



# CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
(IRNASA-CSIC)



Departamento de Fisiología Vegetal  
Facultad de Biología  
Universidad de Salamanca

# **Caracterización funcional de las proteínas**

## **Executer en la señalización plástica**

### **mediada por oxígeno singlete**

**Estefanía Uberegui Bernad**

**Salamanca, 2015**





**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
(IRNASA-CSIC)

Departamento de Fisiología Vegetal  
Facultad de Biología  
Universidad de Salamanca

## **Caracterización funcional de las proteínas Executer en la señalización plástica mediada por oxígeno singlete**

Trabajo presentado por

**Estefanía Uberegui Bernad**

para optar al grado de Doctor en Agrobiotecnología de la Universidad de Salamanca

bajo la dirección de la

Dra. Mónica Balsera Diéguez

**Salamanca, 2015**





**La Dra. MÓNICA BALSERA DIÉGUEZ**, Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC),

**Certifica**

que la Tesis Doctoral titulada “Caracterización funcional de las proteínas Executer en la señalización plasmática mediada por oxígeno singlete”, ha sido presentada por Dña. Estefanía Uberegui Bernad en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), reúne originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

y para que así conste, y a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Salamanca a 23 de junio de 2015

Fdo.: Mónica Balsera Diéguez



La realización de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una beca JAE-Predocctoral por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) durante el periodo Septiembre 2010-Agosto 2014, y a las ayudas para estancias breves asociada a la beca JAE-Predocctoral en el Departamento de la Universidad de Umeå (Suecia) desde el 15 de agosto al 16 de octubre de 2011, y en la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC) de Granada desde el 1 de marzo al 12 de junio de 2012.

El trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos “Caracterización funcional de las proteínas Executer en la señalización plastídica mediada por oxígeno singlete” con referencia BFU2010-18252 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, y “Rutas de señalización redox en plantas asociadas a la respuesta a ROS en cloroplastos” con referencia 200940I204 financiado por la Junta de Castilla y León.



## Agradecimientos

En estas líneas me gustaría agradecer a todas las personas que han participado en este trabajo y han hecho que saliera adelante.

En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Mónica Balsera Diéguez, por haber confiado en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo. Por el apoyo, la dirección, el esfuerzo, y la dedicación en este trabajo a lo largo de estos años.

Al Dr. Óscar Lorenzo Sánchez del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias de la Universidad de Salamanca (CIALE-USAL), por abrirnos permanentemente las puertas de su laboratorio, ya que en él se crecieron y analizaron las líneas mutantes, y se llevó a cabo el experimento de complementación bimolecular fluorescente, y parte de la visualización con el microscopio confocal.

Al Dr. Rubén Martínez Buey de la Universidad de Salamanca, y al Dr. José María de Pereda del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, CSIC-USAL) con los que se llevaron a cabo los ensayos de cristalización de proteínas, y de interacción proteína-proteína mediante cromatografía de exclusión molecular. Además de su gran ayuda en el análisis estructural de las proteínas Executer.

Al Prof. Wolfgang Schröder del Departamento de Química de la Universidad de Umeå por haberme recibido en su grupo de investigación durante mi estancia. A él y al Dr. Michael Hall por habernos ayudado en el experimento de proteómica realizando el análisis 2D-DIGE y la posterior identificación de las proteínas diferencialmente expresadas.

A la Dra. Mariam Sahrawy Barragán y al Dr. Antonio Jesús Serrato Recio de la Estación Experimental del Zaidín en Granada (EEZ-CSIC) por acogerme en su laboratorio, y brindarnos toda la ayuda necesaria para llevar a cabo los análisis de expresión génica mediante qRT-PCR y la generación de las plantas transgénicas.

Al Dr. Rafael Samaniego de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón de Madrid (IiSGM), que nos enseñó a utilizar el microscopio confocal para realizar los ensayos de co-localización de proteínas fluorescentes.

A Jaime Curto Martín, que nos ayudó en gran parte del trabajo experimental, a Marco Antonio Cañizares Sendín, agradecerle su trabajo con algunas de las proteínas recombinantes utilizadas en esta tesis, y a Sergio Galindo Trigo, por su ayuda en el laboratorio.

A Ana María, Javi, y Rubén, por vuestra ayuda y los buenos ratos pasados en el IRNASA.

Al personal del IRNASA que nos ha ayudado.

A mi familia y a mis amigos, y especialmente a mis padres, quienes me han apoyado en todo este tiempo.

A todos ellos, gracias.



## ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. La célula vegetal y el cloroplasto</b> .....	<b>3</b>
<b>2. La fotosíntesis</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Especies reactivas de oxígeno</b> .....	<b>10</b>
<b>4. La teoría endosimbiótica</b> .....	<b>13</b>
<b>5. Señalización cloroplasto-núcleo</b> .....	<b>15</b>
5.1. Ruta de señalización de los tetrapirroles .....	18
5.2. El estado redox de la membrana tilacoidal.....	21
5.3. Metabolitos.....	24
5.4. Especies reactivas de oxígeno .....	27
5.4.1. El peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) y el superóxido (O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> ) .....	27
5.4.1.1. Función señalizadora de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	27
5.4.1.2. Comparación de transcriptomas de plantas transgénicas con niveles elevados de O <sub>2</sub> • <sup>-</sup> y de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	28
5.4.2. Función señalizadora del oxígeno singlete.....	28
5.5. Proteínas Executer.....	29
<b>Objetivos</b> .....	<b>37</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>41</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>43</b>
<b>1. Análisis de secuencia mediante herramientas bioinformáticas</b> .....	<b>43</b>
1.1. Búsqueda de secuencias y alineamiento múltiple de secuencias.....	43
1.2. Análisis filogenético.....	43
1.3. Identificación de familias y regiones conservadas .....	43
1.4. Predicción de estructura secundaria .....	43
1.5. Predicción de regiones desordenadas .....	43
<b>2. Material biológico</b> .....	<b>44</b>
2.1. Microorganismos.....	44
2.2. Material vegetal.....	44
<b>3. Vectores utilizados</b> .....	<b>45</b>
<b>4. Oligonucleótidos utilizados</b> .....	<b>51</b>
<b>5. Condiciones de cultivo de <i>Arabidopsis</i> y de tabaco</b> .....	<b>57</b>
5.1. Ensayo de crecimiento de raíces en placa vertical .....	57
5.2. Ensayo con el tratamiento lumínico .....	57
<b>6. Manipulación de microorganismos</b> .....	<b>58</b>

6.1. Manipulación y cultivo de <i>Escherichia coli</i> .....	58
6.1.1 Crecimiento, medios de cultivo y conservación de cepas de <i>E.coli</i> .....	58
6.1.2. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	58
6.1.3. Transformación química de células competentes de <i>E. coli</i> .....	58
6.2. Manipulación y cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	59
6.2.1. Crecimiento, medios de cultivo y conservación de cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	59
6.2.2. Preparación de células quimiocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1.....	59
6.2.3. Transformación de células quimiocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1.....	59
6.2.4. Transformación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101.....	60
<b>7. Aislamiento de ácidos nucleicos .....</b>	<b>60</b>
7.1. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	60
7.2. Aislamiento del ADN genómico de <i>Arabidopsis</i> .....	60
7.2.1. Aislamiento del ADN genómico de <i>Arabidopsis</i> por el método CTAB .....	60
7.2.2. Aislamiento del ADN genómico de <i>Arabidopsis</i> mediante kit comercial.....	60
7.3. Aislamiento del ARN de <i>Arabidopsis</i> .....	61
7.3.1. Aislamiento del ARN con el reactivo TRIzol® .....	61
7.3.2. Aislamiento del ARN mediante un kit comercial.....	61
<b>8. Electroforesis de ácidos nucleicos .....</b>	<b>61</b>
8.1. Electroforesis de ADN .....	61
8.2. Electroforesis de ARN .....	62
<b>9. Cuantificación de los ácidos nucleicos .....</b>	<b>62</b>
<b>10. Síntesis de ADN complementario (ADNc).....</b>	<b>62</b>
10.1. Síntesis de ADNc con SuperScript™ III Reverse Transcriptase.....	62
10.2. Síntesis de ADNc con Maxima® Reverse Transcriptase.....	62
<b>11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....</b>	<b>62</b>
11.1. PCR convencional o estándar.....	62
11.2. PCR de colonias .....	63
11.3. PCR con una polimerasa de alta fidelidad que genera extremos romos.....	63
11.4. Mutagénesis dirigida .....	63
11.5. PCR con una polimerasa de alta fidelidad que genera productos de PCR aptos para el TA Cloning® .....	65
11.6. Cuantificación relativa de PCR a tiempo real .....	65
<b>12. Digestión del ADN con enzimas de restricción .....</b>	<b>66</b>



<b>13. Desfosforilación de vectores de clonación .....</b>	<b>66</b>
<b>14. Purificación de una banda de interés del gel de agarosa .....</b>	<b>66</b>
<b>15. Purificación de un producto de PCR en disolución.....</b>	<b>66</b>
<b>16. Ligación.....</b>	<b>66</b>
<b>17. Clonación mediante la tecnología Gateway® .....</b>	<b>67</b>
17.1. Obtención del vector de entrada pCR®/GW/TOPO® con el gen de interés para el sistema de clonación Gateway® .....	67
17.2. Reacción de recombinación LR .....	68
<b>18. Secuenciación de ADN .....</b>	<b>68</b>
<b>19. Clonación de los genes de interés en los vectores de expresión comerciales .....</b>	<b>69</b>
<b>20. Electroforesis en geles desnaturalizantes y reductores de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....</b>	<b>76</b>
<b>21. Cuantificación de las proteínas .....</b>	<b>76</b>
<b>22. Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes.....</b>	<b>76</b>
22.1. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i> cepa Rosetta, BL21, C43, y Origami .....	76
22.2. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i> cepa Arctic Express .....	77
22.3. Purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a GST mediante cromatografía de afinidad con Glutación sefarosa.....	77
22.4. Expresión y purificación de la proteínas recombinante atm2Ex1-His <sub>6</sub> en <i>E. coli</i> con chaperonas.....	78
<b>23. Cuerpos de inclusión .....</b>	<b>79</b>
23.1. Lavado de los cuerpos de inclusión.....	79
23.2. Solubilización de los cuerpos de inclusión.....	79
23.3. Purificación de la proteína recombinante solubilizada a partir de los cuerpos de inclusión. ....	79
23.4. Ensayos de renaturalización de las proteínas recombinantes purificadas mediante dilución ( <i>refolding</i> ) .....	79
<b>24. Diálisis de las muestras de proteína.....</b>	<b>80</b>
<b>25. Concentración de muestras de proteínas. ....</b>	<b>81</b>
<b>26. Cromatografía de exclusión molecular.....</b>	<b>81</b>
26.1. Ensayo de interacción mediante cromatografía de exclusión molecular.....	81
<b>27. Ensayos de cristalización de proteínas .....</b>	<b>81</b>
<b>28. Entrecruzamiento (<i>cross-linking</i>) químico de proteínas .....</b>	<b>82</b>
28.1. Entrecruzamiento químico de proteínas mediado por glutaraldehído .....	82
28.2. Entrecruzamiento químico de proteínas mediado por DSS.....	82
<b>29. Geles de poliacrilamida sin SDS (<i>native PAGE</i>) .....</b>	<b>83</b>

<b>30. Transformación de las hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> mediante agroinfiltración .</b>	<b>83</b>
<b>31. Aislamiento de protoplastos de <i>Nicotiana benthamiana</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>32. Aislamiento y transformación de protoplastos de <i>Arabidopsis</i> .....</b>	<b>84</b>
32.1. Aislamiento de protoplastos de <i>Arabidopsis</i> .....	84
32.2. Transformación transitoria de protoplastos de <i>Arabidopsis</i> .....	85
<b>33. Visualización en el microscopio confocal .....</b>	<b>85</b>
<b>34. Extracción de proteínas de hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> transformadas .....</b>	<b>85</b>
<b>35. Análisis por Western blot .....</b>	<b>85</b>
<b>36. Obtención de plantas transgénicas estables <i>promotorEx1-GUS</i> y <i>promotorEx2-GUS</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>86</b>
36.1. Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	86
36.2. Selección de las líneas transgénicas homocigotas.....	86
<b>37. Tinción histoquímica de la actividad <math>\beta</math>-glucuronidasa .....</b>	<b>87</b>
<b>38. Medidas de la fluorescencia de la clorofila .....</b>	<b>87</b>
<b>39. Aislamiento de las proteínas solubles del estroma de <i>Arabidopsis</i> .....</b>	<b>88</b>
<b>40. Depleción de la proteína Rubisco.....</b>	<b>89</b>
<b>41. Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) .....</b>	<b>89</b>
41.1. Marcaje de las muestras .....	89
41.2. Primera dimensión: Enfoque isoelectrico.....	90
41.3. Segunda dimensión: SDS-PAGE .....	91
41.4. Preparación de geles bidimensionales para la identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en 2D-DIGE.....	91
41.5. Análisis de las imágenes .....	91
41.6. Digestión enzimática de las proteínas incluidas en el gel o digestión trípica en gel.	92
41.7 Identificación de proteínas por espectrometría de masas .....	92
<b>Resultados .....</b>	<b>93</b>
<b>1. Análisis estructural de las proteínas Executer.....</b>	<b>95</b>
<b>1.1. Identificación y distribución de las secuencias Executer .....</b>	<b>95</b>
<b>1.2. Análisis filogenético.....</b>	<b>95</b>
<b>1.3. Comparación y características de secuencia de la familia de proteínas Executer..</b>	<b>101</b>
1.3.1. Diseño y obtención de las proteínas recombinantes maduras Ex1 y Ex2 y de sus módulos N- y C-terminal.....	106
1.3.2. Análisis del estado oligomérico del dominio N-terminal de Ex1 y de Ex2 .....	115
1.3.3. Análisis de la interacción <i>in vitro</i> de Ex1 y Ex2 a través del dominio N-terminal .	121
<b>2. Visualización de las proteínas Ex1 y Ex2 fusionadas a proteínas fluorescentes en células de <i>Arabidopsis thaliana</i> y de <i>Nicotiana benthamiana</i> mediante microscopía confocal.....</b>	<b>126</b>

2.1. Localización subcelular de Ex1 y Ex2 en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	126
2.2. Ensayo de interacción proteína-proteína mediante BiFC en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	128
2.3. Colocalización de las proteínas Ex1 y Ex2 en nucleoides y plastoglobulos .....	131
<b>3. Patrón espacio-temporal de la expresión de los genes Ex1 y Ex2 .....</b>	<b>135</b>
3.1. Análisis de la expresión génica de <i>Ex1</i> y <i>Ex2</i> mediante qRT-PCR.....	135
3.2. Expresión de <i>patEx1::GUS</i> y <i>patEx2::GUS</i> en plantas transgénicas.....	137
3.2.1. Expresión en tejido aéreo durante la emergencia del cotiledón y del hipocotilo	138
3.2.2. Expresión en tejido aéreo durante la emergencia y maduración de roseta.....	139
3.2.3. Expresión en raíces.....	139
3.2.4. Expresión en la aparición del tallo floral.....	141
3.3. Análisis del fenotipo en plantas mutantes .....	142
3.3.1. Líneas mutantes.....	142
3.3.2. Análisis del fenotipo de las hojas roseta .....	143
3.3.3. Análisis de plantas en estadio cotiledón en diferentes condiciones .....	144
3.3.4. Análisis en raíces.....	148
<b>4. Análisis proteómico del cloroplasto de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>149</b>
4.1. Rendimiento fotosintético de las plantas mutantes <i>ex1</i> y <i>ex2</i> en comparación con las silvestres.....	149
4.2. Análisis 2D-DIGE del proteoma soluble del cloroplasto .....	150
4.3. Identificación y análisis de las proteínas diferencialmente expresadas.....	153
Cadena de transporte de electrones fotosintético .....	153
Metabolismo primario y secundario.....	153
Síntesis de proteínas del cloroplasto y homeostasis .....	154
Otras proteínas .....	154
<b>Discusión.....</b>	<b>161</b>
<b>La expansión de la familia Executer ocurrió con la aparición de espermatofitas.....</b>	<b>164</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>171</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>175</b>
<b>Material suplementario .....</b>	<b>199</b>
<b>Material suplementario.....</b>	<b>201</b>
<b>Figura A1 .....</b>	<b>201</b>
<b>Figura A2 .....</b>	<b>212</b>
<b>Tabla A1.....</b>	<b>224</b>



# Introducción



## Introducción

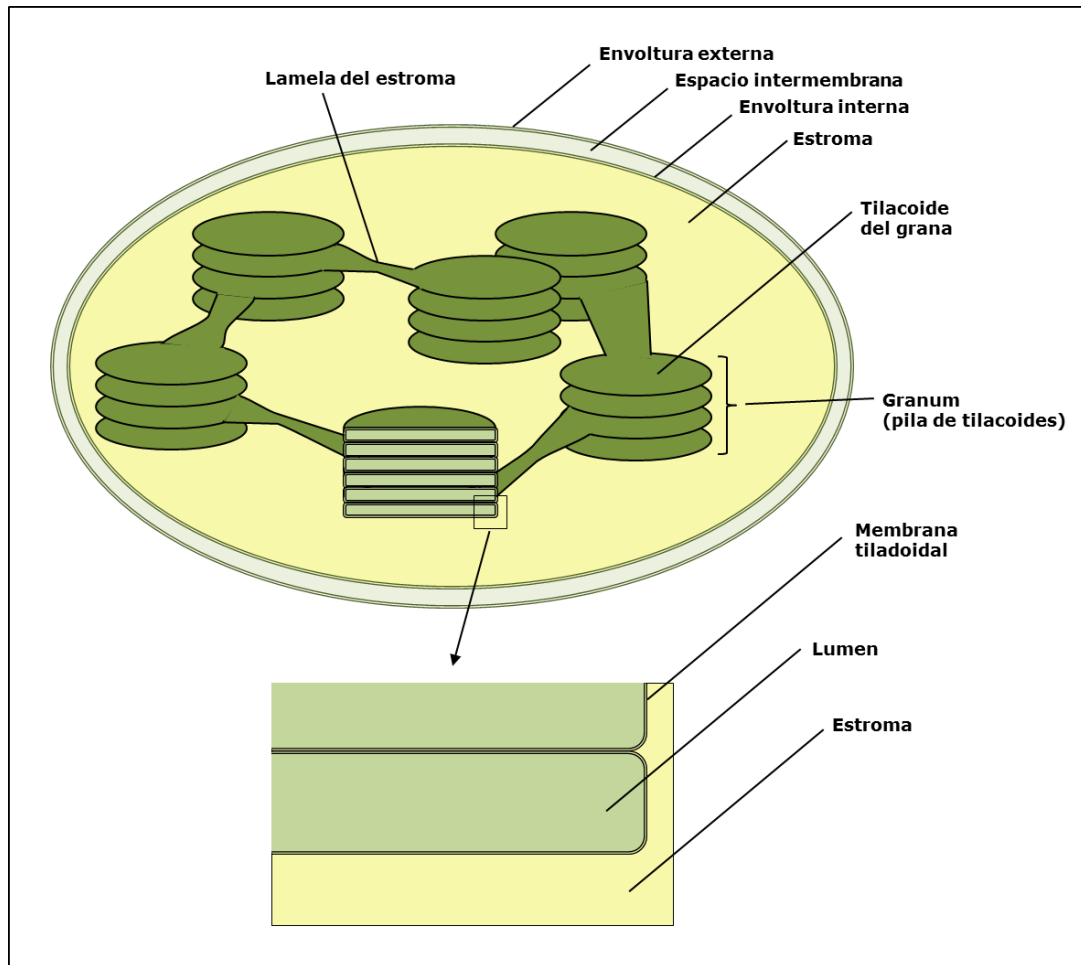
### 1. La célula vegetal y el cloroplasto

La célula vegetal es una célula eucariota delimitada por una pared celular, y una doble membrana lipídica que encierra un compartimento soluble formado por el citoplasma, el núcleo, y los orgánulos celulares. Además de mitocondrias, y a diferencia de la célula animal, la célula vegetal contiene plastidios, orgánulos esenciales para el desarrollo y el crecimiento de la planta.

Los plastidios derivan de los proplastidios, plastidios sin diferenciar que se encuentran en los meristemos y en los tejidos reproductores de las plantas. Cuando la parte aérea de la planta se expone a la luz durante el desarrollo, los proplastidios se diferencian en cloroplastos. Sin embargo, si las plantas se mantienen en oscuridad, el desarrollo de los proplastidios se detiene en un estadio intermedio y se forman etioplastos. Si las plantas se vuelven a exponer a la luz, los etioplastos continúan su desarrollo hasta cloroplastos. Además, los proplastidios se diferencian en leucoplastos, grupo de plastidios sin color importantes para el almacenamiento de lípidos (elaioplastos), almidón (amiloplastos) o proteínas (proteinoplastos); cromoplastos, donde se sintetizan y almacenan los pigmentos de la fruta, raíces/tubérculos, y flores; y los gerontoplastos, plastidios que se forman durante la senescencia. Los plastidios pueden desdiferenciarse y convertirse en otro tipo de plastidios en determinadas condiciones (Jarvis y Lopez-Juez 2013). En el cloroplasto tiene lugar la fotosíntesis y otros procesos metabólicos como la asimilación del nitrato, la biosíntesis de ácidos grasos y de aminoácidos (Waters y Langdale 2009).

En las plantas dicotiledóneas la diferenciación del cloroplasto en los cotiledones (hojas embrionarias formadas durante la embriogénesis) es diferente a la de las hojas verdaderas aunque ambos órganos contienen cloroplastos fotosintéticamente activos (Mansfield y Briarty 1996). En los cotiledones, los plastidios se desarrollan parcialmente durante la embriogénesis, pero el desarrollo se detiene durante la maduración y dormición de la semilla. En presencia de luz, los plastidios de las plántulas germinadas se desarrollan en cloroplastos funcionales. Por el contrario, durante el desarrollo de las hojas verdaderas, los proplastidios se diferencian en cloroplastos maduros. Los cloroplastos totalmente diferenciados de los cotiledones se parecen a los cloroplastos de las hojas verdaderas jóvenes, aunque normalmente contienen membranas tilacoidales menos extensas que los cloroplastos de las hojas verdaderas maduras (Deng y Gruijsem 1987). Cuando las plántulas crecen enterradas en el suelo, estas viven heterotróficamente utilizando los nutrientes almacenados en las células de los cotiledones. Durante este estadio inicial de desarrollo, los proplastidios de los cotiledones se desarrollan en etioplastos. Una vez que la plántula emerge del suelo y se expone a la luz, los etioplastos se transforman rápidamente en cloroplastos, permitiendo la fotosíntesis y cambiando el crecimiento heterótrofo por el autótrofo (Pogson *et al.* 2015). A diferencia de lo que ocurre en los cotiledones, los cloroplastos de las hojas verdaderas se desarrollan directamente de los proplastidios.

Los cloroplastos están separados del citoplasma por dos dobles membranas lipídicas: la envoltura externa y la envoltura interna, que delimita el estroma, un compartimento soluble en el que se encuentra un sistema de membranas denominadas tilacoides. Los tilacoides apilados forman los *grana* que están conectados a través de la lamela del estroma. La cavidad interior soluble de un tilacoide se denomina lumen (Figura 1). El tamaño de un cloroplasto es de 5 a 10  $\mu\text{m}$  (Taiz y Zeiger 2010).



**Figura 1.** Representación de la estructura de un cloroplasto adaptada de (Taiz y Zeiger 2002).

## 2. La fotosíntesis

Los organismos fotosintéticos son capaces de absorber y utilizar la energía lumínica para su subsistencia. La fotosíntesis comienza con la absorción de la luz por complejos pigmento-proteína denominados antena, y continúa con la canalización de la energía absorbida hacia los centros de reacción de los fotosistemas, donde la energía lumínica se transforma en energía química a través de la cadena de transporte de electrones.

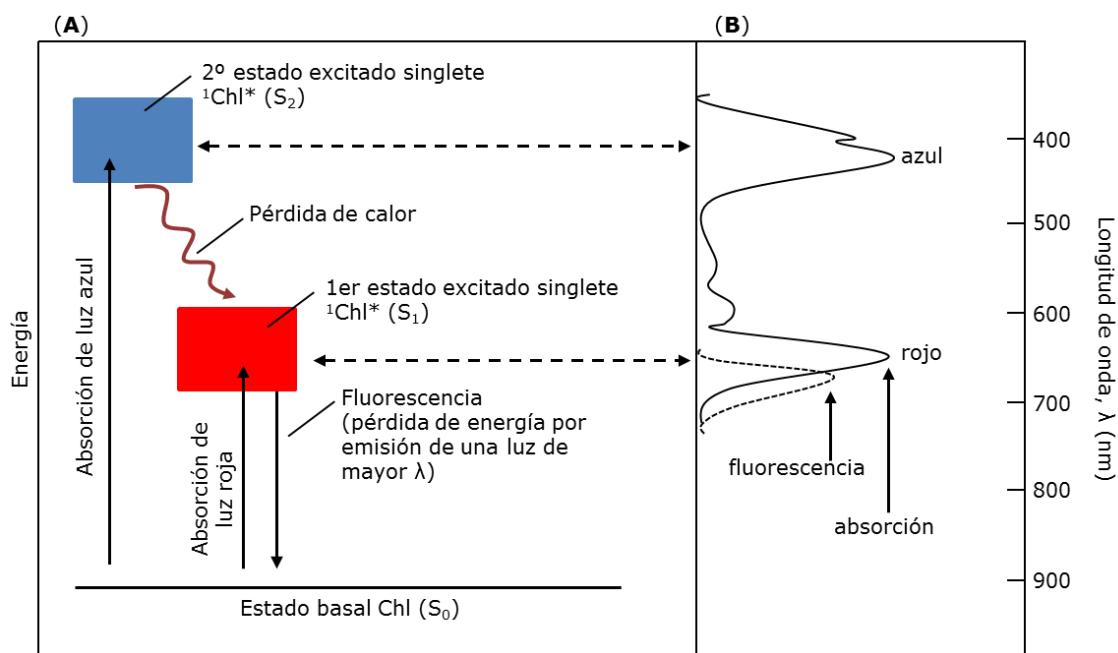
En la fotosíntesis oxigénica, las plantas, algas, y cianobacterias oxidan el agua para producir oxígeno molecular, y los electrones y protones liberados durante las reacciones de transferencia de electrones y quimiosmosis en la membrana tilacoidal se utilizan para producir energía química en forma de ATP, y poder reductor en forma de NADPH. Estos se utilizan principalmente en el ciclo de Calvin-Benson (CB) durante el cual se produce la fijación del dióxido de carbono de la atmósfera y la síntesis de compuestos de carbono (Hohmann-Marriott y Blankenship 2011).

Las clorofilas y carotenoides son los pigmentos fotosintéticos responsables de la absorción de la luz en plantas verdes. Estos se localizan en las membranas tilacoidales unidas a proteínas especializadas formando complejos proteína-pigmento. La **clorofila** es el pigmento mayoritario y las dos formas más abundantes en plantas verdes son la clorofila *a* y *b*. La molécula de clorofila está compuesta por un complejo de estructura de anillo porfirina-



implicado en la absorción de la energía lumínica—con un átomo de magnesio en el centro y un sistema de electrones en enlaces dobles conjugados, y una larga cadena hidrocarbonada hidrofóbica anclada a la membrana tilacoidal. La clorofila absorbe mayoritariamente la luz azul y roja del espectro visible, es decir, a longitudes de onda de 400-500 nm y de 600-700 nm, respectivamente (Figura 2B). En cambio, los **carotenoides** absorben en la región de 400-500 nm de longitud de onda y son polienos lineales con múltiples enlaces dobles conjugados. Los carotenoides, además de servir como pigmentos accesorio, esto es, transfieren la energía lumínica absorbida a las moléculas de clorofila, protegen el aparato fotosintético del daño fotooxidativo causado por un exceso de energía lumínica (Ort y Kramer 2009).

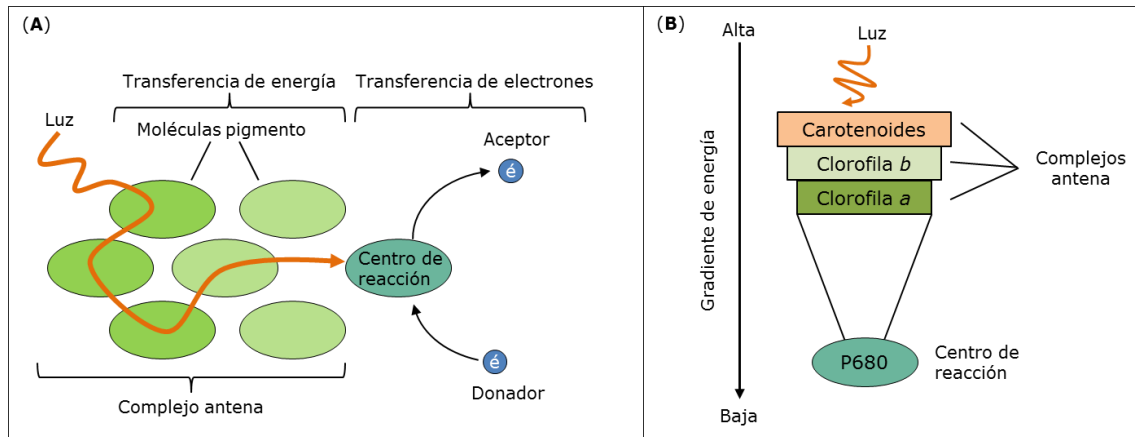
El proceso de absorción de la energía lumínica se inicia cuando un pigmento fotosintético (clorofila, Chl) en su **estado basal** absorbe un fotón a una determinada longitud de onda, pasando a un **estado excitado singlete** ( $^1\text{Chl}^*$ ) (Figura 2A). Las clorofilas *a* y *b* contienen dos absorciones principales máximas que corresponden a dos estados excitados principales. La absorción de luz azul excita la molécula de clorofila a un estado energético superior (segundo estado excitado singlete), mientras que la absorción de luz roja excita la clorofila a un estado energético inferior (primer estado excitado singlete) (Figura 2). En el estado excitado energético superior, la clorofila es muy inestable (vida media de  $10^{-12}$  s) y libera parte de su energía en forma de calor pasando al estado excitado energético inferior (Figura 2). En el estado excitado energético inferior, la clorofila es más estable (vida media de  $10^{-9}$  s) y dispone de varias vías mediante las cuales puede volver al estado basal. En primer lugar, la clorofila puede volver a emitir el fotón a través de un proceso denominado fluorescencia (Figura 2). Cuando esto sucede una parte de la energía de excitación se pierde en forma de calor antes de que se emita el fotón, por lo que la luz de la fluorescencia tiene una energía menor a la de excitación. En segundo lugar, puede convertir su energía de excitación en forma de calor sin emitir un fotón. En tercer lugar, el electrón del estado excitado singlete puede pasar a otro estado de excitación con una energía menor denominada **estado triplete**, que puede volver al estado basal emitiendo luz mediante fosforescencia. Este estado triplete no contribuye a las reacciones de transferencia de electrones y energía de la fotosíntesis. En cuarto lugar, la clorofila puede transferir su energía de excitación a otra molécula. Por último, a través del proceso denominado fotoquímica, la energía del estado excitado promueve las reacciones químicas de la fotosíntesis. La fotoquímica compite con el resto de reacciones descritas (Fujita 2005, Taiz y Zeiger 2010).



