-2 (Temporal Clustering by Affinity Propagation, version2) (Kiddle *et al.*, 2010) a la selección de

genes, usándose un algoritmo llamado AP (Affinity Propagation) (Frey y Dueck, 2007). Dicho algoritmo permitió agrupar de nuevo los genes en gráficos de perfiles de expresión a lo largo de las distintas series de tiempo, pudiéndose observar la correlación entre ellos, es decir, si dentro de un mismo cluster o grupo los genes quedan alineados con el patrón de expresión dominante, o si su respuesta se retrasa o se adelanta en el tiempo (Figura 45).

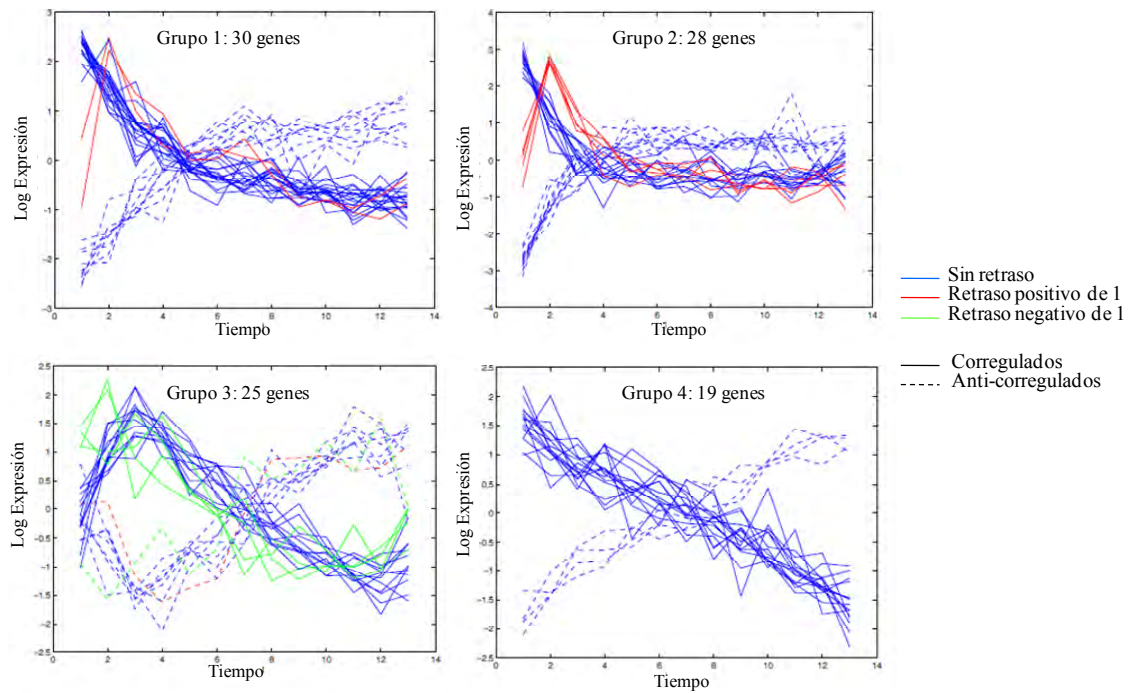


Figura 45. Patrón de co-regulación de los genes seleccionados con expresión alterada en *cs26* en condiciones de día largo tras el análisis TCAP-2.

Se representan sólo los cuatro primeros grupos obtenidos, donde existía un mayor número de genes co-regulados. Las líneas continuas representan correulación, las líneas discontinuas representan anti-correulación. El color azul indica expresión dominante en el grupo; los colores rojo y verde indican retraso positivo o negativo, respectivamente, de 1 punto en la serie de tiempos.

En el siguiente paso, se tomó un máximo de 80 genes y se sometieron a un análisis VBSSM (Variational Bayesian State Space Modelling), que permitió determinar las interacciones entre los distintos genes. Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa matemático Matlab (The MathWorks). Los datos obtenidos se visualizaron en el programa Cytoscape, donde se generaron los esquemas de los modelos de interacción génica. Se generaron 5 modelos y en todos se obtuvieron los mismos resultados (Figura 46).

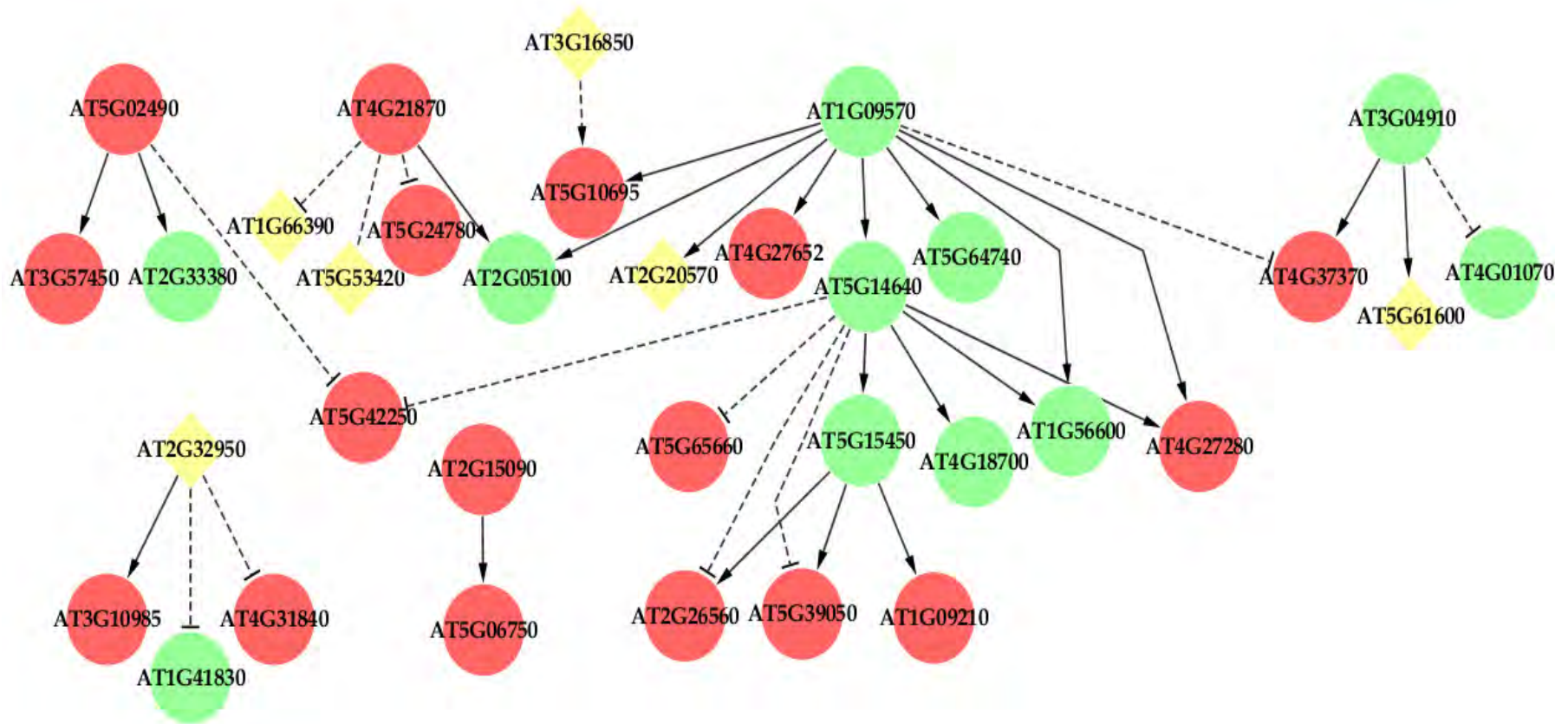


Figura 46. Modelo de redes génicas generado a partir del perfil transcripcional del mutante *cs26* en condiciones de ciclo largo.

Los círculos rojos representan genes inducidos, los verdes indican genes reprimidos. Los rombos amarillos indican factores de transcripción. Las líneas continuas indican interacción positiva, mientras que las discontinuas indican interacción negativa.

Tabla 27. Anotación de los genes representados en el modelo generado para las condiciones de ciclo largo.

Datos obtenidos de la base de datos *TAIR* (www.arabidopsis.org).

| Gen | Nombre del Gen | Función |
|-----------|--|--|
| AT1G09210 | Calreticulin 2 (CRT2) | Response to oxidative stress |
| AT1G09570 | PHYA (PHYTOCHROME A) | G-protein coupled photoreceptor/ signal transducer |
| AT1G41830 | SKS6 (SKU5 Similar 6) | Pectinesterase. Involved in oxidation reduction process |
| AT1G56600 | ATGOLS2 (<i>Arabidopsis Thaliana</i> Galactinol Synthase 2) | |
| AT1G66390 | PAP2 (Production Of Anthocyanin Pigment 2) | DNA binding / transcription factor |
| AT2G05100 | LHCB2.1 | Photosystem II light harvesting complex gene 2.1 chlorophyll binding |
| AT2G15090 | Fatty acid elongase, putative | |
| AT2G20570 | GLK1 (GOLDEN2-LIKE 1) | Transcription factor that regulates chloroplast development in a cell autonomous manner. |
| AT2G26560 | PLP2 (PHOSPHOLIPASE A 2A) | Nutrient reservoir. Response to pathogens |
| AT2G32950 | COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1). | Represses photomorphogenesis and induces skotomorphogenesis in the dark. |
| AT2G33380 | RD20 (RESPONSIVE TO DESSICATION 20) | Calcium ion binding. Located in Chloroplast membrane |
| AT3G04910 | WNK1 (WITH NO LYSINE (K) 1) | Serine/threonine kinase |
| AT3G10985 | SAG20 (Wound-Induced Protein 12) | |
| AT3G16870 | Zinc finger (GATA type) family protein | |
| AT4G01070 | GT72B1 | UDP-glucosyltransferase |
| AT4G18700 | CIPK12 (SNF1-Related Protein Kinase 3.9) | Serine/threonine kinase |
| AT4G21870 | 26.5 kDa class P-related heat shock protein (HSP26.5-P) | |
| AT4G27280 | Calcium-binding EF hand family protein | |
| AT4G27652 | Similar to unknown protein (AT4G27657.1) | |
| AT4G31840 | Early Nodulin-Like Protein 15 (ENODL15) | Electron carrier activity. |
| AT4G37370 | CYP81D8 (cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8) | Oxygen binding, electron carrier activity |
| AT5G02490 | HSC70-2 | Heat shock cognate 70 kDa protein 2 |
| AT5G06750 | Protein phosphatase 2C family protein / PP2C family protein. | Serine/threonine Phosphatase activity. |
| AT5G10695 | Similar to unknown protein | |
| AT5G14640 | SK13 (shaggy-like kinase 13). | Serine/threonine kinase activity. Related to Brassinosteroids. |
| AT5G15450 | APG6/CLPB-P/CLPB3 (Albino And Pale Green 6) | ATP binding / ATPase. HSP101 homologue. |
| AT5G24780 | AT5G24780, VSP1 | Acid phosphatase activity. Transcription factor binding. |

| Gen | Nombre del Gen | Función |
|-----------|--|---|
| AT5G39050 | Transferase family protein | |
| | Alcohol dehydrogenase, putative. | |
| AT5G42250 | Oxidoreductase activity. | |
| AT5G53420 | Similar to unknown protein | Contains InterPro domain CCT. |
| AT5G57450 | XRCC3 | ATP binding / damaged DNA binding |
| | EFR104. Ethylene-responsive element-binding family protein | |
| AT5G61600 | CESA6 (CELLULOSE SYNTHASE 6) | Transferase, transferring glycosyl groups |
| AT5G65660 | Hydroxyproline-rich glycoprotein protein | |

En este modelo de interacción génica se sugirió un número de genes que podrían ser potencialmente interesantes para clarificar el papel de la actividad S-Sulfocisteína sintasa. La anotación y función de cada nodo se describe en la Tabla 27. Los nodos principales corresponden a los genes *PHYA* (At1g09570), y las Ser-Thr quinasas *SK13* (At5g14640) y *WNK1* (At3g04910). También podemos distinguir seis factores de transcripción entre los que se encuentran *GLK1* (At2g20570) y *COPI* (At2g32950). *GLK1* regula el desarrollo del cloroplasto. El doble mutante *glk1glk2* presenta coloración verde pálida y una deficiencia en la formación del aparato fotosintético de manera parecida al mutante *cs26*, pero posee un tamaño similar al silvestre. Los genes que codifican proteínas de localización cloroplástica que están presentes en el modelo son *GLK1*, *APG6* y *RD20*. Además, también encontramos un gen relacionado con el complejo de antenas del fotosistema II (*LHCB2.1*).

4.3.2. Modelado del perfil transcripcional en condiciones de ciclo corto

Los resultados obtenidos a partir del modelado del perfil transcripcional en condiciones de ciclo corto se obtuvieron de la misma forma descrita anteriormente. En el primer dendograma obtenido formado por 14 grupos (Figura 47) se observó que la respuesta al estrés puede dividirse en dos, obteniéndose una primera respuesta temprana en los tiempos 4, 5 y 6 de la serie (grupos 5 y 7) y una segunda más tardía en los tiempos 9, 10 y 11 (grupo 9, 10 y 13).

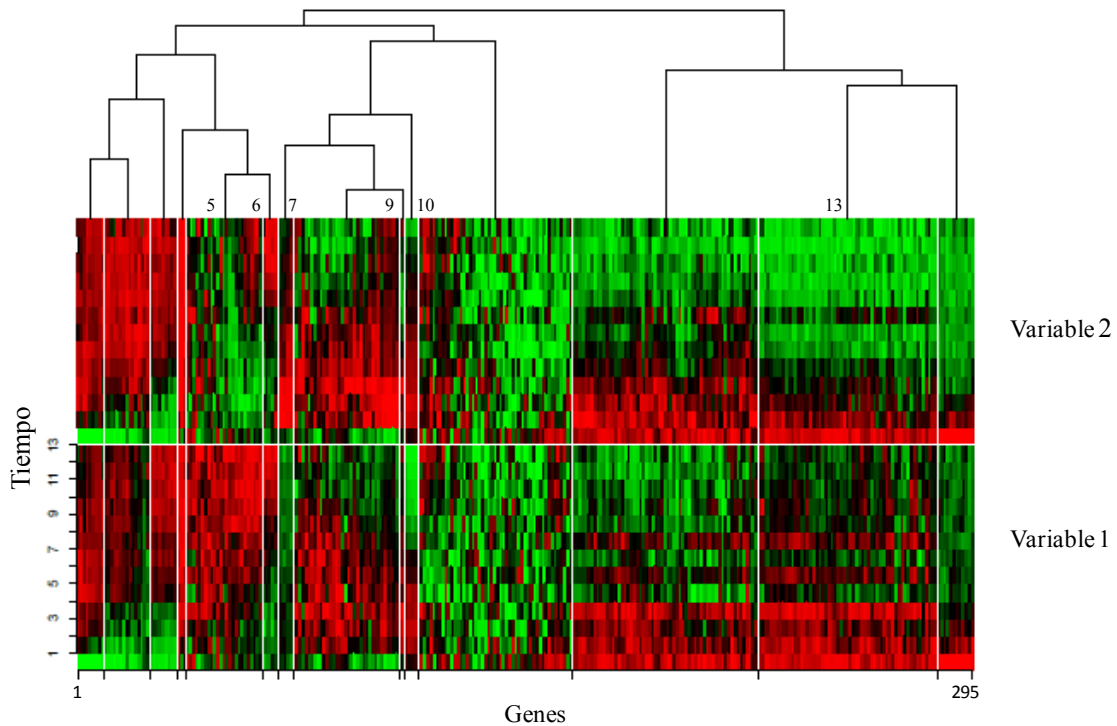


Figura 47. Dendrograma de la expresión de los genes desregulados en *cs26* en condiciones de día corto.

La variable 1 representa la expresión en condiciones control, la variable 2 representa la expresión en condiciones de estrés de alta luminosidad. Se generaron 14 grupos. Los grupos 5 y 7 mostraron diferencia en la expresión en los primeros puntos de la serie de tiempos. Los 9, 10 y 13 mostraron diferencia en la expresión en los últimos puntos de la serie de tiempos. Color rojo: inducción; color verde: represión.

De los grupos obtenidos tras este análisis de conjunto, se aplicó un análisis t-test para obtener aquellos genes en los que se observó una respuesta de expresión máxima. A este segundo grupo de genes, se les volvió a aplicar el software *SplineCluster* para corroborar la similitud de respuesta entre ellos, generándose un segundo dendrograma para la respuesta temprana y otro para la respuesta tardía (Figura 48, A y B).

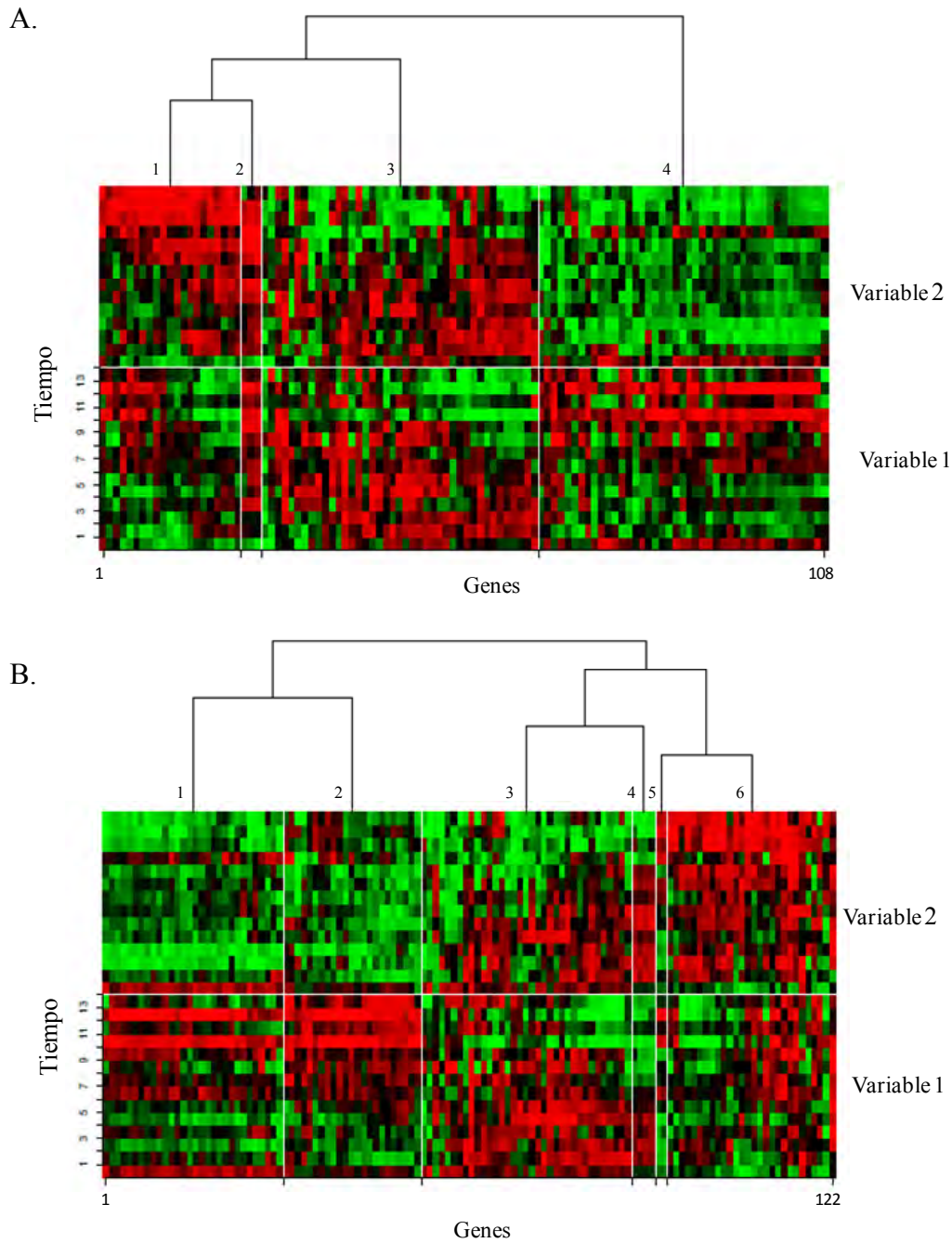


Figura 48. Dendograma de la expresión de los genes desregulados en *cs26* en condiciones de día corto obtenido después del análisis t-test con la respuesta temprana y tardía.

La variable 1 representa la expresión en condiciones control, la variable 2 representa la expresión en condiciones de estrés. (A) Respuesta temprana generada con tiempo 4, 5 y 6. (B) Respuesta tardía generada con tiempo 9, 10 y 11. Color rojo: inducción; color verde: represión.

El análisis de grupos funcionales realizado sobre estos genes se dividió en 19 categorías (Figura 49). Las categorías más importantes fueron las relacionadas con señalización, estrés y proteínas. En el caso de la respuesta temprana se puede destacar los genes *MPK19* (MAP Kinase 19), *WRKY46* y cuatro genes que codifican para

proteínas de choque térmico. En los genes de la respuesta tardía encontramos cinco genes de proteína de choque térmico, *GLK1*, así como genes relacionados con procesos de autofagia, tales como *ATG8E*.

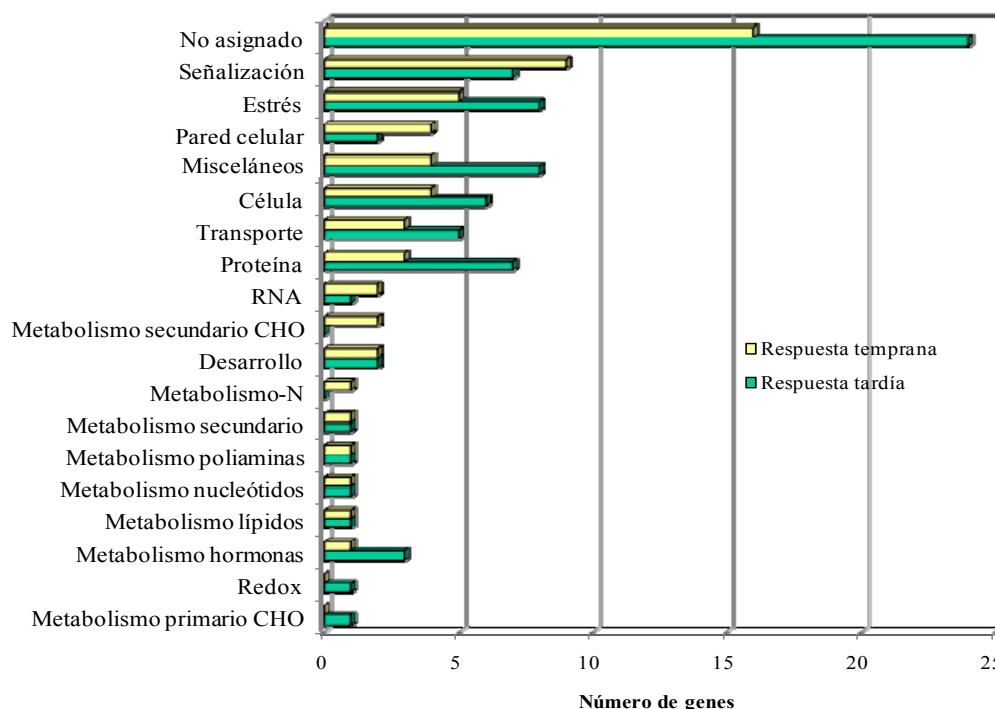


Figura 49. Categorías funcionales en las que se agrupan los genes que presentaron mayor cambio de expresión en el dendograma filtrado para el análisis de perfiles transcripcionales en condiciones de ciclo corto.

Estos genes se sometieron al análisis VBSSM para determinar las interacciones entre los distintos genes, obteniéndose los siguientes modelos de interacción génica (Figuras 50 y 51).