**Figura 2.** La emisión y absorción de luz de la clorofila. **A)** Diagrama que muestra el nivel de energía del estado basal y de los estados excitados de la clorofila. **B)** Espectro de absorción y fluorescencia de la clorofila. Imagen adaptada de (Taiz y Zeiger 2010).

La energía de excitación de la clorofila en el primer estado excitado singlete (<sup>1</sup>Chl\*) migra mediante la transferencia de energía por resonancia (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*) de clorofila en clorofila hasta alcanzar la clorofila del centro de reacción (Foyer *et al.* 2012) (Figura 3A).

El sistema de transporte de electrones durante la fotosíntesis en la membrana tilacoidal incorpora una vía lineal y otra cíclica. En el **transporte de electrones lineal** participan los fotosistemas I (PSI) y II (PSII) que son complejos multisubunidad pigmento-proteína integrales de membrana. Ambos fotosistemas están compuestos por un complejo central que contiene los centros de reacción y por unos complejos antena o recolectores de luz (Lhc, *light-harvesting complex*). Los complejos Lhc son proteínas tilacoidales integrales de membrana que coordinan moléculas de clorofila y carotenoides, particularmente, xantofila (Dall'Osto *et al.* 2015). Algunas de estas proteínas están asociadas con el fotosistema II y se denominan LhcII, y otras están asociadas al fotosistema I y se denominan LhcI. Los pigmentos del **complejo antena** están organizados de forma que la transferencia de energía de excitación al centro de reacción sea energéticamente favorable. La energía de excitación de los pigmentos aumenta con la distancia al **centro de reacción**, lo que significa que los pigmentos cercanos al centro de reacción tienen una energía menor que los que están alejados del centro de reacción (Figura 3B). El par especial de clorofilas *a* del centro de reacción del PSI absorbe a un máximo de 700 nm en su estado reducido y se denomina P700 (la letra P significa pigmento); y el par especial de clorofilas *a* del centro de reacción del PSII absorbe a un máximo de 680 nm y se denomina P680.



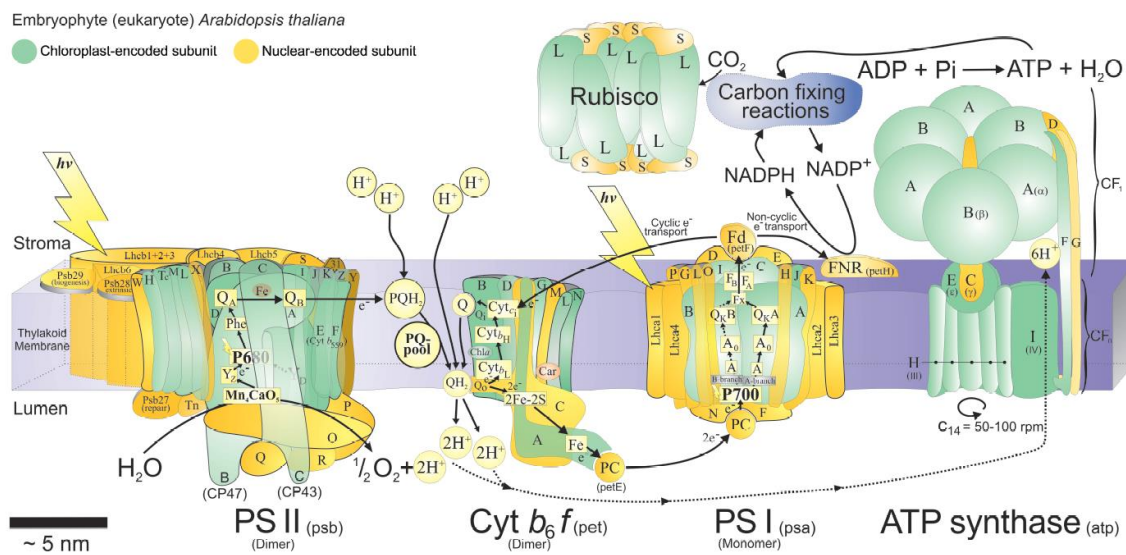
**Figura 3.** (A) Esquema de la transferencia de energía y de electrones que tiene lugar en la cadena de transporte de electrones. Los pigmentos absorben la energía de la luz, y transfieren la energía de pigmento en pigmento hasta llegar al centro de reacción, donde se produce la transferencia de electrones de un pigmento a una molécula aceptora. Un donador de electrones es el encargado de volver a reducir la clorofila en el centro de reacción. (B) Los carotenoides tienen una energía de excitación mayor que la clorofila *b*, que la clorofila *a*, y que la clorofila del centro de reacción (P680). Este gradiente de energía permite que la transferencia de energía hacia el centro de reacción sea favorable. Imágenes adaptadas de (Taiz y Zeiger 2010) y (Blankenship 2014)

P680 se excita directamente por absorción de la energía lumínica o a través de la transferencia de energía de excitación procedente de una clorofila *a* del complejo antena excitada por un fotón. P680 excitada transfiere un electrón a la **feofitina** (Pheo), una molécula de clorofila en la que el átomo de magnesio se ha sustituido por dos átomos de hidrógeno. En el lado del lumen del PSII, se produce la fotólisis del agua que libera oxígeno molecular, electrones, y protones según la siguiente reacción:  $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{ electrones}$ . En el lado oxidante del PSII, P680 oxidada se vuelve a reducir por el transportador de electrones  $\text{Y}_Z^-$  que ha recibido los electrones del agua. En el lado reductor del PSII, Pheo transfiere electrones a los aceptores **plastoquinona**  $\text{Q}_A$  y esta a su vez a plastoquinona  $\text{Q}_B$ .  $\text{Q}_B$  reducida toma dos protones del estroma produciendo la **plastohidroquinona** reducida ( $\text{PQH}_2$ ), que se disocia del PSII y transfiere sus electrones al complejo citocromo *b<sub>6</sub>f*. El complejo **citocromo b<sub>6</sub>f** es una proteína con muchas subunidades con grupos prostéticos como el citocromo *f*, el citocromo *b<sub>6</sub>*, la proteína Rieske Fe-S, las subunidades IV, G, L, M, N, y V, un grupo hemo, una clorofila y un carotenoide. Este complejo actúa como una bomba de protones en un proceso similar a un ciclo Q. En este ciclo Q, la plastohidroquinona ( $\text{PQH}_2$ ) se oxida en el sitio  $\text{Q}_0$  y uno de los dos electrones se transfiere a la proteína oxidada Rieske Fe-S—liberando dos protones al lumen—y lo pasa al citocromo *f*. A continuación, el citocromo *f* transfiere un electrón a la proteína **plastocianina** (PC), localizada en el lumen, que reduce al P700 oxidado del PSI. El otro electrón de la  $\text{PQH}_2$  oxidada se transfiere al  $\text{cyt}_{b_L}$  y  $\text{cyt}_{b_H}$  dentro del complejo *cyt<sub>b<sub>6</sub>f</sub>*, y finalmente pasa a la quinona (PQ) en el sitio  $\text{Q}_1$  para formar semiquinona ( $\text{PQH}^\bullet$ ) tomando un protón del estroma. Una segunda molécula de  $\text{PQH}_2$  repite el mismo proceso de oxidación en el sitio  $\text{Q}_0$ , y en el sitio  $\text{Q}_1$ , el segundo electrón reduce la semiquinona ( $\text{PQH}^\bullet$ ) a  $\text{PQH}_2$ —tomando un segundo protón del estroma—que se libera de  $\text{Q}_1$  y puede volver a entrar al ciclo Q otra vez (Rochaix 2011). En total, en el proceso de oxidación de una molécula de  $\text{PQH}_2$  se transfieren cuatro protones del estroma al lumen, y se reducen dos moléculas de plastocianina (Govindjee *et al.* 2010) (Figura 4).

## Introducción

El centro de reacción del **fotosistema I (PSI)**, al igual que el PSII, forma parte de un supercomplejo proteico con multisubunidades. El centro de reacción del PSI está compuesto de dos proteínas: PsaA y PsaB, junto con otras diez proteínas adicionales. El primer aceptor de electrones del P700\* es la clorofila A<sub>0</sub>, y el segundo aceptor A<sub>1</sub> es una filoquinona. Esta transfiere los electrones a una serie de proteínas de membrana hierro-azufre, que a su vez los transfieren a la proteína del estroma **ferredoxina (Fd)**, el aceptor final. La ferredoxina reducida transfiere los electrones a la enzima **ferredoxina-NADP-reductasa (FNR)** que reduce NADP<sup>+</sup> a **NADPH** (poder reductor) (Figura 4). Además de contribuir a la reducción del NADP<sup>+</sup> a través de la FNR, la ferredoxina participa como reductor en otros procesos del cloroplasto como la reducción del nitrato en amonio, la síntesis del aminoácido glutamato y la regulación mediada por tiorredoxinas de la ATP sintasa y de otras enzimas del ciclo de Calvin-Benson, entre otros (Blankenship 2014).

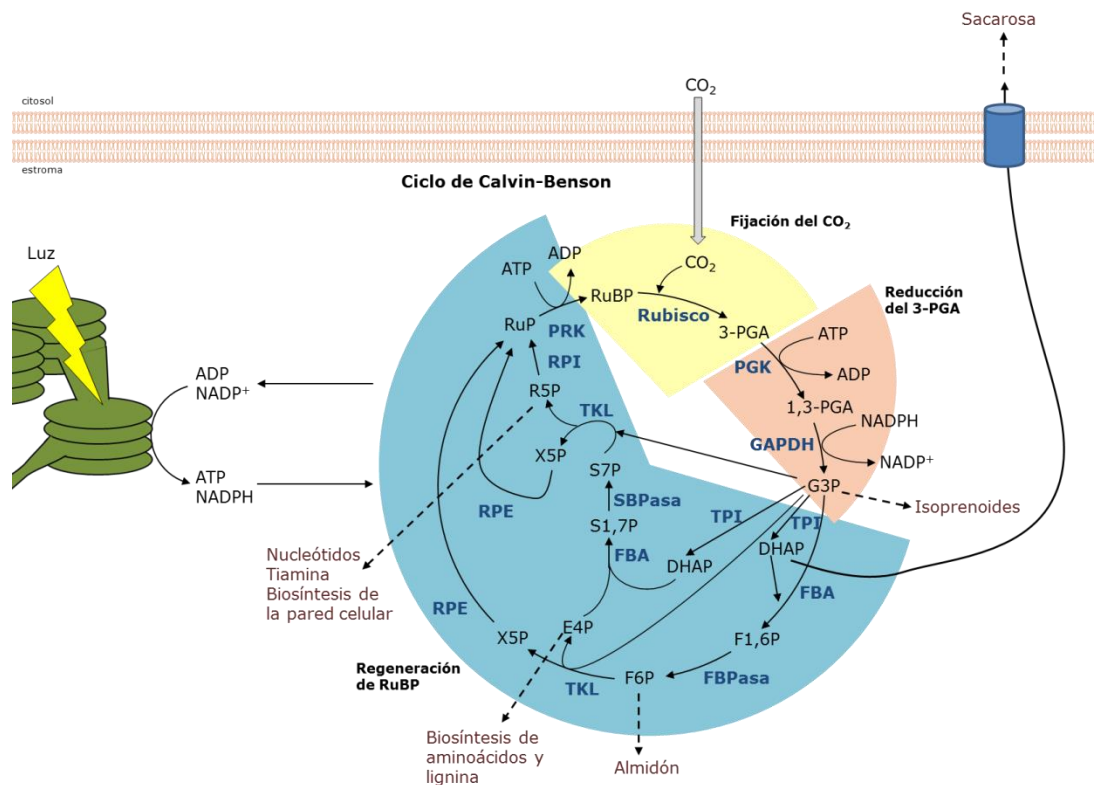
Los protones acumulados en el lumen durante la cadena de transporte de electrones se transfieren al estroma por translocación a través de la **ATP sintasa**, promoviendo la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) en el estroma. La ATP sintasa está compuesta por una porción hidrofóbica unida a la membrana tilacoidal denominada CF<sub>0</sub> y una porción que se extiende en el estroma denominada CF<sub>1</sub>. CF<sub>0</sub> forma un canal en la membrana a través del cual pueden pasar los protones. En cambio, CF<sub>1</sub> es la parte del complejo que sintetiza ATP y está formado por tres copias de los péptidos α y β situados de forma alterna. En la subunidad β se localizan los sitios catalíticos (Figura 4).



**Figura 4.** Imagen de las proteínas mayoritarias y complejos proteicos del aparato fotosintético del cloroplasto de plantas verdes tomada de (Allen *et al.* 2011). Abreviaturas: Fotosistema II (PSII), citocromo *b<sub>6</sub>f* (Cyt *b<sub>6</sub>f*), fotosistema I (PSI), ATP sintasa, y Rubisco. Las subunidades se nombran con una única letra, y se omite el prefijo de tres letras que corresponde al complejo proteico del que forman parte. Para las subunidades del fotosistema I el prefijo es *psa*, para las del fotosistema II es *psb*, para las del complejo citocromo *b<sub>6</sub>f* es *pet* (*photosynthetic electron transport*), para las de la ATP sintasa es *atp*, y para las de la Rubisco es *rbc*. Las subunidades polipeptídicas codificadas en el cloroplasto están coloreadas de verde, y las subunidades polipeptídicas codificadas en el núcleo están coloreadas de amarillo.

El **flujo de electrones cíclico** ocurre en el lado reductor del PSI a través de la plastohidroquinona ( $PQH_2$ ) y de los complejos citocromo  $b_6f$ —localizados en la lamela del estroma—y de vuelta al P700. El transporte cíclico, a diferencia del transporte lineal que genera poder reductor y ATP, produce únicamente ATP. En plantas verdes, se han descrito al menos dos vías parcialmente redundantes: la ruta dependiente de ferredoxina quinona oxidoreductasa (FQR), y la ruta dependiente NAD(P)H deshidrogenasa (NDH). En la ruta de FQR, los electrones del PSI se vuelven a transferir al complejo citocromo  $b_6f$ . En cambio, en la vía dependiente de NDH, los electrones se transportan del PSI al *pool* de PQ a través del NADPH o de la ferredoxina reducida y del complejo NDH (Foyer *et al.* 2012). La elección entre la vía cíclica y la no cíclica proporciona un grado de flexibilidad del ratio de producción de ATP y NADPH, de forma que las plantas pueden ajustar el ratio de ATP y NADPH según las necesidades de su metabolismo (Foyer *et al.* 2012). La flexibilidad en la formación de la fuerza motriz de protones y el poder reductor no solo es importante para las necesidades del ciclo Calvin-Benson y otras vías metabólicas, sino que también es muy importante para la activación y regulación de la fotosíntesis en la transición de oscuridad a luz, en respuesta a cambios rápidos en la luz ambiental y en la disponibilidad del  $CO_2$ , así como en la aclimatación a un estrés ambiental (Foyer *et al.* 2012).

El ATP y el NADPH generados durante la fotosíntesis se utilizan principalmente en los procesos de fijación y reducción del  $CO_2$  en el estroma, acumulando los compuestos orgánicos útiles para el crecimiento y el desarrollo de los organismos fotosintéticos (Figura 5).



**Figura 5.** Imagen del ciclo de Calvin-Benson adaptada de (Stitt *et al.* 2010, Raines 2011, Michelet *et al.* 2013). El ciclo consta de tres fases: la fijación del dióxido de carbono, la reducción del 3-PGA, y la regeneración de RuBP. Las enzimas del ciclo se muestran de color azul y los metabolitos en negro. Abreviaturas: RuP (Ribulosa-5-fosfato), PRK (fosforibuloquinasa), RuBP (ribulosa-1,5-bisfosfato), Rubisco (ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa), 3-PGA (3-fosfoglicerato), PGK (3-fosfoglicerato quinasa), 1,3-PGA (Glicerato-1,3-bisfosfato), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), G3P

(Gliceraldehído-3-fosfato), FBA (fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa), TPI (triosa fosfato isomerasa), DHAP (dihidroxiacetona-fosfato), F1,6P (fructosa-1,6-bisfosfato), FBPasa (fructosa-1,6-bisfosfatasa), F6P (fructosa-6-fosfato), TKL (transquetolasa), X5P (Xilulosa-5-fosfato), E4P (Eritrosa-4-fosfato), RPE (ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa), RPI (ribosa-5-fosfato isomerasa), S1,7P (Sedoheptulosa-1,7-fosfato), S7P (Sedoheptulosa-1,7-bisfosfato), SBPasa (sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa), R5P (ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa).

### 3. Especies reactivas de oxígeno

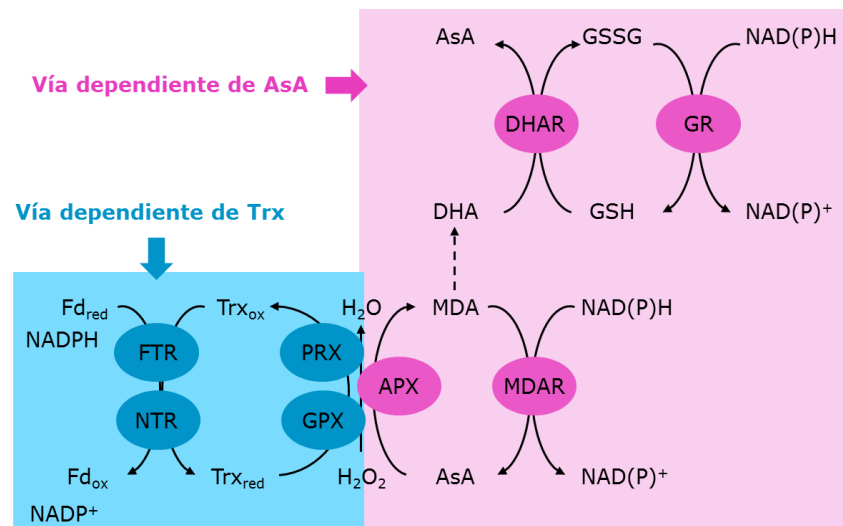
Las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) se generan en los cloroplastos en presencia de luz como consecuencia inevitable de las reacciones de transferencia de electrones y de energía que se producen en la cadena de transporte de electrones de la membrana tilacoidal junto con la producción del oxígeno molecular en el fotosistema II (Asada 2006, Galvez-Valdivieso y Mullineaux 2010).

Las plantas utilizan únicamente una proporción de la energía lumínica que absorben en la fotosíntesis (Karpinski *et al.* 1999, Li *et al.* 2009, Foyer *et al.* 2012). Se denomina exceso de energía de excitación a la cantidad de energía lumínica absorbida que excede de su capacidad fotosintética (Pfannschmidt 2003, Wilhelm y Selmar 2011). Este exceso de energía de excitación se incrementa en condiciones de estrés (Demmig-Adams y Adams 1992). La exposición a luz ultravioleta, una intensidad de luz moderada, bajas temperaturas, sequía, y bajos niveles de CO<sub>2</sub> favorecen la acumulación del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), y del radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) (Apel y Hirt 2004, Mittler *et al.* 2004, Halliwell 2006, Suzuki y Mittler 2006, Gill y Tuteja 2010, Miller *et al.* 2010) (Figura 7). En cambio, en condiciones de temperaturas moderadas, o alta y moderada intensidad de luz se acumula principalmente oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Fryer *et al.* 2002, Hideg *et al.* 2002, Krieger-Liszkay *et al.* 2008, Havaux *et al.* 2009) (Figura 7). Las ROS, en condiciones no controladas, promueven el daño fotooxidativo en el aparato fotosintético (Niyogi 1999), que a su vez favorece la disminución prolongada de la eficiencia y de la velocidad de la fotosíntesis (Long *et al.* 1994). Además, pueden causar daño a través de la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, desequilibrios metabólicos y, en determinados casos, dañar estructuras celulares y promover la muerte celular (Foyer *et al.* 2009). Por esa razón, las plantas han desarrollado mecanismos de disipación de exceso de energía para prevenir la formación de ROS como son los procesos de atenuación no fotoquímica (NPQ, *non-photochemical quenching*) y fotoquímica, junto con moléculas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas para eliminar las ROS ya formadas. En cambio, en condiciones controladas, las ROS tienen una función—diferente a la modulación en la concentración de ROS—como moléculas señalizadoras que regulan la expresión nuclear de genes en respuesta a estrés para controlar el crecimiento y desarrollo de la planta, la defensa de patógenos, el comportamiento de los estomas, la producción de hormonas en respuesta a estrés, la aclimatación, y la muerte celular programada (Apel y Hirt 2004, Galvez-Valdivieso y Mullineaux 2010, Foyer y Shigeoka 2011).

El **peróxido de hidrógeno** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el **radical superóxido** (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), y los **radicales hidroxilo** (OH<sup>•</sup>) se generan principalmente por transferencia de electrones desde PSI al oxígeno molecular en su estado basal triplete. En el PSI, el primer producto que se obtiene de la reducción del oxígeno es el radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) que se metaboliza en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por la superóxido dismutasa (SOD) (Asada 2006). El radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>) se genera mediante el mecanismo Haber-Weiss cuya reacción neta es: O<sub>2</sub><sup>•-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → O<sub>2</sub> + OH<sup>-</sup> + OH<sup>•</sup>. La velocidad de la reacción es muy lenta, por lo que es catalizada por iones metálicos de transición como el hierro.



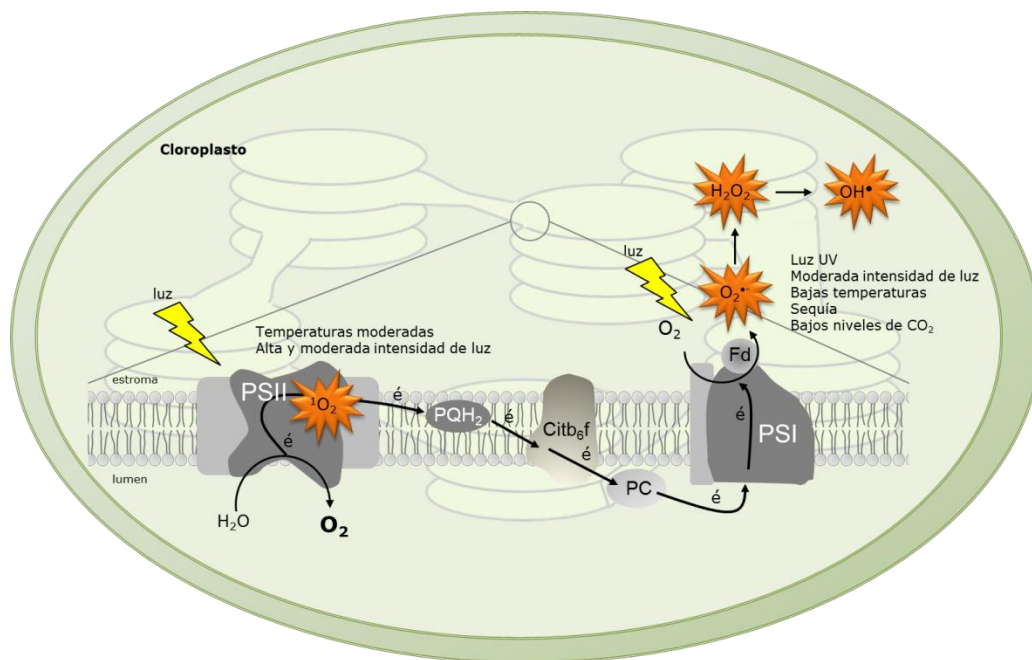
Entre los procesos de atenuación que metabolizan estas ROS se encuentran la fotorespiración, la clororespiración, el transporte de electrones cíclico, y el ciclo agua-agua. La fotorespiración utiliza poder reductor para regenerar el  $\text{NADP}^+$ , por lo que previene la sobrerreducción de la cadena de transporte de electrones (Kozaki y Takeba 1996). La oxidasa terminal del plastidio (PTOX) está involucrada en la clororespiración y actúa como una válvula de escape de electrones previniendo la sobrerreducción de los aceptores del PSII y la fotoinhibición del PSII (Rumeau *et al.* 2007). El flujo de electrones cíclico entorno al PSI (Foyer *et al.* 2012) previene la sobrerreducción del lado aceptor del PSI y la formación de superóxido y peróxido de hidrógeno. La reducción del peróxido de hidrógeno a agua se lleva a cabo a través de dos vías: el ciclo agua-agua dependiente de ascorbato en el que están involucradas la enzima ascorbato peroxidasa unida al tilacoide y del estroma (tAPX, sAPX) acoplada a la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) o a la dehidroascorbato reductasa (DHAR) y a la glutatión reductasa (GR); y la vía independiente de ascorbato que utiliza peroxirredoxinas (PRX), glutatión peroxidasa (GPX), sulfirredoxina, y ciclofilina que actúan junto con las tiorredoxinas (TRX) en el cloroplasto (Foyer y Shigeoka 2011) (Figura 6).



**Figura 6.** Imagen de la vía dependiente de AsA y la vía dependiente de Trx que eliminan el peróxido de hidrógeno en los cloroplastos adaptada de (Foyer y Shigeoka 2011). Abreviaturas: AsA (ascorbato), Trx (tiorredoxina), GSSG (glutatión oxidado), GSH (glutatión reducido), DHA (dehidroascorbato), DHAR (dehidroascorbato reductasa), GR (glutatión reductasa), MDA (monodehidroascorbato), MDAR (monodehidroascorbato reductasa), PRX (peroxirredoxina), GPX (glutatión peroxidasa),  $\text{Trx}_{\text{ox}}$  (tiorredoxina oxidada),  $\text{Trx}_{\text{red}}$  (tiorredoxina reducida), FTR (ferredoxina tiorredoxina reductasa), NTR (NADP-tiorredoxina reductasa),  $\text{Fd}_{\text{red}}$  (ferredoxina reducida), y  $\text{Fd}_{\text{ox}}$  (ferredoxina oxidada).

La formación del **oxígeno singlete** ( $^1\text{O}_2$ ) se produce principalmente en el PSII como resultado de las reacciones de transferencia de energía del estado triplete de los pigmentos excitados al oxígeno molecular en su estado triplete (Asada 2006). En plantas, la clorofila es el pigmento fotosensible que produce  $^1\text{O}_2$ . En los **complejos antena**, la absorción de un fotón eleva la clorofila a su estado excitado singlete ( $^1\text{Chl}^*$ ), y a través del cruzamiento intersistema (*intersystem crossing*, ISC) se genera el estado excitado triplete de la clorofila ( $^3\text{Chl}^*$ ). El estado triplete de la clorofila transfiere su energía al oxígeno molecular en su estado basal triplete convirtiéndolo en la forma singlete (Figura 8) según la siguiente reacción:  $\text{Chl} + \text{luz} \rightarrow ^1\text{Chl}^* \rightarrow ^3\text{Chl}^* + ^3\text{O}_2 \rightarrow \text{Chl} + ^1\text{O}_2$ . Los carotenoides atenúan la mayoría de la  $^3\text{Chl}^*$  formada en los complejos antena (Jahns y Holzwarth 2012) (Figura 8). En el **centro de reacción del PSII**, se produce una separación de cargas entre la clorofila oxidada  $\text{P680}^+$  y la feofitina reducida ( $\text{Pheo}^-$ ).

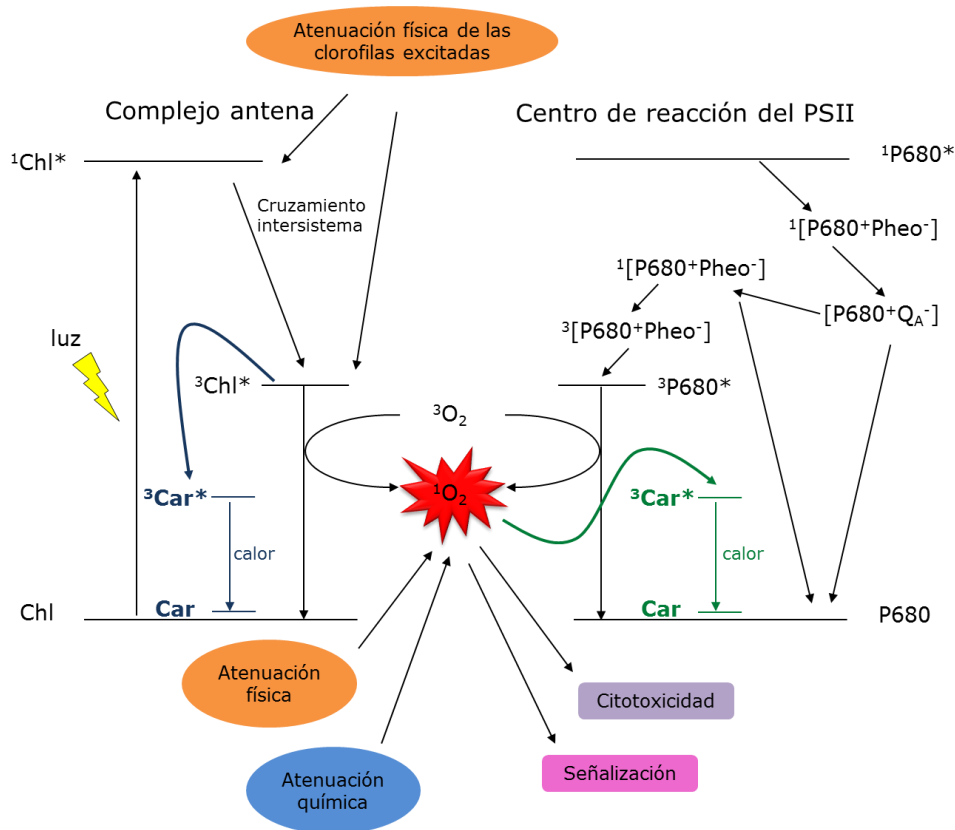
) y se forma el primer par radical ( $P680^+Pheo^-$ ), que se estabiliza por la transferencia de un electron de  $Pheo^-$  al aceptor de  $Q_A$  formando el segundo par radical ( $P680^+Q_A^-$ ) (Figura 8). Cuando el transporte de electrones desde la  $Q_A$  a la  $Q_B$  está inhibido, tiene lugar la reacción reversa del transporte de electrones desde  $Q_A^-$  a  $Pheo$  que da como resultado la formación del par radical  $^1(P680^+Pheo^-)$  con menor energía que el primer par radical  $^1(P680^+Pheo^-)$  formado por separación de cargas (Krieger-Liszky 2005) (Figura 8). Cuando el potencial redox de las parejas redox  $Q_A/Q_A^-$  y  $Pheo/Pheo^-$  es más positivo (capacidad oxidante elevada), la recombinación de cargas de los pares ( $P680^+Q_A^-$ ) y ( $P680^+Pheo^-$ ) favorece la vuelta de P680 al estado singlete basal (Figura 8). En cambio, cuando el potencial redox de  $Q_A/Q_A^-$  es más negativo (capacidad reductora elevada), se promueve el transporte de electrones desde  $Q_A^-$  a  $Pheo$  y la formación del par radical  $^1(P680^+Pheo^-)$  (Figura 8). A continuación, el par radical  $^1(P680^+Pheo^-)$  puede convertirse al par radical triplete  $^3(P680^+Pheo^-)$  (Figura 8). La recombinación de cargas del par triplete radical  $^3(P680^+Pheo^-)$  favorece la formación de la clorofila en el estado triplete excitado  $^3P680^*$  (Figura 8). La energía de excitación del estado triplete  $^3P680^*$  se transfiere al oxígeno molecular en el estado triplete  $^3O_2$  generando el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y la clorofila al estado singlete basal P680 (Figura 8). En el centro de reacción del PSII, la distancia entre la clorofila P680 y las dos moléculas  $\beta$ -carotenos es bastante grande como para que se produzca la atenuación de  $^3P680$  (Trebst 2003, Umena *et al.* 2011). En este caso, los carotenoides reaccionan químicamente con el  $^1O_2$  producido en los centros de reacción del PSII, generando productos de oxidación (Figura 8).



**Figura 7.** Generación de las especies reactivas de oxígeno en el cloroplasto. Imagen adaptada de (Pogson *et al.* 2008).

Particularmente el  $^1O_2$ , en condiciones no controladas, causa un daño oxidativo de lípidos (Triantaphylidès *et al.* 2008), de proteínas (Davies 2003) y de ácidos nucleicos (Sies y Menck 1992). En cambio, en condiciones controladas el  $^1O_2$  también actúa como una molécula señalizadora que desencadena respuestas celulares como la aclimatación, los mecanismos de reparación, y la activación de la muerte celular programada (Apel y Hirt 2004) (Figura 8).





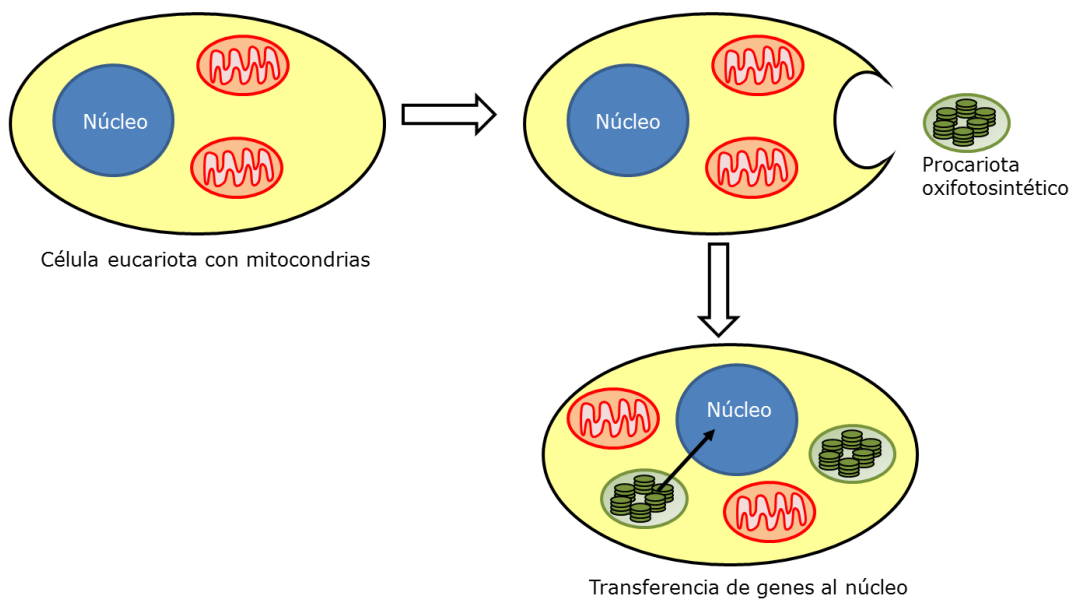
**Figura 8.** Formación del oxígeno singlete en los complejos antena y en el centro de reacción del PSII. Para evitar y controlar la producción del oxígeno singlete, las plantas poseen sistemas de defensa entre los que se encuentran la atenuación física y química. La prevención de la producción del  $^1\text{O}_2$  se hace en primer lugar controlando los niveles de  $^1\text{Chl}$  a través de la atenuación no fotoquímica. En los complejos antena, los carotenoides previenen la formación del  $^1\text{O}_2$  por atenuación física de  $^3\text{Chl}^*$ , y además desactivan directamente el  $^1\text{O}_2$  producido. En el centro de reacción del PSII, el  $\beta$ -caroteno tiene una función similar. Después de la atenuación, los carotenoides excitados disipan el exceso de energía en forma de calor. La acumulación de  $^1\text{O}_2$  se controla en último lugar mediante los procesos de atenuación química con compuestos como los carotenoides, los tocoferoles, el ascorbato, los ácidos grasos saturados y también proteínas como la D1. En condiciones no controladas, el  $^1\text{O}_2$  es una molécula citotóxica, mientras que en condiciones controladas actúa como una molécula señalizadora. Imagen adaptada de (Triantaphylidès y Havaux 2009) y de (Pospíšil 2012).

#### 4. La teoría endosimbiótica

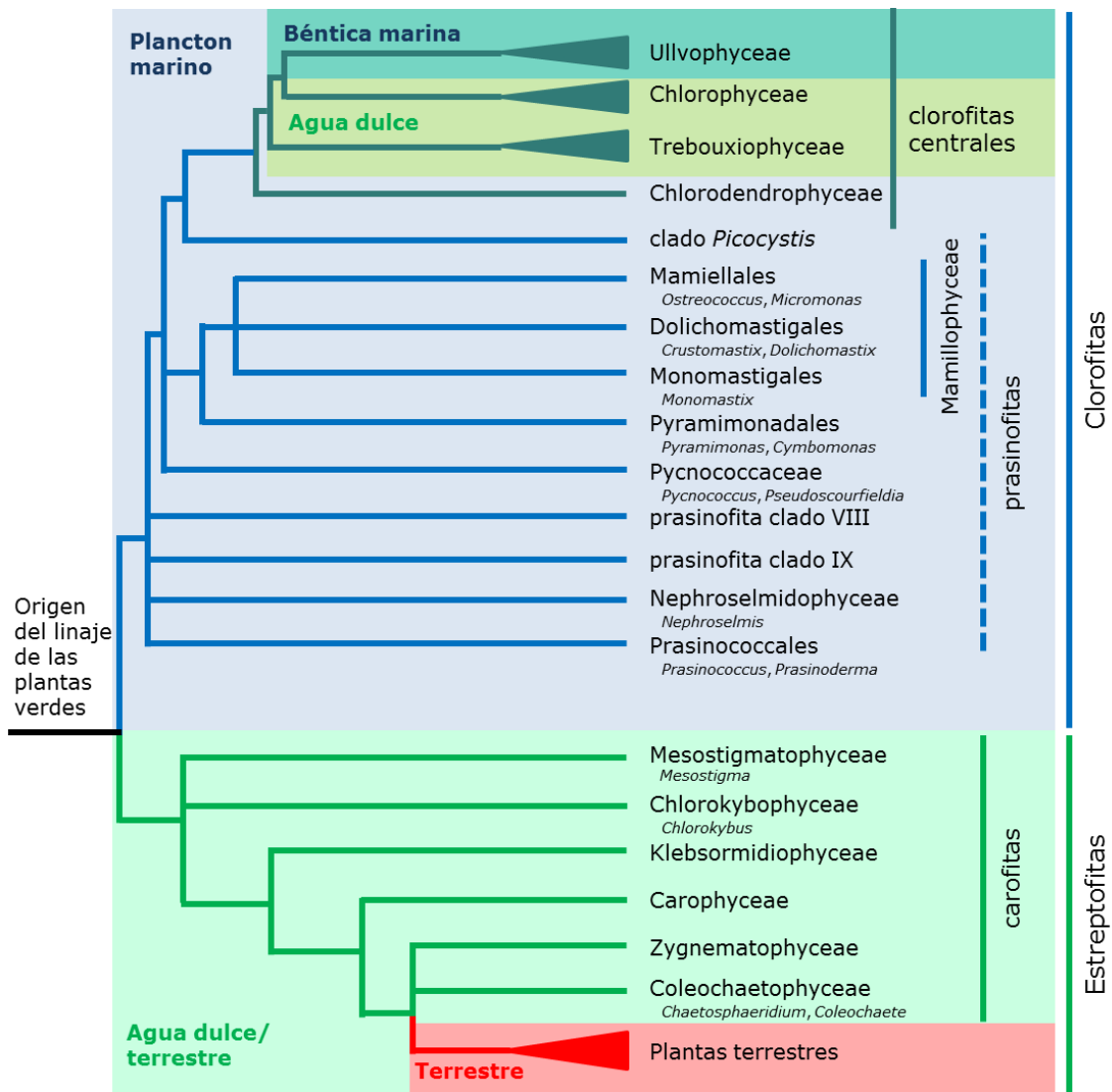
El origen del cloroplasto se explica gracias a la aceptada **teoría endosimbiótica** (Figura 9). Según esta, un eucariota, que ya contenía mitocondrias, incorporó un procarionta oxifotosintético, ancestro de las actuales cianobacterias, formando una asociación simbiótica entre el organismo procarionta y el eucariota (Dyall *et al.* 2004). Este evento marcó el origen de la fotosíntesis oxigénica en eucariotas y dio lugar a tres linajes autótrofos con plastidios primarios: las plantas verdes, las algas rojas, y las glaucofitas. En la evolución de las plantas verdes, se produjo una división temprana que dio lugar a sus dos principales linajes, los cuales siguieron trayectorias drásticamente diferentes (Figura 10) (Lewis y McCourt 2004, Lemieux *et al.* 2007, Rodríguez-Ezpeleta *et al.* 2007). Uno de los linajes, las clorofitas, diversificó como plancton en los océanos y dio lugar a las modernas prasinofitas y a las clorofitas centrales que a su vez se dividieron en ambientes de la costa marina y de agua dulce (Figura 10). Las clorofitas incluyen una gran diversidad de algas verdes con una variedad de formas del cuerpo,

## Introducción

características ecofisiológicas, y estrategias del ciclo de la vida (Lewis y McCourt 2004). El segundo linaje, las estreptofitas, evolucionaron en hábitats de agua dulce y terrestre húmedo, y colonizaron la tierra seca hace aproximadamente 476-432 millones de años, dando lugar a las plantas terrestres (McCourt *et al.* 2004) (Figura 10). Las estreptofitas contemporáneas se componen de una diversa variedad de principalmente algas de agua dulce (también denominadas carofitas) y una enorme cantidad de especies de plantas terrestres (McCourt *et al.* 2004). Las carofitas son generalmente algas verdes de agua dulce con morfologías diversas que van desde unicélulas simples y filamentos a macrofitas complejas y altamente especializadas. La colonización de la tierra seca implicó muchos desafíos como la desecación, el aumento de fluctuaciones en la temperatura, la exposición a radiación UV y la gravedad (Waters 2003, Floyd y Bowman 2007, Lang *et al.* 2008). Varias innovaciones fisiológicas y morfológicas llevaron a una adaptación exitosa a la vida terrestre (Graham *et al.* 2000, Waters 2003, Becker y Marin 2009). Algunas de estas innovaciones como las paredes celulares de celulosa, la multicelularidad, las células y los tejidos diferenciados, las redes de comunicación intercelulares (plasmodesmos y hormonas de plantas), la retención del cigoto y la placenta—se encontraron también en una o dos carofitas y de este modo evolucionaron antes del origen de las plantas terrestres (Graham *et al.* 2000, Becker y Marin 2009). Otras innovaciones como la historia de la vida sexual que implica una alternancia de dos cuerpos multicelulares, y embriones protegidos parecen ser exclusivos de las plantas terrestres (Graham *et al.* 2000). La osmoregulación, la desecación y tolerancia al frío, y la resistencia al calor son adaptaciones adicionales a la vida en la tierra seca (Waters 2003, Rensing *et al.* 2008).



**Figura 9.** Representación esquemática de la teoría endosimbiótica.



**Figura 10.** Relaciones filogenéticas entre los dos principales linajes de las plantas verdes. Imagen adaptada de (Leliaert *et al.* 2011).

## 5. Señalización cloroplasto-núcleo

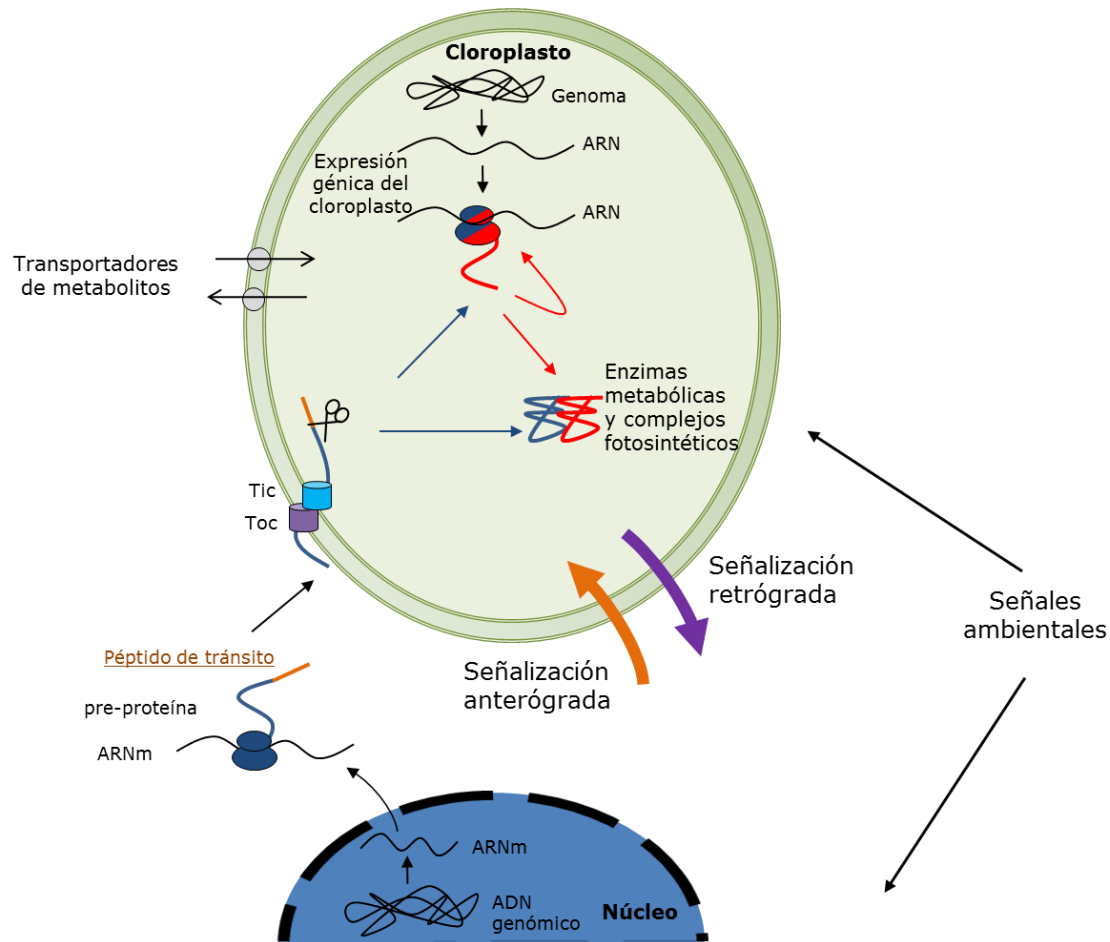
En la transición del endosimbionte al orgánulo plastidio, muchos genes del endosimbionte se perdieron, otros muchos se transfirieron al genoma nuclear del hospedador, y unos pocos se mantuvieron en el orgánulo (Keeling 2010). Aunque se localizan más de 3000 proteínas en el cloroplasto (Leister 2003), pero solo unas 100 proteínas se codifican en el plastoma, el genoma del cloroplasto (Sato *et al.* 1999, Timmis *et al.* 2004). La mayoría de las proteínas cloroplastídicas se codifican en el núcleo y se sintetizan en el citoplasma en forma de pre-proteínas. Las pre-proteínas se transportan al cloroplasto gracias a un péptido de tránsito localizado en el extremo N-terminal que es reconocido por dos complejos multiproteicos denominados translocones localizados en las membranas de la envoltura externa (TOC) y en la envoltura interna (TIC) del cloroplasto (Balsera *et al.* 2009) (Figura 11). Una vez en el interior del cloroplasto, la peptidasa de procesamiento del estroma (SPP, *stromal processing peptidase*) elimina el péptido de tránsito (Teixeira y Glaser 2013) y las proteínas maduras del estroma adquieren su conformación funcional. Las proteínas de la envoltura interna, la membrana tilacoidal, o el lumen se dirigen al compartimento en las que son funcionales (Jarvis y Lopez-

Juez 2013). Además existen otras vías a través de las cuales determinadas proteínas entran al cloroplasto (Jarvis 2008).

El ADN cloroplastídico (cpDNA, *chloroplast DNA*) codifica para algunas proteínas fotosintéticas como son algunos componentes de los fotosistemas I y II, algunas subunidades del complejo citocromo *b<sub>6</sub>f* y de la ATP sintasa; o la subunidad mayor de la proteína RuBisCO (RbcL) (Berry *et al.* 2013). Además el genoma contiene los genes que codifican para las subunidades del ARN ribosómico 16S, 23S, y 5S; para las subunidades del ARN de transferencia 27S, 28S, 29S, 30S, y 31S, y para tres de las cuatro subunidades de la ARN polimerasa de tipo procariota *rpoB*, *C1*, y *C2* (Green 2011).

La localización dual de muchos complejos proteicos cloroplastídicos, esenciales para la fotosíntesis y el metabolismo, requiere que tanto la síntesis como el ensamblaje de los complejos multiproteicos estén estrictamente controlados durante los cambios en los estadios de desarrollo de la célula y bajo condiciones ambientales que varían como son los cambios rápidos en el estado redox, el daño oxidativo, y los cambios en la disponibilidad de nutrientes (Figura 11).

La coordinación entre el núcleo y el cloroplasto es vital para mantener las funciones cloroplastídicas y celulares para el desarrollo y el crecimiento de la planta. La comunicación que se produce del núcleo al plastidio se denomina anterógrada (Woodson y Chory 2008, Jung y Chory 2010). En cambio, en la **señalización retrógrada**, el plastidio emite diferentes señales al núcleo, a través de las cuales comunica su estado metabólico y de desarrollo, que el núcleo interpreta y responde regulando la expresión de los genes nucleares que apoyan o mejoran las funciones del plastidio (Nott *et al.* 2006, Pfannschmidt 2010, Barajas-López *et al.* 2013, Chi *et al.* 2013) (Figura 11).



**Figura 11.** La mayoría de las proteínas cloroplásticas codificadas en el núcleo entran al cloroplasto a través del complejo TOC-TIC. Una vez dentro del cloroplasto, se ensamblan con otras proteínas para formar complejos proteicos como los involucrados en la expresión génica del cloroplasto, enzimas metabólicas y complejos fotosintéticos. Asimismo, se produce un intercambio de metabolitos entre el cloroplasto y el núcleo. La comunicación entre el cloroplasto y el núcleo está altamente regulada y coordinada durante la biogénesis del cloroplasto y en respuesta a señales ambientales. Esta comunicación se produce a través de la señalización anterógrada (del núcleo al cloroplasto) y de la señalización retrógrada (del cloroplasto al núcleo). Imagen adaptada de (Finazzi *et al.* 2003).

La primera evidencia de la vía de señalización del cloroplasto al núcleo se sugirió en el trabajo de (Bradbeer *et al.* 1979), en el que se trabajó con los mutantes de cebada (*Hordeum vulgare* L. cv. Haisa) *albostrians* y *Saskatoon*. Estos mutantes contienen plastidios sin diferenciar, son deficientes en los ribosomas plastídicos, y poseen poca cantidad de clorofila. Estos plastidios, inactivos fotosintéticamente, tienen bloqueada la síntesis de enzimas plastídicas codificadas en el núcleo como la familia de genes *Lhc*, la subunidad pequeña de la *Rubisco* (*Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa*, *RbcS*), y las enzimas del ciclo de Calvin-Benson (Hess *et al.* 1991, Hess *et al.* 1994). Estos resultados sugirieron que los plastidios dañados envían algún tipo de señal al núcleo que regula la expresión de proteínas plastídicas codificadas en el núcleo.

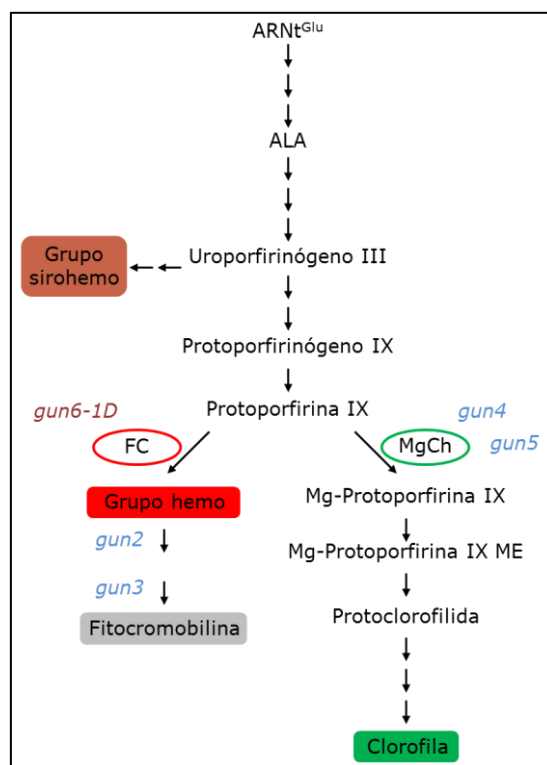
Las señales plastídicas se pueden agrupar en función del estadio de desarrollo de los plastidios y de la célula en la que residen (Pogson *et al.* 2008). El **control biogénico** corresponde a las señales que actúan durante el desarrollo inicial del cloroplasto, en el que se requiere un control del estadio y una correcta estequiometría de las subunidades y cofactores de

complejos proteicos para su ensamblaje. El **control operativo** se refiere a las señales que se producen en el cloroplasto maduro cuando está sometido a cambios en las condiciones ambientales, en el que se realizan ajustes rápidos para optimizar el rendimiento fotosintético.

Dentro del control operativo, las señales se pueden clasificar dependiendo de las condiciones de estrés por las que han sido generadas: los intermediarios de la biosíntesis de los tetrapirroles, el estado redox de la membrana tilacoidal (Pfalz *et al.* 2012, Foyer y Noctor 2013), y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Foyer y Noctor 2008, Galvez-Valdivieso y Mullineaux 2010). Asimismo el cloroplasto comunica su estado metabólico al núcleo exportando metabolitos como fosfonucleótidos, intermediarios isoprenoides, productos de la oxidación del  $\beta$ -caroteno (Woodson y Chory 2012), carbohidratos, o a partir del intercambio de poder reductor (Kleine *et al.* 2009).

### 5.1. Ruta de señalización de los tetrapirroles

Las plantas verdes sintetizan cuatro tipos de tetrapirroles a partir de una ruta de biosíntesis común en los plastidios: la clorofila, el grupo hemo, el grupo sirohemo, y la fitocromobilina (Tanaka y Tanaka 2007, Mochizuki *et al.* 2010) (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema de la ruta de los tetrapirroles. Abreviaturas: ARNt<sup>Glu</sup> (glutamil-ARNt), ALA (ácido 5-aminolevulínico), FC (ferroquelatasa), MgCh (Mg-quelatasa), Mg-Protoporfirina IX ME (Mg-Protoporfirina IX metil éster). Los mutantes *gun* (*genome uncoupled*): *gun2* (mutación en el gen que codifica para la hemo oxigenasa), *gun3* (mutación en el gen que codifica para la fitocromobilina sintasa), *gun4* (mutación en el gen que codifica para la proteína GUN4 que activa la enzima Mg-quelatasa), *gun5* (mutación en el gen que codifica para la subunidad H de Mg-quelatasa), *gun6-1D* (sobre-expresión de la enzima ferroquelatasa 1 plastídica (FC1)).

La implicación de los tetrapirroles en la comunicación retrógrada se estudió en el alga *Chlamydomonas*. En un primer trabajo, se bloquearon las reacciones de Protoporfirina IX a

hemo y de Mg-Protoporfirina IX a Protoclorofilida con  $\alpha,\alpha$ -dipiridil, causando la acumulación del intermediario porfirina Mg-protoporfirina metil éster (Figura 12), y la posterior represión de la transcripción de *Lhcb* (Johanningmeier y Howell 1984, Johanningmeier 1988). Los resultados de estudios posteriores sugieren que las moléculas Mg-Protoporfirina IX y el grupo hemo actúan como señalizadoras que afectan la expresión génica nuclear en *Chlamydomonas* (Kropat *et al.* 1997, von Gromoff *et al.* 2008).

Para tratar de averiguar las señales emitidas desde el cloplasto al núcleo en plantas, se utilizaron inhibidores específicos de las funciones plastídicas. El herbicida norflurazon (NF), un inhibidor de la enzima fitoeno desaturasa (Pds, *phytoene desaturase*) de la ruta de biosíntesis de los carotenoides (Chamovitz *et al.* 1991) disminuye la producción de carotenoides. En ausencia de carotenoides, la clorofila en su estado excitado triplete reacciona con el oxígeno molecular en estado basal generando oxígeno singlete, lo que causa un daño fotooxidativo en los cloroplastos (Oelmüller 1989). Las plantas silvestres tratadas con norflurazon reprimen la expresión de los genes *Lhcb* (Oelmüller 1989). En cambio, los **mutantes *gun*** (*genome uncoupled*) generados—en los que el desarrollo del cloroplasto está bloqueado por norflurazon—presentan un incremento en los niveles de transcritos de *Lhcb*. Se sugirió que, debido al daño producido en el estado funcional de los plastidios, se emite una señal del cloroplasto al núcleo que comunica su estado reprimiendo la expresión de genes nucleares que son necesarios para el desarrollo normal de los cloroplastos. Por esta razón, se propuso que en los mutantes *gun* esa comunicación entre el cloroplasto y el núcleo está dañada (Susek *et al.* 1993).

De los cinco mutantes aislados, *gun2* y *gun3* tienen mutaciones en los genes que codifican para la Hemo oxigenasa y la Sintasa fitocromobilina, respectivamente (Figura 12), lo que causa la acumulación del grupo hemo (Mochizuki *et al.* 2001). En cambio, los mutantes *gun4* y *gun5* están directamente asociados con la biosíntesis de Mg-protoporfirina IX (Larkin *et al.* 2003, Adhikari *et al.* 2011) (Figura 12).

Las actividades biológicas de las proteínas GUN2, GUN3, GUN4, y GUN5 indican que la acumulación de **Mg-protoporfirina IX** puede estar involucrada en la represión de los genes nucleares fotosintéticos (Strand *et al.* 2003). Asimismo, se sugirió que la Mg-Protoporfirina acumulada se exporta del cloroplasto al núcleo según la visualización *in vivo* en plantas tratadas con norflurazon (Ankele *et al.* 2007), aunque el mecanismo mediante el cual eso sucede es desconocido. Sin embargo, el papel de la Mg-protoporfirina IX como la señal emitida por el plastidio se cuestionó en dos estudios complementarios, en los que se demostró que los cambios en la acumulación de Mg-protoporfirina IX no se correlacionan con los cambios en la expresión génica de *Lhcb* (Mochizuki *et al.* 2008, Moulin *et al.* 2008). Se sugirió que el origen de la señal plastídica puede ser la acumulación de ROS, la actividad de Mg-quelatasa o la acumulación de Mg-Protoporfirina IX transitoria y local, que es difícil detectar (Mochizuki *et al.* 2008, Moulin *et al.* 2008, Mochizuki *et al.* 2010). Un trabajo posterior detectó que, en presencia de norflurazon, se produce un incremento transitorio de Mg-Protoporfirina IX en los cloroplastos y en el citosol de plantas maduras de *Arabidopsis* además de generar señales ROS (Zhang *et al.* 2011). Sin embargo, la ruta mediante la cual los tetrapirroles se transportan desde el cloroplasto al núcleo continúa siendo desconocida.

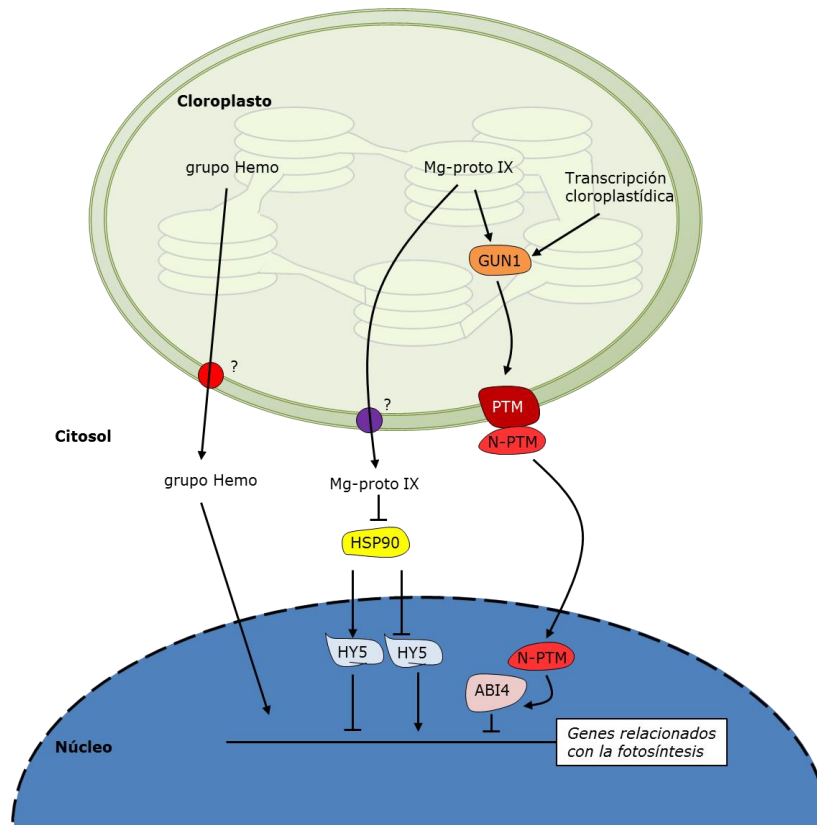
Se propuso un modelo en el que GUN1 actúa como una proteína integradora de las múltiples señales en el cloroplasto—la vía de Mg-Protoporfirina IX, la vía de la expresión génica plastídica, y la vía del estado redox (reducción/oxidación) de la cadena de transferencia de electrones fotosintética—que genera o transmite una señal hacia el núcleo en el que se induce al

factor de transcripción ABI4 (*Apetala 2-type transcription factor Abscisic acid-Insensitive 4*) (Koussevitzky *et al.* 2007) o se suprime al factor de transcripción GLK1 (*Golden 2-like 1*) (Kakizaki *et al.* 2009) bloqueando la expresión de genes fotosintéticos en el núcleo (Figura 13). Aunque todavía se desconoce su función bioquímica, GUN1 es una proteína de localización cloroplastídica que contiene dominios de repetición pentatricopéptido (PPR, *pentatricopeptide-repeat*) (Koussevitzky *et al.* 2007), que podrían estar implicados en la unión a ARN (Barkan y Small 2014). GUN1 tiene una gran similitud con la proteína pTAC2 (*Plastid transcriptionally active chromosome protein2*) (Pfalz *et al.* 2006), y al igual que ella, está asociada a los sitios de transcripción activos en el ADN plastídico (Koussevitzky *et al.* 2007). En un trabajo posterior, se demostró que la transcripción plastídica genera dos señales retrógradas independientes mediadas por SIG2 y por SIG6—factores sigma que utiliza la polimerasa de ARN codificada en el plastidio—en las que GUN1 está involucrada para modificar la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis (Woodson *et al.* 2013). Se sugirió que GUN1 puede regular la estabilidad de transcritos plastídicos como ARN<sup>Glu</sup>—el sustrato de glutamil-ARNt reductasa que corresponde al paso limitante de la síntesis de tetrapirroles—(Woodson *et al.* 2013). Como alternativa, se ha sugerido que GUN1 reprime el desarrollo del cloroplasto o la síntesis de la señal justo antes o después de la biosíntesis de ALA en lugar de integrar las diferentes señales (Terry y Smith 2013).