En el modelo de redes génicas que responden de forma temprana se observó cinco nodos principales: At1g04040 (fosfatasa de la superfamilia HAD), At4g13800 (función desconocida), At5g37600, que codifica GLN1;1 (glutamina sintetasa citosólica), At2g46400 (factor de transcripción *WRKY46*), y At3g15570 (*NPH3*, implicado en respuesta a luz). Las interacciones que muestra el gen At5g37600 son negativas en relación a muchos de los genes del modelo, incluido el factor de transcripción *WRKY46*. En la Tabla 28 se detalla el resto de genes y su función biológica. Existen además dos genes que codifican proteínas localizadas en el cloroplasto: NPQ1 (NON-PHOTOCHEMICAL QUENCHING 1) y un inhibidor de proteasas tipo Kunitz (At1g17860).

Tabla 28. Anotación de los genes representados en el modelo generado para las condiciones de ciclo corto y respuesta temprana.Datos obtenidos de la base de datos *TAIR* (www.arabidopsis.org).

| Gen | Nombre | Función |
|-----------|------------|--|
| AT1G02205 | CER1 | ECERIFERUM 1 |
| AT1G04040 | | Acid phosphatase class B family protein |
| AT1G08550 | NPQ1 | NON-PHOTOCHEMICAL QUENCHING 1 |
| AT1G10340 | | Ankyrin repeat family protein |
| AT1G17860 | | Trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein |
| AT1G17870 | ATEGY3 | ATEGY3 |
| AT1G57770 | FAD/NAD(P) | Amine oxidase family, oxidoreductase activity |
| AT1G62510 | | Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein |
| AT1G72060 | | Serine-type endopeptidase inhibitor |
| AT1G73805 | | Calmodulin binding |
| AT1G76090 | SMT3 | S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase 3 |
| AT1G79270 | ECT8 | Evolutionarily conserved C-terminal region 8 |
| AT2G07671 | | [AT2G07671, H ⁺ -transporting two-sector ATPase, C subunit family protein];[ATMG01080, subunit 9 of mitochondrial F ₀ -ATPase] |
| AT2G18230 | ATPPA2 | ARABIDOPSIS THALIANA PYROPHOSPHORYLASE 2; inorganic Diphosphatase/ pyrophosphatase |
| AT2G24600 | | Ankyrin repeat family protein |
| AT2G40960 | | Nucleic acid binding |
| AT2G46400 | WRKY46 | WRKY DNA-binding protein 46; transcription factor |
| AT3G05030 | NHX2 | Sodium proton exchanger 2; sodium:hydrogen antiporter |
| AT3G13470 | | Chaperonin, putative |
| AT3G15570 | NPH3 | Phototropic-responsive NPH3 family protein |
| AT3G22840 | ELIP1 | EARLY LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN; chlorophyll binding |
| AT3G26210 | CYP71B23 | Cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 23; oxygen binding |
| AT3G48460 | | GDSL-motif lipase/hydrolase family protein |
| AT3G48640 | | unknown protein |
| AT4G05590 | | unknown protein |
| AT4G12320 | CYP706A6 | Cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 6; oxygen binding |
| AT4G13800 | | unknown protein |
| AT4G14365 | | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein / ankyrin repeat family protein |
| AT4G21840 | | [AT4G21830, methionine sulfoxide reductase domain-containing protein / SeIR domain-containing protein]; |
| AT4G23140 | CRK6 | [CYSTEINE-RICH RLK 6; protein kinase family protein] |
| AT4G23880 | | unknown protein |
| AT4G27450 | | unknown protein |
| AT4G36670 | | Mannitol transporter, putative |
| AT5G12020 | HSP17.6II | 17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN |

Resultados

| Gen | Nombre | Función |
|------------|---------------|---|
| AT5G12110 | eEF1Balpha1 | Elongation factor 1B alpha-subunit 1 |
| AT5G20230 | ATBCB | ARABIDOPSIS BLUE-COPPER-BINDING PROTEIN; copper ion binding |
| AT5G24780 | VSP2 | VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2; acid phosphatase |
| AT5G37600 | ATGSR1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> glutamine synthase clone R1; glutamate-ammonia ligase |
| AT5G48570 | | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative / FK506-binding protein, putative |
| AT5G64510 | | Unknown protein |
| AT1G59590 | ZCF37 | ZCF37 |

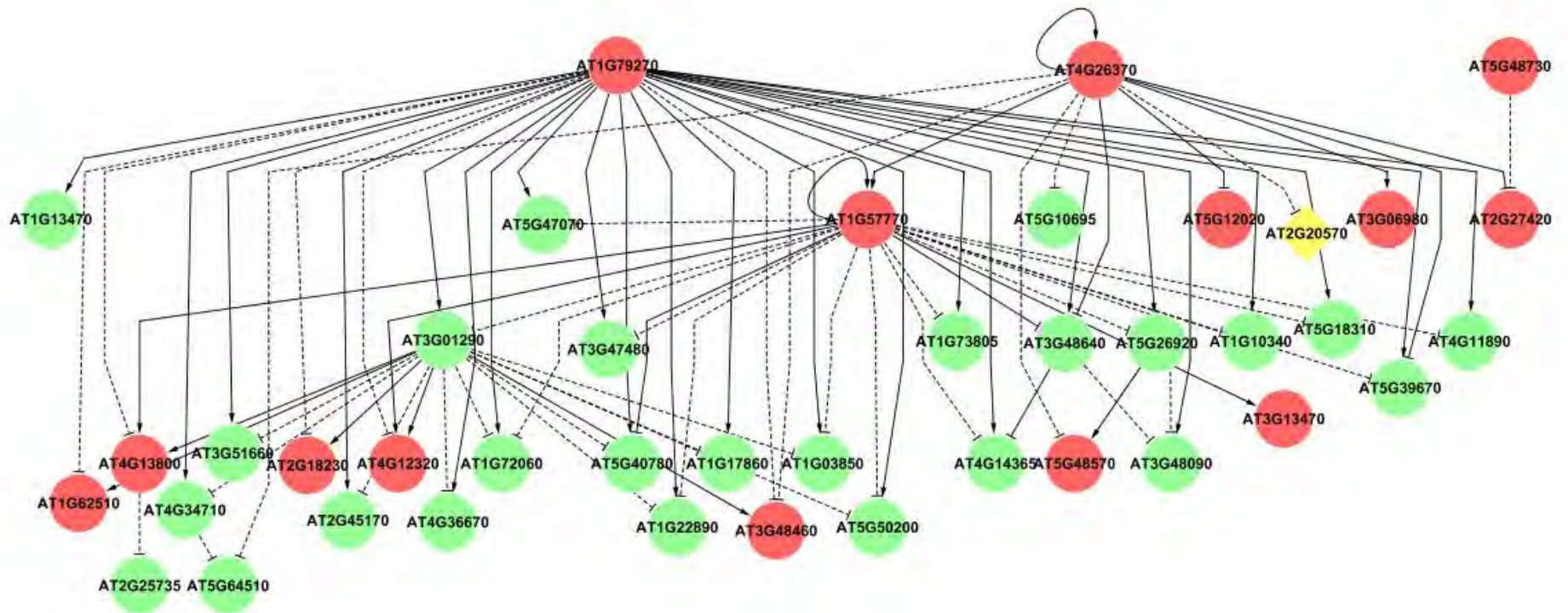


Figura 51. Modelo de redes génicas generado a partir del perfil transcripcional del mutante *cs26* en condiciones de ciclo corto y respuesta tardía.

Los círculos rojos representan genes inducidos, los verdes indican genes reprimidos. Los rombos amarillos indican factores de transcripción. Las líneas continuas indican interacción positiva, mientras que las discontinuas indican interacción negativa.

Tabla 29. Anotación de los genes representados en el modelo generado para las condiciones de ciclo corto, respuesta tardía.Datos obtenidos de la base de datos *TAIR* (www.arabidopsis.org).

| Gen | Nombre | Función |
|-----------|--------------|--|
| AT1G03850 | | Glutaredoxin family protein. Electron carrier activity, protein disulfide oxidoreductase activity |
| AT1G17860 | | Trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein |
| AT1G57770 | FAD/NAD(P) | Amine oxidase family. FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein. Located in chloroplast |
| AT1G62510 | LTP | protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein |
| AT1G72060 | | Serine-type endopeptidase inhibitor. Response to oxidative stress |
| AT1G73805 | | Calmodulin binding |
| AT1G79270 | ECT8 | ECT8 (evolutionarily conserved C-terminal region 8) |
| AT2G18230 | ATPPA2 | Arabidopsis Thaliana Pyrophosphorylase 2. |
| AT2G20570 | GLK1 | GPRI1 (GOLDEN2-LIKE 1); transcription factor |
| AT2G27420 | | Cysteine proteinase, putative |
| AT2G45170 | AtATG8e | AtATG8e (AUTOPHAGY 8E); microtubule binding |
| AT3G01290 | HIR2 | HYPERSENSITIVE INDUCED REACTION 2. Involved in N-terminal protein myristoylation |
| AT3G04260 | PTAC3 | Plastid Transcriptionally Active3. Possibly involved in plastid gene expression |
| AT3G06980 | | DEAD/DEAH box helicase, putative |
| AT3G12580 | HSP70 | HSP70 (heat shock protein 70); ATP binding |
| AT3G13470 | | Chaperonin, putative/chloroplast envelope |
| AT3G15570 | NPH3 | Phototropic-responsive NPH3 family protein. Response to light stimulus |
| AT3G47480 | | Calcium-binding EF hand family protein |
| AT3G48090 | EDS1 | Enhanced Disease Susceptibility 1; signal transducer/ triacylglycerol lipase |
| AT3G48460 | | GDSL-motif lipase/hydrolase family protein |
| AT3G48640 | | Similar to unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TAIR:AT5G66670.2) |
| AT3G51660 | | Macrophage migration inhibitory factor family protein / MIF family protein |
| AT4G11890 | | Protein kinase family protein |
| AT4G12320 | CYP706A6 | Cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 6; oxygen binding. |
| AT4G14365 | | zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein / ankyrin repeat family protein |
| AT4G26370 | | Antitermination NusB domain-containing protein. Regulation of transcription, DNA-dependent |
| AT4G34710 | ADC2 | Arginine Decarboxylase 2 |
| AT4G36670 | | Mannitol transporter, putative |
| AT5G10695 | | Similar to unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TAIR:AT5G57123.1); |
| AT5G12020 | HSP17.6II | 17.6 KDA Class II Heat Shock Protein |
| AT5G12110 | eEF1 B alpha | Glutathione S-transferase, C-terminal-like, elongation factor 1B alpha-subunit 1. Translation elongation factor activity |
| AT5G22920 | | Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein |

| Gen | Nombre | Función |
|-----------|----------------|---|
| AT5G26920 | | Calmodulin binding |
| AT5G39670 | | Calcium-binding EF hand family protein |
| AT5G40780 | LHT1 | Lysine Histidine Transporter 1. Amino acid transmembrane transporter. Knockout mutant presents a broad spectrum of disease resistance in a salicylic acid-dependent manner. |
| AT5G44420 | PDF1.2 | Encodes an ethylene- and jasmonate-responsive plant defensin |
| AT5G47070 | protein kinase | Protein serine/threonine kinase activity |
| AT5G48730 | PPR | Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein |
| AT5G49910 | cpHSC70-2 | Heat Shock Protein 70-7. Required for normal plastid structure |
| AT5G50200 | WR3 | Wound-Responsive 3. Nitrate transmembrane transporter. Involved in jasmonic acid-independent wound signal transduction. |

En el modelo obtenido para la respuesta tardía se observa que hay varios nodos principales (Tabla 29). Entre ellos se pudo destacar el nodo At1g79270 que codifica ECT8, proteína que contiene la región C-terminal 8 conservada evolutivamente, del cual no existe mucha información pero se ha descrito que al igual que este gen, algunas proteínas que pertenecen a la misma familia tales como ECT1 o ECT2, pueden jugar un papel crítico relacionado con la señalización del Ca²⁺ citosólico al núcleo, y por tanto, regulando la expresión génica (Ok *et al.*, 2005).

Existen además ocho genes que codifican proteínas localizadas en el cloroplasto. Uno de ellos es el factor de transcripción GLK1, antes descrito en el modelo de día largo, y el gen *PTAC3*, que codifica un factor de transcripción y posiblemente está relacionado con la expresión de genes cloroplásticos. En ambos ciclos, este gen se encuentra reprimido. También existe otro gen localizado en el cloroplasto (At4g26370: *ANTI-TERMINATION NUSB DOMAIN*) también relacionado con la regulación de la transcripción y que parece ser uno de los nodos principales del modelo. Al igual que en el modelo de respuesta temprana, aparece la proteína perteneciente a la familia FAD/NAD(P)-oxidoreductasa localizada en el cloroplasto (At1g57770). Otro de los genes localizados en el cloroplasto es *cpHSP70-2* (At5g49910), que codifica una proteína de choque térmico del estroma implicada en el transporte de proteínas al cloroplasto.

Todos estos genes que constituyen nodos principales de interacción génica tanto en condiciones de día largo como día corto, serán analizados en una investigación futura con objeto de validar los modelos matemáticos obtenidos.

5. Análisis del perfil metabólico de los mutantes *cs26* y *oas-b* de *Arabidopsis thaliana*

5.1. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción y separación de metabolitos

El estudio de perfiles metabólicos se realizó de forma comparativa entre las líneas silvestres, *cs26* y *oas-b* mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrofotómetro de masas (HPLC/MS). Este análisis se enfocó a la detección de metabolitos de bajo peso molecular en modo de ionización positiva, limitando el rango de barrido de la relación masa/carga entre 50-1000 m/z, y se abordó a través de diferentes condiciones de análisis, teniendo en cuenta el método de extracción del material vegetal, y la columna cromatográfica utilizada para la retención y separación de los compuestos detectados. De esta forma, se realizó un análisis de los principales metabolitos encontrados en cada una de las líneas utilizando cuatro aproximaciones en función del método de extracción y dos en función de las columnas cromatográficas (fase reversa y fase sílice polarizada). Como modelo representativo se ilustrará sólo los datos obtenidos en el caso de la línea silvestre como estudio previo para la determinación de las condiciones más favorables en cuanto a los distintos métodos empleados.

A partir de esta caracterización se eligió el tratamiento analítico más adecuado que nos permitió observar una mayor diferencia entre las distintas líneas, con objeto de disponer de un sistema de análisis en el que se pudiesen observar cambios significativos en los perfiles metabólicos.

5.1.1. Puesta a punto del método de extracción: fase acuosa frente a fase orgánica, con columna cromatográfica no-polar

Para la extracción de los metabolitos de hojas en fase acuosa se utilizó una solución ácida compuesta por 0,1 N HCl y 0,1 % ácido fórmico (ver materiales y métodos). Una vez obtenido el extracto de hojas, se analizó mediante HPLC/MS con una columna cromatográfica de fase reversa C18, utilizando los parámetros del método descrito en Materiales y métodos (Sección 7). El perfil metabólico obtenido para la línea silvestre se puede observar en la figura 52A. Con este análisis se detectaron un total de 238 compuestos. Por otro lado, en los cromatogramas obtenidos se pudo determinar aquellos compuestos que, en relación al área o a la intensidad de pico detectada, pudieron considerarse como más abundantes o mayoritarios tomando como criterio que

la intensidad de pico sea superior a 10^5 . Bajo estas condiciones se detectaron 28 compuestos mayoritarios.

Para la extracción de metabolitos en fase orgánica se utilizó una mezcla compuesta por MeOH:H₂O:CHCl₃ (2,5:1:1) (Figura 52B). En este caso, se detectaron para la línea silvestre un total de 232 compuestos, de los cuales se pudieron determinar como más intensos 24 compuestos.

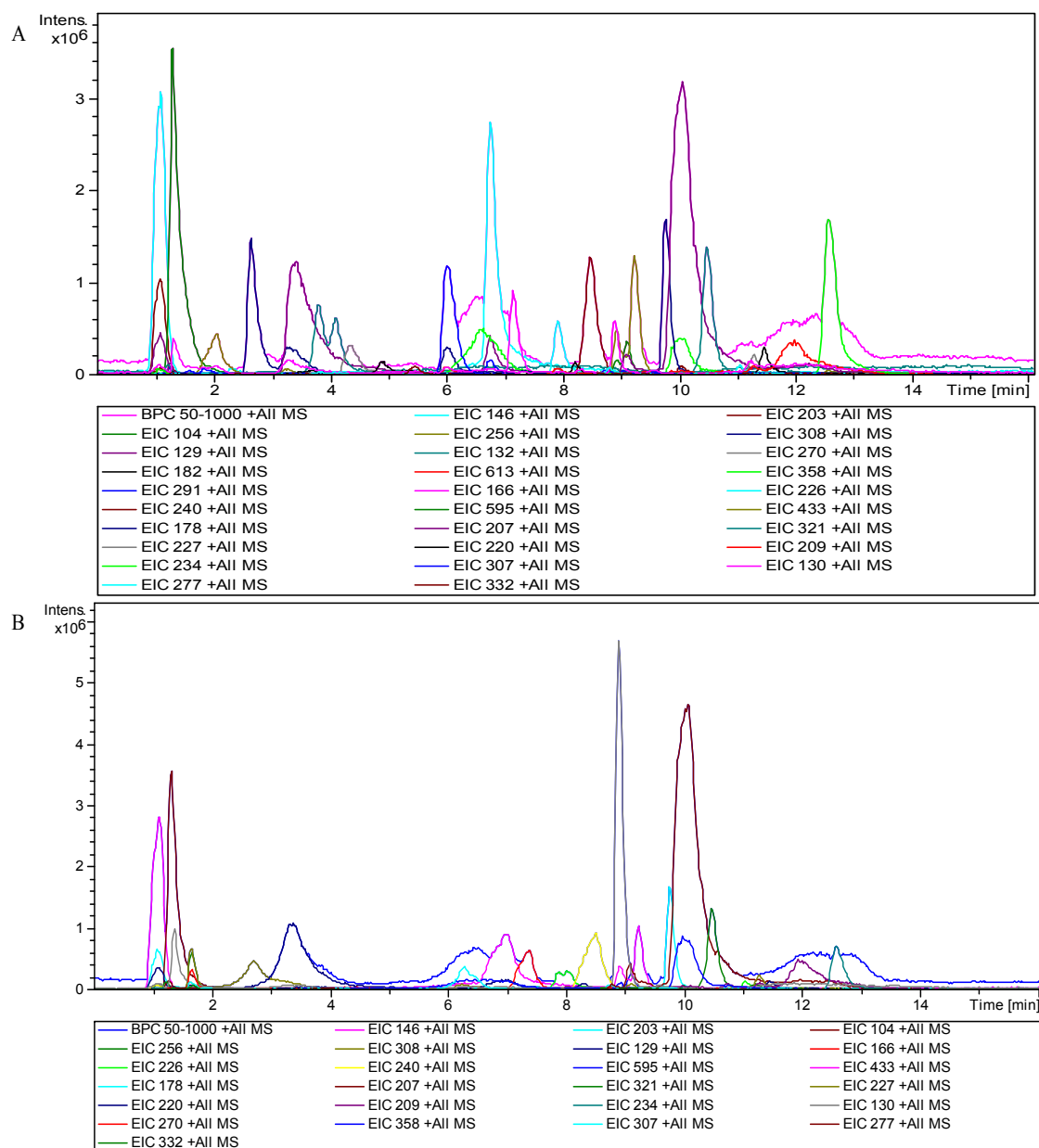


Figura 52. Separación y detección de metabolitos mediante LC/MS utilizando una columna RF-C18.

A: Perfil metabólico de hojas de plantas silvestres mediante extracción con la solución acuosa ácida.

B: Perfil metabólico de hojas de plantas silvestres mediante extracción con la solución orgánica.

Para aumentar la intensidad de la señal y el número de metabolitos detectables, se realizó la extracción en las distintas fases (acuosa u orgánica), y a continuación las muestras se concentraron mediante liofilización. Posteriormente, los residuos sólidos se re-suspendieron en 250 μL de tampón de extracción acuoso y orgánico, respectivamente. Seguidamente, se llevó a cabo la detección del número total de metabolitos en cada caso, siendo de 223 para la extracción acuosa y de 235 para la extracción orgánica. El número de compuestos mayoritarios para cada análisis fue de 31 y 39, respectivamente (Tabla 30).

Tabla 30. Comparación de número de compuestos totales (T) y de máxima intensidad (M) detectados en plantas silvestres en función del método de extracción y la columna cromatográfica.

| Columna | Método de extracción | | | | | | | |
|----------------------|-------------------------|-----|---------------------|-----|---|-----|-------------------------------------|-----|
| | Extracción acuosa ácida | | Extracción orgánica | | Extracción acuosa ácida + liofilización | | Extracción orgánica + liofilización | |
| | M | T | M | T | M | T | M | T |
| <i>RF-C18</i> | 28 | 238 | 24 | 232 | 31 | 223 | 39 | 235 |
| <i>HILIC</i> | 28 | 307 | 39 | 360 | 29 | 375 | 41 | 380 |

A continuación, se llevó a cabo un estudio comparativo mediante diagramas de Venn de los diferentes métodos empleados, obteniéndose las representaciones mostradas en la figura 53.

Cuando se comparó la extracción en fase acuosa frente a la extracción en fase orgánica se observó que existían 85 compuestos que estaban presentes en ambos métodos, y que son independientes del tipo de fase utilizada. Cuando realizamos la concentración posterior mediante liofilización, el número de compuestos extraídos en ambas fases es de 96. También se observó que cuando se realizó la concentración de las muestras en el caso de la fase acuosa ácida, aunque se aumentó la intensidad de los compuestos mayoritarios, hubo una reducción del número total de metabolitos detectados, debido probablemente a una degradación física producida por el método de concentración. En el caso de la fase orgánica no hubo diferencias significativas en cuanto al número total de metabolitos detectados.

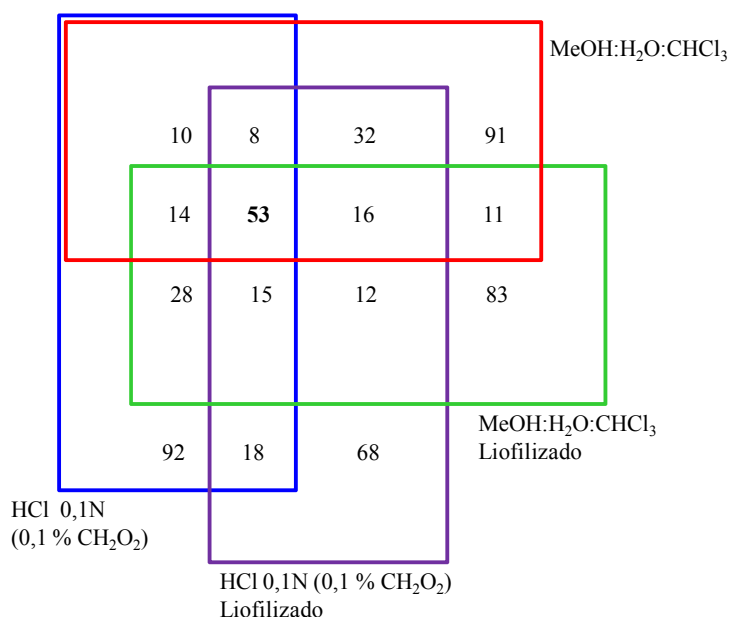


Figura 53. Diagramas de Venn de los compuestos detectados por diferentes métodos (fase reversa). Se representa el número de solapamientos de compuestos con igual m/z - t_R (relación carga/masa-tiempo de retención) detectados mediante LC/MS en extracto de hojas de plantas basado en diferentes métodos de extracción, y detectados con columna de fase reversa.