El tetrapirrol **hemo** también está implicado en el control retrógrado de la expresión génica nuclear. Se ha identificado el mutante *gun6-1D* en el que se sobreexpresa la ferroquelatasa 1 plastídica (FC1) (Figura 12), causando un incremento en la actividad de la ferroquelatasa total del plastidio. El aumento del flujo hacia la rama de la biosíntesis del grupo hemo incrementó la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis respecto a las plantas silvestres crecidas en presencia de norflurazon. Sin embargo, la segunda ferroquelatasa 2 (FC2) plastídica, que colocaliza con la FC1, no es capaz de aumentar la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis en las mismas condiciones (Woodson *et al.* 2011). Todavía son desconocidos tanto los componentes nucleares involucrados en la señalización del grupo hemo como el mecanismo mediante el cuál el grupo hemo llega al núcleo (Figura 13).

El mecanismo molecular exacto mediante el cuál las señales del cloroplasto se transmiten al núcleo es desconocido. Se identificó un factor de transcripción con un dominio homeo de plantas (PHD, *plant homeo-domain*) anclado a la envoltura del cloroplasto con dominios transmembrana PTM (*PHD with transmembrane domains*) (Sun *et al.* 2011). En respuesta a las señales retrógradas, el factor de transcripción PTM sufre un corte proteolítico y el dominio N-terminal de PTM se libera, permitiendo que se dirija al núcleo, donde activa al factor de transcripción ABI4 (Figura 13). El dominio PHD se une al promotor de ABI4, y su activación está asociada con las modificaciones en las histonas (Sun *et al.* 2011). No obstante, en plantas transgénicas que producen el fragmento procesado N-terminal de PTM, no se induce una respuesta retrógrada en ausencia de inhibidores, lo que sugiere la necesidad de una señal adicional o que el mecanismo es más complejo (Sun *et al.* 2011).





**Figura 13.** Señalización retrógrada de los intermediarios de la biosíntesis de tetrapirroles. El grupo hemo regula positivamente la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis, aunque se desconoce completamente la ruta de señalización. Mg-proto IX se exporta desde los plastidios a través de un mecanismo desconocido. En el citosol, Mg-proto IX inhibe la actividad de HSP90, de forma que, activa la represión o inhibe la activación de la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis a través del factor de transcripción HY5 en respuesta a estrés oxidativo. Las señales de la transcripción cloroplastica y las señales de los tetrapirroles convergen en GUN1, el cual genera una segunda señal que a su vez activa el proceso proteolítico del N-terminal de la proteína PTM. El N-terminal de PTM (N-PTM) se dirige al núcleo donde activa la expresión del factor de transcripción ABI4, que a su vez inhibe la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis. Imagen adaptada de (Barajas-López *et al.* 2013, Chi *et al.* 2013).

## 5.2. El estado redox de la membrana tilacoidal

Diversos estudios han señalado que cambios en el estado redox de la cadena de transporte de electrones fotosintética desencadenan procesos de señalización retrógrada. Estas señales son importantes para gestionar la energía lumínica, por ejemplo, durante el proceso en el que las semillas germinadas reciben la luz por primera vez y se ponen verdes, o durante la aclimatación a condiciones adversas del medio ambiente en plantas adultas. Las señales redox plastídicas se pueden clasificar en función de su origen: el *pool* de plastoquinona (PQ), la disponibilidad del aceptor del fotosistema I (PSI), y el sistema tiorredoxina (Baier y Dietz 2005).

El primer trabajo que demostró una conexión entre el **estado redox del *pool* de plastoquinona** y la expresión de genes de la fotosíntesis codificados en el núcleo se realizó con el alga *Dunaliella tertiolecta* (Escoubas *et al.* 1995). El estado redox del *pool* de PQ se modificó a través de dos inhibidores de la cadena de transporte de electrones. DCMU bloquea el flujo de electrones del PSII a PQ dejando PQ oxidada y aumentando la expresión de *Lhcb*, y DBMIB

inhibe la transferencia de electrones de PQ al complejo del citocromo *b<sub>6</sub>f* dejando a PQ reducida y disminuyendo la expresión de *Lhcb* (Escoubas *et al.* 1995) (Figura 14).

En hojas maduras se ha observado que el **estado redox** de los componentes del **lado aceptor del PSI** es más influyente que el estado redox del *pool* de PQ en la modulación de la expresión de los genes nucleares que se produce en respuesta a cambios en iluminación a corto plazo, especialmente durante las fases tempranas de la señalización (Piippo *et al.* 2006). Además, se sugirió que la **generación de metabolitos o moléculas señalizadoras durante la fotosíntesis** también está involucrada en la transmisión de información del cloroplasto al núcleo (Fey *et al.* 2005, Piippo *et al.* 2006).

La proteína Immutans (IM) o **PTOX** es una oxidasa terminal del plastoquinol que regula el estado redox del *pool* de plastoquinona (PQ)—transfiriendo los electrones del *pool* de PQ al oxígeno molecular manteniéndolo oxidado—durante la biogénesis temprana del cloroplasto (Foudree *et al.* 2012) (Figura 14). PTOX parece ser el nexo de unión de una serie de rutas bioquímicas en el plastidio como la biosíntesis de los carotenoides, el flujo cíclico de electrones del PSI, y la cloro-respiración (Foudree *et al.* 2012).

El mejor candidato propuesto para percibir las señales redox de PQ es la proteína **STN7**, una quinasa tilacoidal involucrada en las transiciones de estado y en la aclimatación fotosintética (Bellafiore *et al.* 2005, Bonardi *et al.* 2005), tanto a corto como a largo plazo (Bonardi *et al.* 2005, Pesaresi *et al.* 2009). La **aclimatación** a los **cambios a largo plazo** en el medio ambiente promueve el inicio de los mayores ajustes en la composición del aparato fotosintético (Chow *et al.* 1990), y **a corto plazo**, desencadenan modificaciones reversibles en la utilización fotosintética de la luz. Los cambios en la calidad espectral de la luz promueven el desequilibrio de la energía de excitación entre el PSI y el PSII, especialmente las intensidades de luz actínica bajas. Las transiciones de estado se inician en esta situación (Schöttler y Toth 2014). Un exceso de excitación del PSII reduce el *pool* de PQ, favoreciendo la activación de la quinasa tilacoidal STN7, que fosforila los complejos antena LhcII (Bellafiore *et al.* 2005). Sin embargo, la fosforilación de LhcII no está regulada únicamente por el estado redox de PQ, sino que está regulado por una red compleja (control redox de PQ y complejo citocromo *b<sub>6</sub>f*, sistema ferredoxina/tiorredoxina en el estroma). Las dos cisteínas de STN7 expuestas en el lumen son dianas reversibles de oxidación/reducción, y son esenciales para la actividad quinasa. En el estado 2, el LhcII fosforilado migra del PSII al PSI (Pesaresi *et al.* 2011). Las transiciones de estado son reversibles, y la luz en el rojo lejano y las altas intensidades de luz inactivan la actividad quinasa de STN7. En el estado 1, la inactivación de STN7 promueve la defosforilación de LhcII y su vuelta al PSII. La fosfatasa PPH1/TAP38 es la responsable de la defosforilación del LhcII. Se ha sugerido que STN7 participa en la transducción de la señal redox desde el plastidio al núcleo (Bonardi *et al.* 2005) (Figura 14), aunque la actividad quinasa de STN7 no regula directamente la transcripción de los genes nucleares asociados a la fotosíntesis de *Arabidopsis* (Pesaresi *et al.* 2009, Pesaresi *et al.* 2011).

Siguiendo en la línea de los trabajos anteriores, se utilizó un sistema de señalización redox que excita el PSI o el PSII, y se midió el impacto de la señales redox en el transcriptoma y en el metaboloma de *Arabidopsis thaliana* a lo largo del tiempo (Bräutigam *et al.* 2009). En respuesta a los cambios en el medio ambiente, se propuso un modelo en el que la fotosíntesis promueve la emisión de señales redox que afectan a la maquinaria de expresión de genes plastídicos y al metabolismo del cloroplasto. En paralelo, las señales redox se transmiten al

núcleo donde afectan a genes que codifican proteínas relacionadas con la fotosíntesis y el metabolismo (Bräutigam *et al.* 2009).

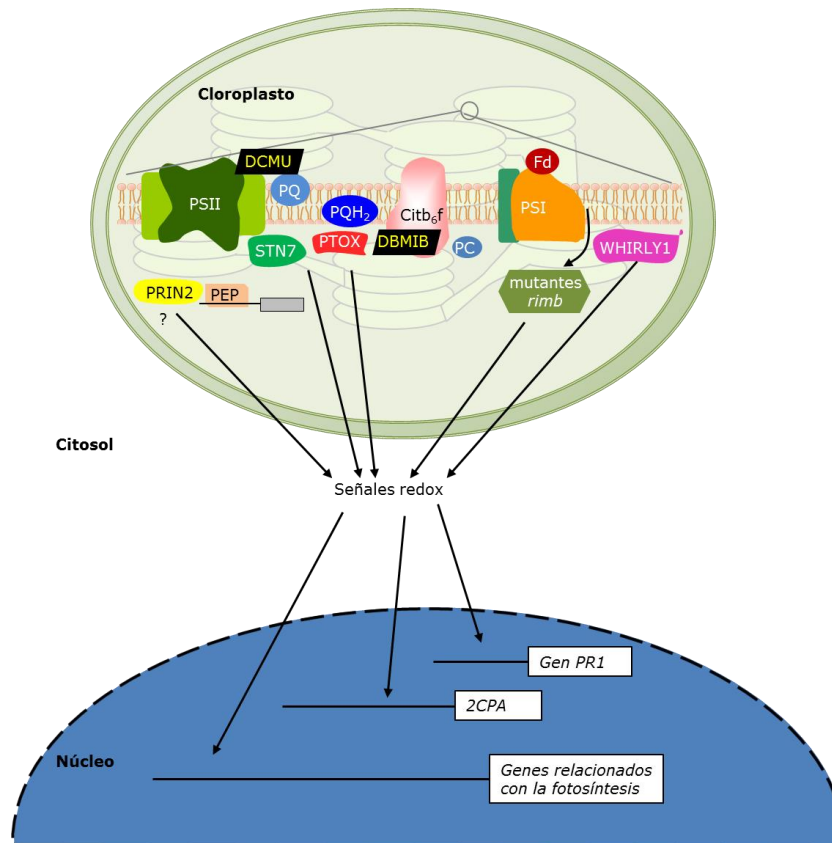
El promotor del gen que codifica para la proteína **2-Cys peroxiredoxina A** (2CPA) (Baier y Dietz 1999, König *et al.* 2002) regula la expresión en función del estado redox de los aceptores de electrones del PSI (Baier *et al.* 2004). En los mutantes *rimb* (*redox imbalanced*), la expresión de 2CPA está desacoplada del estado redox del lado aceptor del PSI (Heiber *et al.* 2007) (Figura 14).

La **tioredoxina z** (Trx z) es un componente de los cromosomas transcripcionalmente activos en los plastidios (TAC, *plastid transcriptionally active chromosomes*) (Pfalz *et al.* 2006), cuyo estado redox regula la actividad **ARN polimerasa codificada en el plastidio** (PEP, *plastid-encoded RNA polymerase*) a través de quinasas durante las transiciones de oscuridad a luz (Arsova *et al.* 2010). La proteína del plastidio insensible a redox **PRIN2** (*Plastid redox insensitive2*) forma parte de PEP, que a su vez responde a los cambios redox de la cadena de transporte de electrones y emite una señal retrógrada permitiendo la sincronización de la expresión de los genes fotosintéticos entre los genomas nucleares y plastídicos (Kindgren *et al.* 2012) (Figura 14).

Se ha propuesto a la proteína **Whirly** como una posible candidata que se transfiere del cloroplasto al núcleo, y que una vez en el núcleo, regula la expresión de genes de respuesta a patógenos *PR* (*pathogen response*) como *PR1* (Isemer *et al.* 2012). Se sugiere que Whirly desempeña un papel como sensor redox en la comunicación plastidio-núcleo, aunque los mecanismos de su translocación desde los plastidios hasta el núcleo todavía no se han investigado (Foyer *et al.* 2014).

En un trabajo reciente, se mostró que el estado redox del *pool* de las plastoquinonas inicia una señal retrógrada en la que modula el “**splicing**” **nuclear alternativo**—proceso en el que se obtienen distintos ARN mensajeros (ARNm) a partir de un único ARNm o ARNm precursor—necesario para que la planta responda correctamente a los cambios en la intensidad de luz (Petrillo *et al.* 2014).

Aparentemente, las señales fotosintéticas redox no solo ajustan la expresión de los genes fotosintéticos, sino que también regulan los genes que codifican para algunas enzimas metabólicas, algunos componentes en la transducción de señal, y algunos factores de regulación génica, lo que indica una implicación mayor de las señales redox en las redes de señalización celular en plantas (Pfalz *et al.* 2012).



**Figura 14.** Señalización retrógrada redox. El tratamiento con los inhibidores de la cadena de transporte de electrones DCMU y DBMIB está correlacionado con los cambios en la expresión de los genes relacionados con la fotosíntesis. En los mutantes *rimb* (*redox imbalance*), se produce una desregulación de *2CPA* (2-Cys peroxidoredoxina A), lo que indica que *2CPA* responde al estado redox del lado aceptor del PSI. PTOX transfiere los electrones del *pool* de PQ al oxígeno molecular de modo que modula el estado redox de PQ. STN7 está involucrada en la transmisión de los cambios en el estado redox del cloroplasto al núcleo. PRIN2 conecta la regulación redox de los genes relacionados con la fotosíntesis con la actividad de la ARN polimerasa codificada en el cloroplasto (PEP). Imagen adaptada de (Barajas-López *et al.* 2013, Chi *et al.* 2013, Foyer *et al.* 2014).

### 5.3. Metabolitos

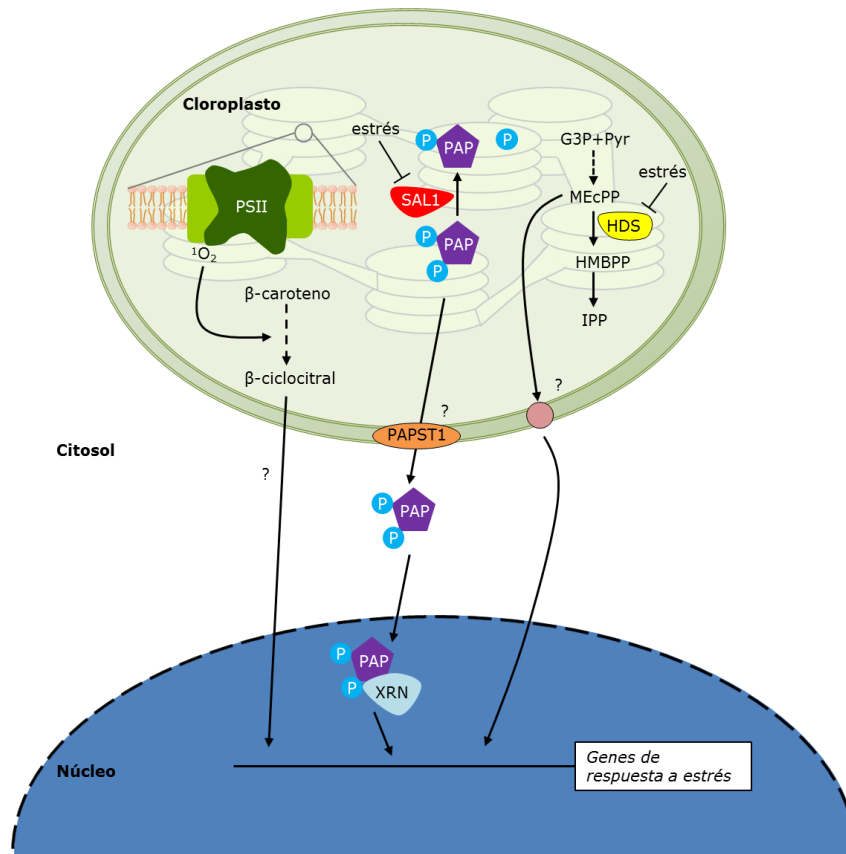
Además, se han propuesto nuevas rutas de señalización a través de metabolitos que se sintetizan en el cloroplasto y se exportan al núcleo comunicando los diferentes cambios en el desarrollo de la planta o las diferentes respuestas a estrés. A diferencia de las señales descritas anteriormente descubiertas en condiciones artificiales, estas nuevas señales se identificaron durante respuestas a estrés fisiológico como la sequía o la alta intensidad de luz. Estos resultados apoyan el concepto de que los cloroplastos se comportan como sensores del medio ambiente (Estavillo *et al.* 2013).

El fosfonucleótido **PAP** (3'-fosfoadenosina 5'-fosfato) se acumula en el cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* cuando la planta se expone a una alta intensidad de luz y a la sequía (Estavillo *et al.* 2011). La enzima **SAL1** es una fosfatasa—acumulada en cloroplastos y mitocondrias pero no en el citosol (Estavillo *et al.* 2011)—que hidroliza un grupo fosfato de los fosfonucleótidos y de los inositol polifosfatos *in vitro* (Quintero *et al.* 1996, Xiong *et al.* 2001). SAL1 regula los niveles de PAP desfosforilando PAP a AMP (Estavillo *et al.* 2011). Una vez en el núcleo, PAP altera el metabolismo del ARN a través de la inhibición de 5–3'

exoribonucleasas (XRNs), modificando la expresión de genes nucleares inducidos por estrés como la ascorbato peroxidasa 2 (*Apx2*) y el gen que codifica para la proteína *Elip2* (*Early Light Induced Protein 2*) (Estavillo *et al.* 2011). Se ha identificado un transportador denominado PAPST1 que pertenece a una familia de transportadores mitocondriales que se localiza en el tilacoide y en la envoltura del cloroplasto (Gigolashvili *et al.* 2012). PAPST1 puede transportar ADP/ATP o PAPS/ATP, o PAP por antiporte *in vitro* (Gigolashvili *et al.* 2012). De todas formas, todavía no está claro que este transportador esté involucrado en la ruta de señalización de PAP (Estavillo *et al.* 2013) (Figura 15).

El compuesto **MEcPP** (metileritritol ciclodifosfato), un precursor de los isoprenoides producido en la ruta plastídica de MEP (metileritritol fosfato), se acumula en plantas silvestres durante la exposición a diferentes estreses induciendo la expresión de genes nucleares de respuesta a estrés que codifican para proteínas plastídicas (Xiao *et al.* 2012). MEcPP se convierte a HMBPP por la enzima HDS. Se ha propuesto que la ruta de MEP, además de para producir isoprenoides, funciona como sensor del estrés y coordinador de la expresión de genes en respuesta a estrés a través de la modulación de los niveles de MEcPP (Xiao *et al.* 2012). No obstante, se desconoce si MEcPP es la molécula señalizadora que sale del cloroplasto y viaja al citoplasma o al núcleo (Xiao *et al.* 2012) (Figura 15). En otros trabajos en cultivos de *Chlamydia trachomatis* se observó que MEcPP afecta a la remodelación de la cromatina desestabilizando la asociación de las proteínas similares a las histonas con el ADN (Grieshaber *et al.* 2004, Grieshaber *et al.* 2006). Se ha sugerido que en las plantas, MEcPP puede alterar la arquitectura y la organización dinámica del núcleo, aunque todavía se tiene que investigar el mecanismo de acción (Xiao *et al.* 2012).

La exposición de plantas de *Arabidopsis* a una alta intensidad de luz induce la producción de oxígeno singlete, y por consiguiente el oxígeno singlete oxida el carotenoide  $\beta$ -caroteno generando diferentes derivados volátiles. El compuesto  **$\beta$ -ciclocitral**, uno de los productos volátiles que se acumulan, induce cambios en la expresión de genes que se identificaron previamente en respuesta al oxígeno singlete (Ramel *et al.* 2012) (Figura 15). Los cambios detectados en la expresión génica después de la exposición de plantas al  $\beta$ -ciclocitral están asociados con el aumento de la tolerancia de *Arabidopsis* frente a un tratamiento posterior de estrés fotooxidativo (Ramel *et al.* 2012). Se sugirió que el  $\beta$ -ciclocitral se produce durante el estrés fotooxidativo y actúa como un mensajero involucrado en la respuesta mediada por oxígeno singlete (Ramel *et al.* 2012). Como  $\beta$ -ciclocitral es un compuesto volátil de cadena corta, parece factible que pueda distribuirse desde el lugar de origen a otras partes de la célula mediante difusión (Leister 2012).



**Figura 15.** Algunos metabolitos se comportan como moléculas señalizadoras del cloroplasto. El  $\beta$ -ciclocitral, un producto de oxidación del  $\beta$ -caroteno por el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), puede actuar como un mensajero secundario del oxígeno singlete difundiéndose a través de la membrana al citosol. Los niveles de PAP están regulados por la enzima SAL1, y probablemente PAP se dirija al citosol a través del transportador PAPST1. Una vez en el núcleo, PAP inhibe las exoribonucleasas (XRN) y regula la expresión de los genes de respuesta a estrés. MEcPP, un intermediario de los precursores isoprenoides, se produce a través de la ruta MEP a partir de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y piruvato (Pyr). MEcPP se acumula cuando la planta se expone a un estrés, y funciona como un sensor que envía una señal al núcleo modificando la expresión de los genes de respuesta a estrés, aunque su transporte y su mecanismo de acción son desconocidos. Imagen adaptada de (Barajas-López *et al.* 2013, Chi *et al.* 2013, Estavillo *et al.* 2013).

Los **carbohidratos** generados en la fotosíntesis en los tejidos fuente (principalmente en hojas), además de ser la fuente de energía y carbono para la síntesis de otros compuestos, actúan como moléculas señalizadoras que modulan el crecimiento, el desarrollo, y las respuestas a estrés de la planta (Rolland *et al.* 2006). Mediante análisis genéticos se han detectado interacciones entre los carbohidratos y la señalización hormonal, como por ejemplo la mediada por la enzima hexoquinasa (HXK), que no solo cataliza la fosforilación de hexosas (glucosa y fructosa), sino que también actúa como un sensor de la cantidad de hexosas en plantas (Rolland *et al.* 2006). Asimismo los carbohidratos regulan la transcripción de un gran número de genes fotosintéticos en el núcleo (Rolland *et al.* 2006). Existen diferentes carbohidratos que actúan en diversas rutas dependientes e independientes de HXK, que utilizan diferentes mecanismos moleculares para controlar la transcripción, la traducción, la estabilidad de las proteínas y la actividad enzimática (Rolland *et al.* 2006).

La inhibición de la expresión génica plastídica por cloramfenicol aumenta la sensibilidad de la célula a los azúcares (Zhang *et al.* 2010). Las hexoquinasas son sensores de

una gran parte de las señales de los azúcares, y en *Arabidopsis* solo se ha localizado una **hexoquinasa en el plastidio** la pHXK (*plastid hexoquinase*) (Claeysen y Rivoal 2007). La represión de los genes *Lhcb* en las plantas silvestres debidos al tratamiento con glucosa o con cloramfenicol se inhibió en el mutante *phxk* (hexoquinasa plastídica). Estos resultados indicaron que pHXK está involucrada en la señalización dependiente de la expresión génica plastídica (Zhang *et al.* 2010). Se ha sugerido que la hexoquinasa plastídica (pHXK) es un “nudo de convergencia” entre las señales mediadas por azúcares y las señales mediadas por la expresión génica plastídica (Zhang *et al.* 2010).

Los flujos de carbohidratos entre el cloroplasto y el citosol median el intercambio de información en el estado redox del cloroplasto. Existen al menos dos transportadores de carbohidratos que pueden transferir fuera del cloroplasto el **poder reductor en forma de NADH** (Noctor y Foyer 2000, Facchinelli y Weber 2011). Estos son el intercambio de triosa fosfato por 3-fosfoglicerato a través de un translocador de fosfato inorgánico (Flugge y Heldt 1991), y la válvula de malato compuesta por malato deshidrogenasas y transportadores de intercambio malato-oxalacetato—que “alivian” la sobrerreducción de la cadena de transporte de electrones y del estroma del cloroplasto exportando el exceso de equivalentes reductores del cloroplasto al citosol—(Heineke *et al.* 1991, Scheibe 2004, Scheibe *et al.* 2005).

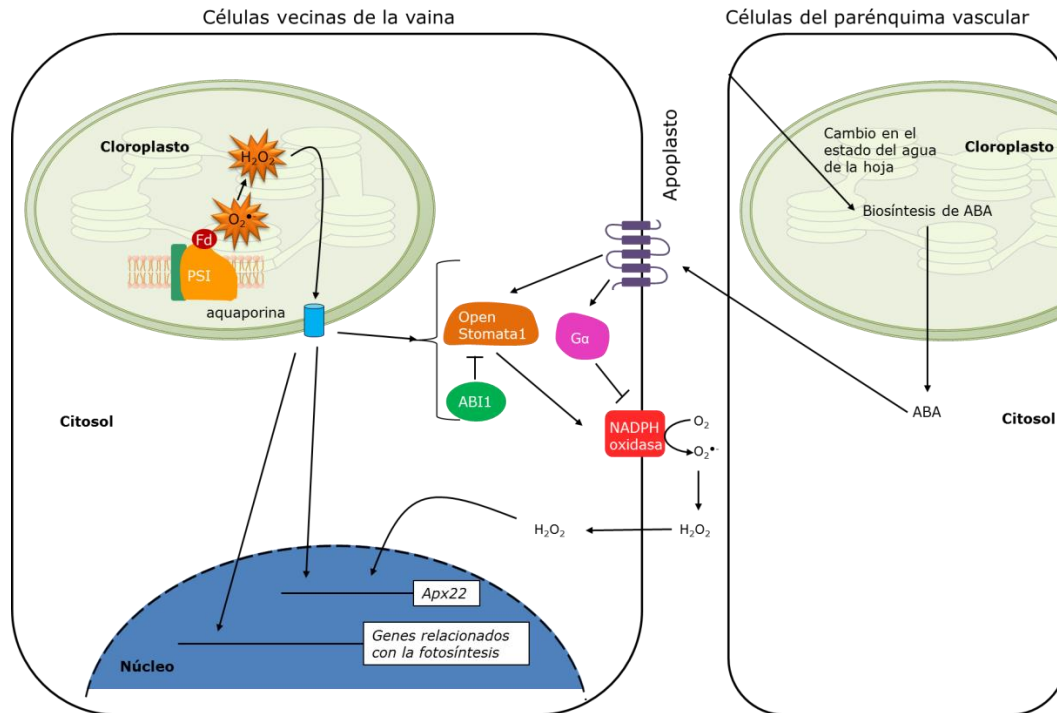
#### 5.4. Especies reactivas de oxígeno

##### 5.4.1. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

###### 5.4.1.1. Función señalizadora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en el cloroplasto es el principal candidato ROS involucrado en la ruta de señalización que induce la expresión de *Apx2* en condiciones de alta intensidad de luz (Fryer *et al.* 2003). Se ha propuesto que el peróxido de hidrógeno en cloroplastos aislados difunde a través de la envoltura principalmente a través de las aquaporinas (Borisova *et al.* 2012) (Figura 16).

En las células del parénquima vascular, el ácido abscísico (ABA) sintetizado activa una red de señalización en las células vecinas de la vaina (*bundle sheath cell*) que promueve la producción extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induciendo la expresión de *Apx2* (Galvez-Valdivieso *et al.* 2009, Mullineaux y Baker 2010). Mientras tanto, la exposición a una alta intensidad de luz en los cloroplastos de las células vecinas de la vaina desencadena la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que junto con otros eventos redox asociados, emite una señal retrógrada que acelera la señalización iniciada por ABA (Galvez-Valdivieso y Mullineaux 2010) (Figura 16).



**Figura 16.** Señalización retrógrada mediada por  $H_2O_2$ . El peróxido de hidrógeno del cloroplasto difunde a través de las aquaporinas localizadas en la envoltura del cloroplasto. La exposición de las hojas a una alta intensidad de luz induce la biosíntesis de ABA debido a un cambio rápido en el estado del agua de la hoja. El ABA se secreta desde las células del parénquima e interacciona con receptores de ABA en la membrana plasmática. En las células vecinas de la vaina, ABA desencadena una red de señalización que incluye las proteínas OST1, ABI1 y proteínas G heterotriméricas que promueven la producción de  $H_2O_2$  entre las células (apoplasto). Mientras tanto, los cloroplastos de las células de la vaina en alta intensidad de luz, aumentan la producción de  $H_2O_2$  que, junto con otras señales redox, emite una señal que acelera la red de señalización iniciada por ABA en el apoplasto. El  $H_2O_2$  regula la expresión de genes involucrados en el desarrollo de la planta y en respuestas a estrés, y en particular en la expresión del gen *Apx2*. Imagen adaptada de (Galvez-Valdivieso y Mullineaux 2010, Barajas-López *et al.* 2013).

#### 5.4.1.2. Comparación de transcriptomas de plantas transgénicas con niveles elevados de $O_2^{\cdot-}$ y de $H_2O_2$

Se compararon datos de los transcriptomas de plantas transgénicas en las que la actividad de una enzima antioxidante individual está dañada como la superóxido dismutasa cobre/zinc cloroplastídica (Cu/ZnSOD) (niveles elevados de  $O_2^{\cdot-}$ ), la ascorbato peroxidasa citosólica (APX1) (niveles elevados de  $H_2O_2$ ), la catalasa peroxisómica (CAT) (niveles elevados de  $H_2O_2$ ); para determinar las respuestas genéticas de las señales ROS originadas en los plastidios, el citosol, los peroxisomas y las mitocondrias (Gadjev *et al.* 2006). Se detectaron transcritos marcadores regulados específicamente por cada ROS, aunque también se identificaron genes marcadores comunes a todas las respuestas al estrés oxidativo (Gadjev *et al.* 2006).

#### 5.4.2. Función señalizadora del oxígeno singlete

El oxígeno singlete es muy reactivo y tiene una vida media corta de 200 ns (Gorman y Rodgers 1992), por lo que parece poco probable que el oxígeno singlete sea la molécula señalizadora que vaya desde el cloroplasto al citoplasma.