Otro aspecto estudiado fue el número total de compuestos coincidentes en todos los análisis. En este caso, se obtuvo un total de 53 metabolitos con igual m/z que eran independientes del tipo de análisis utilizado, y por tanto, bastante estables, puesto que no sufrieron degradación física tras la liofilización. Este resultado pone de manifiesto, como era de esperar, que el rango de metabolitos extraídos es dependiente del tipo de solvente empleado y método de extracción, ya que sólo aproximadamente el 20 % del total de los metabolitos es detectado en todos los casos.

5.1.2. Puesta a punto del método de extracción: fase acuosa frente a fase orgánica, con columna cromatográfica polar

Se llevó a cabo el mismo tipo de análisis que en el apartado anterior, pero con una columna de fase polar o sílice polarizada. La cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) es una técnica cromatográfica para la separación de compuestos hidrófilos y muy polarizados, que a menudo tienen poca o ninguna retención en las columnas de fase inversa. El perfil cromatográfico obtenido en la elución de las muestras de la línea silvestre utilizando esta columna de fase normal polarizada se puede observar en la figura 54.

El número de compuestos detectados en cada una de las extracciones aplicadas se muestran en la anterior Tabla 30. A la vista de los resultados obtenidos se pudo

determinar que el mejor método de extracción para el uso de la columna HILIC es una extracción orgánica seguida de concentración mediante liofilización.

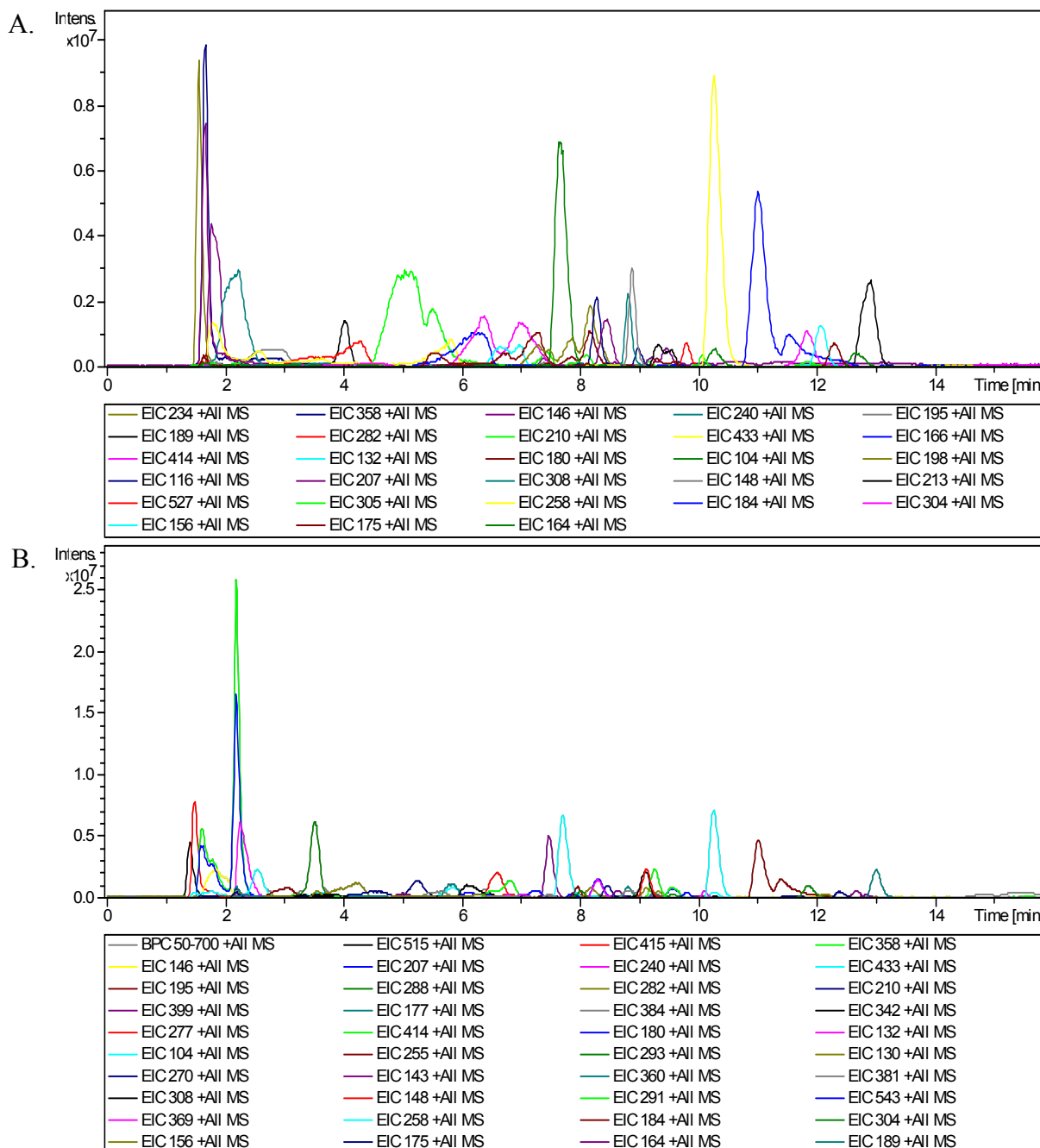


Figura 54. Separación y detección de metabolitos mediante LC/MS utilizando una columna de fase normal HILIC.

A: Perfil metabólico de hojas de plantas silvestres mediante extracción con la solución acuosa ácida.

B: Perfil metabólico de hojas de plantas silvestres mediante extracción con la solución orgánica.

Los diagramas de Venn que se obtuvieron en este caso mostraron que hay un total de 153 compuestos que solaparon cuando se utilizó la extracción orgánica y acuosa ácida sin liofilizar, y 145 cuando se realizó la liofilización en ambos casos. Por último, hubo 72 compuestos que se detectaron en todos los casos, independientemente del tipo de análisis empleado (aproximadamente el 20 % del total de metabolitos) (Figura 55).

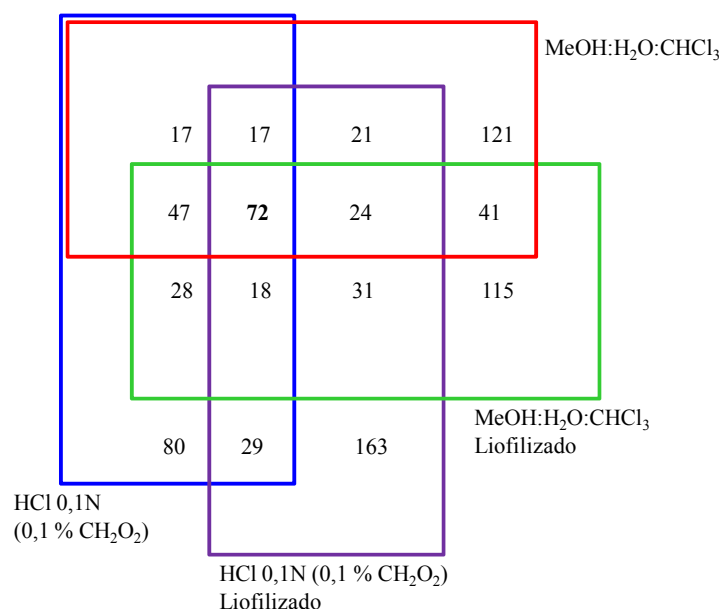


Figura 55. Diagramas de Venn de los compuestos detectados por diferentes métodos (fase normal)

Se representa el número de solapamientos de compuestos con igual $m/z-t_R$ (relación carga/masa-tiempo de retención) detectados mediante LC/MS en extracto de hojas de plantas basado en diferentes métodos de extracción y detectados con columna de fase normal.

5.2. Análisis metabólico de las distintas líneas silvestre, *oas-b* y *cs26*

Para determinar qué metabolitos están presentes en cada línea, se aplicó el método que dio mejores resultados con la columna de fase reversa, en este caso, la extracción en fase acuosa ácida; y con la columna en fase normal, la extracción orgánica concentrada.

De todos los metabolitos encontrados en el primer caso, existe un total de 89 compuestos presentes en las tres líneas. Las dos líneas mutantes comparten además 55 metabolitos que no están presentes en la línea silvestre, como se puede observar en el diagrama de Venn de la figura 56A.

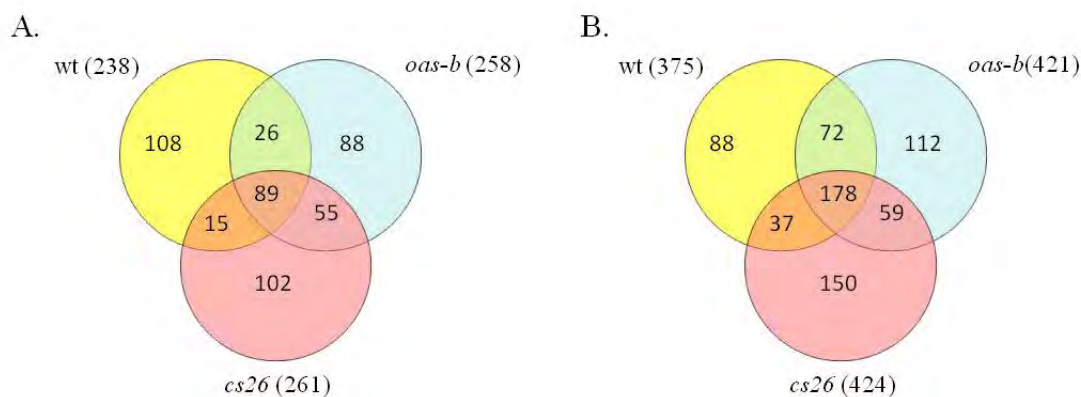


Figura 56. Diagrama de Venn de los perfiles metabólicos de las líneas silvestres y mutantes *cs26* y *oas-b*.

Se comparan los compuestos detectados en las tres líneas analizadas crecidas en condiciones de día largo durante 3 semanas. A. Extracción acuosa ácida con columna de fase reversa. B. Extracción orgánica con columna de fase normal. Se muestra entre paréntesis el número total de compuestos detectados en cada caso.

En el análisis con la columna en fase normal, se encontró un total de 178 compuestos comunes en las tres líneas. También se observó que las líneas mutantes *oas-b* y *cs26* presentan un mayor número de compuestos detectados que la línea silvestre, compartiendo 59 metabolitos exclusivos en estas líneas que no se encuentran en la silvestre (Figura 56B).

5.2.1. Análisis de componentes principales

El método estadístico de análisis de componentes principales está diseñado para extraer k componentes principales de un conjunto de p variables cuantitativas X . Los componentes principales se definen como el conjunto de combinaciones lineales ortogonales de X que tienen la máxima varianza. La determinación de los componentes principales se usa con frecuencia para reducir la dimensionalidad de un conjunto de variables predictivas antes de utilizarlas en procedimientos tales como regresión múltiple o análisis de conglomerados.

Este estudio de análisis de componentes principales se realizó utilizando los extractos de hojas de plantas crecidas en condiciones de día corto y de día largo. Para ello, se utilizaron 6 replicas biológicas en cada caso. El análisis se realizó utilizando como datos todos los metabolitos extraídos en cada línea mediante LC/MS, en los dos fotoperiodos, teniendo en cuenta la relación m/z , el tiempo de retención, área e intensidad de pico de cada metabolito. Estos datos se compararon independientemente y a continuación se realizó un análisis conjunto para determinar las diferencias entre el tipo de fotoperiodo utilizado. Se realizó un filtro previo para reducir la cantidad de datos

a analizar limitando la intensidad de pico 1/100 de la intensidad máxima detectada, considerando los compuestos por debajo de este valor no significativos en el análisis.

En el estudio en ciclo largo, se determinó el gráfico de sedimentación con los valores propios observándose que para F1 el valor es de aproximadamente 43, que significa que un único vector es capaz de explicar el 34,5 % de la varianza en las tres poblaciones (Figura 57).

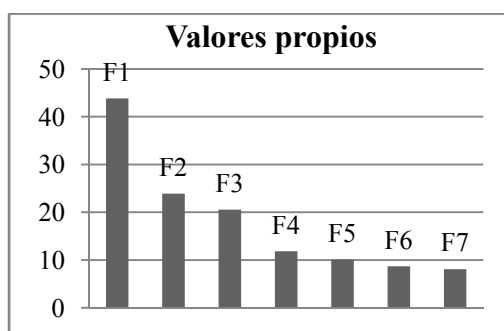


Figura 57. Valores propios de los factores obtenidos tras el análisis de PCA en ciclo largo.

A continuación se obtuvo la gráfica correspondiente a la extracción de los componentes principales F1 + F2 (Figura 58), que explican un 53.34 % de disimilitud entre las distintas líneas. Se puede observar que, tal como habíamos predicho en la gráfica anterior, el factor que determina la mayor varianza es F1, y como se puede apreciar en el gráfico, es en este eje donde observamos una mayor separación entre las poblaciones de la línea silvestre y *oas-b* frente a *cs26*.

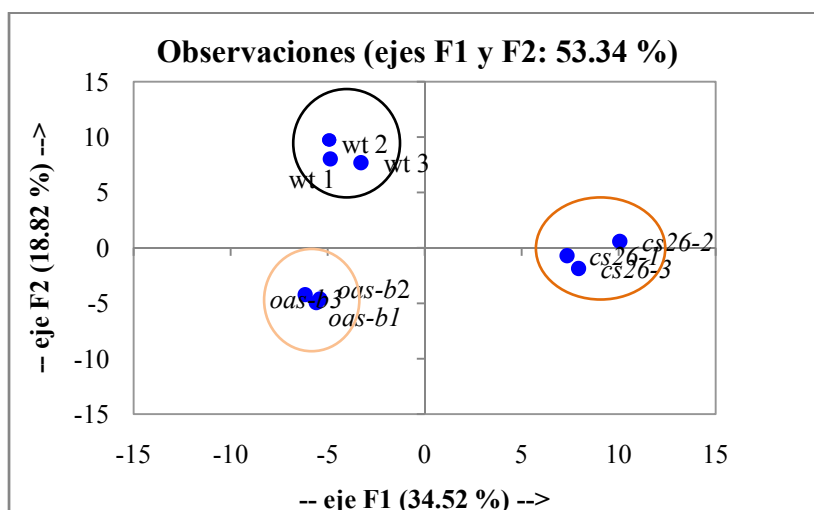


Figura 58. Análisis de PCA de los dos primeros componentes principales para ciclo largo.

Perfiles metabólicos obtenidos a partir de extractos de hojas de plantas silvestres (circulo negro), *oas-b* (circulo rosa), y *cs26* (circulo naranja) crecidas en ciclo largo.

El factor F2 cobró mayor importancia a la hora de discernir entre las poblaciones silvestre y *oas-b*. En estas condiciones, las tres poblaciones son muy diferentes en cuanto a la composición metabólica, siendo silvestre y *oas-b* más similares entre sí, ya que se determinan a partir del componente principal F2, que presentó un peso menor que F1.

Este tipo de análisis también nos permitió determinar el porcentaje de contribución de las distintas variables, en este caso de los distintos metabolitos. Así, es posible obtener la contribución de cada compuesto en cada línea analizada. La abundancia relativa de cada metabolito se calculó como las veces de cambio de la concentración de dicho metabolito obtenida en el mutante frente a los valores obtenidos para plantas silvestres. El estudio estadístico de los resultados se llevó a cabo mediante el test de Student, utilizando los datos procedentes de 3 réplicas biológicas independientes. En el análisis realizado se pudo determinar que había 38 metabolitos en la línea *oas-b* que presentaban un valor absoluto de veces de cambio mayor de dos, siendo en la línea *cs26* de 43 metabolitos.

Bajo las condiciones de crecimiento de ciclo corto se obtuvo el gráfico de valores propios (Figura 59), y se observó que el componente principal F1 podía explicar el 34 % de la varianza observada en las tres poblaciones.

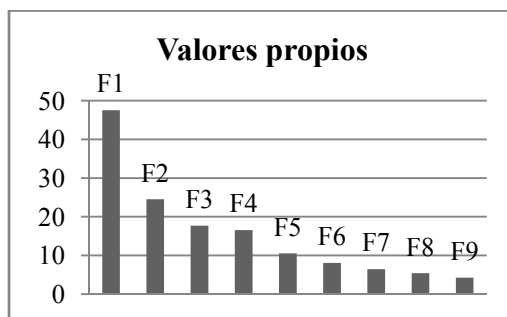


Figura 59. Valores propios de los factores obtenidos tras el análisis de PCA en ciclo corto.

El gráfico obtenido de representar los dos primeros componentes principales permitió deducir que las poblaciones son distintas entre sí en cuanto al perfil metabólico que presentan en condiciones de día corto, a pesar de que el fenotipo de *cs26* en este fotoperiodo es similar al de la línea silvestre. También se pudo deducir que el mutante *oas-b* es metabólicamente menos parecido a la línea silvestre en condiciones de día corto que lo observado en ciclo largo, ya que es el componente principal F1 (que es el de mayor contribución) el que separa estas dos poblaciones (Figura 60). El cálculo del contenido relativo de cada metabolito mostró que existían 23 metabolitos en la línea

oas-b que presentaban un valor absoluto de veces de cambio mayor de dos con respecto a silvestre, siendo en la línea *cs26* de 35 metabolitos.

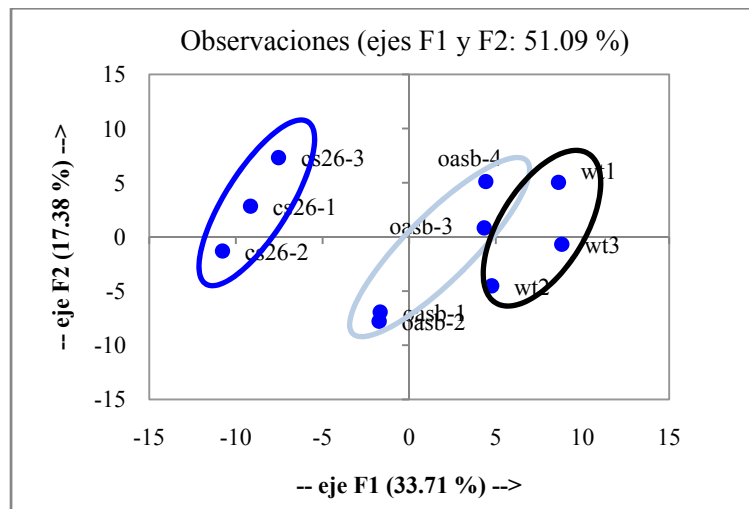


Figura 60. Análisis de PCA de los dos primeros componentes principales para ciclo corto.

Perfiles metabólicos obtenidos a partir de extractos de hojas de plantas silvestres (circulo negro), *oas-b* (circulo celeste), y *cs26* (circulo azul) crecidas en ciclo corto.

Por último, se llevó a cabo el análisis de PCA conjunto de las muestras que fueron analizadas en ciclo corto y en ciclo largo. En este caso se obtuvo el primer componente principal con un valor de > 90 , lo que implicaría que con este factor es posible explicar un porcentaje de varianza de un 51 % (Figura 61).

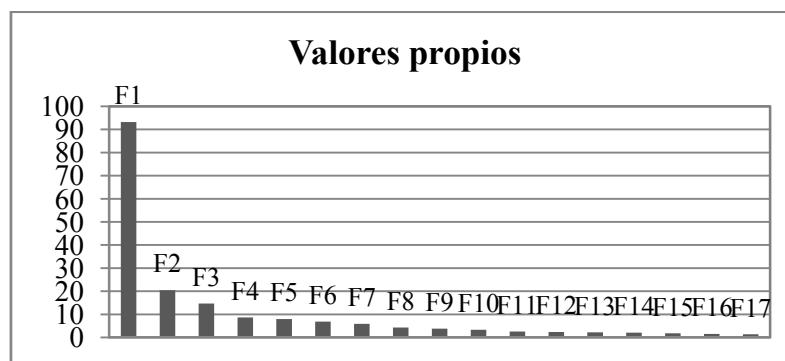


Figura 61. Valores propios de los factores obtenidos tras el análisis de PCA de los metabolitos de las distintas líneas en ambos ciclos, largo y corto.

Con estos datos se obtuvieron dos gráficas de PCA, una correspondiente a la extracción de los componentes principales F1 + F2, y la otra correspondiente a F1 + F3. (Figura 62). Se puso de manifiesto que existen dos grupos diferenciados; en uno se

encontraron aquellas muestras que fueron crecidas en condiciones de día corto, y en el otro, aquellas crecidas en día largo. Esto indicó que existen diferencias metabólicas importantes cuando las plantas se someten a diferentes regímenes de luz, pero también que las líneas mutantes analizadas mantienen el perfil metabólico acorde con el que cabría tener bajo un fotoperiodo dado.

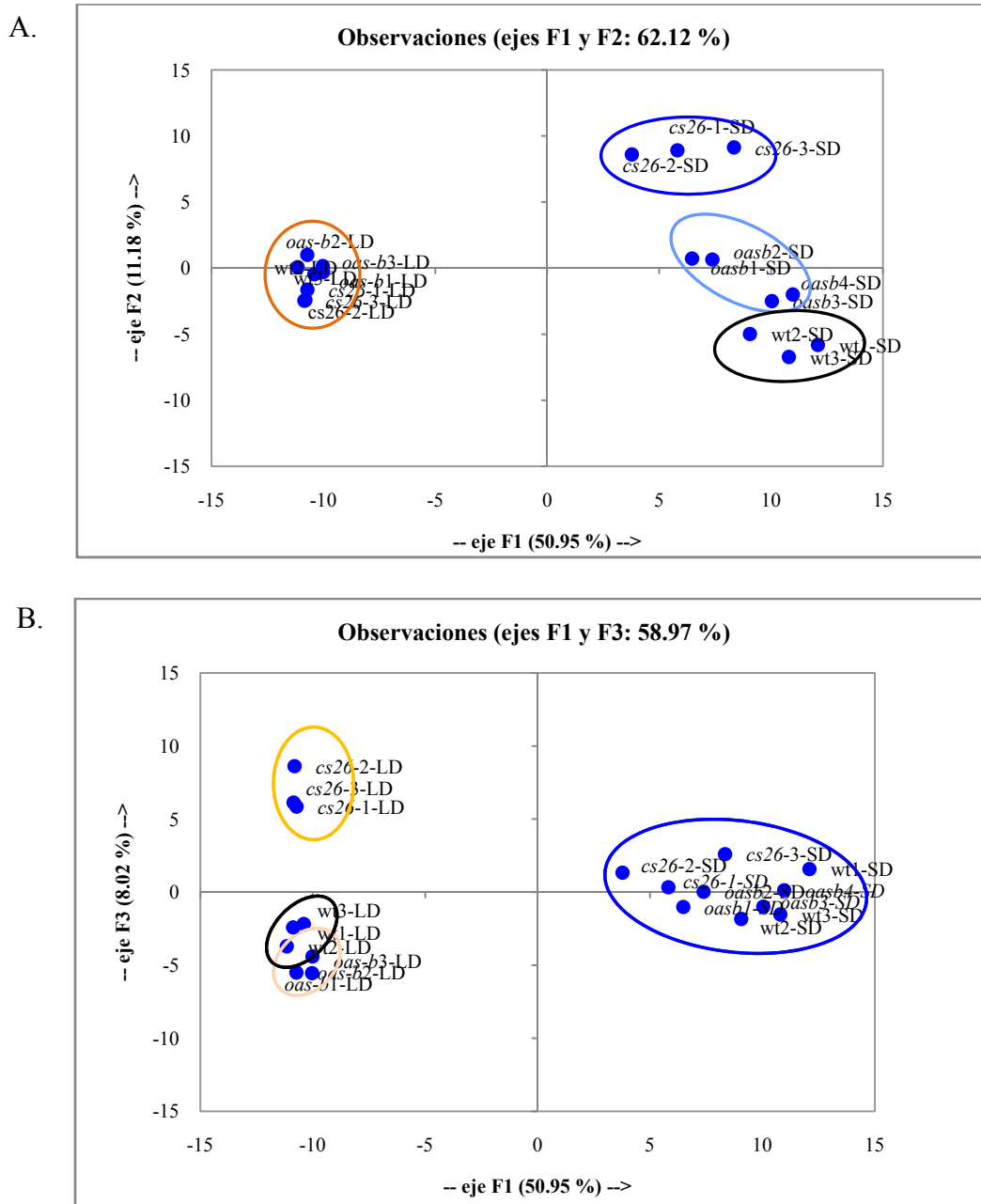


Figura 62. Análisis de PCA para los componentes principales F1, F2 (A) y F1, F3 (B).