La exposición de *Chlamydomonas reinhardtii* a niveles subletales de oxígeno singlete, generado por el rosa bengala en presencia de luz o a altas intensidades de luz, indujo su aclimatación activando respuestas de defensa que incrementaron la tolerancia a niveles tóxicos de oxígeno singlete. Se identificaron unos pocos genes que respondieron a la exposición de niveles bajos de oxígeno singlete entre los que se encuentran los genes que codifican para la glutatión peróxidasa y la glutatión S-transferasa. La resistencia al oxígeno singlete se incrementó al sobreexpresar estos dos genes identificados (Ledford *et al.* 2007). Sin embargo, aunque en plantas todavía no se ha mostrado una mayor tolerancia a estrés fotooxidativo después de la aclimatación con bajos niveles de  $^1\text{O}_2$ , sí se han detectado cambios en la expresión génica asociados a la aclimatación (Alboresi *et al.* 2011).

En el estudio de (Alboresi *et al.* 2011), se expusieron plantas silvestres y mutantes *npq1lut2*—que no producen las xantofilas luteína y zeaxantina— a un exceso de luz acompañado de temperaturas bajas. El oxígeno singlete aumentó en las plantas mutantes respecto a las silvestres, mientras que no cambiaron los niveles de otras ROS. Los grupos de genes diferencialmente expresados en *npq1lut2* en respuesta a la alta intensidad de luz y bajas temperatura que codifican proteínas cloroplásticas están involucrados en la biosíntesis de tetrapirroles, el catabolismo de las clorofilas, el importe, plegamiento y reemplazo de proteínas, la síntesis e inserción de membrana de subunidades fotosintéticas, y en la reparación del daño fotooxidativo. Estos ensayos mostraron que la función señalizadora de  $^1\text{O}_2$  en plantas silvestres y mutantes *npq1lut2* en condiciones de estrés oxidativo (Alboresi *et al.* 2011). Por otra parte, se investigó la capacidad de *Arabidopsis* para aclimatarse al oxígeno singlete utilizando el mutante *chlorinal* (*chl*) (Ramel *et al.* 2013). Este mutante es deficiente en clorofila *b* y, como el complejo antena no puede ensamblarse en ausencia de clorofila *b*, es también deficiente en el complejo antena del PSII (Havaux *et al.* 2007). El mutante *chl* es muy fotosensible a altas intensidades de luz, es decir, muestra daño en las hojas y muerte celular. Este efecto está asociado al aumento en los niveles de  $^1\text{O}_2$  en los centros de reacción fotosistema II en ausencia de los mecanismos protectores del complejo antena del PSII como la atenuación no fotoquímica (NPQ). En condiciones de alta intensidad de luz, se activa la expresión de genes nucleares en respuesta al oxígeno singlete. Una exposición previa a una intensidad de luz moderada, elimina el daño fotooxidativo sin suprimir la formación de  $^1\text{O}_2$ . Este resultado indica que existe una aclimatación al  $^1\text{O}_2$ . Además, se detectaron diferencias significativas en la expresión génica entre la exposición a la alta intensidad de luz y a la aclimatación (Ramel *et al.* 2013).

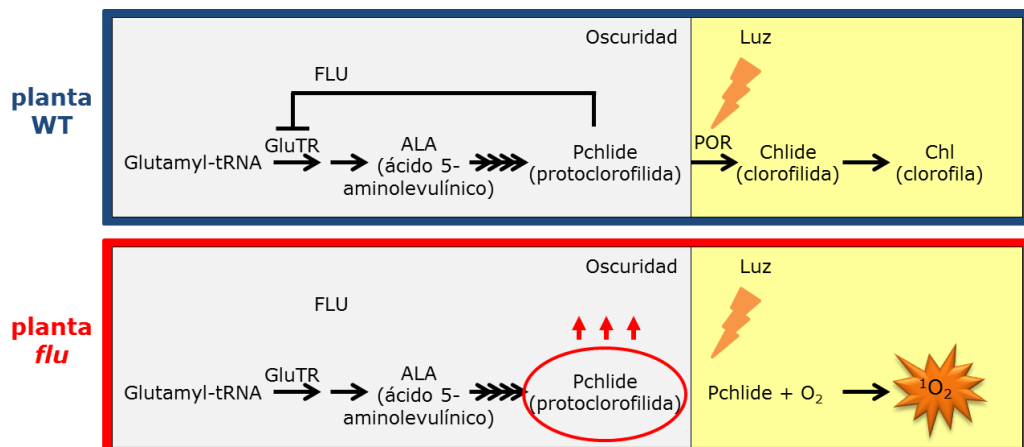
### 5.5. Proteínas Executer

La exposición de las plantas a un estrés provoca un aumento simultáneo de las diferentes ROS en el cloroplasto (Apel y Hirt 2004). Esto supone un problema a la hora de asignar los cambios en la expresión génica nuclear a cada ROS por separado. El oxígeno singlete activa una serie de genes nucleares diferentes de los inducidos por superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y por peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), lo que sugiere que el  $^1\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$  activan distintas vías de señalización (op den Camp *et al.* 2003). Se ha propuesto que  $\text{H}_2\text{O}_2$  regula negativamente las respuestas mediadas por  $^1\text{O}_2$  (Laloi *et al.* 2007). Una posible interpretación es que  $\text{H}_2\text{O}_2$  incrementa la oxidación de  $\text{Q}_\text{A}$ , esto mejora la eficiencia del transporte de electrones en el PSII, lo que causa una reducción de las cantidades del  $^1\text{O}_2$  formado en el PSII (Laloi *et al.* 2007). La señalización mediada por el  $^1\text{O}_2$  no opera solo como una ruta linear aislada, sino que forma parte de una red de señalización que es modificada por otras rutas de señalización que conjuntamente afectan al desarrollo de la planta y a las respuestas a estrés (Baruah *et al.* 2009). Este problema se trató de resolver mediante la utilización del mutante condicional fluorescente (*flu*) de

*Arabidopsis thaliana* (Meskauskiene *et al.* 2001), que permite evaluar los efectos y la actividad biológica del oxígeno singlete en los cloroplastos.

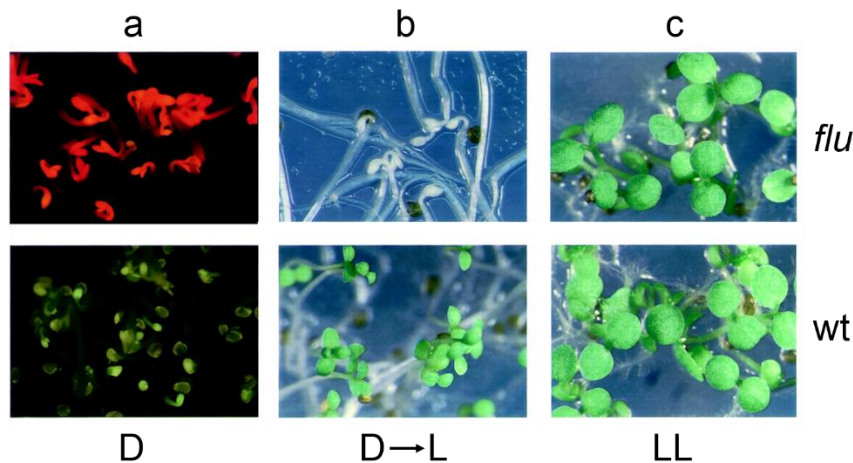
Los precursores de los tetrapirroles son muy reactivos en presencia de luz, por ello las plantas previenen su acumulación regulando su biosíntesis. En oscuridad, la ruta de biosíntesis de la clorofila se bloquea después de la formación protoclorofilida (Pchl<sub>id</sub>e). Cuando los niveles de Pchl<sub>id</sub>e llegan a un umbral, la síntesis de ácido δ-aminolevulínico (ALA) disminuye. En presencia de luz, la protoclorofilida (Pchl<sub>id</sub>e) se reduce a clorofilida (Chl<sub>id</sub>e) por la NADPH-Pchl<sub>id</sub>e oxidoreductase (POR) (Figura 17).

El mutante de pérdida de función *flu* no es capaz de restringir la acumulación de Pchl<sub>id</sub>e en oscuridad, un metabolito altamente fotosensible que en presencia de luz genera oxígeno singlete (op den Camp *et al.* 2003) debido a la transferencia de energía lumínica al oxígeno molecular (Gollnick 1968) (Figura 17). El nombre de este mutante se debe a la fluorescencia que emite la protoclorofilida acumulada en oscuridad después de la exposición a luz azul (400-450 nm) (Figura 18a) (Meskauskiene *et al.* 2001). Se ha sugerido que la proteína cloroplastídica de codificación nuclear Flu actúa mediante control *feedback* negativo modificando la enzima Glutamyl-tRNA reductasa (GluTR) (Kauss *et al.* 2012).



**Figura 17.** Esquema de la ruta de la biosíntesis de la clorofila en plantas verdes. Imagen adaptada de (Kauss *et al.* 2012).

El paso de oscuridad a luz en plantas *flu* provoca dos tipos de reacciones: el blanqueamiento y la muerte de las plantas *flu* en estadio cotiledón crecidas en oscuridad (Meskauskiene *et al.* 2001) (Figura 18b); y una parada en el crecimiento (Figura 19) y muerte celular en hojas roseta con lesiones necróticas en plantas maduras *flu* crecidas en luz continua hasta el estadio roseta (op den Camp *et al.* 2003). Sin embargo, estos síntomas no se detectaron en las plantas *flu* ni en plantas silvestres crecidas bajo luz continua (Figura 18c y 19). Esto es debido a que, en luz continua, la protoclorofilida es fotorreducida a clorofilida, por lo que no se acumula (Meskauskiene *et al.* 2001, op den Camp *et al.* 2003).



**Figura 18.** Las plantas *flu* y silvestres (*wt*) en estadio cotiledón etioladas (*dark*, D) (a) expuestas a luz azul (400-450 nm), (b) crecidas en oscuridad y expuestas a la luz durante 12 horas (*dark*→*light*, D→L), y (c) crecidas en luz continua (*light/light*, LL). Imagen tomada de (Meskauskiene *et al.* 2001).



LL-LD	LL	LL-LD-LL
15 29	44	15 7 22
Tiempo de tratamiento (días)		

**Figura 19.** Las plantas *flu* crecieron bajo 24 h de luz (*light/light*, LL) hasta el estadio de hoja roseta, se incubaron en ciclos de 16 h luz/8 h oscuridad (*light/dark*, LD), y se volvieron a incubar bajo luz continua (*light/light*, LL). Las plantas crecidas durante 44 días LL crecieron como las plantas silvestres en LL (no se muestran las imágenes). Se produjo una inhibición en el crecimiento de las plantas crecidas durante 15 días en LL y 29 días en LD. El crecimiento de las plantas se reanudó al volverse a exponer a la iluminación continua durante 22 días de las plantas crecidas 15 días en LL, y 7 días en LD. Imagen tomada de (op den Camp *et al.* 2003).

Varios estudios de expresión génica han demostrado que las reacciones observadas en las plantas *flu* con altos niveles de oxígeno singlete puede que no sean debidas a la citotoxicidad de esta ROS, sino más bien a la función señalizadora del  $^1\text{O}_2$  que activa rutas de respuesta a estrés (op den Camp *et al.* 2003, Gadjev *et al.* 2006, Laloi *et al.* 2006, Przybyla *et al.* 2008).

La activación genética en respuesta al estrés causado por el  $^1\text{O}_2$  se trató de identificar buscando segundas mutaciones en las plantas *flu* que supriman la inhibición en el crecimiento y muerte celular en plantas maduras, y el blanqueamiento y muerte de plantas en estadio cotiledón. La mutación en el gen *Executer1* en plantas *flu* acumula los mismos niveles de protoclorofilida en oscuridad, y en presencia de luz, generan oxígeno singlete pero no muestran ninguna de las dos respuestas a estrés observadas en el mutante *flu* (Wagner *et al.* 2004) (Figura 20 y 21, L/D). Esto demuestra que tanto la inhibición del crecimiento en plantas maduras como la muerte de las plantas en estadio cotiledón no son debidas al daño fotooxidativo del oxígeno singlete. La proteína *Executer1* parece que tiene la capacidad de sentir el  $^1\text{O}_2$  y, como consecuencia, activar rutas de señalización en respuesta al estrés (Wagner *et al.* 2004).

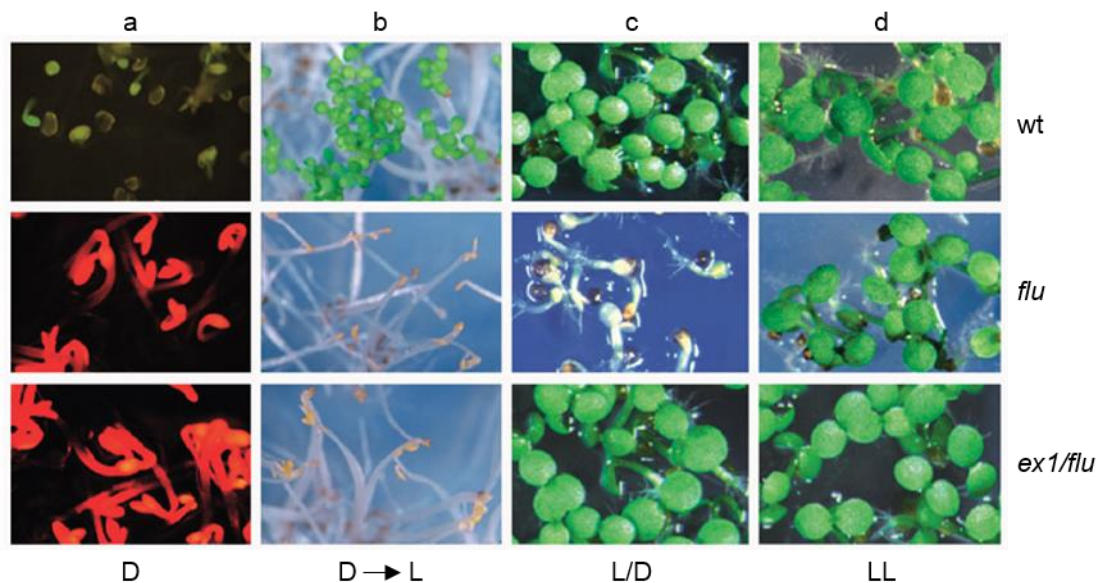
En oscuridad, las plantas etioladas *executer1/flu* y *flu*, a diferencia de las plantas silvestres, expuestas a luz azul (400-450 nm) emiten fluorescencia roja debido a que ambas acumulan protoclorofilida libre (Figura 21, D). En las plantas crecidas en luz y sometidas a varios ciclos de 16 h luz/8 h oscuridad, la pérdida de *Executer1* en *flu* inhibe el blanqueamiento de las plantas en estadio cotiledón y las plantas crecen como las silvestres (Figura 21, L/D). Las plantas *executer1/flu* crecidas en oscuridad y expuestas a la luz no son capaces de eliminar la respuesta mediada por  $^1\text{O}_2$  y se blanquean y mueren como *flu* (Figura 21, D→L). Este colapso es debido a que en plantas *executer1/flu* y *flu* crecidas en oscuridad, la cantidad de protoclorofilida es de cuatro a cinco veces mayor que la cantidad acumulada en las plantas *executer1/flu* y *flu* crecidas en luz continua y expuestas a 8 horas de oscuridad (Przybyla *et al.* 2008). Esto muestra que las plantas *flu* crecidas en luz y expuestas a ciclos luz/oscuridad contienen una cantidad de oxígeno singlete que no llega a ser citotóxico e induce programas de respuesta genética controlados dependientes de *Executer1*, mientras que las plantas etioladas transferidas a la luz generan niveles citotóxicos de  $^1\text{O}_2$  que causan daños irreversibles a componentes celulares (Przybyla *et al.* 2008). En este mismo trabajo, se hicieron medidas de las oxilipinas, los productos de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados—una forma de monitorizar la citotoxicidad de ROS—y observaron que en las plantas *flu* etioladas expuestas a la luz, se acumulan grandes cantidades de oxilipinas no generadas enzimáticamente (peroxidación lipídica no enzimática). Esto indica que en condiciones extremas prevalecen los efectos tóxicos del  $^1\text{O}_2$ . Algunos de esos productos de oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados se acumulan también en plantas silvestres expuestas a una intensidad de luz alta y a frío (Havaux *et al.* 2009). Estos resultados sugieren que en estas condiciones, el  $^1\text{O}_2$  es la principal ROS responsable de la peroxidación lipídica (Triantaphylidès *et al.* 2008). En cambio, en las plantas *flu* iluminadas después de 8 horas de oscuridad, se acumulan oxilipinas generadas enzimáticamente (peroxidación lipídica enzimática) y no se forman las oxilipinas no generadas enzimáticamente (Przybyla *et al.* 2008). Por esa razón se ha sugerido que a niveles medios de  $^1\text{O}_2$  se activan las rutas de señalización dependientes de *Executer1*, y a niveles elevados de  $^1\text{O}_2$  las plantas mueren debido a la citotoxicidad del  $^1\text{O}_2$  (Kim *et al.* 2008).

Bajo condiciones de luz continua las plantas *executer1/flu* crecen como *flu* y las plantas silvestres (Figura 21, LL), debido a que no acumulan protoclorofilida, como se ha descrito anteriormente.

La proteína cloroplastídica *Executer1* de codificación nuclear (At4g33630) ha sido cartografiada en el cromosoma 4 de *Arabidopsis thaliana*, y el marco de lectura del cDNA predice una proteína de 684 aminoácidos y un peso molecular de 76 kDa (Wagner *et al.* 2004).



**Figura 20.** Planta madura del doble mutante *executer1/flu* y del mutante *flu* crecidas en luz continua hasta el estadio de hoja roseta, y sometidas a ciclos de luz/oscuridad. La planta *ex1/flu* crece de forma similar a la planta silvestre (aunque no se muestran las imágenes), mientras que la planta *flu* muestra una inhibición en el crecimiento. Esta imagen está tomada de (Wagner *et al.* 2004).



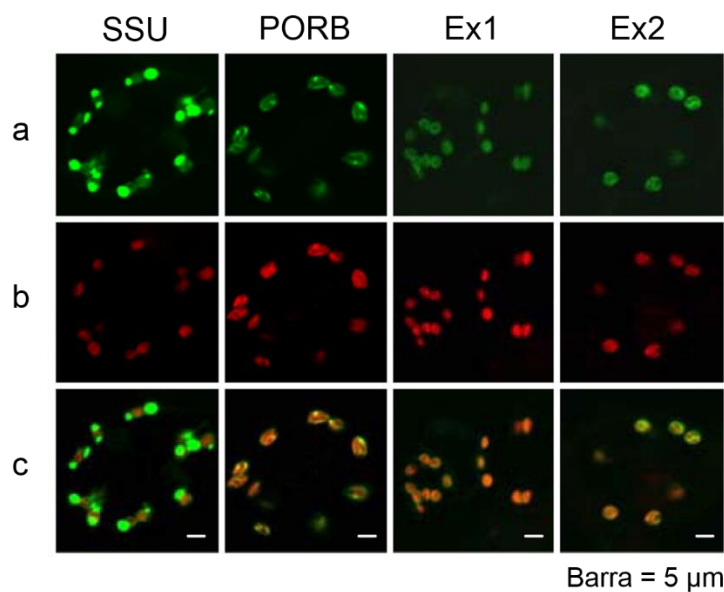
**Figura 21.** En oscuridad (*dark*, D), las plantas silvestres (wt), *flu* y *ex1/flu* en estadio cotiledón (a) se exponen a luz azul (400-450 nm). (b) Las plantas crecidas en oscuridad y expuestas a la luz durante 12 horas (*dark*→*light*, D→L), (c) en luz continua y sometidas a ciclos de 16 h luz/8h oscuridad (*light/dark*, L/D), y (d) en luz continua (*light/light*, LL). Esta imagen se ha tomado de (Kim *et al.* 2008).

El mutante *flu* no solo muestra un fenotipo característico, sino que modula la expresión de genes nucleares después de la generación del  $^1\text{O}_2$  (op den Camp *et al.* 2003). Sin embargo, la pérdida de función de la proteína Executer1 en *flu* no elimina completamente los cambios en la expresión génica inducidos por  $^1\text{O}_2$ , sugiriendo que todavía queda una transducción de señales “residual” desde el cloroplasto al núcleo que continúa activo en ausencia de Executer1 (Lee *et al.* 2007). La pérdida de función de una segunda proteína identificada, denominada Executer2, en las plantas *ex1/flu* parece ser suficiente para eliminar la activación de casi todos los genes que responden al  $^1\text{O}_2$ . De este modo, se ha sugerido que Executer2 está involucrada en la señalización inducida por  $^1\text{O}_2$  (Lee *et al.* 2007).

## Introducción

La proteína cloroplástica Executer2 de codificación nuclear (At1g27510) ha sido cartografiada en el cromosoma 1 de *Arabidopsis thaliana*, y el marco de lectura del cDNA predice una proteína de 651 aminoácidos y un peso molecular de 72 kDa (Wagner *et al.* 2004, Lee *et al.* 2007).

Las proteínas Executer1 y Executer2 son dos proteínas homólogas de *Arabidopsis thaliana* y comparten una identidad de secuencia proteica del 38 % (Lee *et al.* 2007). La proteína Executer1 se localiza mayoritariamente en el estroma, y otra parte se encuentra asociada a las membranas tilacoidales de los cloroplastos (Wagner *et al.* 2004). La localización cloroplástica se confirmó mediante la visualización con el microscopio confocal de plantas transgénicas estables de *Arabidopsis* que expresan las proteínas de fusión Executer1-GFP y Executer2-GFP y parecen estar asociadas a las membranas tilacoidales (Figura 22) (Lee *et al.* 2007).

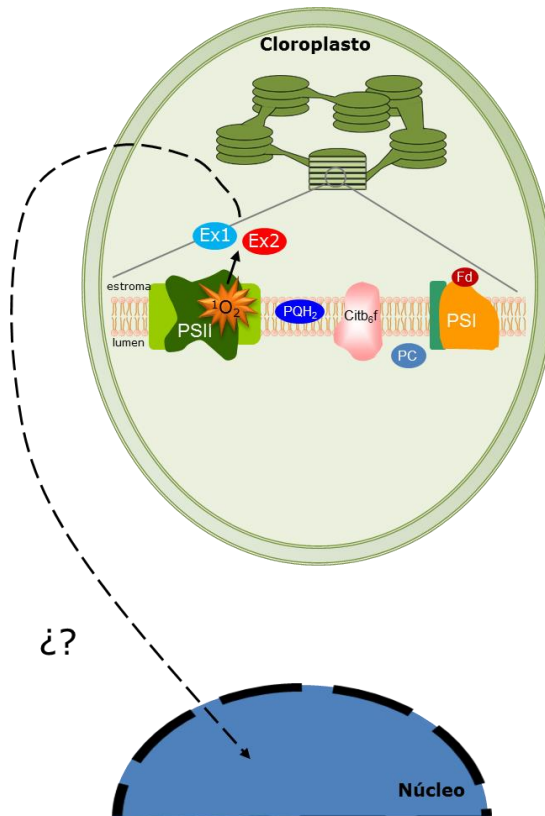


**Figura 22.** Imagen tomada de (Lee *et al.* 2007) que muestra (a) la fluorescencia de las proteínas de fusión GFP, (b) la fluorescencia roja de la clorofila, y (c) el solapamiento de ambas imágenes obtenidas mediante microscopía confocal láser. Se observan la localización de las proteínas Executer1 (Ex1) y Executer2 (Ex2) en comparación con los controles. La subunidad pequeña (SSU, *small subunit*) de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa se localiza en el estroma, y la enzima NADPH-protoclorofilida oxidoreductasa (PORB) forma parte de las membranas cloroplásticas.

Las plantas mutantes *flu*, *ex1/flu*, *ex2/flu*, *ex1/ex2/flu*; y las silvestres crecieron bajo luz continua hasta que alcanzaron el estadio de hoja roseta justo antes de florecer, y se expusieron a ciclos repetidos de 16 h luz/8 h oscuridad durante 30 días. Se observó como las plantas *flu* y *ex2/flu* pararon de crecer, mientras que *ex1/flu*, *ex1/ex2/flu* continuaron creciendo de forma comparable a las plantas silvestres. En condiciones de luz continua, todas las plantas crecieron de la misma forma. Estos resultados sugieren que Executer2 no es esencial para la mediación de la respuesta a estrés visible, aunque esto no significa que no esté implicada en la ruta de señalización retrógrada (Lee *et al.* 2007). En *ex2/flu* no se produce la inactivación de la expresión de genes en respuesta al  $^1\text{O}_2$  como sucede en *ex1/flu*, aunque tampoco se activan y se reprimen los mismos genes que en *flu*. La pérdida de función de Executer2 en *flu* activó la expresión de genes que no estaban activados en *flu*, y activó o reprimió genes que estaban activados en *flu*. Por lo que se propuso que la proteína Executer1 es la responsable de la



activación de la mayoría de los genes en *flu*, mientras que la proteína Executer2 modula negativamente la actividad de Executer1 (Lee *et al.* 2007) (Figura 23).



**Figura 23.** Las proteínas Executer se han asociado al PSII en el lado del estroma y están involucradas en la señalización mediada por oxígeno singlete, que envían una señal al núcleo que es todavía desconocida. Imagen adaptada de (Pogson *et al.* 2008) y de (Barajas-López *et al.* 2013).

Los cambios citológicos que siguen al comienzo de la producción del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> incluyen una pérdida rápida de la integridad del cloroplasto seguido de una ruptura de la vacuola central y el colapso final de la célula (Kim *et al.* 2012). Cuando se inactivan las dos proteínas Executer en el mutante *flu* se suprimen estas respuestas, lo que indica que la desintegración de los cloroplastos es debido a la señalización que depende de Executer más que la citotoxicidad del oxígeno singlete (Kim *et al.* 2012).

En las plantas silvestres no se ha descrito la muerte celular en semillas germinadas, ni la inhibición transitoria del crecimiento en plantas maduras como en *flu*, incluso en condiciones en las que se espera que se acumule el oxígeno singlete. Esta diferencia entre las plantas *flu* y las silvestres cuestiona la relevancia fisiológica de las respuestas a estrés que tienen lugar en *flu*. El mutante *flu* sirve como sistema para identificar las rutas de señalización individuales (Lee *et al.* 2007), pero la utilización del fondo silvestre permite estudiar la función de Executer en las condiciones del medio ambiente.

La pérdida de función de las proteínas Executer en fondo silvestre no muestra ningún fenotipo diferente al del silvestre en condiciones normales (Wagner *et al.* 2004, Lee *et al.* 2007, Kim y Apel 2013a). Sin embargo, el ensayo con hojas de plantas mutantes *executer1* y silvestres expuestas a altas intensidades de luz en presencia de 0.025 a 2.5 μM de 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU)—que inhibe el fotosistema II tanto a las plantas silvestres como a las mutantes, generando <sup>1</sup>O<sub>2</sub>—muestra que *executer1* es más resistente al daño celular que la

silvestre (Wagner *et al.* 2004). Se ha sugerido que el escape de iones (*ion leakage*) y el daño de membranas a concentraciones bajas de DCMU en hojas puede ser el resultado de la activación de la muerte celular programada dependiente de las proteínas Executer. No obstante, en presencia de altas concentraciones de DCMU (25  $\mu\text{M}$ ), ambos genotipos resultan dañados como resultado de la citotoxicidad del  $^1\text{O}_2$  (Wagner *et al.* 2004).

El tratamiento de las plantas *executer1* y las silvestres con  $\beta$ -ciclocitral, un producto de la oxidación del  $\beta$ -caroteno, a altas intensidades de luz y bajas temperaturas muestra que las plantas *executer1* son ser más resistentes al estrés fotooxidativo que las plantas silvestres Col-0 (Ramel *et al.* 2012). En un estudio sobre la respuesta hipersensible causada por una infección con patógenos, se observó que las plantas *executer2* inoculadas con cantidades bajas de patógenos (en torno a  $10^4$  bacteria·mL<sup>-1</sup>) son algo más resistentes que las plantas silvestres (Mur *et al.* 2010).

El doble mutante *ex1/ex2* en estadio cotiledón tiene afectado el desarrollo del cloroplasto mostrando un contenido reducido de clorofila y menor fluorescencia, con cloroplastos mucho más pequeños que los de la planta silvestre y con una cierta similitud a los proplastidios sin diferenciar (Kim *et al.* 2009). Sin embargo, todas estas deficiencias observadas en los cotiledones, no se detectaron en las hojas verdaderas del doble mutante (Kim *et al.* 2009). Las plantas en estadio cotiledón *ex1/ex2*, sometidas a un tratamiento de baja temperatura y alta intensidad lumínica, son menos susceptibles que las plantas silvestres como se observa en las diferencias detectadas en la formación de lesiones y en la eficiencia fotoquímica máxima del PSII (Kim *et al.* 2012). En las plantas mutantes *ex1/ex2* se redujo el número de lesiones respecto a las plantas silvestres 3 días después de inocular con 1-2 mM de ácido tenuazónico (TeA), una toxina del hongo patógeno necrótrofo *Alternaria alternata*, que bloquea el sitio de unión de Q<sub>B</sub> del lado aceptor del fotosistema II (Chen *et al.* 2015).



# Objetivos

## Objetivos

## Objetivos

El objetivo general de esta tesis es caracterizar funcionalmente las proteínas de la familia Executer involucradas en la señalización del cloroplasto al núcleo mediada por oxígeno singlete. Para abordar este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis comparativo de las secuencias de las proteínas de la familia Executer mediante herramientas bioinformáticas. Para ello, se buscaron las secuencias de las proteínas Executer en diferentes organismos, se alinearon las secuencias encontradas, y se construyó un árbol filogenético.
2. Caracterización estructural de las proteínas Executer1 y Executer2 de *Arabidopsis thaliana*. Para ello, se construyeron vectores de expresión que contienen los genes que codifican para las proteínas Ex1 y Ex2, que se expresaron y se purificaron. El estado oligomérico y la interacción *in vitro* Ex1-Ex2 se analizaron mediante cromatografía de exclusión molecular y entrecruzamiento químico.
3. Detección de la interacción Ex1-Ex2 en hojas de tabaco mediante el Ensayo de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC).
4. Identificación de los órganos y estadios de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* donde se expresan los genes *Executer1* y *Executer2* a través de la tinción histoquímica de plantas transgénicas que expresan el gen reportero GUS bajo el control de los promotores de los genes *Executer1* y *Executer2*, y de la cuantificación relativa de los transcritos mediante PCR a tiempo real en *A. thaliana*.
5. Análisis del proteoma del estroma del cloroplasto en tres genotipos diferentes de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo silvestre Col-0, el mutante *executer1*, y el mutante *executer2*) en dos tratamientos lumínicos mediante la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE), e identificación de las proteínas diferencialmente expresadas a través de espectrometría de masas con un equipo MALDI-TOF.