Se analizaron los perfiles metabólicos obtenidos a partir de extractos de hojas de plantas silvestres y mutantes *oas-b* y *cs26* crecidas en día largo (LD) y día corto (SD).

También es posible determinar la relación m/z de los metabolitos que más contribuyen en cada grupo. La representación gráfica de F1 y F2 indicó los valores de las variables que más contribuyeron en la separación metabólica de día largo, mientras que la representación de F1 y F3 lo representó para día corto. Es interesante resaltar que con estos resultados se observó de nuevo que la línea del mutante *oas-b* en ciclo corto es metabólicamente menos parecida a la línea silvestre que en el caso de día largo, donde ambas líneas aparecieron formando un único grupo.

5.3. Identificación, normalización y cuantificación de metabolitos específicos

Debido a la falta de una biblioteca de espectros de LC/MS homogénea en la literatura, y a la baja resolución de masa de la trampa iónica utilizada (0,1 uma), no ha sido posible identificar de forma inequívoca los compuestos separados. Para abordar este problema, se realizó una biblioteca propia en nuestro grupo con el fin de poder identificar los principales compuestos azufrados que son interesantes en el metabolismo del azufre en plantas, así como otro tipo de compuestos de interés para la caracterización de las diferentes líneas tales como aminoácidos y fitohormonas.

5.3.1. Metabolitos azufrados

Los metabolitos que se estudiaron fueron aquellos relacionados con la ruta de síntesis y asimilación de cisteína en plantas. Los compuestos azufrados presentan una polaridad alta y son solubles en agua, por lo tanto la extracción acuosa ácida fue la más apropiada en este caso, utilizando la columna de fase reversa C18.

Lo primero que se realizó fue una inyección directa en el espectrómetro de una solución estándar de cada compuesto a una concentración de 200 μM . La finalidad de la inyección directa es la determinación de los parámetros de sintonización para aumentar y mejorar la señal de cada analito, así como la obtención del espectro de masas de cada uno de ellos.

A continuación, se registró el patrón de elución de cada compuesto mediante análisis de muestras patrones en el HPLC, pudiéndose determinar de esta forma el tiempo de retención en la columna para cada uno de ellos (Tabla 31).

Tabla 31. Compuestos detectados e identificados mediante LC/MS.

Para cada compuesto se determina el tiempo de retención y los parámetros de sintonización. MW: peso molecular.

| Compuesto | MW | Tiempo retención (min) | Capillary (V) | Skimmer (V) | Cap Exit (V) |
|----------------------------|-------|------------------------|---------------|-------------|--------------|
| Cisteamina | 77,2 | 1,2 | -4500 | 29,3 | 50 |
| Serina | 105,1 | 0,8 | -3000 | 32 | 75 |
| Hipotaurina | 109,2 | 1,2 | -4500 | 30,58 | 91,67 |
| β -cianoalanina | 114,1 | 0,8 | -4500 | 29,17 | 70,83 |
| Cisteína | 121,2 | 1 | -2950 | 29,17 | 50 |
| Taurina | 125,2 | 1,2 | -4500 | 30,58 | 91,67 |
| O-Acetilserina | 147,1 | 1,1 | -2200 | 30,58 | 70,83 |
| 3-Sulfinoalanina | 153,2 | 1,1 | -4000 | 30,58 | 70,83 |
| S-Sulfocisteína | 201,1 | 1,5 | -3550 | 40 | 106,2 |
| Cistina | 240,3 | 8,7 | -3700 | 43,33 | 120,83 |
| γ -Glutamilcisteína | 250,3 | 2 | -3250 | 40,5 | 133,33 |
| Glutación reducido | 307,3 | 2 | -2250 | 15 | 104,17 |
| Glutación reducido* | 310,3 | 2 | -2250 | 15 | 104,17 |
| Glutación oxidado | 612,6 | 4,4 | -3000 | 15 | 179,17 |

* Marcado isotópicamente.

Como se comentó anteriormente, el relleno de la columna utilizada es una matriz hidrófoba C18 y según la polaridad de los analitos, quedarán más o menos retenidos en la columna, e irán eluyendo poco a poco con el paso de la fase móvil. De esta forma, los compuestos más polares eluyen antes y por tanto tendrán un tiempo de retención más bajo. Algunos de los analitos co-eluyen en el mismo tiempo de retención, pero este problema es resuelto gracias a que es posible la extracción del cromatograma de un ión específico conociendo la relación m/z del compuesto que queremos analizar.

Además se puede analizar el patrón de fragmentación de cada compuesto mediante determinación MS/MS, ya que existe la posibilidad de seleccionar una única masa y aislarla mediante la aplicación de un valor de radiofrecuencia adecuado en la trampa iónica. Mediante nuevos voltajes se aumenta la amplitud de oscilación del ión y se fragmenta el analito. De esta forma se detectan los fragmentos, obteniéndose así espectros MS^2 . Utilizando el mismo procedimiento, se puede determinar también los espectros MS^3 . Como ejemplo se expone el caso del GSH, al que se le ha determinado los espectros de masas MS , MS^2 y MS^3 (Figura 63).

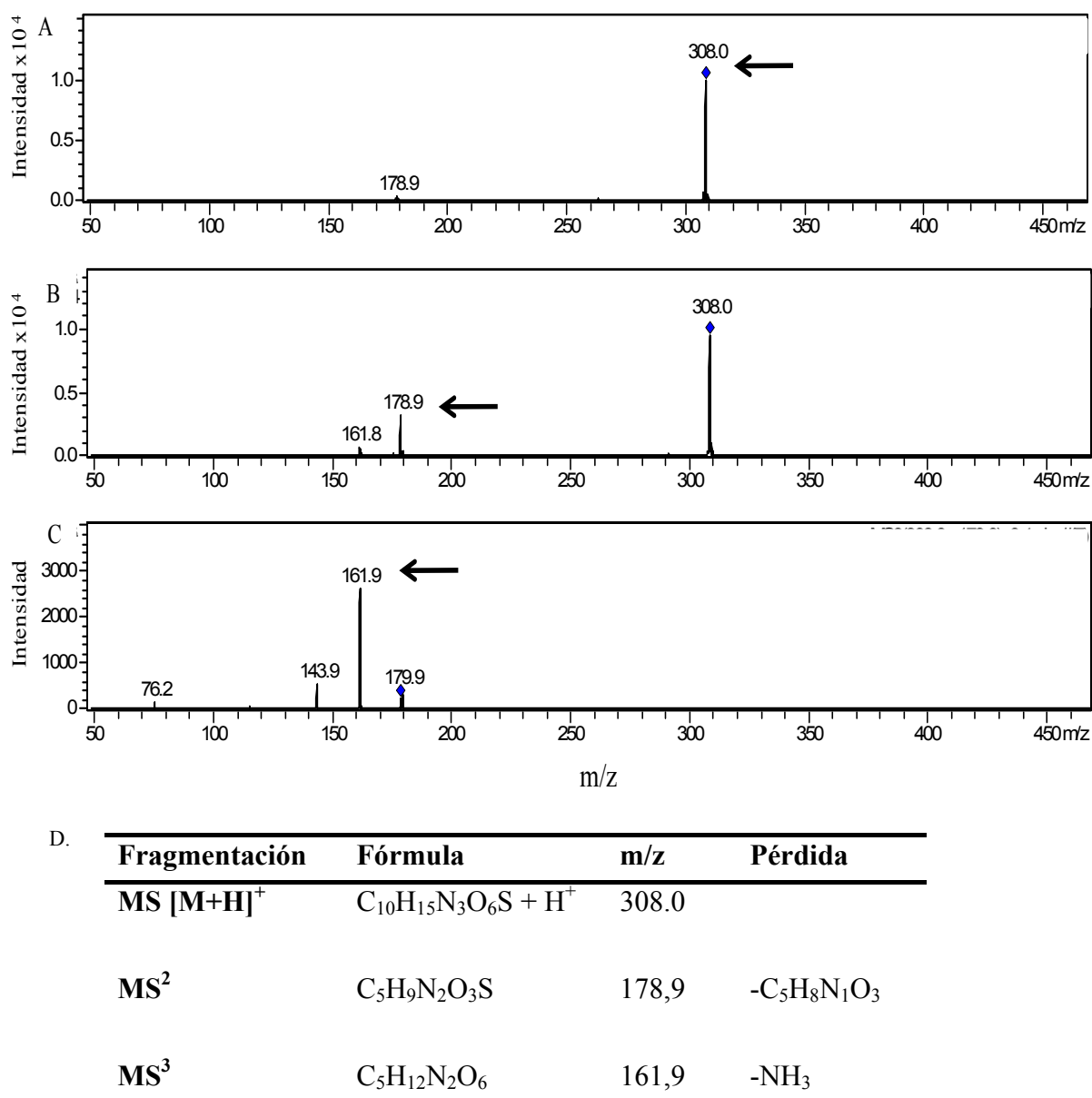


Figura 63. Patrón de fragmentación de la molécula de glutatión reducido.

- A. Espectros de masas MS del ion [M+H]⁺ aislado en la trampa iónica.
 B. Patrón de fragmentación MS² del ion parental m/z 308,0.
 C. Patrón de fragmentación MS³ del ion parental m/z 178,9.
 Las flechas indican el ion fragmentado.
 D. Detalles de la ionización y fragmentación de GSH e identificación de los iones detectados.

Una vez identificados los parámetros de cada metabolito, se procedió a realizar la cuantificación de cada uno de ellos a diferentes concentraciones conocidas, permitiendo de este modo efectuar el cálculo de los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) (Tabla 32).

Tabla 32. Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) de los compuestos azufrados analizados.

| Compuesto | LOD (μM) | LOQ (μM) |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Cisteamina | 46,61 | 155,36 |
| Serina | 62,57 | 208,59 |
| Hipotaurina | 60,58 | 201,93 |
| β -Cianoalania | 48,03 | 160,12 |
| Cisteína | 14,71 | 49,052 |
| Taurina | 74,49 | 248,30 |
| O-Acetilserina | 3,747 | 12,492 |
| 3-Sulfinoalanina | 46,61 | 155,36 |
| S-sulfocisteína | 12,32 | 41,093 |
| Cistina | 35,12 | 117,09 |
| γ -glutamilcisteína | 38,01 | 126,66 |
| Glutación reducido | 0,358 | 1,193 |
| Glutación reducido* | 0,388 | 1,202 |
| Glutación oxidado | 31,51 | 105,04 |

Otros compuestos interesantes presentes en plantas y relacionados con el metabolismo de la cisteína son las fitoquelatinas, que poseen un papel importante en la detoxificación de los metales. La estructura general de las fitoquelatinas es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, representándose así como PC_n , siendo $n = 2-11$. Además, se ha descrito que en algunas plantas la glicina del C-terminal puede ser reemplazada por serina, glutamina, glutamato o alanina, formándose así moléculas derivadas llamadas iso-fitoquelatinas (iso-PCs) (Ducruix *et al.*, 2008). La detección de las PCs se realizó mediante el aislamiento de los iones de relación masa/carga de cada PC, según el método descrito por Ducruix.

Para poder observar la inducción de la síntesis de fitoquelatinas, las plantas silvestres crecidas en tierra fueron regadas con cadmio a una concentración de $250 \mu\text{M}$ durante 13 días. Se tomaron muestras a distintos días durante el tratamiento (0, 3, 6, 10, 13 días). Como se puede observar en la Tabla 33, a tiempos cortos de exposición al metal las fitoquelatinas que se detectan son PC_2 , PC_3 y DesGluPC_3 . Tras el tratamiento de 13 días con cadmio, se puede observar un incremento en la detección del número de fitoquelatinas. Cuando la planta no está expuesta a un estrés por metal, no hay inducción de PC, encontrándose sólo PC_2 e Iso-PC_4 . Estos niveles basales de PC_2 e Iso-PC_4 .

PC₄ encontrados en ausencia de Cd podrían ser consecuencia de la presencia de concentraciones traza de otros metales, tales como Zn y Cu, en el medio de riego.

Tabla 33. Detección de fitoquelatinas durante varios días de tratamiento con CdCl₂.

DesGluPC₃: Cys- γ -(Glu-Cys)₃-Gly; DesGluPC₄: Cys- γ -(Glu-Cys)₄-Gly; t_R: Tiempo de retención; ctas: cuentas; nd: no detectado. Se representan los valores medios \pm SD de tres experimentos independientes.

| Compuesto | m/z | t _R | Área (x10 ⁶ ctas) | | | | |
|---------------|------|----------------|-------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | | | Periodo de tratamiento (días) | | | | |
| | | | 0d | 3d | 6d | 10d | 13d |
| PC2 | 540 | 16,6 | 1,9 \pm 0,1 | 76,9 \pm 8,6 | 89,5 \pm 7,6 | 100,0 \pm 9,3 | 65,0 \pm 8,9 |
| PC3 | 772 | 20,8 | nd | 12,5 \pm 0,2 | 7,20 \pm 0,5 | 7,8 \pm 0,8 | 7,0 \pm 0,9 |
| PC4 | 1004 | - | nd | nd | nd | nd | nd |
| PC5 | 1236 | - | nd | nd | nd | nd | nd |
| Iso-PC2 (Ala) | 554 | 29,0 | nd | nd | nd | nd | 0,30 \pm 0,02 |
| Iso-PC3 (Ala) | 786 | - | nd | nd | nd | nd | nd |
| Iso-PC4 (Ala) | 1018 | - | nd | nd | nd | nd | nd |
| Iso-PC3 (Ser) | 802 | 30,5 | nd | nd | nd | nd | 4,2 \pm 0,5 |
| Iso-PC4 (Ser) | 1034 | - | nd | nd | nd | nd | nd |
| Iso-PC3 (Gln) | 843 | 26,1 | nd | 1,2 \pm 0,2 | nd | nd | 13,0 \pm 0,2 |
| Iso-PC4 (Gln) | 1075 | 28,0 | 10,0 \pm 2,1 | 8,2 \pm 1,2 | 7,6 \pm 0,8 | 6,4 \pm 0,8 | 8,0 \pm 0,7 |
| Iso-PC3 (Glu) | 844 | 26,1 | nd | nd | nd | nd | 5,5 \pm 0,6 |
| DesGluPC3 | 643 | 17,9 | nd | 1,2 \pm 0,1 | 1,2 \pm 0,2 | 2,0 \pm 0,3 | 4,4 \pm 0,6 |
| DesGluPC4 | 875 | - | nd | nd | nd | nd | nd |

5.3.2. Otros metabolitos de interés

Además del análisis de metabolitos azufrados, se puso a punto el análisis de otros metabolitos que fueron interesantes de estudiar en los diferentes genotipos.

5.3.2.1. Análisis de aminoácidos

La determinación de la concentración de aminoácidos se llevó a cabo utilizando la extracción acuosa ácida y detección en modo de ionización positiva con la columna de fase reversa. Para realizar este estudio, se procedió de la misma manera que en el apartado anterior, realizándose primero infusión directa de soluciones patrones de aminoácidos, y después determinando los parámetros, tales como el tiempo de retención, relación masa/carga, LOD y LOQ (Tabla 34).

Tabla 34. Aminoácidos detectados e identificados mediante LC/MS.

Se muestra el tiempo de retención, relación masa/carga, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) de los aminoácidos analizados.

| Aminoácido | m/z | Tiempo de retención (min) | LOD(μ M) | LOQ(μ M) |
|------------|-----|---------------------------|---------------|---------------|
| ALA | 90 | 1,5 | 76,0 | 255,0 |
| ARG | 175 | 5,5 | 1,6 | 5,6 |
| ASN | 134 | 1,2 | 28,0 | 92,0 |
| CYS | 122 | 1,2 | 35,0 | 117,0 |
| CYSS | 241 | 1,3 | 2,6 | 8,5 |
| GLN | 147 | 3,2 | 6,9 | 23,0 |
| GLU | 148 | 1,3 | 6,5 | 22,0 |
| GLY | 76 | 1,3 | nd | nd |
| HPRO | 132 | 1,3 | 7,8 | 27,0 |
| HYS | 156 | 4,6 | 2,7 | 9,0 |
| ILE | 132 | 3,7 | 9,1 | 30,4 |
| LEU | 132 | 4,0 | 9,1 | 30,4 |
| LYS | 147 | 5,1 | 3,0 | 10,0 |
| MET | 150 | 2,3 | 1,8 | 6,2 |
| PHE | 166 | 4,4 | 4,3 | 14,3 |
| PRO | 116 | 1,3 | 6,5 | 21,8 |
| SER | 106 | 1,2 | 63,0 | 209,0 |
| THR | 120 | 1,4 | 71,0 | 237,0 |
| TYR | 182 | 2,5 | 2,3 | 7,7 |
| VAL | 118 | 2,2 | 6,8 | 22,8 |

Además se creó una colección de cromatogramas y espectros de masas de cada aminoácido (Figura 64). El método empleado no requiere de una derivatización previa de los compuestos, lo cual lo hace muy interesante en cuanto a la reducción del tiempo de preparación de la muestra y la eliminación del uso de compuestos derivatizantes, así como una ganancia en la rapidez del tiempo de análisis, siendo éste de 7 minutos para el análisis total de LC/MS.

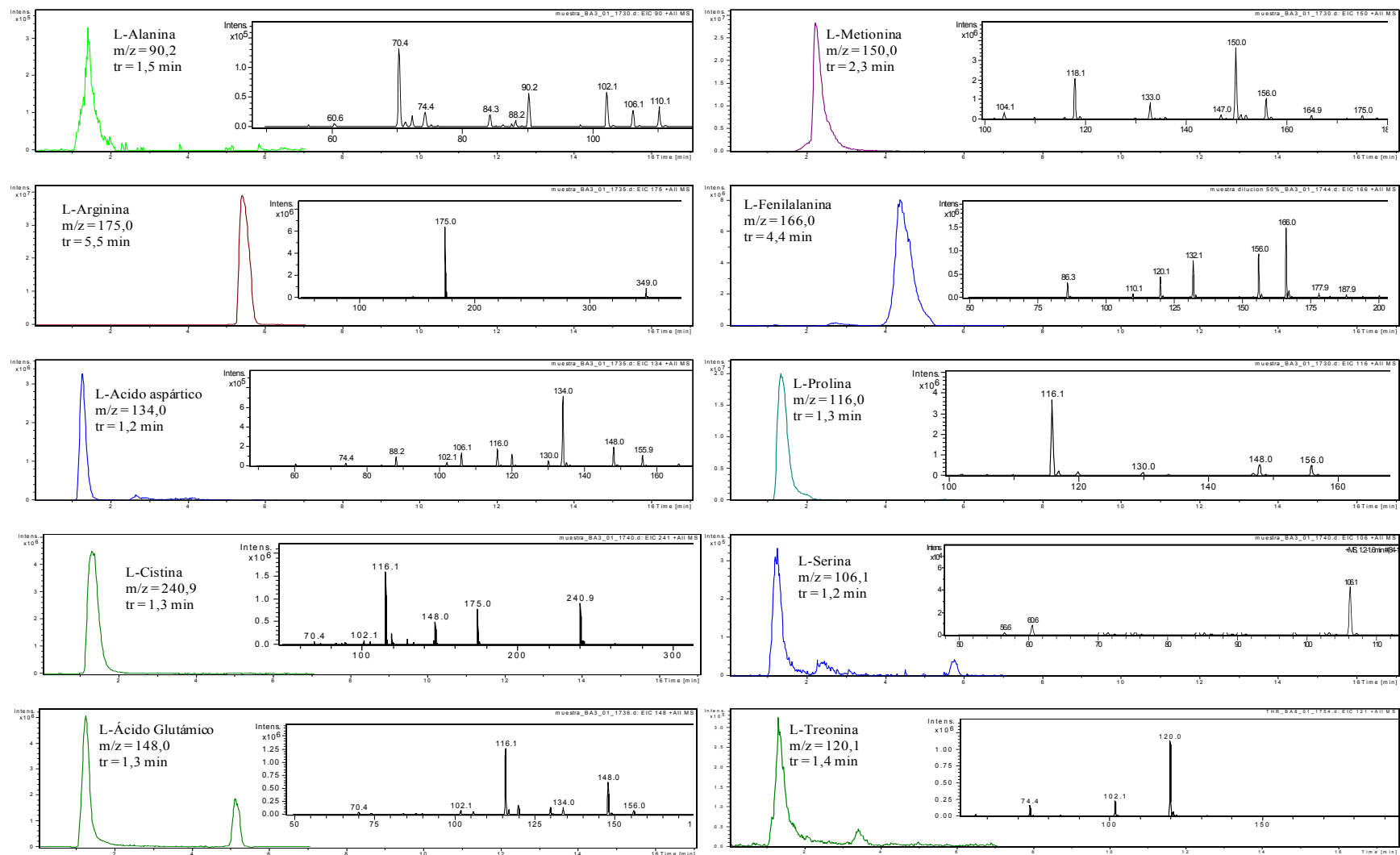


Figura 64. Cromatograma de LC/MS de cada aminoácido en modo positivo.

Se detalla el tiempo de retención, la relación m/z y el espectro de masas de cada uno de ellos.

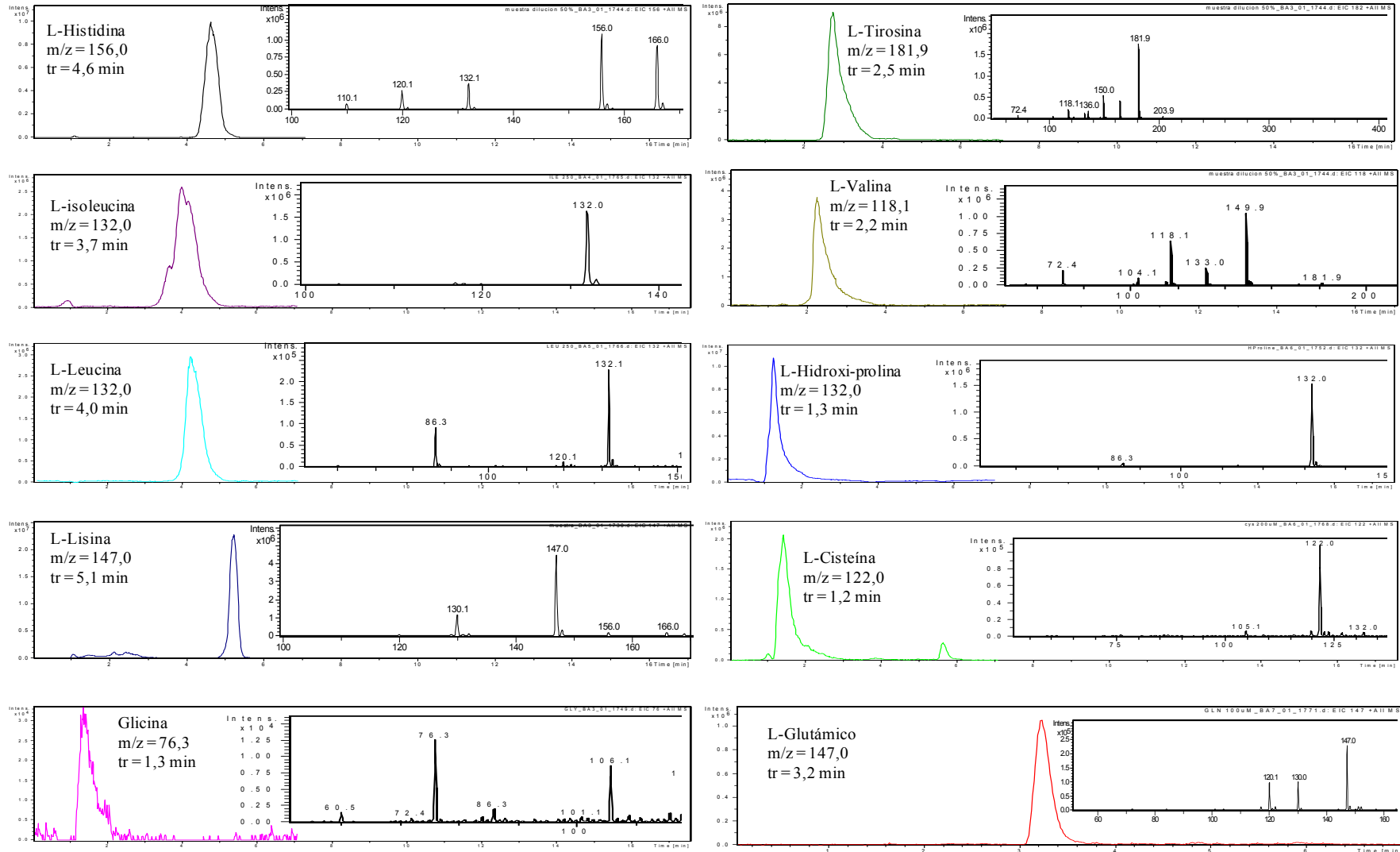


Figura 64. Cromatograma de LC/MS de cada aminoácido en modo positivo. (Continuación)

5.3.2.2. Análisis de fitohormonas

Las hormonas analizadas mediante LC/MS fueron el ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), metil jasmónico (MeJA), ácido jasmónico (JA) y el precursor OPDA (ácido 12-oxofitodienoico).

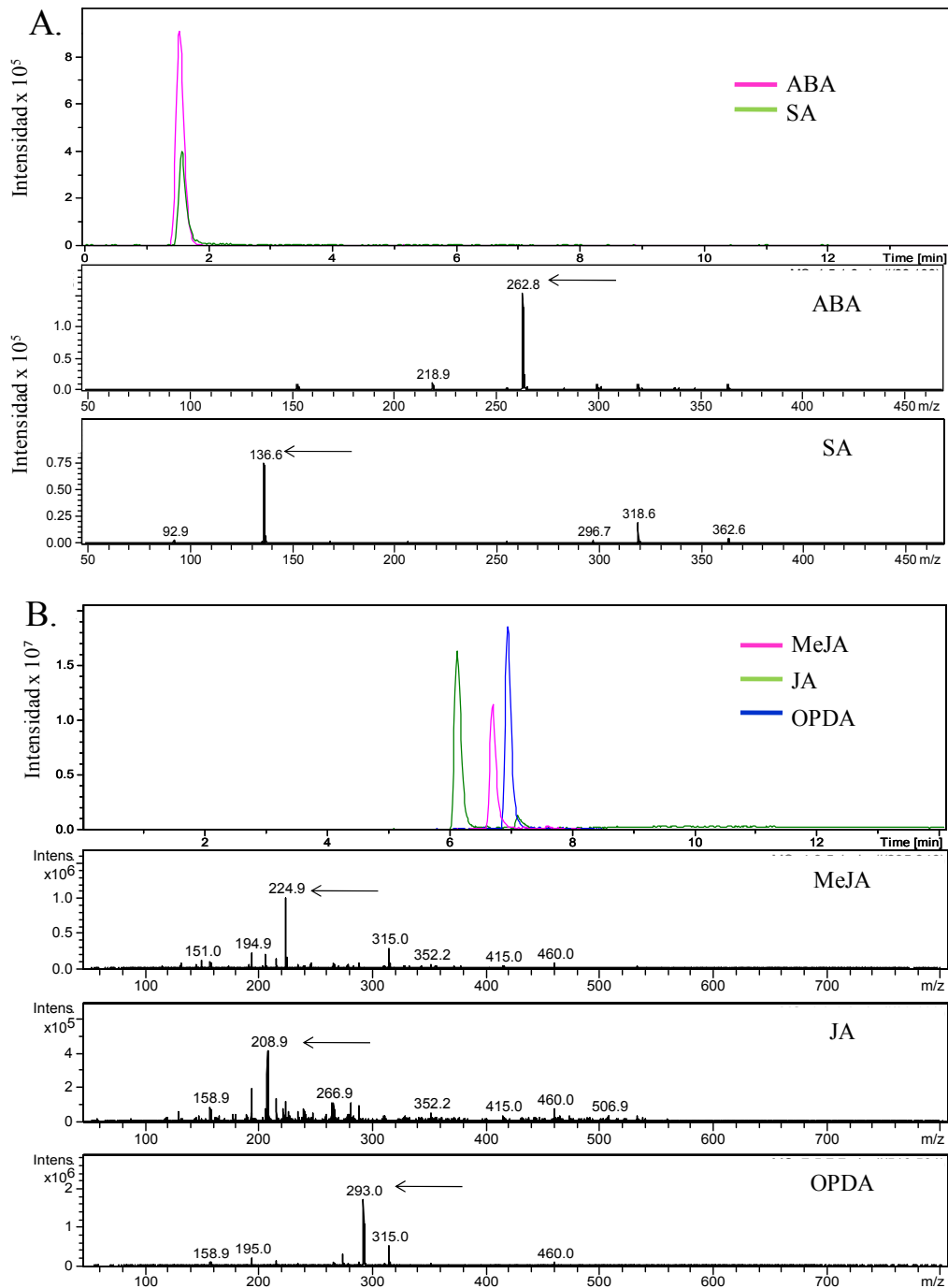


Figura 65. Cromatogramas de LC/MS de distintas hormonas.

A. Cromatogramas del ácido salicílico (verde) y ácido abscísico (rosa), y sus correspondientes espectros de masas.

B. Cromatogramas del metil jasmónico (rosa), ácido jasmónico (verde) y OPDA (azul), y sus correspondientes espectros de masas.

Un análisis previo de las soluciones estándares mediante infusión directa reveló que SA y ABA son detectados de forma más eficiente en cuanto a la intensidad de señal en modo negativo, mientras que JA, MeJA y OPDA lo fueron en modo positivo. En la figura 65 se pueden observar los cromatogramas de elución y espectros de masas obtenidos para las soluciones patrones. En la Tabla 35 se detallan los parámetros característicos para cada compuesto.

Tabla 35. Hormonas detectadas e identificadas mediante LC/MS.

Se detallan el peso molecular, tiempo de retención, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) de las hormonas analizadas.

| Hormona | MW | Tiempo de retención (min) | LOD (μM) | LOQ (μM) |
|---------|-------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
| ABA | 264,3 | 1,8 | 0,78 | 2,58 |
| SA | 138,1 | 1,8 | 0,77 | 2,59 |
| JA | 210,3 | 6,1 | 1,76 | 9,37 |
| MeJA | 224,3 | 6,8 | 2,08 | 14,21 |
| OPDA | 291,2 | 7,0 | 1,47 | 7,80 |

5.4. Determinación de metabolitos específicos en las líneas silvestre y mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Una vez puestos a punto los métodos de extracción y determinación de los distintos metabolitos estudiados, se procedió a la cuantificación y comparación de los mismos en muestras de hojas de las líneas silvestres y mutantes *cs26* y *oas-b* de *Arabidopsis*.

Se analizaron los compuestos azufrados que presentaron mayor interés en este estudio por estar directamente relacionados con el metabolismo de la cisteína, y que fueron glutatión reducido y oxidado (GSH y GSSG), γ -glutamilcisteína (γ -EC) y cisteína (ver Tablas 14 y 15).

La detección de los aminoácidos en las tres líneas mutantes se llevó a cabo en extractos de hojas, y utilizando plantas crecidas en ambos fotoperiodos (Figuras 66 y 67). En ciclo largo, en el mutante *cs26* se observó un aumento significativo en el contenido total de los aminoácidos L-asparagina, L-glutámico, L-treonina, L-histidina, L-fenilalanina y L-prolina con respecto a la línea silvestre. En el mutante *oas-b* solo se observó cambios significativos en el contenido de L-histidina y L-fenilalanina. No se detectaron en estos extractos L-cisteína, L-glutamato, L-glicina, L-isoleucina y L-lisina.

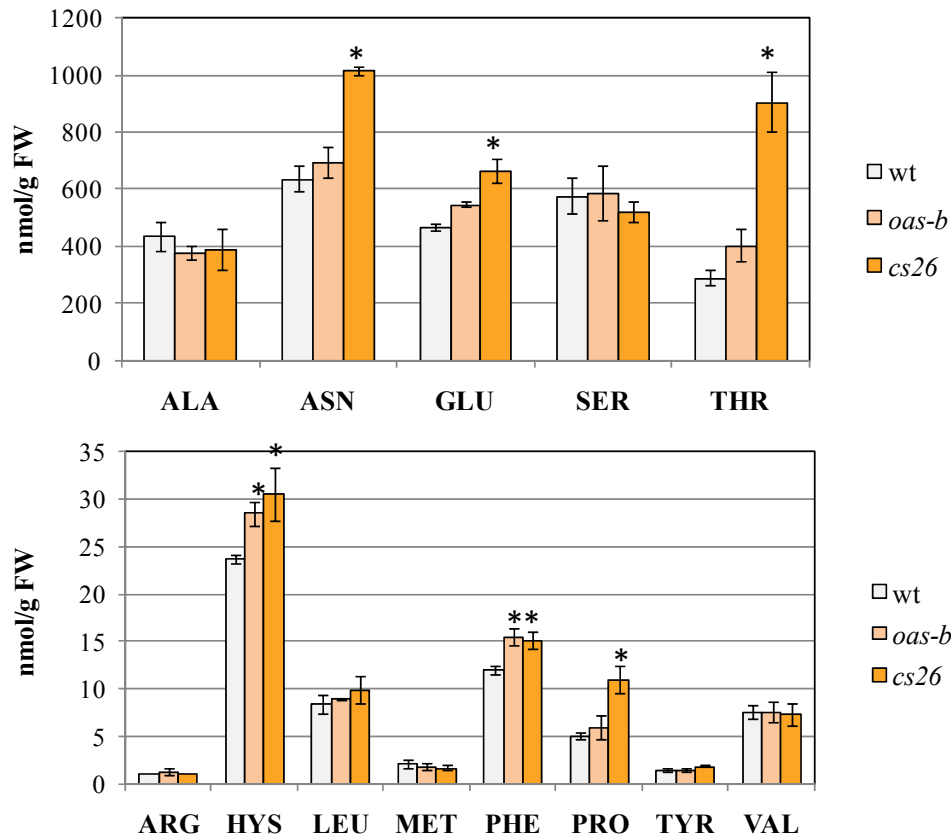


Figura 66. Contenido total de aminoácidos solubles en hojas de plantas crecidas en condiciones de día largo.

Se muestran los valores medios \pm SD de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican una significancia estadística de $*P < 0,05$.

En el caso de las plantas crecidas en ciclo corto (Figura 67), se observó que el mutante *cs26* presentaba un aumento significativo en los niveles de L-asparagina, L-treonina, L-histidina y L-valina, y un menor nivel de L-prolina cuando se comparaba con la línea silvestre. En el caso del mutante *oas-b*, el metabolismo de los aminoácidos se vió más afectado en ciclo corto, ya que se observó mayores niveles de L-asparagina, L-glutámico, L-serina, L-histidina y L-fenilalanina, mientras que se registró menores contenidos de L-alanina, L-prolina y L-valina en comparación con la línea silvestre. No se detectaron L-cisteína, L-gultamato, L-glicina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina y L-tirosina en estos extractos.

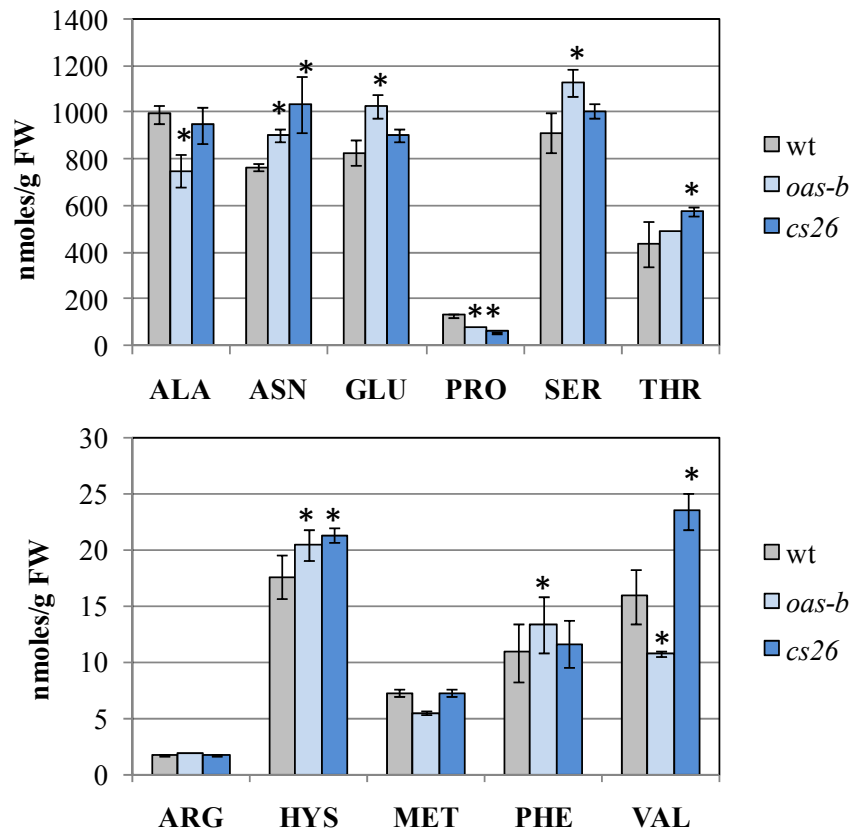


Figura 67. Contenido total de aminoácidos solubles en hojas de plantas crecidas en condiciones de día corto.

Se muestran los valores medios \pm SD de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican una significancia estadística de $*P < 0,05$.

La detección de ácido salicílico y ácido abscísico se llevó a cabo en hojas en ambos fotoperiodos. Sin embargo, la detección de JA, MeJA y OPDA no se ha podido realizar satisfactoriamente, debido a la falta de un método de extracción adecuado que nos permitiese obtener estos analitos sin que lleguen a sufrir degradación durante el tratamiento.

Se pudo observar que en ambos mutantes la concentración de ácido salicílico en ciclo largo es aproximadamente un 60 % superior al determinado en las plantas silvestres (Figura 68A). Sin embargo, en ciclo corto, el mutante *oas-b* no muestra diferencias con respecto a la línea silvestre y el mutante *cs26* muestra una disminución del 30 % en el contenido de ácido salicílico (Figura 68B). El análisis de ácido abscísico en ciclo largo mostró que en el mutante *cs26* la concentración de ABA es 2,3 veces superior con respecto a la línea silvestre, no existiendo cambios significativos en la línea *oas-b* (Figura 68C). En ciclo corto, en *cs26* se observó un ligero descenso de la

concentración (aproximadamente un 10 %), y en *oas-b* un aumento de 1,75 veces con respecto a silvestre (Figura 68D).

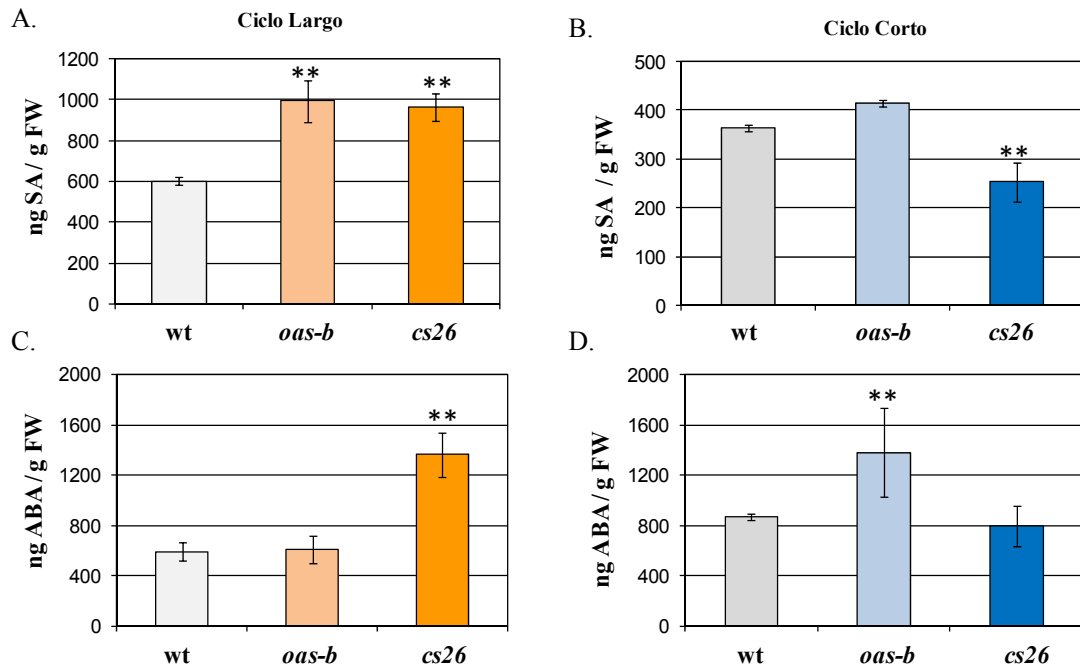


Figura 68. Contenido de ácido salicílico (A y B) y ácido abscísico (C y D) en extracto crudo de hojas de plantas crecidas en condiciones de ciclo largo y ciclo corto.

Se muestran los valores medios \pm SD de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican una significancia estadística de $*P < 0,01$.

V. DISCUSIÓN

En el año 2000 se publicó el análisis de la secuencia genómica de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Nature 408: 796-815). Uno de los aspectos destacados en dicho análisis es que una gran proporción del genoma de esta planta codifica enzimas implicadas en un conjunto de procesos metabólicos muy parecidos a los encontrados en otros organismos fotoautotróficos como la cianobacteria *Synechocystis*. Sin embargo, mientras que por lo general en *Synechocystis* una enzima está codificada por un único gen, en *Arabidopsis* está codificada por varios genes. Éste era el caso de la enzima piruvato quinasa (codificada por 7 genes), de la celulosa sintasa (codificada por 12 genes), poligalacturonasas (codificada por 52 genes) o citocromos P450 (codificada por aproximadamente 286 genes), por citar algunos ejemplos. Este alto grado de una aparente redundancia estructural no tiene por qué necesariamente implicar redundancia funcional de dichas enzimas.

En el caso de la ruta de biosíntesis del aminoácido cisteína, el análisis del genoma muestra que existen 9 genes homólogos que codifican posibles enzimas O-acetilserina(tiol)liasas, de los cuales uno es un pseudogén que no se transcribe (Jost *et al.*, 2000). Mediante aproximaciones de genética funcional, varios grupos hemos avanzado en el estudio de las isoformas mayoritarias de las enzimas O-acetilserina(tiol)liasas y serina acetiltransferasas de localización citosólica, cloroplástica y mitocondrial. Estos estudios dejan un escenario en el cual, en condiciones controladas de crecimiento, las isoformas OASTL mayoritarias en el citosol (OAS-A1), en el cloroplasto (OAS-B) y en la mitocondria (OAS-C) son enzimas redundantes ya que su mutación no repercute en un cambio fenotípico acusado, probablemente porque los sustratos sulfuro, O-acetilserina y el producto cisteína son intercambiables entre el citosol y los otros orgánulos. Sin embargo, el análisis metabólico de los diferentes mutantes indica que cada uno de estos compartimentos contribuye de forma diferente a la síntesis global del aminoácido cisteína. Así, la síntesis del precursor OAS tiene lugar preferentemente en la mitocondria, el cloroplasto contribuye con la síntesis de sulfuro, y finalmente, en el citosol tiene lugar la síntesis de cisteína de manera preferente (Heeg *et al.*, 2008; López-Martín *et al.*, 2008a; Watanabe *et al.*, 2008a; Watanabe *et al.*, 2008b; Krueger *et al.*, 2009).

Si la cisteína se puede mover o difundir entre los compartimentos celulares, tal y como los datos experimentales sugieren, es interesante preguntarse por qué existen tantas isoformas con la misma actividad enzimática en las células de plantas. Los estudios realizados hasta el inicio de esta tesis habían dejado sin caracterizar cuatro de las isoformas OASTL, consideradas minoritarias en base a la abundancia de sus correspondientes transcritos: CS26, ATCYS-D1, ATCYS-D2 y DES-1.

CS26 de *A. thaliana* es una S-Sulfocisteína sintasa

Es ampliamente conocido en las bacterias *E. coli* y *S. typhimurium* que la biosíntesis de cisteína tiene lugar por la acción de dos enzimas, la isoenzima A (codificada por el gen *cysK*), y la isoenzima B (codificada por el gen *cysM*). Esta última también es capaz de incorporar tiosulfato para producir S-sulfocisteína (Hulanicka *et al.*, 1979; Nakamura *et al.*, 1984; Hulanicka *et al.*, 1986). Además de en *E. coli* y *S. typhimurium*, la síntesis de S-sulfocisteína ha sido también estudiada en muchas cepas de bacterias fotosintéticas púrpuras, tales como *Rhodospirillum tenue*, *Rhodospseudomonas gelatinosa*, *Chromatium vinosum*, y *Thiocapsa pfennigii*, entre otras (Hensel y Truper, 1976). Sin embargo, esta actividad no había sido estudiada previamente en plantas o microorganismos eucarióticos. La única excepción en la bibliografía la encontramos en el producto *cysM* de *Trichomonas vaginalis*, un protozoo anaeróbico que es parásito de los humanos. Esta enzima es capaz de usar sulfuro o tiosulfato como sustrato para producir cisteína o S-sulfocisteína (Westrop, 2006).

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas OAS-A1, OAS-B y CS26 claramente permite identificar que CS26 es una proteína de localización cloroplástica, y su comparación con las enzimas bacterianas indica que es más homóloga a las isoformas bacterianas codificadas por los genes *cysM* por presentar una deleción de varios aminoácidos entre los dominios β 8A y β 9A. Los trabajos realizados en esta tesis demuestran claramente que la isoforma OASTL cloroplástica minoritaria codificada por el gen CS26 de *Arabidopsis* es en realidad una enzima con actividad S-Sulfocisteína sintasa. Esta conclusión se basa en el hecho de que la proteína recombinante no posee actividad OASTL pero cataliza la formación de S-sulfocisteína, metabolito que ha sido identificado mediante espectrometría de masas. La actividad SSCS observada en la proteína recombinante no es debida a la deleción del péptido señal en el extremo N-terminal, ni a la adición de la cola de histidinas, porque en los mutantes nulos de este gen se pierde esta actividad SSCS cuando se compara con la obtenida en la línea silvestre. Por tanto, la actividad enzimática SSCS de la proteína CS26 no es un artefacto de la proteína recombinante. Además, la comparación del análisis bioquímico de las líneas *oas-b* y *cs26* demostró que la mutación CS26 no tuvo influencia en los niveles de actividad OASTL, mientras que en el mutante *oas-b* se observó significativamente menos actividad OASTL, similar a los valores publicados previamente por otros autores (Watanabe *et al.*, 2008a).