## Objetivos

# Materiales y métodos



## Materiales y métodos

### 1. Análisis de secuencia mediante herramientas bioinformáticas

#### 1.1. Búsqueda de secuencias y alineamiento múltiple de secuencias

Las secuencias de las proteínas homólogas de Executer se obtuvieron de las bases de datos de secuencias de proteínas no redundantes (nr) en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y en Phytozome v10.1 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) utilizando la herramienta BLASTp (BLAST proteína-proteína) (Altschul *et al.* 1990). Para ello, se utilizaron las secuencias de Executer1 y Executer2 de *Arabidopsis* (At4g33630 y At1g27510, respectivamente) como moldes para la búsqueda inicial de secuencias. Se aisló el ARN mensajero (ARNm) de hojas de *Arabidopsis thaliana*, se transcribió a ADN complementario (ADNc), se amplificaron los genes *Ex1* y *Ex2*, se introdujeron en el vector pET21d, y se secuenciaron. Las secuencias recopiladas se alinearon con ClustalX (Larkin *et al.* 2007), y se ajustaron manualmente con el software Seaview (Gouy *et al.* 2010).

#### 1.2. Análisis filogenético

Para llevar a cabo el análisis filogenético, se eliminaron las regiones menos conservadas con el *software* Gblocks 0.91 (Castresana 2000, Dereeper *et al.* 2008). Se utilizó el software ProtTest 3 (Guindon y Gascuel 2003, Darriba *et al.* 2011) para estimar el mejor modelo de la evolución aminoacídica para la filogenia. Tanto la infraestructura estadística AIC como BIC escogieron el modelo JTT+I+G. El árbol filogenético se generó en la base del *maximum-likelihood* (ML) utilizando el *software* PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010). Para el análisis ML, se consideraron 4 sitios distribuidos como Gamma y se fijaron los parámetros en: 4 categorías de sustitución, 1.555 como parámetro gamma, y 0.06 como proporción de sitios invariables. Los valores *bootstrap* no paramétricos se calcularon en el análisis ML (100 réplicas) para evaluar la significancia del árbol obtenido. El árbol obtenido se representó con el software NJplot (Perrière y Gouy 1996).

#### 1.3. Identificación de familias y regiones conservadas

Los dominios y/o motivos de las proteínas se identificaron utilizando las bases de datos PFAM (Finn *et al.* 2014) e InterPro (Mitchell *et al.* 2015). Los esquemas de las proteínas con sus dominios se realizaron con la herramienta de MyDomains de Prosite (<http://prosite.expasy.org/mydomains/>).

#### 1.4. Predicción de estructura secundaria

La predicción de estructura secundaria de las secuencias correspondientes a las proteínas Executer1 y Executer2 de *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo con Phyre2 (Kelley y Sternberg 2009), Psipred (Jones 1999, Buchan *et al.* 2013), y Jpred3 (Cole *et al.* 2008).

#### 1.5. Predicción de regiones desordenadas

La predicción de las regiones desordenadas se realizó con el servidor DISOPRED3 (Jones y Cozzetto 2015).

## 2. Material biológico

### 2.1. Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este trabajo fueron *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*. Las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y One Shot<sup>®</sup> TOP10 (Invitrogen) se emplearon para el clonaje y la propagación de los plásmidos; la cepa DB3.1, para amplificar los vectores Gateway<sup>®</sup> que contienen el gen *ccdB*; y las cepas BL21(DE3), Rosetta(DE3), C43(DE3), Origami(DE3), y Arctic Express(DE3) para la producción de proteínas recombinantes. La cepa BL21(DE3) es la más comunmente utilizada para la producción de proteínas (Tabla 1). La cepa Rosetta(DE3), diseñada para aumentar la producción de proteínas eucariotas que contienen codones poco comunes en *E. coli*, contiene el plásmido pRARE que le confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol y proporciona los ARNs de transferencia para los codones AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, y GGA. La cepa C43(DE3) contiene al menos una mutación sin caracterizar que previene la muerte celular asociada a la producción de proteínas tóxicas para *E. coli*. La cepa Origami(DE3) tiene mutaciones en los genes tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*), lo que incrementa la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. La expresión de proteínas recombinantes en la cepa Arctic Express(DE3) (Agilent Technologies) tiene lugar a temperaturas muy bajas, y coexpresa las chaperoninas adaptadas al frío Cpn10 y Cpn60—cuyos genes están en un plásmido similar a pACYC que contiene el gen de resistencia a gentamicina—junto con la proteína de interés (Tabla 1). La cepa C58C1 de *A. tumefaciens*, resistente a rifampicina, se empleó para la transformación de hojas de plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*), y la cepa GV3101, resistente a gentamicina, se utilizó para la transformación de plantas transgénicas estables de *Arabidopsis thaliana* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo. Cm<sup>R</sup>: gen de resistencia a cloranfenicol, Gent<sup>R</sup>: gen de resistencia a gentamicina.

Cepa	Genotipo cromosómico	Plásmido
DH5 $\alpha$	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 <math>\Phi</math>80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	-
One Shot <sup>®</sup> TOP10	<i>F- mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC) <math>\Phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math> lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	-
DB3.1	<i>F- gyrA462 endA1 <math>\Delta</math>(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 <math>\lambda</math>- leu mtl1</i>	-
BL21 (DE3)	<i>F- ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) <math>\lambda</math> lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>	-
Rosetta (DE3)	<i>F- ompT hsdSB(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm <math>\lambda</math> lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>	pRARE (Cm <sup>R</sup> )
C43 (DE3)	<i>F- ompT hsdSB (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>	-
Origami (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522:: Tn10 trxB (Kan<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)</i>	-
Arctic Express (DE3)	<i>B F- ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>R</sup> gal <math>\lambda</math>(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent<sup>R</sup>]</i>	pACYC (Gent <sup>R</sup> )

### 2.2. Material vegetal

Se emplearon plantas de *Arabidopsis thaliana* y de tabaco (*Nicotiana benthamiana*). Las plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas fueron de ecotipo silvestre Columbia-0 (Col-0), y las mutantes *executer1* (*ex1*) y *executer2* (*ex2*) en fondo genético Col-0. La línea mutante *ex1* SALK\_002088C contiene una inserción de T-DNA en el gen *EXECUTER1* (At4g33630), y la



línea mutante *ex2* SALK\_021694C contiene una inserción de T-DNA en el gen *EXECUTER2* (At1g27510). Estas líneas se obtuvieron del NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*) (Alonso *et al.* 2003).

Las plantas de *A. thaliana* Col-0 se transformaron con la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* para obtener plantas transgénicas estables. Las hojas de las plantas de tabaco se transformaron con la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* para visualizar la localización subcelular de las proteínas fluorescentes mediante microscopía confocal.

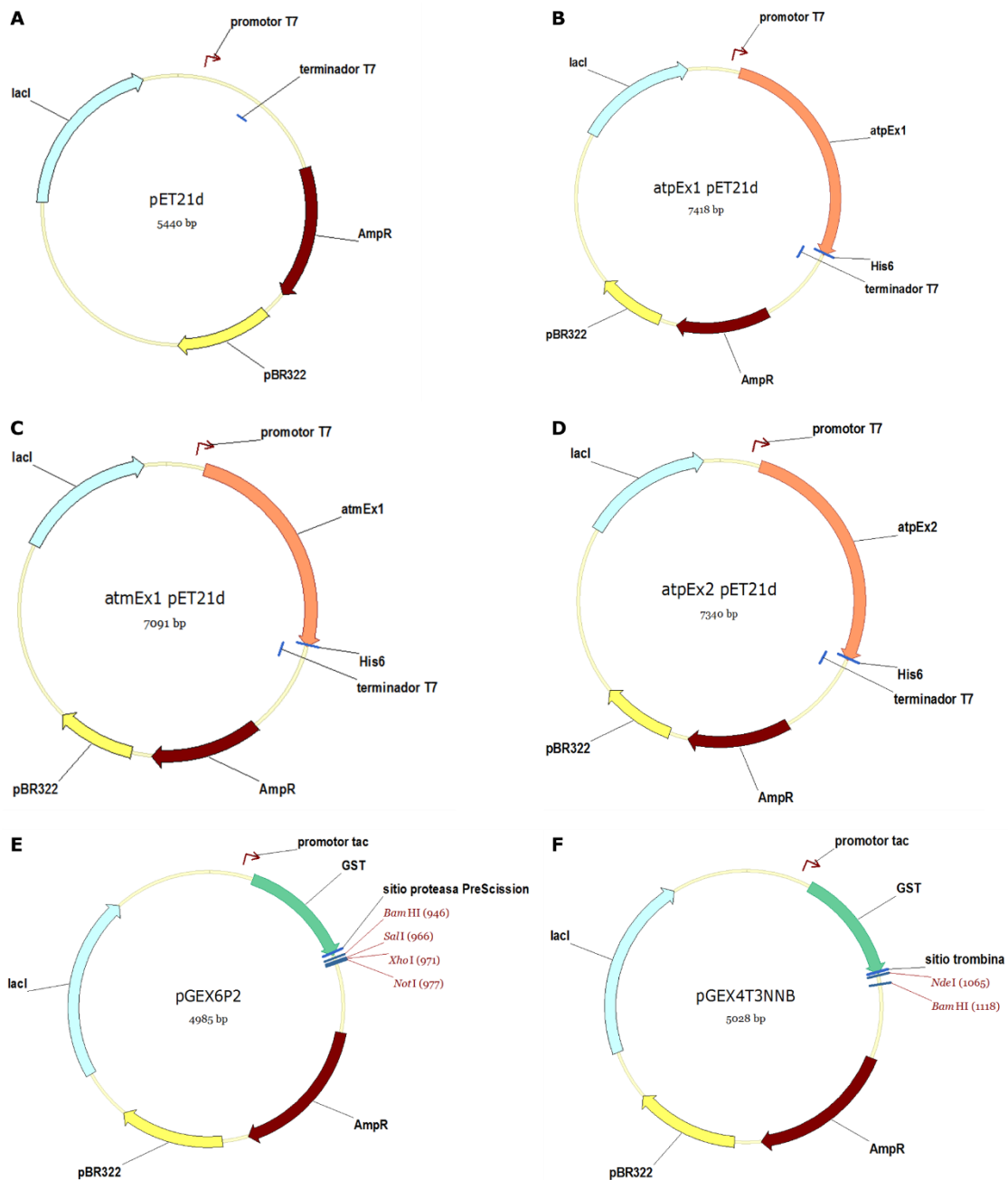
### **3. Vectores utilizados**

Los vectores utilizados se muestran en la Tabla 2 y en las Figuras 24, 25, 26, y 27.

**Tabla 2.** Vectores utilizados. **T7:** bacteriófago T7; **CaMV:** virus del mosaico de la coliflor, **atpEx1:** preproteína Executer1 de *Arabidopsis thaliana*, **atmEx1:** proteína madura Executer1 de *A. thaliana*, **atmEx2:** proteína madura Executer2 de *A. thaliana*, **His6:** etiqueta de 6 histidinas consecutivas, **GST:** glutatión S-transferasa, **YFPN:** fragmento N-terminal de YFP desde el aminoácido 1 al 155. **YFPC:** fragmento C-terminal de YFP desde el aminoácido 156 al 239. **HA:** hemaglutinina, **Amp:** ampicilina; **Kan:** kanamicina, **Cm:** cloranfenicol, **Hyg:** higromicina, **Sm:** espectinomicina, **Sp:** estreptomycinina, **Bar:** herbicida *bialaphos*, **nos T:** gen de la nopalina sintasa del plásmido *Ti* de *A. tumefaciens*, **L.S.:** Localización subcelular, **BiFC:** complementación bimolecular fluorescente, **GUS:** β-glucuronidasa.

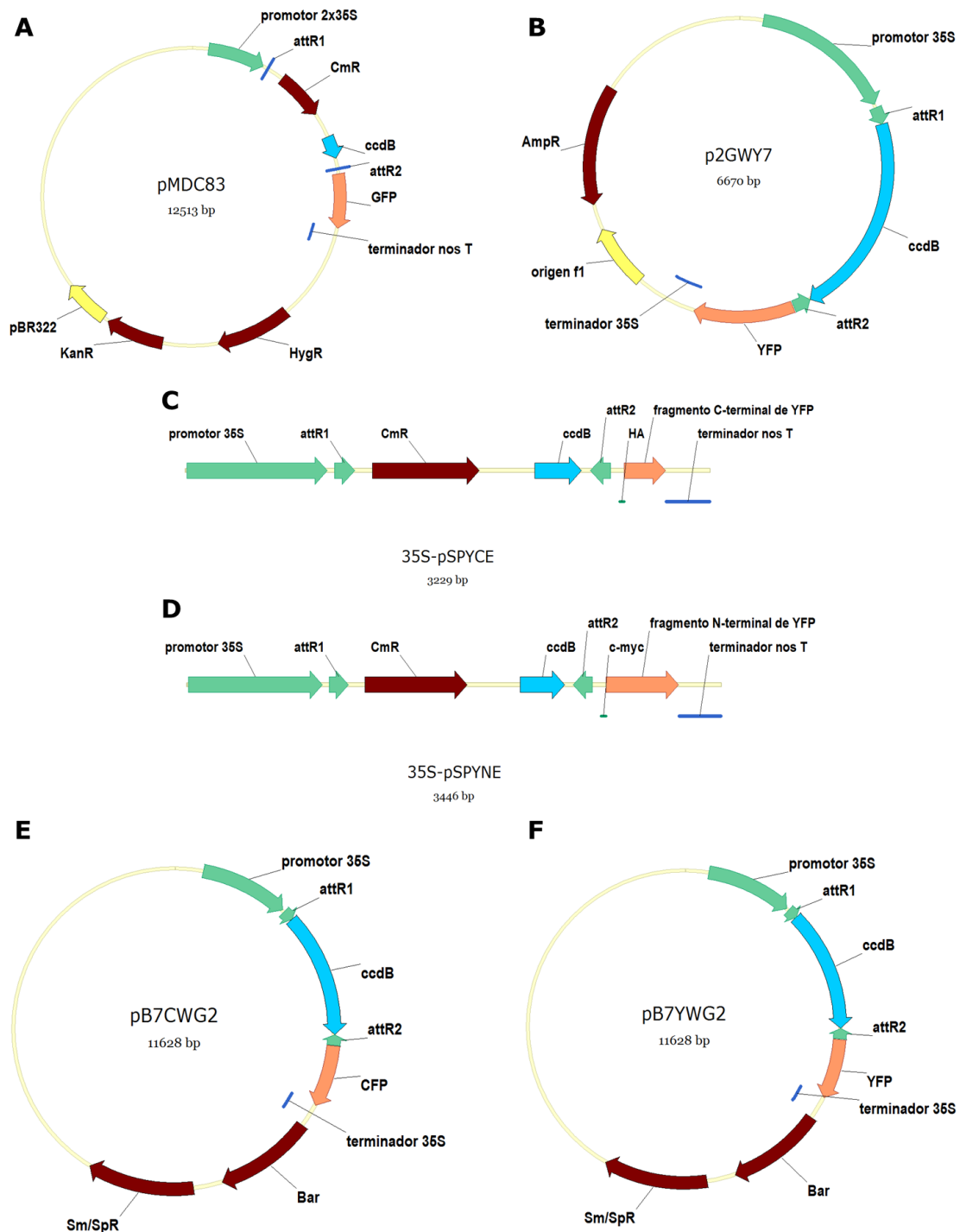
Vectores	Organismos	Promotor	Gen	Proteína fluorescente	Etiqueta de afinidad	Resistencia	Gen terminador	Uso	Referencia
pET21d	<i>E. coli</i>	T7	-	-	His <sub>6</sub>	Amp	T7	producción de proteínas recombinantes	Novagen
atpEx1_pET21d	<i>E. coli</i>	T7	atpEx1	-	His <sub>6</sub>	Amp	T7	molde en la PCR	nuestro laboratorio
atmEx1_pET21d	<i>E. coli</i>	T7	atmEx1	-	His <sub>6</sub>	Amp	T7	molde en la PCR	nuestro laboratorio
atpEx2_pET21d	<i>E. coli</i>	T7	atmEx2	-	His <sub>6</sub>	Amp	T7	molde en la PCR	nuestro laboratorio
pGEX6P2	<i>E. coli</i>	tac	-	-	GST	Amp	-	producción de proteínas recombinantes	GE Healthcare
pGEX4T3NNB	<i>E. coli</i>	tac	-	-	GST	Amp	-	producción de proteínas recombinantes	Modificado de pGEX4T3 (GE Healthcare)
pMDC83	<i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>N. benthamiana</i>	35S CaMV	-	GFP	-	Kan, Cm, Hyg	nos T	L.S.	(Curtis y Grossniklaus 2003)
p2GWY7	<i>E. coli</i> , <i>A. thaliana</i>	35S CaMV	-	YFP	-	Amp	35S T	L.S.	(Karimi <i>et al.</i> 2005)
35S-pSPYCE	<i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>N. benthamiana</i>	35S CaMV	-	YFPC	c-myc	Kan, Cm	nos T	BiFC	(Walter <i>et al.</i> 2004)

35S-pSPYNE	<i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>N. benthamiana</i>	35S CaMV	-	YFPN	HA	Kan, Cm	nos T	BiFC	(Walter <i>et al.</i> 2004)
bZip63_35S- pSPYCE	<i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>N. benthamiana</i>	35S CaMV	-	YFPC	c-myc	Kan, Cm	nos T	control positivo BiFC	(Walter <i>et al.</i> 2004)
bZip63_35S- pSPYNE	<i>E. coli</i> , <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> , <i>N. benthamiana</i>	35S CaMV	-	YFPN	HA	Kan, Cm	nos T	control positivo BiFC	(Walter <i>et al.</i> 2004)
pB7CWG2	<i>E. coli</i> , <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> , <i>N. benthamiana</i>	35S CaMV	-	CFP	-	Sm/Sp, Bar	35S T	L.S.	(Karimi <i>et al.</i> 2005)
pB7YWG2	<i>E. coli</i> , <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> , <i>N. benthamiana</i>	35S CaMV	-	YFP	-	Sm/Sp, Bar	35S T	L.S.	(Karimi <i>et al.</i> 2005)
atpEx1_ pCR8 <sup>®</sup> /GW/TOPO <sup>®</sup>	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	Sm	-	vector de entrada, Gateway <sup>®</sup>	nuestro laboratorio, Life technologies
atpEx2_ pCR8 <sup>®</sup> /GW/TOPO <sup>®</sup>	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	Sm	-	vector de entrada, Gateway <sup>®</sup>	nuestro laboratorio, Life technologies
pCR8 <sup>®</sup> /GW/TOPO <sup>®</sup>	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	Sm	-	vector de entrada, Gateway <sup>®</sup>	Life technologies
pENTR <sup>™</sup> 11	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	Kan, Cm	-	vector de entrada, Gateway <sup>®</sup>	Life technologies
pBI101	<i>E. coli</i> , <i>A.</i> <i>tumefaciens</i> , <i>A. thaliana</i>	-	GUS	-	-	Kan	-	Tinción histoquímica GUS	Clontech



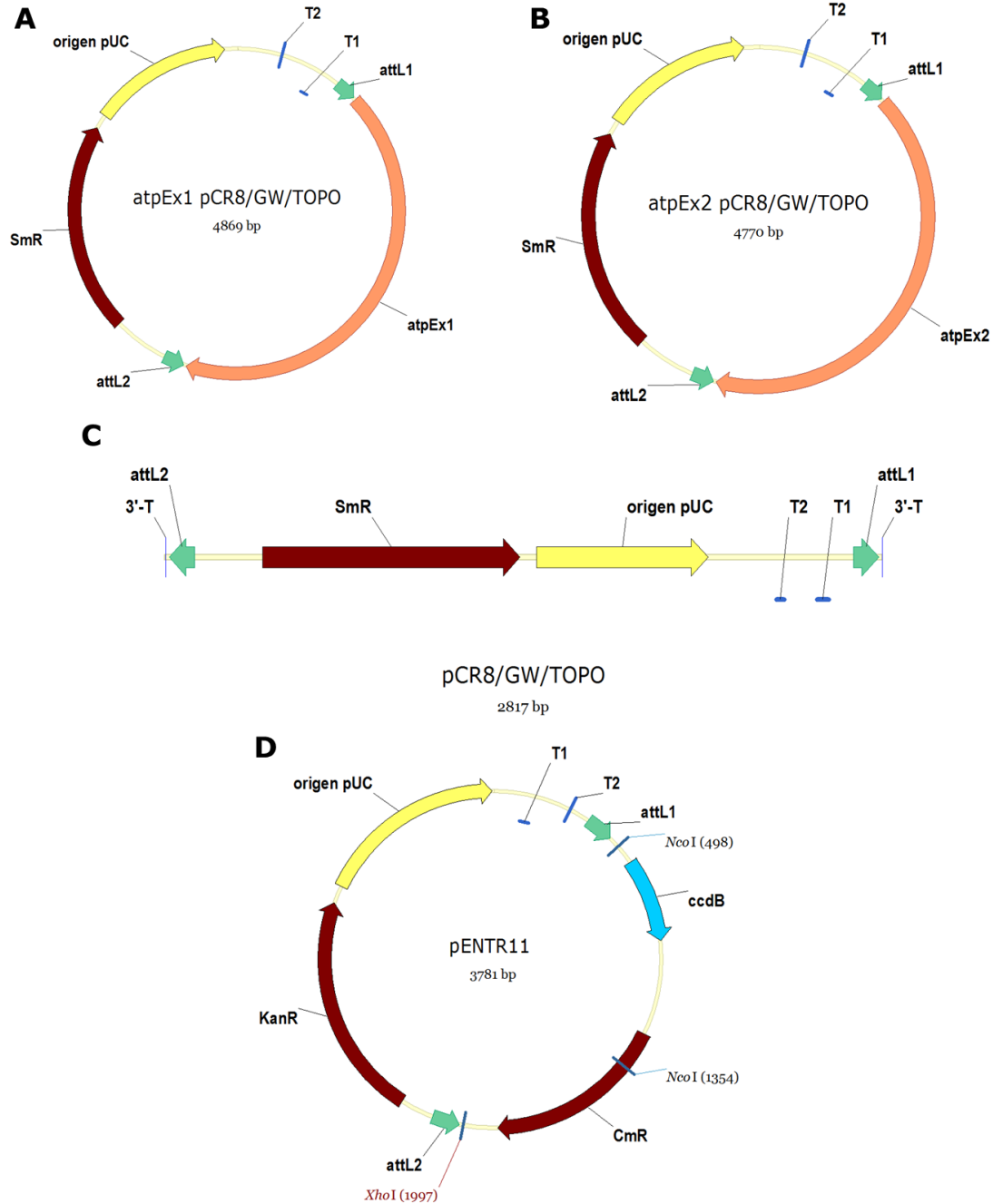
**Figura 24.** Vectores utilizados para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. (**A**, **B**, y **C**) Esquemas del vector comercial pET21d (Novagen) en los que la proteína producida está fusionada a una etiqueta de 6 histidinas (His6), y que contiene el promotor y el terminador T7. (**A**) El vector atpEx1\_pET21d, contiene el gen que codifica para la preproteína Executer1 de *Arabidopsis thaliana* (atpEx1), (**B**) el vector atmEx1\_pET21d contiene el gen que codifica para la proteína madura (sin el péptido de tránsito) Executer1 de *A. thaliana* (atmEx1), y (**C**) el vector atpEx2\_pET21d contiene el gen que codifica para la preproteína Executer2 de *A. thaliana* (atpEx2). (**D**) Esquema del vector pGEX6P2 (GE Healthcare) que contiene el gen que codifica para la proteína Glutación S-transferasa (GST), un sitio de reconocimiento de la proteasa PreScission, y los sitios de restricción *Bam*HI, *Xho*I, *Sal*I, y *Not*I. (**E**) Esquema del vector pGEX4T3NNB (modificado del pGEX4T3 de GE Healthcare), que contiene el gen que codifica para la proteína Glutación S-transferasa (GST), un sitio de digestión de la proteasa trombina, y los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI. Los vectores **D** y **E** contienen el promotor tac. Los vectores **A**,

**B, C, D, y E** contienen el gen de resistencia a ampicilina (AmpR), el origen de replicación del plásmido (pBR322), y el gen lacI que codifica para la proteína represora lac.



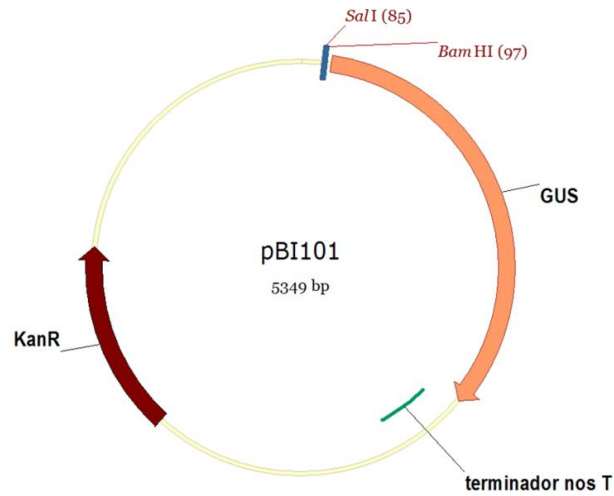
**Figura 25.** Vectores que contienen los genes que codifican para las proteínas fluorescentes. **A)** Esquema del vector pMDC83 (Curtis y Grossniklaus 2003), que contiene el gen que codifica para la proteína GFP. **B)** Esquema del vector p2GWY7 (Karimi *et al.* 2005), que contiene el gen que codifica para la proteína YFP. **C)** Esquema del fragmento del vector 35S-pSPYCE (Walter *et al.* 2004), que contiene el gen que codifica para el fragmento C-terminal de la proteína YFP. **D)** Esquema del fragmento del vector 35S-pSPYNE (Walter *et al.* 2004), que contiene el gen que codifica para el fragmento N-terminal de la proteína YFP. **E)** Esquema del vector pB7CWG2 (Karimi *et al.* 2005), que contiene el gen que codifica para la proteína CFP. **F)** Esquema del vector pB7YWG2 (Karimi *et al.* 2005), que contiene el gen que

codifica para la proteína YFP. El vector **A** tiene el origen de replicación del plásmido pBR322, y el vector **B** tiene el origen de replicación f1. Los vectores **A**, **C**, y **D** contienen el casete Gateway® attR1-CmR-ccdB-attR2; y los vectores **B**, **E**, y **F** contienen el casete Gateway® attR1-ccdB-attR2.



**Figura 26.** Vectores de entrada de la tecnología Gateway®. **A)** Esquema del vector *atpEx1*\_pCR8/GW/TOPO, que contiene el gen que codifica para la preproteína Executer1 de *A. thaliana* (*atpEx1*) flanqueado por los sitios de recombinación Gateway® attL1 y attL2. **B)** Esquema del vector *atpEx2*\_pCR8/GW/TOPO, que contiene el gen que codifica para la preproteína Executer2 de *A. thaliana* (*atpEx2*) flanqueado por los sitios de recombinación Gateway® attL1 y attL2. **C)** Esquema del vector lineal pCR8/GW/TOPO que contiene los sitios de recombinación attL1 y attL2. **D)** Esquema del vector pENTR11 que contiene el casete Gateway® attL1-ccdB-CmR-attL2 y los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*

*XhoI*. Los vectores **A**, **B**, **C**, y **D** contienen el origen de replicación pUC, y las secuencias de terminación de la transcripción *rrnB* T1 y T2.



**Figura 27.** Fragmento del vector pBI101 que se inserta en el genoma de la planta *A. thaliana*. El vector completo tiene aproximadamente 12 kb. En el esquema se muestran los sitios de restricción *SalI* y *BamHI* donde se inserta el promotor del gen de interés, el gen β-glucuronidasa (GUS), el terminador nos T, y el gen de resistencia a kanamicina (KanR).

#### 4. Oligonucleótidos utilizados

Para cada PCR, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 3, 4, 5, 6, y 7), y se sintetizaron bajo pedido en Invitrogen (Life technologies).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados en la clonación de constructos. Abreviaturas: fw (*forward*, oligonucleótido en sentido directo), rv (*reverse*, oligonucleótido en sentido reverso).