Esta actividad SSCS detectada en cloroplastos de *Arabidopsis* no es exclusiva de esta especie y hemos sido capaces de detectar actividad SSCS en otras plantas como en *Brachypodium distachyon* o *Ricinus comunis*, que poseen en ambos casos genes que

codifican ortólogos OASTL que presentan variaciones de aminoácidos entre los dominios β 8A y β 9A. Estas alteraciones en el sitio activo de la isoenzima B bacteriana cuando se compara con la isoforma A parecen ser determinantes de las características cinéticas de la enzima, siendo más polar y flexible en el caso de la isoenzima B. Estas características estarían de acuerdo con una especificidad por sustrato más amplia, pudiendo aceptar como sustrato nucleófilo tanto sulfuro como tiosulfato (Claus et al., 2005; Chattopadhyay et al., 2007). Esta flexibilidad del dominio activo de las isoformas B también se extiende al otro sustrato de la reacción; así, en el caso de *M. tuberculosis* y *T. vaginalis* la proteína puede utilizar O-fosfoserina como sustrato en lugar de O-acetilserina, mostrando por tanto actividad O-fosfoserina sulfhidrilasa (Westrop et al., 2006; Agren et al., 2008). CS26 también tiene capacidad de utilizar O-fosfoserina como sustrato de reacción aunque con menor especificidad que O-acetilserina. Esta versatilidad en aceptar una mayor variedad de sustratos por la isoenzima B ha sido utilizada para la producción de aminoácidos no naturales con fines agronómicos y farmacéuticos como es el caso de la S-fenil-L-cisteína, inhibidor de la proteasa del VIH (Claus et al., 2005).

La presencia de actividad SSCS en cloroplastos puede ser una reminiscencia de su origen endosimbionte y, por tanto, los cloroplastos de planta han mantenido las dos isoformas A y B existentes en bacterias, OAS-B y CS26, respectivamente. Sin embargo, no hemos sido capaces de detectar actividad SSCS en *Synechocystis sp* o en *Chlamydomonas reinhardtii*.

Localización subcelular de la proteína CS26

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína CS26 no sólo predice que esta proteína es cloroplástica sino que, además, la extensión de su péptido tránsito es compatible con una localización de la proteína en el lumen tilacoidal. Las proteínas codificadas en el genoma nuclear destinadas al lumen tilacoidal son sintetizadas en el citosol con un péptido tránsito N-terminal bipartito que lleva dos señales de transporte en tándem. El dominio amino proximal media el transporte de la proteína precursora al interior del cloroplasto a través del traslocón Toc/Tic donde es cortado por una peptidasa, dejando expuesto la segunda señal de transporte que media el paso a través de la membrana tilacoidal (Robinson et al., 2001; Gutensohn et al., 2006; Aldridge et al., 2009). Los péptidos de señalización al lumen tienen estructuras similares a las secuencias procarióticas que utilizan los sistemas Sec y Tat. Para ambos sistemas de transporte, los péptidos transítos se caracterizan por tener una región básica N-terminal, un núcleo central hidrofóbico y un dominio C-terminal polar que termina en un sitio de procesamiento Ala-X-Ala. Las proteínas que se transportan por el sistema Tat contienen

un par de residuos argininas (RR) en la región N-terminal del péptido señal (Gutensohn et al., 2006; Aldridge et al., 2009). La extensión del péptido tránsito de CS26 para localización al lumen es compatible con esta estructura con un dominio N-terminal con 6 residuos de Lys y una Arg, un dominio hidrofóbico central con seis residuos de prolina y un dominio C-terminal polar con varios residuos de aspártico. Aunque el péptido de señalización al lumen de CS26 no contiene el sitio de reconocimiento Ala-X-Ala del sistema Sec o la pareja de residuos RR conservados para el sistema de transporte Tat, sí posee la modificación KR descrita en algunas proteínas que utilizan el sistema Tat (Peltier et al., 2002).

Los análisis proteómicos y los datos publicados hasta el 2008 no habían permitido identificar de forma experimental la presencia de la proteína CS26 en ningún proteoma. La mejora en la sensibilidad de las técnicas de espectrometría de masas ha permitido identificar un único péptido de la proteína CS26 en fracciones cloroplásticas, sugiriendo que esta proteína debe ser muy poco abundante (Zybaïlov et al., 2008). Nuestro análisis de actividad SSCS y de localización mediante Western-Blot de una preparación de cloroplastos enriquecidos de las líneas silvestre y mutante corroboró la idea de la localización subcelular cloroplástica de CS26, mostrando la presencia de la enzima tanto en el estroma como en el lumen, siendo más abundante en este último compartimento (Figura 69). La actividad de la proteína se observó casi exclusivamente en el lumen tilacoidal, existiendo una actividad residual en la fracción estromática que puede ser debido a contaminación de restos tilacoidales/luminales. Sin embargo, no podemos descartar que la enzima pre-procesada sea parcialmente activa en el estroma.

Como ya se ha indicado, en este estudio se ha puesto de manifiesto la existencia de proteínas ortólogas a CS26 en otros organismos, que muestra la delección de aminoácidos antes mencionada, así como actividad SSCS en preparaciones enriquecidas de cloroplastos. El análisis mediante el programa ChlorP en *Brachypodium distachyon* y *Ricinus communis* donde se observa actividad SSCS predice una longitud de péptido tránsito al lumen cloroplástico adecuada en ambas proteínas.

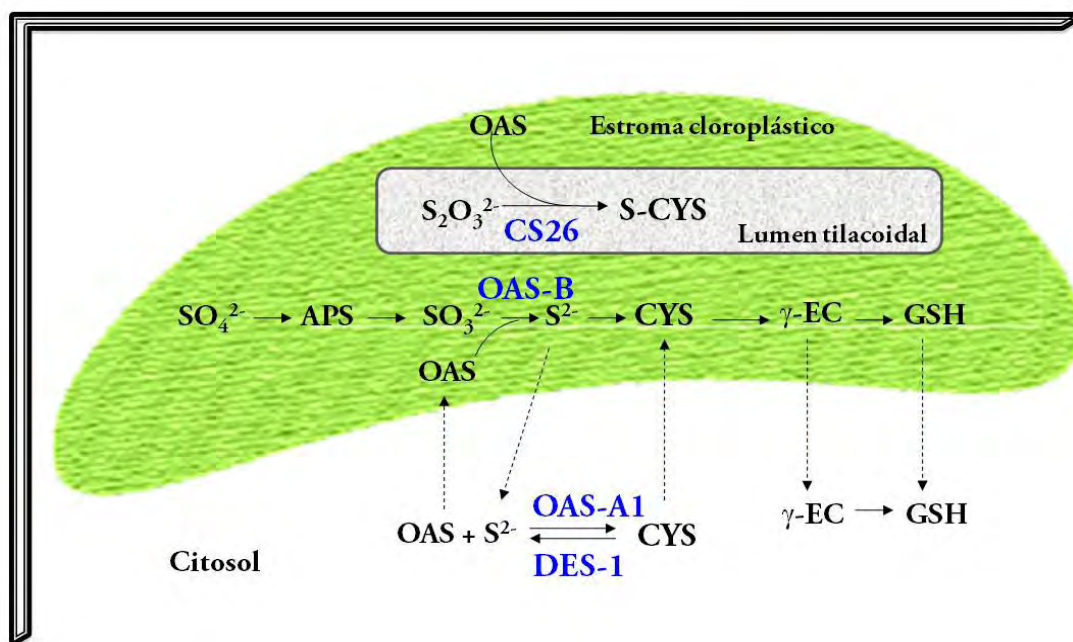


Figura 69. Localización subcelular de las enzimas responsables de la biosíntesis de cisteína y S-sulfocisteína en el cloroplasto y citosol de *Arabidopsis*.

Se muestra de forma representativa un único grana tilacoide como un compartimento ovalado de color gris. Las enzimas implicadas en las rutas se muestran en azul. S-CYS: S-sulfocisteína, CYS: Cisteína, GSH: Glutati6n, OAS: O-acetilserina, γ -EC: γ -glutamilcisteína. Las flechas discontinuas indican transporte de los metabolitos.

El an6lisis comparado de los perfiles de prote6nas realizados mediante electroforesis bidimensional en fracciones de lumen cloropl6stico de las l6neas silvestres y mutantes nos ha permitido identificar varias manchas de prote6nas que estaban presentes en la l6nea silvestre y no en la l6nea mutante *cs26*. Sin embargo, ninguna de estas manchas correspond6a con la prote6na CS26 cuya detecci6n ha estado probablemente limitada por su baja abundancia y la baja sensibilidad del equipo MALDI-TOF utilizado. A pesar de ello, el an6lisis comparativo de dichos perfiles de prote6na pone de manifiesto importantes cambios en la composici6n del lumen en el mutante *cs26* respecto a la l6nea silvestre. Por ejemplo, las subunidades α y β del complejo C1 de la ATP sintasa tilacoide est6n ausentes en el mutante *cs26*. Este defecto tambi6n se observa en el mutante *flu*, el cual presenta una elevada acumulaci6n de especies reactivas de ox6geno en el cloroplasto, al igual que *cs26*, y tiene un importante impacto en la actividad ATP sintasa (Mahler et al., 2007). Igualmente, *cs26* posee unos niveles muy bajos o casi nulos de la prote6na HCF136, la cual es esencial para el correcto ensamblaje del PSII (Meurer et al., 1998). Dos prote6nas, TLP38 y una tipo-FKBP, con actividad peptidil-propilcic-tras isomerasa est6n reprimidas en el

mutante *cs26* y por tanto el correcto plegamiento de proteínas del lumen o del tilacoide puede estar alterado.

El mutante *cs26* presenta un fenotipo dependiente del régimen lumínico

La pérdida de función de la proteína CS26 produce cambios dramáticos en el fenotipo de la planta, así como una acumulación de ROS, existiendo una dependencia del régimen lumínico, intensificándose las diferencias fenotípicas en condiciones de crecimiento de día largo. Aunque otros estudios no han descrito este fenotipo anómalo en el mutante nulo *cs26*, estos autores de forma rutinaria cultivaron las plantas en un medio de germinación con un contenido de sacarosa del 1 % donde este fenotipo no se aprecia (Watanabe et al., 2008a). El fenotipo mostrado por las plantas de la línea mutante *cs26* y el perfil de proteínas observado en el lumen sugieren un posible defecto para realizar la fotosíntesis bajo las condiciones de crecimiento de día largo, hecho que se corrobora con un menor contenido de clorofila y una menor eficacia fotosintética (F_v/F_m) tanto en condiciones de día largo como de día corto, siendo la reducción de aproximadamente un 74 % en ciclo largo, y de un 32 % en ciclo corto, con respecto a la línea silvestre. Además, se confirma un efecto de fotoinhibición cuando se realiza un análisis más detallado de los valores de F_o y F_m . Este hecho se pone de manifiesto por los altos valores obtenidos para F_o en ambas condiciones de crecimiento, que es indicativo de daños en el aparato fotosintético. El tratamiento de las plantas con distintas PPDF indica además que los centros de reacción en el mutante están dañados, ya que la máxima eficiencia operativa del PSII para reducir a Q_A es muy baja incluso en condiciones de luz no saturante; esta idea se corresponde con el elevado valor del parámetro qL en el mutante *cs26*, indicativo de la fracción de los centros de reacción que se encuentran abiertos en el PSII (Q_A oxidada) (Baker, 2008).

De acuerdo con estos datos, la actividad fotosintética del mutante *cs26* está reducida en condiciones de intensidad de luz no saturante, y además parece estar relacionada con el proceso de desarrollo de las hojas, ya que se observa una mayor reducción de la actividad fotosintética en las hojas jóvenes del mutante en condiciones de ciclo corto, así como una menor activación de NPQ cuando las plantas se exponen a PPDF saturada ($800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estos datos son opuestos a la evolución observada de la eficiencia fotosintética con el desarrollo de las hojas, siendo menor a medida que envejecen las hojas (Stessman et al., 2002). Sin embargo, los datos experimentales sí concuerdan con una mayor expresión de *CS26* en estadios jóvenes de la planta y, por tanto, su ausencia se hace más significativa en estadios tempranos de crecimiento donde es más abundante.

El análisis fotosintético mediante medidas de intercambio de gases y fluorescencia apoyan los datos obtenidos mediante *Fluorimager*. Las curvas de CO₂ y luz muestran que las plantas de la línea mutante *cs26* absorben menos cantidad de luz en condiciones de ciclo largo, existiendo un menor número de fotones absorbidos destinados a convertirse en electrones, y de estos electrones, hay una proporción menor que son destinados a la reacción de carboxilación. Por otro lado, el hecho de que *NPQ* no esté especialmente activada en condiciones de luz no saturante en el mutante *cs26* sugiere que este exceso de electrones no destinados a la carboxilación deriva en la formación de especies reactivas de oxígeno. Las tinciones histoquímicas muestran que en efecto el mutante *cs26* crecido en fotoperiodo de día largo acumula altas concentraciones de agua oxigenada y radicales superóxidos. En estudios anteriores se ha puesto de manifiesto el efecto metabólico generado por la acumulación de H₂O₂ en el cloroplasto. Este es el caso de, por ejemplo, transformantes con una disminución de la actividad APX tilacoidal (Tarantino *et al.*, 2005) o los mutantes nulos de la enzima CuZnSOD cloroplástica (Rizhsky *et al.*, 2003), así como la sobreexpresión de la enzima glicolato oxidasa en el cloroplasto (Fahnenstich *et al.*, 2008); en todos ellos se observa acumulación de ROS en el cloroplasto y un fenotipo de crecimiento retardado con respecto a la línea silvestre.

Por otro lado, la tasa de respiración es mayor en el mutante en día largo, así como los valores de conductancia estomática y del mesófilo, indicando una mayor dificultad para el transporte de CO₂ hasta el cloroplasto. De alguna forma, las necesidades de energía (ATP) se disparan en el mutante, a pesar de tener menos sustrato de reacción (menor cantidad de azúcares, debido a que posee menor tasa fotosintética). Además, las plantas mutantes *cs26* pierden la capacidad de regular el cierre estomático en oscuridad en condiciones de ciclo largo, ya que se observa una mayor conductancia estomática. Este hecho podría estar relacionado con fallos en la sensibilidad a la luz (fitocromos) o en la señalización hormonal por ABA que regula la apertura estomática. Curiosamente, en el modelo de interacción génica generado a partir del perfil transcripcional del mutante en condiciones de día largo uno de los nodos principales de interacción corresponde al gen *PHYA*.

El análisis del perfil transcripcional del mutante crecido en día largo muestra una gran cantidad de genes desregulados, inducidos o reprimidos, que puede ser un efecto pleiotrópico como consecuencia de los importantes cambios fenotípicos observados tanto a nivel de desarrollo como a nivel molecular en el mutante *cs26*. El gran número de transcritos que cambian en condiciones de crecimiento de día largo puede deberse a un efecto sinérgico del estrés oxidativo al cual se expone el mutante durante un periodo prolongado de luz junto con el efecto directo de la mutación. Muchos de estos genes están relacionados con respuesta al estrés biótico y este dato se correlaciona con las

observaciones previamente publicadas sobre la interconexión en el cloroplasto entre las vías de señalización de la aclimatación a la luz y la respuesta inmune (Muhlenbock et al., 2008).

En día corto, donde el fenotipo del mutante es casi indistinguible de la línea silvestre tanto a nivel morfológico como en su capacidad fotosintética, sin embargo también muestra cambios significativos en los niveles de los transcritos de numerosos genes nucleares y cloroplásticos. De hecho, entre los genes más fuertemente inducidos en el transcriptoma en día corto se encuentran cinco genes codificados en el genoma cloroplástico como *rbcL* y *accD*. La transcripción de estos genes es claramente dependiente de luz, se inicia durante la diferenciación de los cloroplastos, y sus niveles de transcritos están fuertemente regulados por la estabilidad del mRNA (Shiina et al., 1998). El gen *rbcL* se transcribe con el concurso de una RNA polimerasa codificada en el genoma cloroplástico (PEP) y requiere factores σ codificados en el núcleo que facilitan el reconocimiento al promotor. A su vez, la transcripción de las subunidades de la PEP, RNAs ribosómicos y proteínas ribosomales dependen de una RNA polimerasa nuclear (NEP) que se transporta al cloroplasto. Por tanto, la transcripción de los genes cloroplásticos está regulada por señales nucleares (Sakamoto et al., 2008). Dado que ambas líneas, silvestre y mutante *cs26*, están sometidas al mismo régimen de luz, las diferencias observadas en los niveles de transcritos de *rbcL* y *accD* deben ser debidas a una alteración en la señalización núcleo-cloroplasto y viceversa. También indicar que en los dos modelos de redes génicas generados a partir del perfil transcripcional del mutante en condiciones de ciclo corto, se observan varios nodos que corresponden con genes que codifican proteínas localizadas en el cloroplasto, y entre ellas el factor de transcripción GLK1 y una proteína que contiene el dominio NusB implicada en la regulación de la transcripción y que constituye uno de los nodos principales de interacción.

El modelo de redes génicas generado a partir de los datos transcriptómicos del mutante *cs26* de plantas crecidas en ambos fotoperiodos mostró que existe una alta correlación entre los genes desregulados en el mutante y los genes que están implicados en la respuesta a luz de alta intensidad, aún cuando el mutante no se crece bajo estas condiciones de estrés. Como se descree a continuación, *cs26* se ha identificado como uno de los genes implicados en la aclimatación a luz (Pesaresi et al., 2009). Este aspecto será objeto de un estudio en profundidad en el trabajo futuro.

Función de la proteína CS26

El papel del gen *cysM* en bacterias no ha sido determinado con claridad. La función asignada a la isoforma B bacteriana es la de asimilar azufre inorgánico en forma de tiosulfato formando S-sulfocisteína como fuente de cisteína obtenida por degradación. De esta forma, esta isoforma B es requerida para que la biosíntesis de cisteína sea eficiente durante el crecimiento en condiciones anaeróbicas (Filutowicz et al., 1982).

Aunque el metabolito S-sulfocisteína puede ser degradado para generar cisteína, el fenotipo observado en el mutante nulo *cs26* de *Arabidopsis* en condiciones de crecimiento de día largo, y la comparación de este fenotipo con el que muestra el mutante *oas-b* sugiere que la S-sulfocisteína debe jugar un papel importante en el cloroplasto, y que la función de CS26 no está relacionada con la capacidad de sintetizar cisteína. Además, por el hecho de que esta enzima es muy poco abundante, su función en el cloroplasto debe estar relacionada con un proceso de señalización más que con un proceso asimilatorio.

Los datos obtenidos en esta tesis no permiten hasta la fecha asignar una función específica a la enzima CS26 o al producto de la reacción que cataliza, es decir la molécula de S-sulfocisteína, en el cloroplasto. Sin embargo, su localización en el lumen tilacoidal nos permite generar alguna hipótesis sobre su posible función en planta.

Recientemente se ha identificado *CS26* como uno de los genes diana de la ruta de señalización de la aclimatación a luz (Pesaresi et al., 2009). Esta conclusión está apoyada por la identificación de genes comunes que se regulan en los mutantes *stn7-1*, *psad1-1* y *psae1-3*, deficientes en los componentes necesarios para la transición de estados, y entre los que se encuentra *CS26*. Los mutantes *psad1-1* y *psae1-3* no poseen la subunidad D1 y E1 del fotosistema I, respectivamente. El mutante *stn7-1* no tiene la proteína quinasa tilacoidal STN7 y muestra una reducción drástica de la fosforilación del sistema de colección de luz del PSII (LHCII), así como una reducción marcada en la transición de estados. En ambos casos de aclimatación a la luz tanto en tiempos largos como cortos se requiere un ajuste importante de la estequiometría de los fotosistemas que es regulada por el estado redox de la plastoquinona y la quinasa STN7 (Kanervo et al., 2005; Dietzel et al., 2008). Recientemente, también se ha identificado que el desensamblaje de los supercomplejos del PSII inducido por alta iluminación dependen del nivel de fosforilación de la proteína CP29 mediada por STN7 (Fristedt y Vener, 2011).

La proteína STN7, y su ortólogo STT7 en *Chlamydomonas*, contiene una región transmembrana que separa su dominio catalítico quinasa en el lado estromático de su extremo N-terminal en el lumen tilacoidal. Este extremo contiene dos residuos de

cisteínas conservados críticos para su actividad. Para que la enzima sea activa, se requiere la formación de un puente disulfuro entre estos dos residuos de cisteína (Lemeille et al., 2009). Un dato importante de resaltar es que la kinasa STT7 actúa en cantidades catalíticas, es decir, que se requiere una cantidad pequeña de enzima activa (Lemeille et al., 2009).

Aunque se desconoce el mecanismo de regulación de la kinasa STN7/STT7, o de otras proteínas del lumen, se postula que estas proteínas están de manera natural en su forma oxidada que es activa y que habría un mecanismo que reduciría estas proteínas para mantenerlas inactivas. Un modelo tentativo sugiere que la proteína tilacoidal CCDA recibe electrones de la tiorredoxina Trx-m y los dona posteriormente a la proteína luminal HCF164, con homología a tiorredoxinas, que sería la que actuaría sobre las proteínas diana del lumen para reducir las (Dietz y Pfannschmidt, 2011). Esta hipótesis implica que en el lumen hay un proceso no regulado y al azar de oxidación de proteínas producido no enzimáticamente por los altos niveles de oxígeno de este compartimento, lo cual en nuestra opinión no parece factible.

La molécula de S-sulfocisteína (RSSO_3^-) puede actuar químicamente como una molécula oxidante reaccionando con tioles reducidos (RSH) de acuerdo con la siguiente reacción:



Aunque el equilibrio de esta reacción está desplazado a la izquierda en condiciones normales, cuando RSH es mucho más abundante que RSSR, el equilibrio se desplaza a la derecha (Neta y Huie, 1985). Por lo tanto, la S-sulfocisteína en el lumen podría actuar mediando la oxidación de los residuos tiólicos de STN7 o de otras enzimas cuyas actividades en el lumen estuvieran reguladas por oxidación. Esta propiedad de la molécula de S-sulfocisteína permitiría actuar a la enzima CS26 como un sensor molecular del funcionamiento del aparato fotosintético. Esta función específica estaría determinada por la aparición en el cloroplasto de uno de los sustratos de la enzima, el tiosulfato. En condiciones normales de funcionamiento del aparato fotosintético, la reducción asimilatoria de sulfato tiene lugar mediante la formación de sulfito y su posterior reducción hasta sulfuro en una única etapa catalizada por la sulfito reductasa, sin formación de tiosulfato como intermediario. Sin embargo, alteraciones en el flujo de electrones fotosintético o en la propia sulfito reductasa resulta en la acumulación de tiosulfato (Khan *et al.*, 2010), el cual sería detectado por la enzima CS26 para catalizar la formación de S-sulfocisteína y regular, mediante la oxidación de residuos tiólicos, la actividad de enzimas implicadas en la reparación o reorganización de los fotosistemas como STN7, KBP13 y Deg1 (Dietz y Pfannschmidt, 2011). Aunque

la enzima es muy poco abundante, bajos niveles de S-sulfocisteína serían suficientes para activar a la enzima STN7 y disparar un proceso de señalización.

La función de CS26/S-sulfocisteína como sensores del correcto estado de funcionamiento de la cadena fotosintética se ajusta a los fenotipos observados en el mutante *cs26* en condiciones de día corto y día largo de crecimiento. En condiciones de día largo (16 horas de iluminación), aunque la intensidad de luz utilizada ($120\text{-}140\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) no es considerada de alta intensidad para *Arabidopsis*, se observa una elevada acumulación de ROS en el mutante *cs26*, que son detoxificados correctamente en la línea silvestre. Además, se observan unos niveles muy elevados en la concentración de glutatión que puede ser una consecuencia del estrés oxidativo de la planta.

En el caso de día corto (8 horas de iluminación) parece que no se genera suficiente daño oxidativo en la planta y por lo tanto no se observa acumulación de ROS. En esta situación, la ausencia de CS26 no compromete el crecimiento de la planta. Sin embargo, en hojas jóvenes del mutante *cs26* se observa una disminución en los valores de F_v/F_m que se correlaciona con una mayor acumulación de transcrito del gen CS26 en plantas silvestres.