Nombre	Secuencia 5'→ 3'
atmEx1_pGEX6P2_fw	GATC <u>GGA TCC</u> TGG GAT TGG GAC CGT TGG BamHI W D W D R W <b>111</b>
atmEx1_pGEX6P2_rv	TCGA <u>CTC GAG</u> TCA GGC TTG AAG CCT CAG GCG XhoI Stop A Q L R L R <b>684</b>
atm2Ex1_pET21d_fw	ATA CC ATG CCT AGA TGG GAC TCT GCG ATT C M P R W D S A I <b>65</b>
atm2Ex1_pET21d_rv	CA TCT AGG CAT GGT ATA TCT CCT TCT TAA AGT TAA AC R P M T Y R R R L T L <b>65</b>
atm2Ex1_pGEX4T3NNB_fw	TGA <u>GAA TTC CATATG</u> CCT AGA TGG GAC TCT GCG ATT CAG EcoRI NdeI P R W D S A I Q <b>65</b>
atm2Ex1_pGEX4T3NNB_rv	GATC <u>GGATCC</u> TCA GGC TTG AAG CCT CAG GCG G BamHI Stop A Q L R L R <b>684</b>

Materiales y métodos

atm3Ex1_ pGEX4T3NNB_fw	GGA TCA GGG AGC GGT GAA ATC GCA GTG AAA TTT GTG ATA GGC GAT ATT G G S G S G E I A V K F V I G D I 408
atm3Ex1_ pGEX4T3NNB_rv	ACC GCT CCC TGA TCC CTT CCA TTT TAA GTA CAC AGC CTG CTT TTT GTA GTT G S G S G K W K L Y V A Q K K Y N 265 CC
atm4Ex1_A_ pGEX4T3NNB_fw	GGA TCA GGG AGC GGT GAG GAA TCT TCT GGT TTC CAG AGT TTC CTG C G S G S G E E S S G F Q S F L 318
atm4Ex1_A pGEX4T3NNB_rv	ACC GCT CCC TGA TCC CTT CCA TTT TAA GTA CAC AGC CTG CTT TTT GTA GTT G S G S G K W K L Y V A Q K K Y N 265 C
atm4Ex1_B_ pGEX4T3NNB_fw	GGA TCA GGG AGC GGT GAA ATC GCA GTG AAA TTT GTG ATA GGC GAT ATT G G S G S G E I A V K F V I G D I 408
atm4Ex1_B_ pGEX4T3NNB_rv	ACC GCT CCC TGA TCC CCT TCC AGG CGC AGT TAC TTT CAT AAC CTT AAC C G S G S G R G P A T V K M V K V 346
atΔC1Ex1 pET21d_fw	TA AAA TGG GCC CTC GAG CAC CAC C K W A L E H H 264
atΔC1Ex1 pET21_rv	TC GAG GGC CCA TTT TAA GTA CAC AGC CTG C L A W K L Y V A Q 264
atΔC2Ex1 pET21d_fw	CGA GAC CTC GAG CAC CAC CAC C R D L E H H H H 189
atΔC2Ex1 pET21d_rv	TG CTC GAG GTC TCG CAA GTA TAC TGC ATC CTT G E L D R L Y V A D K 189
atΔC3Ex1 pET21d_fw	TTG CGA GAC CTC GAG CAC CAC CAC CAC C L R D L E H H H H H 189
atΔC3Ex1 pET21d_rv	CTC GAG GTC TCG CAA GTA TAC TGC ATC CTT GTA ACG E L D R L Y V A D K Y R 189
atΔC3Ex1 pGEX4T3NNB_fw	TGA <u>GAA TTC</u> <u>CAT ATG</u> CCT AGA TGG GAC TCT GCG ATT CAG EcoRI NdeI P R W D S A I Q 89
atΔC3Ex1 pGEX4T3NNB_rv	GATC <u>GGA TCC</u> TCA GTC TCG CAA GTA TAC TGC ATC CTT GTA AC BamHI Stop D R L Y V A D K Y 189
atΔC4Ex1 pGEX4T3NNB_fw	AA CTT AGT TGA GGATCCCCGAATTC L S Stop 234
atΔC4Ex1 pGEX4T3NNB_fw	GATCC TCA ACT AAG TTG CCG AGG ATT ATA ACT TCT TGC Stop S L Q R P N Y S R A 234



atΔC5Ex1 pGEX4T3NNB _fw	AA ATC TTT TGA GGATCCCCGAATTCCCG I F Stop <b>246</b>
atΔC5Ex1 pGEX4T3NNB _fw	GATCC TCA AAA GAT TTC AAA AAG AGG AGC ACC AGC Stop F I E F L P A G A <b>246</b>
atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_fw	TGA <u>GAA TTC</u> <u>CATATG</u> GAT CAA GTT GAT GAC CAA GAC CGT C EcoRI NdeI D Q V D D Q D R <b>121</b>
atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_rv	GATC <u>GGA TCC</u> TCA ATT AGT AGC AGT AGC TGC AAT TGC CAC BamHI Stop N T A T A A I A V <b>163</b>
atΔN1Ex1 pET21d_fw	GATATACC ATG GGT GAT TTG GCC AAA TC M G D L A K <b>485</b>
atΔN1Ex1 pET21d_rv	TC ACC CAT GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAA G M <b>485</b>
atΔN2Ex1 pET21d_fw	ATACC ATG TCG GGT TTG ACA AAA TTT CG M S G L T K F <b>523</b>
atΔN2Ex1 pET21d_rv	A ACC CGA CAT GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC G S M <b>523</b>
atΔN3Ex1 pET21d_fw	ATACC ATG GAT CCC CTA GAC GGA CTT TAT ATT G M D P L D G L Y I <b>538</b>
atΔN3Ex1 pET21d_rv	GGG ATC CAT GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC P D M <b>538</b>
atΔN4Ex1 pET21d_fw	ATACC ATG GAA TAT GTT GAA GCT GTG AAA TTA ACT G M E Y V E A V K L T <b>581</b>
atΔN4Ex1 pET21d_rv	AC ATA TTC CAT GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC Y E M <b>581</b>
atΔN5Ex1 pET21d_fw	ATACC ATG GCA GTG AAA TTT GTG ATA GGC G M A V K F V I G <b>410</b>
atΔN5Ex1 pET21d_rv	T CAC TGC CAT GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC V A M <b>410</b>
atΔN6Ex1 pET21d_fw	GAT GGC AAG CTC GAG CAC CAC CAC CAC C D G K L E H H H H H <b>654</b>
atΔN6Ex1 pET21d_rv	CTC GAG CTT GCC ATC GAG GAT AAC AAG CTC G E L K G D L I V L E <b>654</b>
atmEx2pET21d_fw	ATACC ATG TGG GAT TGG GAT TGG GAT C M W D W D W D <b>85</b>

Materiales y métodos

atmEx2pET21d_rv	CA ATC CCA CAT GGTATATCTCCTTCTTAAAG D W M <b>85</b>
atΔC2Ex2 pGEX4T3NNB_fw	TGA <u>GAA TTC CAT ATG</u> TGG GAT TGG GAT TGG GAT CGT TG EcoRI NdeI W D W D W D D <b>85</b>
atΔC2Ex2 pGEX4T3NNB_rv	GATC <u>GGA TCC</u> TCA GAA AAT CTC AAA CAG GGG TGT TCC AGC BamHI Stop F I E F L P T G A <b>222</b>
atΔC1Ex2 pGEX4T3NNB_fw	CC AGG TTA TGA GGATCCCCGAATTCCCG R L Stop <b>163</b>
atΔC1Ex2 pGEX4T3NNB_rv	GATCC TCA TAA CCT GGA AGC ATC ATG GTA ACG C Stop L R S A D H Y R <b>163</b>
atUvr1Ex2 pGEX4T3NNB_fw	TGA <u>GAA TTC CAT ATG</u> TCC GAG ATT GAA GAA GTC GAG AGC EcoRI NdeI S E I E E V E S <b>97</b>
atUvr1Ex2 pGEX4T3NNB_rv	GATC <u>GGA TCC</u> TCA ATC AAC AGT AGC TTC TGA AAT AGC TTG TTT C BamHI Stop D V T A E S I A Q K <b>138</b>
atpΔC3Ex1_ pCR8/GW/TOPO _fw	CGA GAC AAGGGCGAATTCGACCCAGC R D <b>189</b>
atpΔC3Ex1_ pCR8/GW/TOPO _rv	TCGCCCTT GTC TCG CAA GTA TAC TGC ATC CTT GTA AC R D L Y V A D K Y <b>189</b>
atpEx1_ pENTR11_fw	TGA <u>GAA TTC CCA TGG</u> TC ATG CCT TCC TTA TCC ACC CCG EcoRI NcoI M P S L S T P <b>1</b>
atpEx1_ pENTR11_rv	TGA <u>GAA TTC CTC GAG</u> TG GGC TTG AAG CCT CAG GCG G EcoRI NcoI A Q L R L R <b>684</b>
atPend_fw	ATG CAC TCT CTT AAG ACT ACT TGC GTT G M H S L K T T C V <b>1</b>
atPend_rv	ACC AGG ACC AAG GAC TCT ATT TTC TTG G P G L V R N E Q <b>88</b>
atPgl35_fw	ATG GCG ACG GTA CCA TTG TTC AC M A T V P L F <b>1</b>
atPgl35_rv	AGG GTT TAA GAG AGA GCT TCC TTC TTT G P N L L S S G E K <b>318</b>
promotorEx1_fw	TCGA <u>GTC GAC</u> AACAAACCAAGAATCGTTTTCAAGTG SalI <b>-1995 pb</b>
promotorEx1_rv	TCGA <u>GTC GAC</u> CAT CGCCGGAGAGATGTGAGAG SalI M <b>1</b>

promotorEx2_fw	GATC <u>GGA TCC</u> CATCCAATGTTGTCCCAAGCAG BamHI <b>-1995 pb</b>
promotorEx2_rv	ATC <u>GGA TCC</u> CAT CGGAGGACGTTATCACCG BamHI M <b>1</b>

**Tabla 4.** Oligonucleótidos empleados en las PCRs de colonias. Abreviaturas: fw (*forward*, oligonucleótido en sentido directo), rv (*reverse*, oligonucleótido en sentido reverso).

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Comentarios
atmEx1_pGEX6P2_fw	GATC <u>GGA TCC</u> TGG GAT TGG GAC CGT TGG BamHI W D W D R W <b>111</b>	Anilla en el gen <i>atmEx1</i>
atmEx1_pGEX6P2_rv	TCGA <u>CTC GAG</u> TCA GGC TTG AAG CCT CAG GCG XhoI Stop A Q L R L R <b>684</b>	Anilla en el gen <i>atmEx1</i>
atEx1_1rv	TG TGC GCC AAT ATA AAG TCC G A G I Y L G <b>547</b> <b>542</b>	Anilla en el gen <i>atEx1</i>
promEx1sq1_fw	AGTGAATTTGGAATCGAGAC	Anilla en el promotor del gen <i>Ex1</i>

**Tabla 5.** Oligonucleótidos empleados en la secuenciación. Abreviaturas: fw (*forward*, oligonucleótido en sentido directo), rv (*reverse*, oligonucleótido en sentido reverso).

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Comentarios
atEx1_2fw	T GCA GAG CAT GGA AGA TAT G A E H G R Y <b>218</b>	Anilla en el gen <i>Ex1</i>
atEx1_3fw	CAT TTC GAT CAA GTT GAT G H F D Q V D <b>119</b>	Anilla en el gen <i>Ex1</i>
atEx1_4fw	T GCT GAC ATT GAA TTG G A D I E L <b>389</b>	Anilla en el gen <i>Ex1</i>
5' pGEX_fw	G GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGT G G W Q A T F G <b>205</b>	Anilla en el gen que codifica para la GST (pGEX)
3' pGEX_rv	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	Anilla en el vector pGEX
promotorT7_fw	TAATACGACTCACTATAGGG	Anilla en el promotor T7 (pET21d)
terminadorT7_rv	TATGCTAGTTATTGCTCAG	Anilla en el terminador T7 (pET21d)
atEx2_1fw	AA GCA GCT GGA ACA CCC CTG A A G T P L <b>213</b>	Anilla en el gen <i>Ex2</i>
atEx2_2fw	CA TCT ATG GAT AGT GCA G S M D S A <b>365</b>	Anilla en el gen <i>Ex2</i>
pMDC83Ex1_rv	TT GAT GGC GCT CTT GAG AAC I A S K L V <b>79</b>	Anilla en el gen <i>atpEx1</i> del vector <i>atpEx1_pMDC83</i>

## Materiales y métodos

pMDC83_rv	TTGTGCCCATTAACATCACC	Anilla en el gen que codifica para la proteína GFP del vector pMDC83
pMDC83Ex2_rv	T ATC AGC TCC ATC AAC AGC G D A G D V A 77	Anilla en el gen <i>atpEx2</i> del vector <i>atpEx2_pMDC83</i>
35Sprom_fw	ACGCACAATCCCCTATCCTTC	Anilla en el promotor 35S
SPYCE_rv	TCTTGAAGTTCACCTTGATG	Anilla en el gen que codifica para la proteína YFP-C del vector 35S-pSPYCE
SPYNE_rv	TTGCTCACCATAAGATCCTC	Anilla en el gen que codifica para la proteína YFP-N del vector 35S-pSPYNE
YFP_rv	AACTCAGGGTCAGCTTGCC	Anilla en el gen que codifica para la proteína YFP del vector p2GWY7
pENTR11_rv	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	Anilla en el vector pENTR11
atEx1_5fw	CATGCC ATG CCT TCC TTA TCC ACC CCG C M P S L S T P 1	Anilla en el gen <i>Ex1</i>
M13_fw	TGTA AACGACGGCCAGT	Anilla en el vector pCR8/GW/TOPO
M13_rv	AACAGCTATGACCATG	Anilla en el vector pCR8/GW/TOPO
CFP_rv	TGAACTCAGGGTCAGCTTG	Anilla en el gen que codifica para la proteína CFP del vector pB7CWG2
gus_rv	TCCACAGTTTTTCGGATCCAG	Anilla en el gen <i>GUS</i>
promEx2sq1_fw	AGGTGTCAAGCTGGAAAATC	Anilla en el promotor del gen <i>Ex2</i>
pBI101_fw	ATTAGGCACCCAGGCTTTAC	Anilla en el vector pBI101
promEx1sq2_fw	AGCCAGTATTCAAGAACCTG	Anilla en el promotor del gen <i>Ex1</i>
promEx2sq2_fw	AAGTGCATTCATAAGTGACG	Anilla en el promotor del gen <i>Ex2</i>

**Tabla 6.** Oligonucleótidos empleados en la qRT-PCR. Abreviaturas: fw (*forward*, oligonucleótido en sentido directo), rv (*reverse*, oligonucleótido en sentido reverso).

Nombre	Secuencia 5'→3'	Comentarios
18S_qRTPCR_fw	AATATACGCTATTGGAGCTGG	Anilla en el gen <i>ARN ribosómico 18S</i>
18S_qRTPCR_rv	ATGGCTCATTAATCAGTTAT	Anilla en el gen <i>ARN ribosómico 18S</i>
Ex1_qRTPCR_fw	TGCTGGGTTGGTAGGGTGG	Anilla en el final del exón 3 y el principio del exón 4 del gen <i>Ex1</i>
Ex1_qRTPCR_rv	AGGAGCACCAGCAGCAGATG	Anilla en el exón 5 del gen <i>Ex1</i>
Ex2_qRTPCR_fw	GAGAGAAAGCTTCTTTGAAGGTATCG	Anilla en el final del exón 6 y el principio del exón 7 del gen <i>Ex2</i>
Ex2_qRTPCR_rv	CCCTGTCAACTTACAGCCTCAAC	Anilla en el exón 8 del gen <i>Ex2</i>

**Tabla 7.** Oligonucleótidos empleados en el análisis de las plantas mutantes *ex1* y *ex2*. Abreviaturas: fw (*forward*, oligonucleótido en sentido directo), rv (*reverse*, oligonucleótido en sentido reverso).

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Comentarios
LB	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	Anilla en la inserción de T-DNA de las líneas Salk
RP_Ex1	CACTCCCTCCTCCAAAAGATC	Anilla en el exón 1 del gen <i>Ex1</i>
FP_Ex1	TACCCCAATCACTCAAATTGG	Anilla en el intrón 5 del gen <i>Ex1</i>
RP_Ex2	AAATGTCAATGTGGCTGGAAC	Anilla en el intrón 9 del gen <i>Ex2</i>
FP_Ex2	CACTAAGCTTGTCATCGGAGG	Anilla en el exón 6 del gen <i>Ex2</i>
actina_fw	GCCATCCAAGCTGTTCTCTC	Anilla en el gen <i>Actina</i>
actina_rv	GAACCACCGATCCAGACACT	Anilla en el gen <i>Actina</i>
1F	TGCTGGGTTGGTAGGGTGG	Anilla en los exones 3 y 4 del gen <i>Ex1</i>
1R	AGGAGCACCAGCAGCAGATG	Anilla en el exón 5 del gen <i>Ex1</i>
2F	TCCAAAGAACAAGTAACAGCTCTGC	Anilla en el exón 6 del gen <i>Ex2</i>
2R	AGTCTCAGACGGTTGAAAAGGACC	Anilla en el exón 11 del gen <i>Ex2</i>

## 5. Condiciones de cultivo de *Arabidopsis* y de tabaco

Para el cultivo *in vitro*, las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron durante 3 minutos en una disolución de 50 % (v/v) etanol y 0.05 % (v/v) Tritón X-100, y se lavaron cuatro veces con 70 % (v/v) de etanol. En cambio, las semillas de **tabaco** se incubaron durante 4 minutos en una disolución estéril de 75 % (v/v) de hipoclorito de sodio y 0.01 % (v/v) de Tritón X-100, se lavaron cuatro veces con agua Milli-Q estéril. Una vez esterilizadas, las semillas se sembraron en placas Petri con 0.43 % (p/v) de medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962) con vitaminas (Duchefa Biochemie) previamente ajustado a pH 5.7 con 0.7 % (p/v) de fitoagar (Duchefa Biochemie). Para sincronizar la germinación de todas las semillas, las placas se incubaron a 4 °C durante 48 horas en oscuridad. Las plantas crecieron con un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) o corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad) a 22-23 °C a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , y una humedad relativa del 70 %. Después de aproximadamente 12 días, las plantas crecidas *in vitro* se transfirieron a sustrato y se continuaron creciendo en las condiciones mencionadas anteriormente.

### 5.1. Ensayo de crecimiento de raíces en placa vertical

Para realizar el ensayo de crecimiento de las raíces, las semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, y de los mutantes *ex1* y *ex2* se esterilizaron y se sembraron en placas Petri cuadradas con 0.23 % (p/v) de medio MS, 1.5 % (p/v) de fitoagar, y 0.75 % (p/v) de sacarosa. Las placas se incubaron a 4 °C en oscuridad durante 48 horas para sincronizar la germinación. Las plantas crecieron durante 21 días con las placas en vertical con un fotoperiodo de día corto (8 h luz/16 h oscuridad) a 22-23 °C y a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Por último, se tomaron imágenes cada 2-3 días para medir la longitud de la raíz con el software ImageJ, y para contar el número de raíces laterales por planta.

### 5.2. Ensayo con el tratamiento lumínico

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Col-0, y los mutantes *ex1* y *ex2* se sumergieron en agua Milli-Q, y se incubaron a 4 °C durante 48 horas para sincronizar la germinación de todas las semillas. Pasados esos dos días, se sembraron directamente en tierra (dos partes de sustrato y una parte de vermiculita). Las plantas crecieron en una cámara de cultivo durante 7-8 semanas con un fotoperiodo de 8 horas luz/16 horas oscuridad a 20 °C, con una densidad de flujo de

fotones (*PFD*, *photon flux density*) de  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y una humedad relativa del 70 %. Las plantas seleccionadas para las condiciones normales de luz (NL) permanecieron en la misma cámara de cultivo, y se recogieron a las 7 horas de luz inmediatamente después de haber terminado las 16 horas de oscuridad. En cambio, para el tratamiento de alta intensidad de luz (HL), las plantas permanecieron durante 1 hora en la cámara a  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  después de las 16 horas de oscuridad, y se transfirieron a otra cámara de cultivo con una densidad de flujo de fotones de  $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 6 horas.

## 6. Manipulación de microorganismos

### 6.1. Manipulación y cultivo de *Escherichia coli*

#### 6.1.1 Crecimiento, medios de cultivo y conservación de cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* crecieron en cultivo líquido a 37 °C con una agitación de 200 rpm. Los medios utilizados fueron LB (Luria-Bertani), TB (Terrific Broth), y SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite repression*, medio de crecimiento superóptimo con represión de catabolitos). La composición del medio LB líquido es 1 % (p/v) bacto triptona, 1 % (p/v) NaCl, y 0.5 % (p/v) extracto de levadura. El medio LB sólido tiene la misma composición del LB líquido suplementado con 2 % de agar bacteriológico. El medio TB se compone de 1.2 % (p/v) bacto triptona, 2.4 % (p/v) extracto de levadura, 0.4 % (v/v) glicerol, 72 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , y 17 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El medio SOC contiene 2 % (p/v) bacto triptona, 10 mM NaCl, 0.5 % (p/v) extracto de levadura, 2.5 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , y 10 mM  $\text{MgSO}_4$ .

La concentración final de los antibióticos incorporada en los medios para selección fueron: kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cloranfenicol (34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), gentamicina (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), espectinomina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y/o estreptomina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### 6.1.2. Preparación de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ , DB3.1, y Rosetta) se realizó según el siguiente protocolo. Se inoculó una única colonia de la cepa celular deseada en 3 mL de LB. En el caso de la cepa Rosetta, al LB se le añadió el antibiótico cloranfenicol a una concentración final de 34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Este precultivo se incubó a 37 °C durante toda la noche con una agitación de 200 rpm. A la mañana siguiente se añadió 1 mL del precultivo a 50 mL de LB sin antibióticos, y se incubó a 37 °C con una agitación de 200 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica medida a 600 nm no superior a 0.4-0.5 (paso óptico de 1 cm). El cultivo se incubó en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C a 3000  $\times g$  y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 20 mL de la disolución 100 mM  $\text{MgCl}_2$  estéril fría, y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 4 °C a 3000  $\times g$  y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 2 mL de la disolución estéril fría 50 mM  $\text{CaCl}_2$  y 15 % (v/v) de glicerol. Se hicieron alícuotas, se congelaron en nitrógeno líquido, y se conservaron a -80 °C.

#### 6.1.3. Transformación química de células competentes de *E. coli*

A 100  $\mu\text{L}$  de células competentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ , DB3.1, One Shot<sup>®</sup> TOP10, BL21, Rosetta, Origami, C43, y Arctic Express) se añadieron aproximadamente 100 ng de plásmido y se incubaron en hielo durante 30 min. Tras un choque térmico de 42 °C durante 45 segundos, se incubaron en hielo durante 2 minutos. Se añadió 300  $\mu\text{L}$  de medio SOC, y se incubó a 37 °C

durante 1 hora con una agitación de 300 rpm. Las células se sembraron en placas de LB con el antibiótico correspondiente al plásmido, y en el caso de Rosetta, se añadió cloranfenicol (34 µg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Una vez crecidas las colonias, las placas se guardaron a 4 °C.

Las células competentes de **Arctic Express** se transformaron igual que el resto de las cepas de *E. coli* exceptuando el choque térmico de 42 °C que se hizo durante 20 segundos en lugar de 45 segundos. Las células se sembraron en placas de LB con el antibiótico al que es resistente el plásmido y gentamicina (20 µg/mL).

## **6.2. Manipulación y cultivo de *Agrobacterium tumefaciens***

### **6.2.1. Crecimiento, medios de cultivo y conservación de cepas de *Agrobacterium tumefaciens***

Las cepas de *Agrobacterium* se crecieron en cultivo líquido a 28 °C con una agitación de 200 rpm. Los tres medios utilizados fueron LB, SOC y YEBS. El medio YEBS (*Yeast Extract Beef Sucrose*) contiene 5 g/L de extracto de ternera, 1 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona, 5 g/L de sacarosa y 0.5 g/L de MgCl<sub>2</sub> ajustado a pH 7.0.

La cepa C58C1 se seleccionó con 50 µg/mL del antibiótico rifampicina, y la cepa GV3101 se seleccionó con 20 µg/mL de gentamicina. Los antibióticos kanamicina (50 µg/mL) y espectinomicina (75 µg/mL) se añadieron para seleccionar los plásmidos transformados en *Agrobacterium*.

### **6.2.2. Preparación de células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1**

Se inoculó una colonia aislada de *Agrobacterium* en 10 mL de LB suplementado con una concentración final de rifampicina de 50 µg/mL, incubándolo a 28 °C con una agitación de 200 rpm durante toda la noche. 4 mL del precultivo se transfirieron a 200 mL de LB con 50 µg/mL de rifampicina y se mantuvo a 28 °C con una agitación de 200 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó 0.8 (paso óptico de 1 cm). El cultivo se centrifugó a 3000 xg durante 20 minutos a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en hielo en un volumen de 100 mL de 10 mM Tris-HCl pH 8.0 previamente autoclavado frío. Se centrifugó a 3000 xg durante 10 minutos a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en hielo en 2 mL de 10 % (v/v) de glicerol en medio LB. Se hicieron alícuotas, se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a - 80°C.

### **6.2.3. Transformación de células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1**

Se añadieron 500 ng del ADN plasmídico a 200 µL de células quimiocompetentes de *Agrobacterium* previamente descongeladas. La suspensión de células se congeló en nitrógeno líquido durante 5 minutos, se descongeló a 37 °C durante 25 minutos, se le añadieron 100 µL de medio SOC, y se incubó a 28 °C durante 1 hora con una agitación de 200 rpm. Las células se sembraron en placas de LB suplementado con rifampicina (50 µg/mL), y el antibiótico al que es resistente el ADN plasmídico transformado. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Una vez crecidas las colonias, las placas se guardaron a 4 °C.

#### **6.2.4. Transformación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101**

Se mezclaron 100 ng de plásmido (previamente dializado) con 200  $\mu$ L de células GV3101 electrocompetentes de *Agrobacterium* (previamente descongeladas), y se añadieron a una cubeta de electroporación. El electrochoque se llevó a cabo en el electroporador MicroPulser™ de Bio-Rad. Las células electroporadas se resuspendieron en 1 mL de medio LB y se incubaron a 28 °C durante 3 horas sin agitación. Las células se sembraron en LB sólido suplementado con 20  $\mu$ g/mL de gentamicina (antibiótico al que es resistente la cepa GV3101) y con el antibiótico al que es resistente el vector introducido. Se incubaron a 28 °C durante 48 horas o hasta la aparición de colonias. Las placas se conservaron a 4 °C.

### **7. Aislamiento de ácidos nucleicos**

#### **7.1. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli***

La extracción del ADN plasmídico de las células de *E. coli* se realizó con el kit GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. El aislamiento de plásmidos a gran escala se llevó a cabo con el kit Nucleobond® AX 100 (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo del fabricante.

#### **7.2. Aislamiento del ADN genómico de *Arabidopsis***

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo mediante dos métodos diferentes: con el reactivo CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y con un kit comercial. El ADN genómico aislado mediante el protocolo con el reactivo CTAB se utilizó para comprobar la inserción del T-DNA en los genes *Executer1* y *Executer2*. El ADN genómico obtenido con el kit comercial se utilizó para verificar la presencia de los transgenes en las plantas *promotorEx1-GUS* y *promotorEx2-GUS*.

##### **7.2.1. Aislamiento del ADN genómico de *Arabidopsis* por el método CTAB**

El ADN genómico se aisló a partir de hojas roseta de *Arabidopsis* mediante el protocolo de extracción con CTAB adaptado de (Weigel y Glazebrook 2002). 100 mg de material vegetal se pulverizaron en nitrógeno líquido que se homogeneizaron en presencia de 500  $\mu$ L de tampón de extracción (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7.0, 3 % (p/v) CTAB, y 140 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). Se incubó durante 30 minutos a 65 °C. A continuación se añadieron 500  $\mu$ L de cloroformo-isoamílico 24:1, se agitó en el vortex, y se centrifugó a 18.000 xg durante 10 minutos. Al sobrenadante se le añadió 1 mL de etanol y 150  $\mu$ L de 3 M de acetato de sodio. Se precipitó en hielo durante 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 18.000 xg durante 10 minutos. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 3 minutos, se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua Milli-Q estéril y se incubó a 4 °C durante toda la noche. Una vez resuspendido, se le añadieron 0.5  $\mu$ L de ARNasa y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

##### **7.2.2. Aislamiento del ADN genómico de *Arabidopsis* mediante kit comercial**

El ADN genómico se extrajo de hojas de *Arabidopsis* con el kit REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit (XNAPS Sigma) siguiendo las instrucciones del proveedor.



### 7.3. Aislamiento del ARN de *Arabidopsis*

El ARN se extrajo mediante dos aproximaciones: con el reactivo TRIzol<sup>®</sup> y con un kit comercial. El ARN obtenido mediante el protocolo del reactivo TRIzol<sup>®</sup> se utilizó en la comprobación de la ausencia de ARN mensajero de *Executer1* y de *Executer2* en las líneas SALK\_002088C y SALK\_021694C respectivamente. El ARN aislado con el kit comercial se utilizó en la cuantificación relativa de PCR a tiempo real.

#### 7.3.1. Aislamiento del ARN con el reactivo TRIzol<sup>®</sup>

El material vegetal (100 mg aprox.) se maceró en nitrógeno líquido y se homogeneizó con 1 mL de TRIzol<sup>®</sup>. La muestra se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 µL de cloroformo, y se centrifugó 12.000 xg a 4 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se precipitó con 500 µL de isopropanol, que se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y durante 1 hora a 4 °C. Se centrifugó a 12.000 xg a 4 °C durante 8 minutos. El precipitado se resuspendió en 1 mL de 75 % (v/v) etanol (previamente almacenado a -20 °C), y se centrifugó a 7.500 xg a 4 °C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió en 40 µL de agua Milli-Q libre de RNAsas (tratada con DEPC y autoclavada dos veces) a 60 °C durante 8 minutos, y a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 12.000 xg a 4 °C durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

#### 7.3.2. Aislamiento del ARN mediante un kit comercial

El ARN se aisló de plantas en estadio cotiledón, hojas roseta, hojas laterales, hojas senescentes, tallo, botones florales, flores, silicuas y raíces de plantas de *Arabidopsis* mediante el kit GeneJET<sup>™</sup> Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante.

## 8. Electroforesis de ácidos nucleicos

### 8.1. Electroforesis de ADN

El análisis de fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon normalmente a una concentración de agarosa del 1 % (p/v) para separar fragmentos entre 500 bp y 10 kb en el tampón TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) con 1 µg/mL de bromuro de etidio. El porcentaje de agarosa se modificó según el tamaño de los fragmentos: desde 0.5 % de agarosa para fragmentos entre 1 a 30 kb hasta 2.0 % de agarosa para fragmentos entre 50 bp a 2 kb. A las muestras se les añadió el tampón de carga 6X (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03 % azul de bromofenol, 0.03 % xylene cyanol FF, 60 % glicerol, y 60 mM EDTA de Thermo Scientific), y se cargaron en el gel. El GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific) se utilizó como marcador de pares de bases. La separación electroforética se llevó a cabo en el tampón TAE dentro de una cubeta horizontal Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT de Bio-Rad aplicando un voltaje constante de 5 V por cm de distancia entre los electrodos positivo y negativo. La visualización de los geles se realizó en el transiluminador con luz ultravioleta Gene Genius Imaging System (Syngene), y las imágenes se tomaron con el software GeneSnap (Syngene).

## 8.2. Electroforesis de ARN

La electroforesis de las muestras de ARN se hizo para evaluar la integridad de ARN. La cubeta, el peine y la bandeja de electroforesis se trataron con una disolución de 1 M NaOH durante 1 hora, y se hicieron lavados con agua Milli-Q y 70 % (v/v) etanol para eliminar las posibles contaminaciones con RNAsas. Se utilizaron geles de agarosa del 1 % (p/v) en el tampón TAE con 1 µg/mL de bromuro de etidio, y a las muestras se les añadió el mismo tampón de carga 6X que en la electroforesis del ADN. La electroforesis se realizó en una cubeta horizontal con el tampón TAE con un voltaje constante de 3 V por cm de distancia entre los electrodos positivo y negativo. La visualización de las bandas se hizo en un transiluminador con luz ultravioleta. Si las muestras de ARN no están degradadas, las bandas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S aparecen muy nítidas en lugar de manchas difusas.

## 9. Cuantificación de los ácidos nucleicos

La determinación de la concentración de los ácidos nucleicos se realizó con el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000, que mediante un software permite la cuantificación de la concentración de ADN o ARN en ng/µL y el cálculo de los ratios de las absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  para el análisis de la calidad del ADN o del ARN preparado.

## 10. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

### 10.1. Síntesis de ADNc con SuperScript™ III Reverse Transcriptase

La retrotranscripción del ARN mensajero obtenido con el método del reactivo TRIzol® se llevó a cabo con la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Para la reacción de síntesis de ADNc se utilizó 1 µg de ARN y se siguieron las instrucciones del fabricante.

### 10.2. Síntesis de ADNc con Maxima® Reverse Transcriptase

La síntesis de ADNc (para la cuantificación relativa de PCR a tiempo real) a partir del ARN obtenido con el kit comercial se hizo con el kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Thermo Scientific). Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo con 500 ng de ARN siguiendo las instrucciones del proveedor. En el caso de la muestra de hojas senescentes, en la que no se obtuvo cantidad suficiente de ARN, se añadió el volumen máximo posible a la reacción de síntesis de ADNc que corresponde a 201.6 ng.

## 11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

### 11.1. PCR convencional o estándar

Las reacciones de PCR convencionales se realizaron con la mezcla DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) que contiene la ADN polimerasa DreamTaq junto con el tampón 2X verde recomendado, 0.4 mM de cada dNTPs, y 4 mM MgCl<sub>2</sub>. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µL, y se prepararon añadiendo 12.5 µL de la mezcla DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), 10 pg-1 µg de ADN molde (ADN complementario, ADN genómico o ADN plasmídico), y con una concentración final de cada oligonucleótido de 0.2 µM.