Aunque podría existir una posible competencia por el sustrato OAS entre las enzimas CS26 y OAS-B, un análisis del patrón de regulación de los genes *OAS-B* y *CS26* (<http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/>), indica que poseen regulación circadiana y niveles diferentes durante el ciclo luz/oscuridad siendo mayor el nivel de transcrito *OAS-B* en oscuridad y *CS26* durante el periodo de luz.

No cabe duda que la hipótesis planteada en esta tesis tiene que ser validada y será el objetivo de la investigación futura que desarrollará el grupo.

VI. CONCLUSIONES

1. El gen *CS26* de *Arabidopsis thaliana* codifica una proteína minoritaria, homóloga a las *O*-acetilserina(tiol)liasas, que posee actividad S-Sulfocisteína sintasa y cataliza la incorporación de tiosulfato al esqueleto carbonado de la *O*-acetilserina para formar la molécula de S-sulfocisteína.
2. La proteína CS26 se localiza en el lumen tilacoidal del cloroplasto aunque también se detecta en el estroma en una forma pre-procesada sin actividad enzimática.
3. La pérdida de función de la proteína CS26 produce cambios significativos en el fenotipo de la planta, que depende del régimen lumínico de crecimiento. Así, en condiciones de día largo, la ausencia de actividad S-Sulfocisteína sintasa en el lumen cloroplástico provoca un efecto de fotoinhibición que degenera en alteraciones del flujo de electrones fotosintético, acumulación de especies reactivas de oxígeno, descenso en la tasa de asimilación de CO₂ e inhibición en el crecimiento de la planta.
4. La función que desempeña la enzima S-Sulfocisteína sintasa o la molécula S-sulfocisteína en el lumen tilacoidal no puede ser establecida con los datos disponibles. Sin embargo, los bajos niveles de la proteína y del metabolito detectados en *Arabidopsis thaliana* y el efecto tan significativo que provoca su ausencia, sugieren que estos deben poseer una importante función regulatoria en el cloroplasto.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agren, D., Schnell, R., Oehlmann, W., Singh, M. y Schneider, G. (2008).** "Cysteine synthase (CysM) of *Mycobacterium tuberculosis* is an O-phosphoserine sulfhydrylase: evidence for an alternative cysteine biosynthesis pathway in mycobacteria." *J Biol Chem* 283(46): 31567-31574.
- Aldridge, C., Cain, P. y Robinson, C. (2009).** "Protein transport in organelles: Protein transport into and across the thylakoid membrane." *Febs Journal* 276(5): 1177-1186.
- Alvarez, C., Calo, L., Romero, L. C., Garcia, I. y Gotor, C. (2010).** "An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 152(2): 656-669.
- Allen, J. F. (1993).** "Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes." *J Theor Biol* 165(4): 609-631.
- Baker, N. R. (2008).** "Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo." *Annu Rev Plant Biol* 59: 89-113.
- Barberon, M., Berthomieu, P., Clairotte, M., Shibagaki, N., Davidian, J. C. y Gosti, F. (2008).** "Unequal functional redundancy between the two *Arabidopsis thaliana* high-affinity sulphate transporters *SULTR1;1* and *SULTR1;2*." *New Phytol* 180(3): 608-619.
- Barroso, C., Romero, L. C., Cejudo, F. J., Vega, J. M. y Gotor, C. (1999).** "Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid." *Plant Mol Biol* 40(4): 729-736.
- Barroso, C., Vega, J. M. y Gotor, C. (1995).** "A new member of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Lett* 363(1-2): 1-5.
- Beal, M. J., Falciani, F., Ghahramani, Z., Rangel, C. y Wild, D. L. (2005).** "A Bayesian approach to reconstructing genetic regulatory networks with hidden factors." *Bioinformatics* 21(3): 349-356.
- Bermúdez, M. A., Paez-Ochoa, M. A., Gotor, C. y Romero, L. C. (2010).** "*Arabidopsis* S-sulfocysteine synthase activity is essential for chloroplast function and long-day light-dependent redox control." *Plant Cell* 22(2): 403-416.
- Bernacchi, C. J., Portis, A. R., Nakano, H., von Caemmerer, S. y Long, S. P. (2002).** "Temperature response of mesophyll conductance. Implications for the determination of Rubisco enzyme kinetics and for limitations to photosynthesis in vivo." *Plant Physiol* 130(4): 1992-1998.

- Bernacchi, C. J., Singaas, E. L., Pimentel, C., Portis, A. R. y Long, S. P. (2001).** "Improved temperature response functions for models of Rubisco-limited photosynthesis." *Plant, Cell and Environment* 24: 253-259.
- Bick, J. A. y Leustek, T. (1998).** "Plant sulfur metabolism--the reduction of sulfate to sulfite." *Curr Opin Plant Biol* 1(3): 240-244.
- Bick, J. A., Setterdahl, A. T., Knaff, D. B., Chen, Y., Pitcher, L. H., Zilinskas, B. A. y Leustek, T. (2001).** "Regulation of the plant-type 5'-adenylyl sulfate reductase by oxidative stress." *Biochemistry* 40(30): 9040-9048.
- Bock, D. y Bock, P. (1987).** "Rhabdomyoma of the soft palate. Fine structural details of a highly differentiated muscle tumor." *Histol Histopathol* 2(3): 285-289.
- Bogdanova, N. y Hell, R. (1997).** "Cysteine synthesis in plants: protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* 11(2): 251-262.
- Bolchi, A., Petrucco, S., Tenca, P. L., Foroni, C. y Ottonello, S. (1999).** "Coordinate modulation of maize sulfate permease and ATP sulfurylase mRNAs in response to variations in sulfur nutritional status: stereospecific down-regulation by L-cysteine." *Plant Mol Biol* 39(3): 527-537.
- Bonner, E. R., Cahoon, R. E., Knapke, S. M. y Jez, J. M. (2005).** "Molecular basis of cysteine biosynthesis in plants: structural and functional analysis of O-acetylserine sulfhydrylase from *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* 280(46): 38803-38813.
- Boron, P., Szpakowicz, T., Bobrowska, E., Boron-Kaczmarska, A., Devajtene, J. y Laiskonis, A. (1977).** "[Hepatitis B antigenemia in chronic hepatopathies (author's transl)]." *Przegl Lek* 34(10): 759-761.
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R. y Grolach, J. (2001).** "Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants." *Plant Cell* 13(7): 1499-1510.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Breeze, E., Harrison, E., McHattie, S., Hughes, L., Hickman, R., Hill, C., Kiddle, S., Kim, Y. S., Penfold, C. A., Jenkins, D., Zhang, C., Morris, K., Jenner, C., Jackson, S., Thomas, B., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J. D., Wild, D. L., Ott, S., Rand, D., Beynon, J., Denby, K., Mead, A. y Buchanan-Wollaston, V. (2011).** "High-resolution temporal profiling of transcripts during *Arabidopsis*

- leaf senescence reveals a distinct chronology of processes and regulation." *Plant Cell* 23(3): 873-894.
- Buchanan, B. B. y Luan, S. (2005).** "Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research." *J Exp Bot* 56(416): 1439-1447.
- Buchner, P., Stuiver, C. E., Westerman, S., Wirtz, M., Hell, R., Hawkesford, M. J. y De Kok, L. J. (2004).** "Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition." *Plant Physiol* 136(2): 3396-3408.
- Buwalda, F., Stulen, I., De Kok, L. J. and Kuiper, P. J. C. (1990).** "Cysteine, g-glutamyl-cysteine and glutathione contents of spinach leaves as affected by darkness and application of excess sulfur. II. Glutathione accumulation in detached leaves exposed to H₂S in the absence of light is stimulated by the supply of glycine to the petiole." *Physiologia Plantarum* 80: 196–204.
- Byrne, C. R., Monroe, R. S., Ward, K. A. y Kredich, N. M. (1988).** "DNA sequences of the *cysK* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* and linkage of the *cysK* regions to *ptsH*." *J Bacteriol* 170(7): 3150-3157.
- Cairns, N. G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C. S. y Meyer, A. J. (2006).** "Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo." *Plant Physiol* 141(2): 446-455.
- Claus, M. T., Zocher, G. E., Maier, T. H. P. y Schulz, G. E. (2005).** "Structure of the O-acetylserine sulfhydrylase isoenzyme CysM from *Escherichia coli*." *Biochemistry* 44(24): 8620-8626.
- Cobbett, C. y Goldsbrough, P. (2002).** "Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis." *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182.
- Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N., Wellburn, A. y Mullineaux, P. (1999).** "Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress." *Plant Cell* 11(7): 1277-1292.
- Curtis, M. D. y Grossniklaus, U. (2003).** "A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta." *Plant Physiol* 133(2): 462-469.
- Chattopadhyay, A., Meier, M., Ivaninskii, S., Burkhard, P., Speroni, F., Campanini, B., Bettati, S., Mozzarelli, A., Rabeh, W. M., Li, L. y Cook, P. F. (2007).** "Structure, Mechanism, and Conformational Dynamics of O-Acetylserine Sulfhydrylase from *Salmonella typhimurium*: Comparison of A and B Isozymes." *Biochemistry* 46(28): 8315-8330.

- Davidian, J. C. y Kopriva, S. (2010).** "Regulation of sulfate uptake and assimilation--the same or not the same?" *Mol Plant* 3(2): 314-325.
- Dietz, K. J. (2003).** "Plant peroxiredoxins." *Annu Rev Plant Biol* 54: 93-107.
- Dietz, K. J., Jacob, S., Oelze, M. L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S. M., Baier, M. y Finkemeier, I. (2006).** "The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism." *J Exp Bot* 57(8): 1697-1709.
- Dietz, K. J. y Pfannschmidt, T. (2011).** "Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression." *Plant Physiol* 155(4): 1477-1485.
- Dietzel, L., Brautigam, K. y Pfannschmidt, T. (2008).** "Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry--functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants." *FEBS J* 275(6): 1080-1088.
- Dominguez-Solis, J. R., Gutierrez-Alcala, G., Vega, J. M., Romero, L. C. y Gotor, C. (2001).** "The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance." *J Biol Chem* 276(12): 9297-9302.
- Dominguez-Solis, J. R., Lopez-Martin, M. C., Ager, F. J., Ynsa, M. D., Romero, L. C. y Gotor, C. (2004).** "Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Biotechnol J* 2(6): 469-476.
- Droux, M. (2004).** "Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey." *Photosynth Res* 79(3): 331-348.
- Droux, M., Ruffet, M. L., Douce, R. y Job, D. (1998).** "Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants--structural and kinetic properties of the free and bound enzymes." *Eur J Biochem* 255(1): 235-245.
- Ducruix, C., Vailhen, D., Werner, E., Fievet, J. B., Bourguignon, J., Tabet, J.-C., Ezan, E. y Junot, C. (2008).** "Metabolomic investigation of the response of the model plant *Arabidopsis thaliana* to cadmium exposure: Evaluation of data pretreatment methods for further statistical analyses." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 91(1): 67-77.
- Ethier, G. H. y Livingstone, N. J. (2004).** "On the need to incorporate sensitivity to CO₂ transfer conductance into the Farquhar-von Caemmerer-Berry leaf photosynthesis model." *Plant, Cell and Environment* 27: 137-153.
- Fahnenstich, H., Scarpeci, T. E., Valle, E. M., Flugge, U. I. y Maurino, V. G. (2008).** "Generation of hydrogen peroxide in chloroplasts of *Arabidopsis*

- overexpressing glycolate oxidase as an inducible system to study oxidative stress." *Plant Physiol* 148(2): 719-729.
- Farquhar, C. y Von Caemmerer, S. (1982).** "Modelling of photosynthetic response to environmental conditions." *Physiological Plant Ecology II*. (O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler Eds). Springer-Verlag Berlin: 549-587.
- Farquhar, G. D., Von Caemmerer, S. y Berry, J. A. (1980).** "A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species." *Planta* 149: 78-90.
- Fernández-García, N., Marti, M. C., Jimenez, A., Sevilla, F. y Olmos, E. (2009).** "Sub-cellular distribution of glutathione in an Arabidopsis mutant (vtc1) deficient in ascorbate." *J Plant Physiol* 166(18): 2004-2012.
- Filutowicz, M., Wiater, A. y Hulanicka, D. (1982).** "Delayed inducibility of sulphite reductase in cysM mutants of *Salmonella typhimurium* under anaerobic conditions." *J Gen Microbiol* 128(8): 1791-1794.
- Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Berry, J. A., Cifre, J., Galmes, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H. y Ribas-Carbo, M. (2007).** "Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization." *J Exp Bot* 58(6): 1533-1543.
- Flexas, J., Ribas-Carbo, M., Hanson, D. T., Bota, J., Otto, B., Cifre, J., McDowell, N., Medrano, H. y Kaldenhoff, R. (2006).** "Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO₂ in vivo." *Plant J* 48(3): 427-439.
- Fodor, J., Gullner, G., Adam, A. L., Barna, B., Komives, T. y Kiraly, Z. (1997).** "Local and Systemic Responses of Antioxidants to Tobacco Mosaic Virus Infection and to Salicylic Acid in Tobacco (Role in Systemic Acquired Resistance)." *Plant Physiol* 114(4): 1443-1451.
- Foyer, C. H. y Noctor, G. (2011).** "Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub." *Plant Physiol* 155(1): 2-18.
- Foyer, C. H., Theodoulou, F. L. y Delrot, S. (2001).** "The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants." *Trends Plant Sci* 6(10): 486-492.
- Frey, B. J. y Dueck, D. (2007).** "Clustering by passing messages between data points." *Science* 315(5814): 972-976.
- Fristedt, R. y Vener, A. V. (2011).** "High Light Induced Disassembly of Photosystem II Supercomplexes in Arabidopsis Requires STN7-Dependent Phosphorylation of CP29." *PLoS ONE* 6(9): e24565.
- Gaitonde, M. K. (1967).** "A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids." *Biochem J* 104(2): 627-633.

- García, I., Castellano, J. M., Vioque, B., Solano, R., Gotor, C. y Romero, L. C. (2010).** "Mitochondrial beta-cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* 22(10): 3268-3279.
- Gómez-Cadenas, A., Pozo, O. J., Garcia-Augustin, P. y Sancho, J. V. (2002).** "Direct analysis of abscisic acid in crude plant extracts by liquid chromatography--electrospray/tandem mass spectrometry." *Phytochem Anal* 13(4): 228-234.
- Gopalan, G., He, Z., Balmer, Y., Romano, P., Gupta, R., Heroux, A., Buchanan, B. B., Swaminathan, K. y Luan, S. (2004).** "Structural analysis uncovers a role for redox in regulating FKBP13, an immunophilin of the chloroplast thylakoid lumen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(38): 13945-13950.
- Gotor, C., Cejudo, F. J., Barroso, C. y Vega, J. M. (1997).** "Tissue-specific expression of ATCYS-3A, a gene encoding the cytosolic isoform of O-acetylserine(thiol)lyase in *Arabidopsis*." *Plant J* 11(2): 347-352.
- Gromes, R., Hothorn, M., Lenherr, E. D., Rybin, V., Scheffzek, K. y Rausch, T. (2008).** "The redox switch of gamma-glutamylcysteine ligase via a reversible monomer-dimer transition is a mechanism unique to plants." *Plant J* 54(6): 1063-1075.
- Gross, A., Brückner, G., Heldt, H. W. y Flügge, U. I. (1990).** "Comparison of the kinetic properties, inhibition and labelling of the phosphate translocators from maize and spinach mesophyll chloroplasts." *Planta* 180 (2): 262-271.
- Gu, L., Jones, A. D. y Last, R. L. (2007).** "LC-MS/MS assay for protein amino acids and metabolically related compounds for large-scale screening of metabolic phenotypes." *Anal Chem* 79(21): 8067-8075.
- Gupta, R., Mould, R. M., He, Z. y Luan, S. (2002).** "A chloroplast FKBP interacts with and affects the accumulation of Rieske subunit of cytochrome bf complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24): 15806-15811.
- Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B. y Klösgen, R. B. (2006).** "Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts." *J Plant Physiol* 163(3): 333-347.
- Gutierrez-Alcala, G., Gotor, C., Meyer, A. J., Fricker, M., Vega, J. M. y Romero, L. C. (2000).** "Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 11108-11113.
- Haas, F. H., Heeg, C., Queiroz, R., Bauer, A., Wirtz, M. y Hell, R. (2008).** "Mitochondrial serine acetyltransferase functions as a pacemaker of cysteine synthesis in plant cells." *Plant Physiol* 148(2): 1055-1067.

- Halliwell, B. y Foyer, C. H. (1976).** "Ascorbic acid, metal ions and the superoxide radical." *Biochem J* 155(3): 697-700.
- Harley, P. C., Loreto, F., Di Marco, G. y Sharkey, T. D. (1992).** "Theoretical Considerations when Estimating the Mesophyll Conductance to CO(2) Flux by Analysis of the Response of Photosynthesis to CO(2)." *Plant Physiol* 98(4): 1429-1436.
- Hatzfeld, Y., Maruyama, A., Schmidt, A., Noji, M., Ishizawa, K. y Saito, K. (2000).** "beta-Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and Arabidopsis." *Plant Physiol* 123(3): 1163-1171.
- Hawkesford, M. J. y De Kok, L. J. (2006).** "Managing sulphur metabolism in plants." *Plant Cell Environ* 29(3): 382-395.
- Heard, N. A., Holmes, C. C., Stephens, D. A., Hand, D. J. y Dimopoulos, G. (2005).** "Bayesian coclustering of Anopheles gene expression time series: study of immune defense response to multiple experimental challenges." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47): 16939-16944.
- Heeg, C., Kruse, C., Jost, R., Gutensohn, M., Ruppert, T., Wirtz, M. y Hell, R. (2008).** "Analysis of the Arabidopsis O-acetylserine(thiol)lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis." *Plant Cell* 20(1): 168-185.
- Hensel, G. y Truper, H. G. (1976).** "Cysteine and S-sulfocysteine biosynthesis in phototrophic bacteria." *Arch Microbiol* 109(1-2): 101-103.
- Hermann, F. G., Martinius, H., Egelhofer, M., Giroglou, T., Tonn, T., Roth, S. D., Zahn, R., Schult-Dietrich, P., Alexandrov, A., Dietrich, U., Baum, C. y von Laer, D. (2009).** "Protein scaffold and expression level determine antiviral activity of membrane-anchored antiviral peptides." *Hum Gene Ther* 20(4): 325-336.
- Hicks, L. M., Cahoon, R. E., Bonner, E. R., Rivard, R. S., Sheffield, J. y Jez, J. M. (2007).** "Thiol-based regulation of redox-active glutamate-cysteine ligase from Arabidopsis thaliana." *Plant Cell* 19(8): 2653-2661.
- Hindson, V. J. y Shaw, W. V. (2003).** "Random-order ternary complex reaction mechanism of serine acetyltransferase from Escherichia coli." *Biochemistry* 42(10): 3113-3119.
- Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M. y Saito, K. (2003).** "Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA microarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition." *Plant J* 33(4): 651-663.

- Hothorn, M., Wachter, A., Gromes, R., Stuwe, T., Rausch, T. y Scheffzek, K. (2006).** "Structural basis for the redox control of plant glutamate cysteine ligase." *J Biol Chem* 281(37): 27557-27565.
- Howarth, J. R., Dominguez-Solis, J. R., Gutierrez-Alcala, G., Wray, J. L., Romero, L. C. y Gotor, C. (2003).** "The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium." *Plant Mol Biol* 51(4): 589-598.
- Hulanicka, M. D., Garrett, C., Jagura-Burdzy, G. y Kredich, N. M. (1986).** "Cloning and characterization of the *cysAMK* region of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* 168(1): 322-327.
- Hulanicka, M. D., Hallquist, S. G., Kredich, N. M. y Mojica, A. T. (1979).** "Regulation of O-acetylserine sulfhydrylase B by L-cysteine in *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* 140(1): 141-146.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. y Speed, T. P. (2003).** "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data." *Biostatistics* 4(2): 249-264.
- Jez, J. M., Cahoon, R. E. y Chen, S. (2004).** "*Arabidopsis thaliana* glutamate-cysteine ligase: functional properties, kinetic mechanism, and regulation of activity." *J Biol Chem* 279(32): 33463-33470.
- Joliot, P. y Joliot, A. (2002).** "Cyclic electron transfer in plant leaf." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 10209-10214.
- Jones-Rhoades, M. W. y Bartel, D. P. (2004).** "Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA." *Mol Cell* 14(6): 787-799.
- Jost, R., Altschmied, L., Bloem, E., Bogs, J., Gershenzon, J., Hahnel, U., Hansch, R., Hartmann, T., Kopriva, S., Kruse, C., Mendel, R. R., Papenbrock, J., Reichelt, M., Rennenberg, H., Schnug, E., Schmidt, A., Textor, S., Tokuhisa, J., Wachter, A., Wirtz, M., Rausch, T. y Hell, R. (2005).** "Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*." *Photosynth Res* 86(3): 491-508.
- Jost, R., Berkowitz, O., Wirtz, M., Hopkins, L., Hawkesford, M. J. y Hell, R. (2000).** "Genomic and functional characterization of the *oas* gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." *Gene* 253(2): 237-247.

- Kanervo, E., Suorsa, M. y Aro, E. M. (2005).** "Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane." *Photochem Photobiol Sci* 4(12): 1072-1080.
- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., Hawkesford, M. J., Yamaya, T. y Takahashi, H. (2004).** "Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in Arabidopsis." *Plant Cell* 16(10): 2693-2704.
- Kawashima, C. G., Yoshimoto, N., Maruyama-Nakashita, A., Tsuchiya, Y. N., Saito, K., Takahashi, H. y Dalmay, T. (2009).** "Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types." *Plant J* 57(2): 313-321.
- Khan, M. S., Haas, F. H., Samami, A. A., Gholami, A. M., Bauer, A., Fellenberg, K., Reichelt, M., Hansch, R., Mendel, R. R., Meyer, A. J., Wirtz, M. y Hell, R. (2010).** "Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is essential for growth and development in Arabidopsis thaliana." *Plant Cell* 22(4): 1216-1231.
- Kiddle, S. J., Windram, O. P., McHattie, S., Mead, A., Beynon, J., Buchanan-Wollaston, V., Denby, K. J. y Mukherjee, S. (2010).** "Temporal clustering by affinity propagation reveals transcriptional modules in Arabidopsis thaliana." *Bioinformatics* 26(3): 355-362.
- Kieselbach, T., Hagman, Andersson, B. y Schroder, W. P. (1998).** "The thylakoid lumen of chloroplasts. Isolation and characterization." *J Biol Chem* 273(12): 6710-6716.
- Klapheck, S. (1988).** "Homogluthathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. ." *Physiologia Plantarum* 74: 727-732.
- Klapheck, S., Fliegner, W. y Zimmer, I. (1994).** "Hydroxymethyl-phytochelatins [(gamma-glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae." *Plant Physiol* 104(4): 1325-1332.
- Klipper-Aurbach, Y., Wasserman, M., Braunsiegel-Weintrob, N., Borstein, D., Peleg, S., Assa, S., Karp, M., Benjamini, Y., Hochberg, Y. y Laron, Z. (1995).** "Mathematical formulae for the prediction of the residual beta cell function during the first two years of disease in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus." *Med Hypotheses* 45(5): 486-490.
- Kopriva, S., Mugford, S. G., Matthewman, C. y Koprivova, A. (2009).** "Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization." *Plant Cell Rep* 28(12): 1769-1780.

- Kopriva, S. y Rennenberg, H. (2004).** "Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism." *J Exp Bot* 55(404): 1831-1842.
- Kopriva, S., Suter, M., von Ballmoos, P., Hesse, H., Krahenbuhl, U., Rennenberg, H. y Brunold, C. (2002).** "Interaction of sulfate assimilation with carbon and nitrogen metabolism in *Lemna minor*." *Plant Physiol* 130(3): 1406-1413.
- Koprivova, A., Meyer, A. J., Schween, G., Herschbach, C., Reski, R. y Kopriva, S. (2002).** "Functional knockout of the adenosine 5'-phosphosulfate reductase gene in *Physcomitrella patens* revives an old route of sulfate assimilation." *J Biol Chem* 277(35): 32195-32201.
- Koprivova, A., North, K. A. y Kopriva, S. (2008).** "Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in *Arabidopsis* roots." *Plant Physiol* 146(3): 1408-1420.
- Koprivova, A., Suter, M., den Camp, R. O., Brunold, C. y Kopriva, S. (2000).** "Regulation of sulfate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 122(3): 737-746.
- Krueger, R. J. y Siegel, L. M. (1982).** "Evidence for siroheme-Fe₄S₄ interaction in spinach ferredoxin-sulfite reductase." *Biochemistry* 21(12): 2905-2909.
- Krueger, S., Niehl, A., Lopez Martin, M. C., Steinhauser, D., Donath, A., Hildebrandt, T., Romero, L. C., Hoefgen, R., Gotor, C. y Hesse, H. (2009).** "Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*." *Plant Cell Environ* 32(4): 349-367.
- Kumaran, S., Yi, H., Krishnan, H. B. y Jez, J. M. (2009).** "Assembly of the cysteine synthase complex and the regulatory role of protein-protein interactions." *J Biol Chem* 284(15): 10268-10275.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laisk, A. K. (1997).** "Kinetics of photosynthesis and photorespiration in C3 plants (in Russian)." Nauka, Moscow, Russia.
- Lappartient, A. G., Vidmar, J. J., Leustek, T., Glass, A. D. y Touraine, B. (1999).** "Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound." *Plant J* 18(1): 89-95.
- Lass, B. y Ullrich-Eberius, C. I. (1984).** "Evidence for proton: sulfate cotransport and its kinetics in *Lemna gibba* G1." *Planta* 161: 53-60.

- Lemaire, S. D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V. y Issakidis-Bourguet, E. (2007).** "Thioredoxins in chloroplasts." *Curr Genet* 51(6): 343-365.
- Lemeille, S., Willig, A., Depege-Fargeix, N., Delessert, C., Bassi, R. y Rochaix, J. D. (2009).** "Analysis of the chloroplast protein kinase Stt7 during state transitions." *PLoS Biol* 7(3): e45.
- Lennartz, K., Plucken, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N. y Meierhoff, K. (2001).** "HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b(6)f complex in Arabidopsis." *Plant Cell* 13(11): 2539-2551.
- Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J. A. y Davies, J. P. (2000).** "Pathways and Regulation of Sulfur Metabolism Revealed through Molecular and Genetic Studies." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 141-165.
- Li, H., Xu, H., Graham, D. E. y White, R. H. (2003).** "Glutathione synthetase homologs encode alpha-L-glutamate ligases for methanogenic coenzyme F420 and tetrahydrosarcinapterin biosyntheses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(17): 9785-9790.
- Liang, G. y Yu, D. (2010).** "Reciprocal regulation among miR395, APS and SULTR2;1 in Arabidopsis thaliana." *Plant Signal Behav* 5(10): 1257-1259.
- Lichtenthaler, F. W. (1987).** "Karl Freudenberg, Burckhardt Helferich, Hermann O. L. Fischer: a centennial tribute." *Carbohydr Res* 164: 1-22.
- Lindberg, P. y Melis, A. (2008).** "The chloroplast sulfate transport system in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Planta* 228(6): 951-961.
- Liu, C., Wang, R., Varlamova, O. y Leyh, T. S. (1998).** "Regulating energy transfer in the ATP sulfurylase-GTPase system." *Biochemistry* 37(11): 3886-3892.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001).** "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- López-Martín, M. C., Becana, M., Romero, L. C. y Gotor, C. (2008a).** "Knocking out cytosolic cysteine synthesis compromises the antioxidant capacity of the cytosol to maintain discrete concentrations of hydrogen peroxide in Arabidopsis." *Plant Physiol* 147(2): 562-572.
- López-Martín, M. C., Romero, L. C. y Gotor, C. (2005).** "Differential involvement of cysteine biosynthesis genes in cadmium tolerance in Arabidopsis thaliana. In 'Sulfur Transport and Assimilation in Plants in the Post Genomic Era', K. Saito, L.J. De Kok, I. Stulen, M.J. Hawkesford, E. Schnug, A. Sirko, H. Rennenberg, eds." Backhuys Publishers, Leiden: 225-227.
- López-Martín, M. C., Romero, L. C. y Gotor, C. (2008b).** "Cytosolic cysteine in redox signaling." *Plant Signal Behav* 3(10): 880-881.

- Loudet, O., Saliba-Colombani, V., Camilleri, C., Calenge, F., Gaudon, V., Koprivova, A., North, K. A., Kopriva, S. y Daniel-Vedele, F. (2007).** "Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2." *Nat Genet* 39(7): 896-900.
- Luan, S., Albers, M. W. y Schreiber, S. L. (1994).** "Light-regulated, tissue-specific immunophilins in a higher plant." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(3): 984-988.
- Maere, S., Heymans, K. y Kuiper, M. (2005).** "BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks." *Bioinformatics* 21(16): 3448-3449.
- Mahler, H., Wuennenberg, P., Linder, M., Przybyla, D., Zoerb, C., Landgraf, F. y Forreiter, C. (2007).** "Singlet oxygen affects the activity of the thylakoid ATP synthase and has a strong impact on its CF_1 subunit." *Planta* 225(5): 1073-1083.
- Marty, L., Siala, W., Schwarzlander, M., Fricker, M. D., Wirtz, M., Sweetlove, L. J., Meyer, Y., Meyer, A. J., Reichheld, J. P. y Hell, R. (2009).** "The NADPH-dependent thioredoxin system constitutes a functional backup for cytosolic glutathione reductase in *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(22): 9109-9114.
- Maruyama-Nakashita, A., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T. y Takahashi, H. (2003).** "Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways." *Plant Physiol* 132(2): 597-605.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Tohge, T., Saito, K. y Takahashi, H. (2006).** "*Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism." *Plant Cell* 18(11): 3235-3251.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E., Yamaya, T. y Takahashi, H. (2005).** "Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots." *Plant J* 42(3): 305-314.
- Maruyama-Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T. y Takahashi, H. (2004).** "Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation." *J Exp Bot* 55(404): 1843-1849.
- May, M. J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M. y Inze, D. (1998).** "Glutathione homeostasis in plants : implications for environmental sensing and plant development." 49(321).
- Meurer, J., Plucken, H., Kowallik, K. V. y Westhoff, P. (1998).** "A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*." *Embo J* 17(18): 5286-5297.

- Meuwly, P., Thibault, P. y Rauser, W. E. (1993).** "gamma-Glutamylcysteinylglutamic acid--a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium." *FEBS Lett* 336(3): 472-476.
- Meyer, A. J. y Hell, R. (2005).** "Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups." *Photosynth Res* 86(3): 435-457.
- Meyer, T., Burow, M., Bauer, M. y Papenbrock, J. (2003).** "Arabidopsis sulfurtransferases: investigation of their function during senescence and in cyanide detoxification." *Planta* 217(1): 1-10.
- Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B. B., Cejudo, F. J. y Geigenberger, P. (2009).** "NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(24): 9908-9913.
- Motohashi, K. y Hisabori, T. (2010).** "CcdA is a thylakoid membrane protein required for the transfer of reducing equivalents from stroma to thylakoid lumen in the higher plant chloroplast." *Antioxid Redox Signal* 13(8): 1169-1176.
- Muhlenbock, P., Szechynska-Hebda, M., Plaszczyca, M., Baudo, M., Mateo, A., Mullineaux, P. M., Parker, J. E., Karpinska, B. y Karpinski, S. (2008).** "Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis." *Plant Cell* 20(9): 2339-2356.
- Mullineaux, P. M. y Rausch, T. (2005).** "Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression." *Photosynth Res* 86(3): 459-474.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962).** "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nakamura, T., Iwahashi, H. y Eguchi, Y. (1984).** "Enzymatic proof for the identity of the S-sulfocysteine synthase and cysteine synthase B of *Salmonella typhimurium*." *J Bacteriol* 158(3): 1122-1127.
- Nakayama, M., Akashi, T. y Hase, T. (2000).** "Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin." *J Inorg Biochem* 82(1-4): 27-32.
- Neta, P. y Huie, R. E. (1985).** "Free-radical chemistry of sulfite." *Environ Health Perspect* 64: 209-217.
- Neuenschwander, U., Suter, M. y Brunold, C. (1991).** "Regulation of Sulfate Assimilation by Light and O-Acetyl-L-Serine in *Lemna minor* L." *Plant Physiol* 97(1): 253-258.

- Newton, G. L., Dorian, R. y Fahey, R. C. (1981).** "Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography." *Anal Biochem* 114(2): 383-387.
- Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H. y Hoefgen, R. (2003).** "Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity." *Plant J* 33(4): 633-650.
- Nixon, P. J., Michoux, F., Yu, J., Boehm, M. y Komenda, J. (2010).** "Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II." *Ann Bot* 106(1): 1-16.
- Niyogi, K. K. (1999).** "PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333-359.
- Noctor, G. y Foyer, C. H. (1998).** "Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. y Foyer, C. H. (2002).** "Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling." *J Exp Bot* 53(372): 1283-1304.
- Noctor, G., Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Foyer, C. H. y Rennenberg, H. (1996).** "Synthesis of Glutathione in Leaves of Transgenic Poplar Overexpressing [gamma]-Glutamylcysteine Synthetase." *Plant Physiol* 112(3): 1071-1078.
- Noji, M., Inoue, K., Kimura, N., Gouda, A. y Saito, K. (1998).** "Isoform-dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* 273(49): 32739-32745.
- Oelze, M. L., Kandlbinder, A. y Dietz, K. J. (2008).** "Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: complexity in redox regulatory networks." *Biochim Biophys Acta* 1780(11): 1261-1272.
- Ohkama-Ohtsu, N., Kasajima, I., Fujiwara, T. y Naito, S. (2004).** "Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant that overaccumulates O-Acetyl-L-Ser." *Plant Physiol* 136(2): 3209-3222.
- Ok, S. H., Jeong, H. J., Bae, J. M., Shin, J. S., Luan, S. y Kim, K. N. (2005).** "Novel CIPK1-associated proteins in *Arabidopsis* contain an evolutionarily conserved C-terminal region that mediates nuclear localization." *Plant Physiol* 139(1): 138-150.
- Okumura, R., Koizumi, Y. y Sekiya, J. (2003).** "Synthesis of hydroxymethylglutathione from glutathione and L-serine catalyzed by carboxypeptidase Y." *Biosci Biotechnol Biochem* 67(2): 434-437.

- Ort, D. R. y Baker, N. R. (2002).** "A photoprotective role for O(2) as an alternative electron sink in photosynthesis?" *Curr Opin Plant Biol* 5(3): 193-198.
- Papenbrock, J. y Schmidt, A. (2000).** "Characterization of two sulfurtransferase isozymes from *Arabidopsis thaliana*." *Eur J Biochem* 267(17): 5571-5579.
- Patron, N. J., Durnford, D. G. y Kopriva, S. (2008).** "Sulfate assimilation in eukaryotes: fusions, relocations and lateral transfers." *BMC Evol Biol* 8: 39.
- Peltier, J. B., Emanuelsson, O., Kalume, D. E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D. A., Soderberg, L., Roepstorff, P., von Heijne, G. y van Wijk, K. J. (2002).** "Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction." *Plant Cell* 14(1): 211-236.
- Perez-Ruiz, J. M., Spinola, M. C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M. y Cejudo, F. J. (2006).** "Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage." *Plant Cell* 18(9): 2356-2368.
- Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Kleine, T., Wagner, R., Strissel, H., Ihnatowicz, A., Bonardi, V., Scharfenberg, M., Schneider, A., Pfannschmidt, T. y Leister, D. (2009).** "*Arabidopsis* STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation." *Plant Cell* 21(8): 2402-2423.
- Pollock, S. V., Pootakham, W., Shibagaki, N., Moseley, J. L. y Grossman, A. R. (2005).** "Insights into the acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to sulfur deprivation." *Photosynth Res* 86(3): 475-489.
- Puthiyaveetil, S., Ibrahim, I. M. y Allen, J. F. (2011).** "Oxidation-reduction signalling components in regulatory pathways of state transitions and photosystem stoichiometry adjustment in chloroplasts." *Plant Cell Environ.*
- Rausch, T. y Wachter, A. (2005).** "Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations." *Trends Plant Sci* 10(10): 503-509.
- Rauser, W. E. (1999).** "Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins." *Cell Biochem Biophys* 31(1): 19-48.
- Rauser, W. E., Schupp, R. y Rennenberg, H. (1991).** "Cysteine, gamma-Glutamylcysteine, and Glutathione Levels in Maize Seedlings : Distribution and Translocation in Normal and Cadmium-Exposed Plants." *Plant Physiol* 97(1): 128-138.
- Reiner, A., Yekutieli, D. y Benjamini, Y. (2003).** "Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures." *Bioinformatics* 19(3): 368-375.

- Rellan-Alvarez, R., Hernandez, L. E., Abadia, J. y Alvarez-Fernandez, A. (2006).** "Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homogluthathione by liquid chromatography-electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts." *Anal Biochem* 356(2): 254-264.
- Rennenberg, H. y Filner, P. (1982).** "Stimulation of h(2)s emission from pumpkin leaves by inhibition of glutathione synthesis." *Plant Physiol* 69(4): 766-770.
- Riemenschneider, A., Riedel, K., Hoefgen, R., Papenbrock, J. y Hesse, H. (2005).** "Impact of reduced O-acetylserine(thiol)lyase isoform contents on potato plant metabolism." *Plant Physiol* 137(3): 892-900.
- Rizhsky, L., Liang, H. y Mittler, R. (2003).** "The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress." *J Biol Chem* 278(40): 38921-38925.
- Robinson, C., Thompson, S. J. y Woolhead, C. (2001).** "Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts." *Traffic* 2(4): 245-251.
- Rochaix, J. D. (2011).** "Reprint of: Regulation of photosynthetic electron transport." *Biochim Biophys Acta* 1807(8): 878-886.
- Roelfsema, M. R. y Hedrich, R. (2005).** "In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'." *New Phytol* 167(3): 665-691.
- Romero, L. C., Domínguez-Solís, J. R., Gutiérrez-Alcalá, G. y Gotor, C. (2001).** "Salt regulation of O-acetylserine(thiol)lyase in *Arabidopsis thaliana* and increased tolerance in yeast." *Plant Physiol. Biochem.* 39: 643-647.
- Rotte, C. y Leustek, T. (2000).** "Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of *Arabidopsis* leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions." *Plant Physiol* 124(2): 715-724.
- Saito, K. (2004).** "Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road." *Plant Physiol* 136(1): 2443-2450.
- Saito, K., Yokoyama, H., Noji, M. y Murakoshi, I. (1995).** "Molecular cloning and characterization of a plant serine acetyltransferase playing a regulatory role in cysteine biosynthesis from watermelon." *J Biol Chem* 270(27): 16321-16326.
- Sakamoto, W., Miyagishima, S.-y. y Jarvis, P. (2008).** "Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance." *The Arabidopsis Book*: e0110.
- Sasaki-Sekimoto, Y., Taki, N., Obayashi, T., Aono, M., Matsumoto, F., Sakurai, N., Suzuki, H., Hirai, M. Y., Noji, M., Saito, K., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D. y Ohta, H. (2005).** "Coordinated activation of metabolic pathways

- for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*." *Plant J* 44(4): 653-668.
- Scheerer, U., Haensch, R., Mendel, R. R., Kopriva, S., Rennenberg, H. y Herschbach, C. (2010).** "Sulphur flux through the sulphate assimilation pathway is differently controlled by adenosine 5'-phosphosulphate reductase under stress and in transgenic poplar plants overexpressing gamma-ECS, SO, or APR." *J Exp Bot* 61(2): 609-622.
- Sharkey, T. D., Bernacchi, C. J., Farquhar, G. D. y Singsaas, E. L. (2007).** "Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C(3) leaves." *Plant Cell Environ* 30(9): 1035-1040.
- Shiina, T., Allison, L. y Maliga, P. (1998).** "rbcL Transcript Levels in Tobacco Plastids Are Independent of Light: Reduced Dark Transcription Rate Is Compensated by Increased mRNA Stability." *The Plant Cell Online* 10(10): 1713-1722.
- Sies, H. (1999).** "Glutathione and its role in cellular functions." *Free Radic Biol Med* 27(9-10): 916-921.
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Hawkesford, M. J. y Clarkson, D. T. (1995).** "Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9373-9377.
- Smith, F. W., Hawkesford, M. J., Ealing, P. M., Clarkson, D. T., Vanden Berg, P. J., Belcher, A. R. y Warrilow, A. G. (1997).** "Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter." *Plant J* 12(4): 875-884.
- Sorbo, B. (1957).** "A colorimetric method for the determination of thiosulfate." *Biochim Biophys Acta* 23(2): 412-416.
- Stessman, D., Miller, A., Spalding, M. y Rodermel, S. (2002).** "Regulation of photosynthesis during *Arabidopsis* leaf development in continuous light." *Photosynth Res* 72(1): 27-37.
- Takahashi, H. (2010).** "Regulation of sulfate transport and assimilation in plants." *Int Rev Cell Mol Biol* 281: 129-159.
- Takahashi, H., Watanabe, A., Smith, F. W., Blake-kalff, M., Hawkesford, M. J. y al., e. (2000).** "The role of three functional sulfate transporters involved in uptake and translocation of sulfate in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Journal* 23: 171-182.
- Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Campa, M., Soave, C. y Murgia, I. (2005).** "Antisense reduction of thylakoidal ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*

- enhances paraquat-induced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death." *Planta* 221(6): 757-765.
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kruger, P., Selbig, J., Muller, L. A., Rhee, S. Y. y Stitt, M. (2004).** "MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes." *Plant J* 37(6): 914-939.
- Todesco, M., Balasubramanian, S., Hu, T. T., Traw, M. B., Horton, M., Epple, P., Kuhns, C., Sureshkumar, S., Schwartz, C., Lanz, C., Laitinen, R. A., Huang, Y., Chory, J., Lipka, V., Borevitz, J. O., Dangl, J. L., Bergelson, J., Nordborg, M. y Weigel, D. (2010).** "Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in *Arabidopsis thaliana*." *Nature* 465(7298): 632-636.
- Vauclare, P., Kopriva, S., Fell, D., Suter, M., Sticher, L., von Ballmoos, P., Krahenbuhl, U., den Camp, R. O. y Brunold, C. (2002).** "Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible than ATP sulphurylase to negative control by thiols." *Plant J* 31(6): 729-740.
- Vavasseur, A. y Raghavendra, A. S. (2005).** "Guard cell metabolism and CO₂ sensing." *New Phytol* 165(3): 665-682.
- Verberne, M. C., Brouwer, N., Delbianco, F., Linthorst, H. J., Bol, J. F. y Verpoorte, R. (2002).** "Method for the extraction of the volatile compound salicylic acid from tobacco leaf material." *Phytochem Anal* 13(1): 45-50.
- Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J. P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S. C., Cobbett, C. S., Van Montagu, M., Inze, D., May, M. J. y Sung, Z. R. (2000).** "The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development." *Plant Cell* 12(1): 97-110.
- Vidmar, J. J., Tagmout, A., Cathala, N., Touraine, B. y Davidian, J. E. (2000).** "Cloning and characterization of a root specific high-affinity sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Lett* 475(1): 65-69.
- Von Caemmerer, S. (2000).** "Biochemical model of leaf photosynthesis." Csiro publishing, Canberra, Australia.
- Wachter, A., Wolf, S., Steininger, H., Bogs, J. y Rausch, T. (2005).** "Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae." *Plant J* 41(1): 15-30.

- Wang, C. L. y Oliver, D. J. (1997).** "Identification of a putative flexible loop in *Arabidopsis* glutathione synthetase." *Biochem J* 322 (Pt 1): 241-244.
- Warren, C. R. y Dreyer, E. (2006).** "Temperature response of photosynthesis and internal conductance to CO₂: results from two independent approaches." *J Exp Bot* 57(12): 3057-3067.
- Watanabe, M., Kusano, M., Oikawa, A., Fukushima, A., Noji, M. y Saito, K. (2008a).** "Physiological roles of the beta-substituted alanine synthase gene family in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 146(1): 310-320.
- Watanabe, M., Mochida, K., Kato, T., Tabata, S., Yoshimoto, N., Noji, M. y Saito, K. (2008b).** "Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 20(9): 2484-2496.
- Westrop, G. D., Goodall, G., Mottram, J. C. y Coombs, G. H. (2006).** "Cysteine biosynthesis in *Trichomonas vaginalis* involves cysteine synthase utilizing O-phosphoserine." *J Biol Chem* 281(35): 25062-25075.
- Wettenhall, J. M., Simpson, K. M., Satterley, K. y Smyth, G. K. (2006).** "affyImGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data." *Bioinformatics* 22(7): 897-899.
- Wirtz, M., Berkowitz, O., Droux, M. y Hell, R. (2001).** "The cysteine synthase complex from plants. Mitochondrial serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana* carries a bifunctional domain for catalysis and protein-protein interaction." *Eur J Biochem* 268(3): 686-693.
- Wirtz, M., Birke, H., Heeg, C., Muller, C., Hosp, F., Throm, C., König, S., Feldman-Salit, A., Rippe, K., Petersen, G., Wade, R. C., Rybin, V., Scheffzek, K. y Hell, R. (2010).** "Structure and function of the hetero-oligomeric cysteine synthase complex in plants." *J Biol Chem* 285(43): 32810-32817.
- Wirtz, M., Droux, M. y Hell, R. (2004).** "O-acetylserine (thiol) lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*." *J Exp Bot* 55(404): 1785-1798.
- Wirtz, M. y Hell, R. (2006).** "Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties." *J Plant Physiol* 163(3): 273-286.
- Wittstock, U. y Halkier, B. A. (2002).** "Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era." *Trends Plant Sci* 7(6): 263-270.
- Yatusevich, R., Mugford, S. G., Matthewman, C., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., Delaney, S., Koprivova, A., Flugge, U. I. y Kopriva, S. (2010).** "Genes of

- primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* 62(1): 1-11.
- Yi, H., Galant, A., Ravilious, G. E., Preuss, M. L. y Jez, J. M. (2010).** "Sensing sulfur conditions: simple to complex protein regulatory mechanisms in plant thiol metabolism." *Mol Plant* 3(2): 269-279.
- Yonekura-Sakakibara, K., Ashikari, T., Tanaka, Y., Kusumi, T. y Hase, T. (1998).** "Molecular characterization of tobacco sulfite reductase: enzyme purification, gene cloning, and gene expression analysis." *J Biochem* 124(3): 615-621.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Saito, K. y Takahashi, H. (2007).** "Posttranscriptional regulation of high-affinity sulfate transporters in *Arabidopsis* by sulfur nutrition." *Plant Physiol* 145(2): 378-388.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F. W., Yamaya, T. y Saito, K. (2002).** "Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots." *Plant J* 29(4): 465-473.
- Zechmann, B., Mauch, F., Sticher, L. y Muller, M. (2008).** "Subcellular immunocytochemical analysis detects the highest concentrations of glutathione in mitochondria and not in plastids." *J Exp Bot* 59(14): 4017-4027.
- Zenk, M. H. (1996).** "Heavy metal detoxification in higher plants--a review." *Gene* 179(1): 21-30.
- Zybilov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q. y van Wijk, K. J. (2008).** "Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome." *PLoS One* 3(4): e1994.