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador Mastercycler de Eppendorf® que consistieron en una desnaturalización inicial de 95 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos que incluyeron: una desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, una hibridación o

anillamiento a una temperatura 5 °C inferior a la temperatura de fusión de los oligonucleótidos durante 30 segundos, y una extensión a 72 °C durante 1 minuto por kilobase (longitud del fragmento a amplificar). Por último, se hizo una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

### 11.2. PCR de colonias

Esta reacción de amplificación se realizó para comprobar la presencia del plásmido transformado en las colonias de *E. coli* o de *A. tumefaciens*. En este caso, el ADN molde utilizado fue una muestra de una colonia recogida con un palillo estéril, que se depositó en un volumen de 13 µL con una concentración final de cada oligonucleótido de 0.38 µM. Esta mezcla se incubó a 98 °C durante 10 minutos y se enfrió en hielo. Posteriormente se añadieron los 12.5 µL de la disolución DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) y se mezclaron bien.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Mastercycler de Eppendorf® con las mismas condiciones de amplificación que en la PCR convencional.

### 11.3. PCR con una polimerasa de alta fidelidad que genera extremos romos

Para las reacciones de amplificación en las que es importante no introducir mutaciones, se empleó la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), que está compuesta por un dominio de unión a ADN fusionado a una polimerasa derivada de *Pyrococcus* que posee actividad correctora.

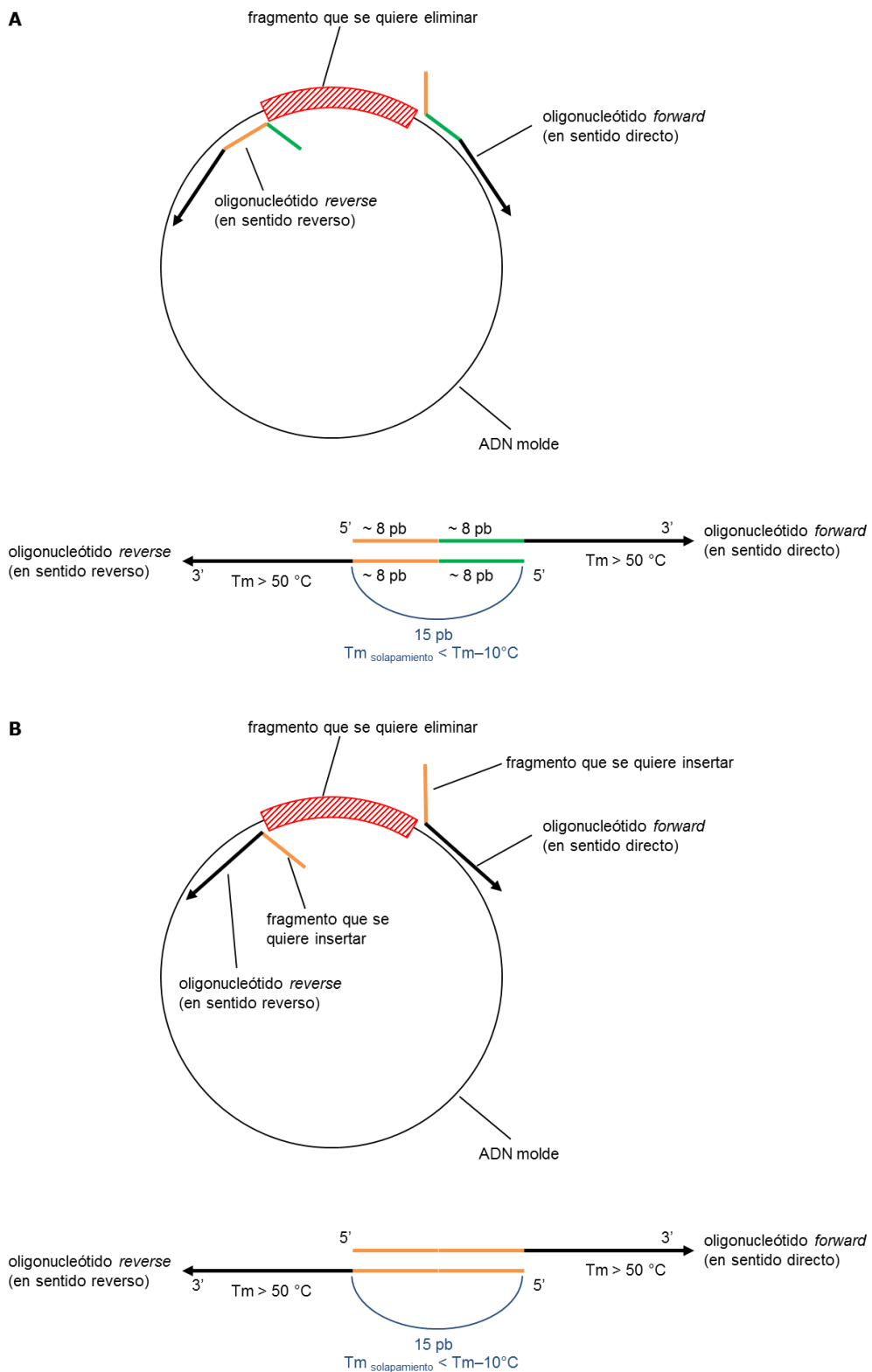
La mezcla Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) contiene la polimerasa ADN Phusion™, los nucleótidos y el tampón optimizado junto con el MgCl<sub>2</sub>. La reacción se realizó en un volumen final de 50 µL con una concentración final de cada oligonucleótido de 0.1 µM añadiendo 25 µL de 2X Phusion™ Master Mix, 10 ng de ADN molde (ADN plasmídico, ADN complementario o ADN genómico).

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador Mastercycler de Eppendorf® que consistieron en una desnaturalización inicial de 98 °C durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos que incluyeron: una desnaturalización a 98 °C durante 20 segundos, una hibridación o anillamiento a una temperatura 5 °C inferior a la temperatura de fusión de los oligonucleótidos durante 30 segundos, y una extensión a 72 °C durante 20 segundos por kilobase (longitud del fragmento a amplificar). Por último, se hizo una extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

### 11.4. Mutagénesis dirigida

Para generar **deleciones** de las proteínas recombinantes, se eliminaron los fragmentos de los genes de vectores mediante el método de mutagénesis dirigida de (Li *et al.* 2008) con una única PCR. Para ello, se amplificó el plásmido completo exceptuando el fragmento que se quiere eliminar utilizando oligonucleótidos que solapan en el extremo 5' unas 15 pb (Figura 28A), el plásmido molde, y la mezcla Phusion™ High-Fidelity PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). La PCR se llevó a cabo con las mismas condiciones de la PCR con una polimerasa de alta fidelidad que genera extremos romos. Una vez confirmada la amplificación del fragmento mediante electroforesis, la reacción de PCR se incubó con la enzima *DpnI* durante 16 horas a 37 °C. La enzima *DpnI* degrada el plásmido molde, y no el plásmido delecionado sintetizado, porque el plásmido molde está metilado (Nøhr y Kristiansen 2003).

Para generar una **delección** y una **inserción** de varios nucleótidos en un gen de un vector, la única diferencia respecto al caso anterior es que la parte que solapa de los oligonucleótidos corresponde a los nucleótidos que se quieren añadir (Figura 28B).



**Figura 28.** A) Esquema del diseño de los oligonucleótidos para eliminar un fragmento, y **B)** para eliminar un fragmento y añadir una mutación de un vector ya construido (ADN molde). Los dos oligonucleótidos se solapan en el extremo 5' unos 15 pb, y la temperatura de fusión ( $T_m$ , *melting temperature*) del

solapamiento tiene que ser 10 °C inferior a la  $T_m$  de las partes que se anillan al ADN molde. La parte del oligonucleótido *forward* que anilla al ADN molde es la verde y la negra, y la del oligonucleótido *reverse* es la naranja y la negra. Las temperaturas de fusión  $T_m$  de las partes que anillan tienen que ser superiores a 50 °C.

### 11.5. PCR con una polimerasa de alta fidelidad que genera productos de PCR aptos para el TA Cloning®

Para la obtención de productos de PCR que puedan ser introducidos en el vector pCR®8/GW/TOPO®, se utilizó la combinación de polimerasas Expand High Fidelity PCR System (Roche) compuesta por la ADN polimerasa Taq termoestable—que añade una desoxiadenosina (A) a los extremos 3' de los productos de PCR debido a su actividad transferasa terminal independiente del molde—y por la ADN polimerasa Tgo termoestable que posee actividad correctora.

Se prepararon dos mezclas diferentes, teniendo cada una de ellas un volumen final de 25 µL. La primera se compone de 200 µM de cada dNTP, 0.6 µM de cada oligonucleótido y de 0.1 a 250 ng de ADN molde (ADN complementario); y la segunda de 5 µL del tampón Expand High Fidelity con una concentración final de 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 2.6 U de la combinación de enzimas Expand High Fidelity. Por último, la segunda mezcla se añadió a la primera y se mezcló bien.

Las reacciones de PCR tuvieron lugar en el termociclador Mastercycler de Eppendorf® con una desnaturalización inicial de 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos que incluyeron: una desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, una hibridación o anillamiento a una temperatura 6 °C inferior a la temperatura de fusión de los oligonucleótidos durante 45 segundos, y una extensión a 72 °C durante 1 minuto por kilobase (longitud del fragmento a amplificar). Por último, se hizo una extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

### 11.6. Cuantificación relativa de PCR a tiempo real

Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en el equipo iCycler MyiQ2™ Two color Real Time PCR system de Bio-Rad, utilizando el kit Maxima® SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific). La cantidad de ADNc que se utilizó en cada reacción fue la equivalente a 12.5 ng de ARN, excepto para las hojas senescentes que fueron 5.0 ng. La reacción se preparó en un volumen final de 20 µL con una concentración final de cada oligonucleótido de 0.2 µM, y añadiendo 10 µL de la mezcla Maxima® SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2X).

El control interno que se utilizó para la posterior cuantificación relativa fue el ARN ribosómico 18S, y los genes de interés *Executer1* y *Executer2*. Los oligonucleótidos 18S\_qRTPCR\_fw y 18S\_qRTPCR\_rv amplifican 514 pb del gen *ARNr 18S*, los oligonucleótidos Ex1\_qRTPCR\_fw y Ex1\_qRTPCR\_rv amplifican 148 pb del gen *Ex1*, y los oligonucleótidos Ex2\_qRTPCR\_fw y Ex2\_qRTPCR\_rv amplifican 290 pb del gen *Ex2*. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos con una desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, una hibridación o anillamiento a una temperatura de 56 °C para los genes *ARNr 18S* y *Ex2* y a una temperatura de 66 °C para el gen *Ex1* durante 30 segundos, y una extensión a 72 °C durante 30 segundos.

El software iQ<sup>TM</sup> 5 de Bio-Rad, instalado en el equipo iCycler MyiQ2<sup>TM</sup> Two color Real Time PCR system de Bio-Rad, calcula automáticamente el valor de fluorescencia umbral (*threshold*) que indica la fase exponencial de la curva de amplificación. Los valores  $C_T$  (*threshold cycle* o ciclo umbral) corresponden al número de ciclo en el que la fluorescencia supera el valor umbral (*threshold*). El valor  $C_T$  de cada muestra se determinó automáticamente a partir del umbral (*threshold*) calculado por el software iQ<sup>TM</sup> 5.

Por cada muestra de ADNc se realizaron tres repeticiones, y se escogieron los dos o tres valores de  $C_T$  que tuvieran una diferencia igual o inferior a 0.5 de  $C_T$ . La metodología que se utilizó para la cuantificación relativa de la expresión génica está basada en la comparativa de  $C_T$ , también conocida como el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Schmittgen y Livak 2008), en el que el nivel de expresión del gen de interés de una muestra está normalizado respecto a un gen de referencia endógeno en la misma muestra, y respecto a otra muestra. En este caso se utilizó como gen de referencia el gen del ARN ribosómico 18S. El cálculo se hizo de la siguiente forma:

$$\text{fold change}_{\text{gen de interés}} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ donde}$$

$$\Delta\Delta C_T = [(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ ARNr 18S}) \text{ muestra 2} \\ - (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ ARN 18S}) \text{ muestra 1}]$$

Se calculó el promedio y la desviación estándar del valor  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  de cada condición.

## 12. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Los fragmentos de PCR y los vectores se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes utilizando las condiciones recomendadas por las casas comerciales (Thermo Scientific, Takara): el tiempo y la temperatura de incubación, la cantidad de ADN de partida, los tampones de digestión, y el número de unidades necesarias de las enzimas de restricción.

## 13. Desfosforilación de vectores de clonación

Para prevenir el cierre intramolecular del vector después de la digestión con enzimas de restricción y antes de la ligación con el inserto, se eliminaron los grupos fosfatos de los extremos 5' de los vectores digeridos con enzimas de restricción. La reacción de desfosforilación se llevó a cabo con la enzima fosfatasa alcalina termosensible FastAP<sup>TM</sup> (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones recomendadas por el proveedor.

## 14. Purificación de una banda de interés del gel de agarosa

Para el aislamiento de ADN de un gel de agarosa, la banda de interés se cortó con un bisturí y se procesó con el kit comercial GeneClean<sup>®</sup> Turbo Kit (MP Biomedicals, LLC) siguiendo las instrucciones del proveedor.

## 15. Purificación de un producto de PCR en disolución

La purificación del producto de PCR en disolución se llevó a cabo con el kit High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche) siguiendo el protocolo del fabricante.

## 16. Ligación

Las reacciones de ligación de fragmentos digeridos con enzimas de restricción se realizaron con la enzima ADN ligase del bacteriófago T4 (Thermo Scientific). Las ligaciones se llevaron a

cabo en un volumen entre 10 y 20  $\mu\text{L}$ . Las concentraciones del inserto y el vector se calcularon a partir del gel de agarosa tomando como referencia las concentraciones de las bandas del marcador. La proporción molar entre inserto y vector fue 3:1, siendo la cantidad de vector utilizada de 50 a 100 ng de ADN y la del inserto la siguiente:

$$\text{cantidad del inserto (ng)} = \frac{3 \times \text{cantidad del vector (ng)} \times \text{tamaño del inserto (bp)}}{\text{tamaño del vector (bp)}}$$

El tampón de ligación utilizado fue el recomendado de la enzima ADN ligase T4 de la casa comercial Thermo Scientific. La reacción se incubó durante toda la noche a 16 °C.

## 17. Clonación mediante la tecnología Gateway®

### 17.1. Obtención del vector de entrada pCR®/GW/TOPO® con el gen de interés para el sistema de clonación Gateway®.

La introducción de un producto de PCR en el vector pCR®/GW/TOPO® se realizó mediante el kit pCR®/GW/TOPO® TA Cloning® kit (Invitrogen by Life technologies). El vector pCR®/GW/TOPO® está linealizado y contiene una desoxitimidina (T) en los extremos 3'. Estas desoxitimidinas (T) son complementarias a las desoxiadenosinas (A) en los extremos 3' de los productos de PCR obtenidos con la Taq polimerasa del Apartado 11.5. La enzima topoisomerasa I está unida covalentemente al vector a través de un enlace fosfo-tirosil en los extremos 3' (Figura 29). Cuando el producto de PCR se inserta en el vector, el enlace se rompe quedando liberada la topoisomerasa (Shuman 1994).

El gen de interés se amplificó mediante PCR utilizando como ADN molde el ADNc de *Arabidopsis thaliana*. El producto de PCR se separó mediante electroforesis de ADN en un gel de agarosa, la banda se cortó del gel y se aisló con el kit comercial GeneClean (Apartado 14). La reacción del TA Cloning® se llevó a cabo en un volumen final de 6  $\mu\text{L}$ . Se añadieron de 5 a 10 ng de vector pCR®/GW/TOPO®, la cantidad de inserto según la siguiente ecuación, y 1  $\mu\text{L}$  de solución salina (incluida en el kit).

$$\text{cantidad del inserto (ng)} = \frac{3 \times 5 - 10 \text{ ng del vector} \times \text{tamaño del inserto (bp)}}{\text{tamaño del vector (bp)}}$$

Esta reacción se incubó a 22 °C durante 30 minutos. A continuación, se transformaron 2  $\mu\text{L}$  de la reacción en 50  $\mu\text{L}$  de células competentes de *E.coli* cepa One Shot® TOP10 (Invitrogen by Life technologies) siguiendo el Apartado 6.1.4.

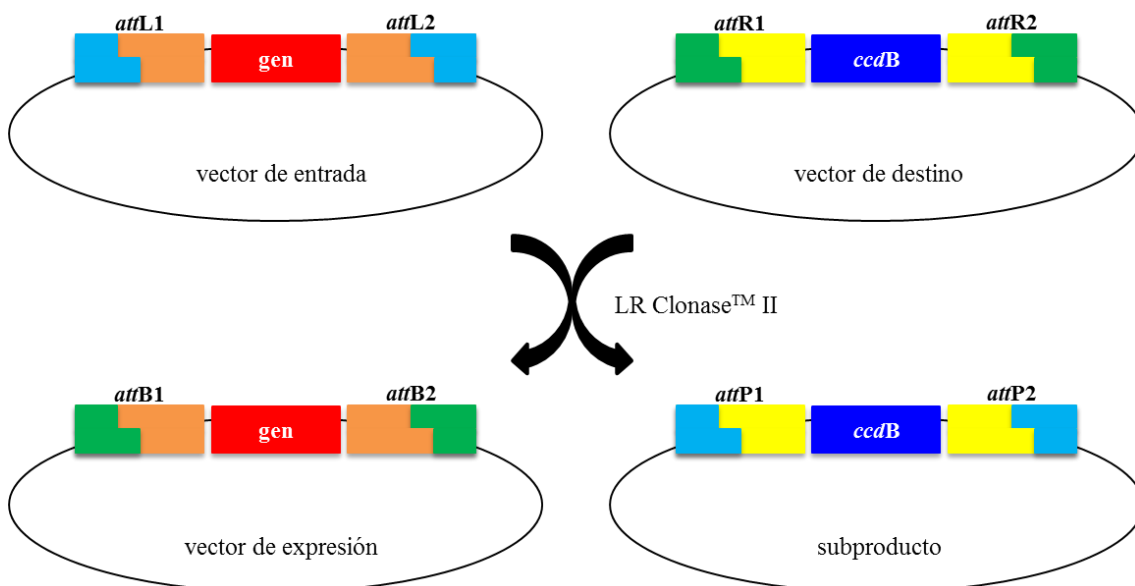


**Figura 29.** Inserción de un producto de PCR (con la desoxiadenosina (A) en los extremos 3') en el vector pCR®/GW/TOPO® (con la desoxitimidina (T) y las topoisomerasas en los extremos 3').

## 17.2. Reacción de recombinación LR

La inserción de los genes de interés en los vectores de expresión se llevó a cabo mediante la reacción LR de la tecnología Gateway<sup>®</sup> (Hartley *et al.* 2000). En la reacción se parte del vector de entrada pCR8<sup>®</sup>/GW/TOPO<sup>®</sup> o del pENTR<sup>™</sup>11, que contiene el gen de interés flanqueado por dos secuencias *attL1* y *attL2*, y un vector destino con dos secuencias *attR1* y *attR2* que flanquean el gen *ccdB*. El gen *ccdB* codifica una proteína que interfiere con la ADN girasa de *E. coli*, inhibiendo el crecimiento de las cepas que lo adquieren. La cepa DB3.1 de *E. coli* es la única resistente a los efectos letales de *ccdB*. La enzima LR Clonase<sup>™</sup> II contiene las proteínas integrasa (Int) y excisionasa (Xis) del bacteriófago  $\lambda$ , y el factor de integración del hospedador (IHF) de *E. coli* necesarias para la recombinación lambda  $\lambda$ . Esta enzima reconoce específicamente las secuencias *attL* y *attR*, escindiendo e integrando *attL1* con *attR1*, y *attL2* con *attR2*. Esta recombinación genera los sitios específicos *attB1* y *attB2* (que flanquean el gen de interés) en el vector de expresión, y los sitios *attP1* y *attP2* (que flanquean el gen letal *ccdB*) (Figura 30).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 8  $\mu$ L, en el que se añadieron 150 ng del vector de entrada, 150 ng del vector de destino, y el tampón TE a pH 8.0 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). A esta mezcla se le añadieron 2  $\mu$ L de la enzima LR Clonase<sup>™</sup> II. La reacción se incubó de 1 a 18 horas a 25 °C. Una vez pasado ese tiempo, se añadió 1  $\mu$ L de la disolución Proteinase K (incluida en el kit) y se incubó a 37 °C durante 10 minutos para detener la reacción. Por último, la reacción se transformó en las células competentes de *E. coli* cepa One Shot<sup>®</sup> TOP10 (Invitrogen by Life technologies), o en las células competentes DH5 $\alpha$  preparadas según el protocolo del Apartado 6.1.2, siguiendo las instrucciones del Apartado 6.1.4 para ambas cepas.



**Figura 30.** Reacción de la recombinación LR por la acción de la enzima LR Clonase<sup>™</sup> II.

## 18. Secuenciación de ADN

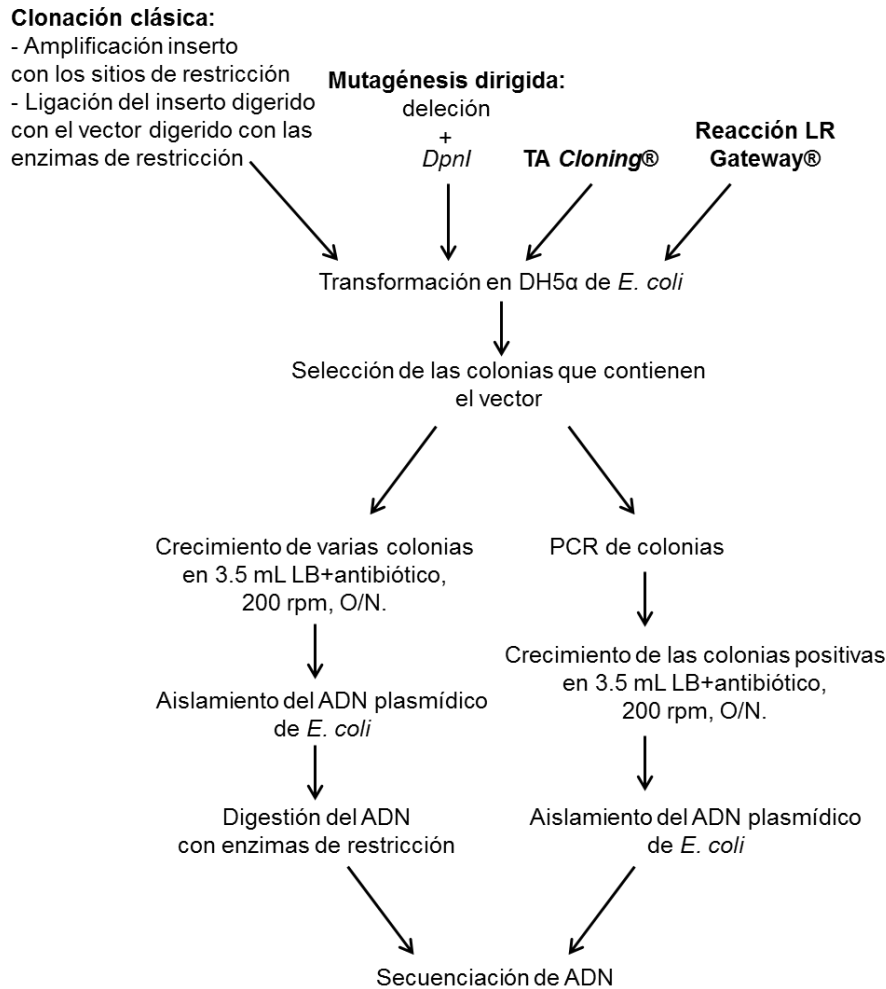
Para la comprobación de la secuencia de ADN de los vectores generados y de productos de PCR, las muestras se enviaron al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. En un tubo de 1.5 mL se prepararon entre 400 y 600 ng de ADN plasmídico, o 100 ng por 1 kb para



productos de PCR, junto con 2  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido específico (Tabla 5) a una concentración final de 0.5  $\mu\text{M}$  y hasta un volumen total de 8  $\mu\text{L}$ . Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### 19. Clonación de los genes de interés en los vectores de expresión comerciales

La clonación de los diferentes vectores utilizados en este trabajo se realizó según el esquema de la Figura 31 y las Tablas 8, 9 y 10. Los mapas de los vectores se encuentran en las Figuras A2-A17 del Anexo.



**Figura 31.** Resumen de la estrategia de la clonación de los diferentes vectores. Abreviatura: O/N (durante toda la noche).

**Tabla 8.** Construcción de los vectores utilizados en el Apartado 1 de los Resultados. Abreviatura: Oligos, oligonucleótidos.

Plásmido	Clonación clásica				Mutagénesis dirigida		Selección del plásmido positivo		Secuenciación
	Oligos para amplificar el inserto	ADN molde	Vector	Digestión con las enzimas	Oligos para amplificar el vector	ADN molde	Digestión con las enzimas	Oligos de la PCR de colonias	Oligos
atmEx1_pGEX6P2	atmEx1pGEX6P2_fw y atmEx1pGEX6P2_rv	atpEx1_pET21d	pGEX6P2	<i>BamHI</i> y <i>XhoI</i>	-	-	-	atmEx1pGEX6P2_fw y atmEx1pGEX6P2_rv	atEx1_2fw, atEx1_3fw, atEx1_4fw, 5'pGEX_fw, y 3'pGEX_rv
atm2Ex1_pET21d	-	-	-	-	atm2Ex1pET21d_fw y atm2Ex1pET21d_rv	atpEx1_pET21d	<i>NcoI</i> y <i>XhoI</i>	-	promotorT7_fw, atEx1_2fw, atEx1_4fw, y terminadorT7_rv
atm2Ex1_pGEX4T3NNB	atm2Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atm2Ex1 pGEX4T3NNB_rv	atpEx1_pET21d	pGEX4T3NNB	<i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	-	-	-	5'pGEX_fw y atΔC2Ex1pET21d_rv	5'pGEX_fw, atEx1_2fw, atEx1_4fw, y 3'pGEX_rv
atm3Ex1_pGEX4T3NNB	-	-	-	-	atm3Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atm3Ex1 pGEX4T3NNB_rv	atm2Ex1_pGEX4T3NNB	-	atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atEx1_1rv	5'pGEX_fw, atEx1_2fw, y 3'pGEX_rv
atm4Ex1_A_pGEX4T3NNB	-	-	-	-	atm4Ex1_A_pGEX4T3NNB_fw y atm4Ex1_A_pGEX4T3NNB_rv	atm2Ex1_pGEX4T3NNB	-	atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atEx1_1rv	5'pGEX_fw, atEx1_2fw, y 3'pGEX_rv
atm4Ex1_B_pGEX4T3NNB	-	-	-	-	atm4Ex1_B_pGEX4T3NNB_fw y atm4Ex1_B_pGEX4T3NNB_rv	atm4Ex1_A_pGEX4T3NNB	-	atm4Ex1_B pGEX4T3NNB_fw y atEx1_1rv	5'pGEX_fw, atEx1_2fw, y 3'pGEX_rv
atΔCEx1_pET21d	-	-	-	-	atΔCEx1pET21d_fw y atΔCEx1pET21d_rv	atmEx1_pET21d	<i>XhoI</i>	-	terminadorT7_rv
atΔC2Ex1_pET21d	-	-	-	-	atΔC2Ex1pET21d_fw y atΔC2Ex1pET21d_rv	atmEx1_pET21d	<i>XhoI</i>	-	terminadorT7_rv

atΔC3Ex1_pET21d	-	-	-	-	atΔC3Ex1pET21d_fw y atΔC3Ex1pET21d_rv	atm2Ex1_ pET21d	<i>XhoI</i>		promotorT7_fw
atΔC3Ex1_ pGEX4T3NNB	atΔC3Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atΔC3Ex1 pGEX4T3NNB_rv	atpEx1_ pET21d	pGEX4T3NNB	<i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	-	-	-	atΔC3Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atΔC3Ex1 pGEX4T3NNB_rv	5'pGEX_fw
atΔC4Ex1_ pGEX4T3NNB	-	-	-	-	atΔC4Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atΔC4Ex1 pGEX4T3NNB_rv	atm2Ex1_ pET21d	-	atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_fw y 3'pGEX_rv	3'pGEX_rv
atΔC5Ex1_ pGEX4T3NNB	-	-	-	-	atΔC5Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atΔC5Ex1 pGEX4T3NNB_rv	atm2Ex1_ pET21d	-	atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_fw y 3'pGEX_rv	3'pGEX_rv
atUvr1Ex1_ pGEX4T3NNB	atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_rv	atpEx1_ pET21d	pGEX4T3NNB	<i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	-	-	-	atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_fw y atUvr1Ex1 pGEX4T3NNB_rv	3'pGEX_rv
atΔN1Ex1_pET21d	-	-	-	-	atΔN1Ex1pET21d_fw y atΔN1Ex1pET21d_rv	atpEx1_pET21d	<i>NcoI</i>	-	promotorT7_fw
atΔN2Ex1_pET21d	-	-	-	-	atΔN2Ex1pET21d_fw y atΔN2Ex1pET21d_rv	atpEx1_pET21d	<i>XhoI</i>	-	promotorT7_fw
atΔN3Ex1_pET21d	-	-	-	-	atΔN3Ex1pET21d_fw y atΔN3Ex1pET21d_rv	atpEx1_pET21d	<i>NcoI</i>	-	promotorT7_fw
atΔN4Ex1_pET21d	-	-	-	-	atΔN4Ex1pET21d_fw y atΔN4Ex1pET21d_rv	atpEx1_pET21d	<i>NcoI</i>	-	promotorT7_fw
atΔN5Ex1_pET21d	-	-	-	-	atΔN5Ex1pET21d_fw y atΔN5Ex1pET21d_rv	atpEx1_pET21d	<i>NcoI</i>	-	promotorT7_fw
atΔN6Ex1_pET21d	-	-	-	-	atΔN6Ex1pET21d_fw y atΔN6Ex1pET21d_rv	atΔN2Ex1_ pET21d	<i>XhoI</i>	-	promotorT7_fw
atmEx2_pET21d	-	-	-	-	atmEx2pET21d_fw y atmEx2pET21d_rv	atpEx2_pET21d	<i>NcoI</i> y <i>BamHI</i>	-	promotorT7_fw, atEx2_1fw, atEx2_2fw, y terminadorT7_rv

atΔC2Ex2_ pGEX4T3NNB	atΔC2Ex2 pGEX4T3NNB_ fw y atΔC2Ex2 pGEX4T3NNB_rv	atpEx2_ pET21d	pGEX4T3NNB	<i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	-	-	-	atΔC2Ex2 pGEX4T3NNB_fw y atΔC2Ex2 pGEX4T3NNB_rv	3'pGEX_rv
atΔC1Ex2_ pGEX4T3NNB	-	-	-	-	atΔC1Ex2 pGEX4T3NNB_fw y atΔC1Ex2 pGEX4T3NNB_rv	atΔC3Ex2_ pGEX4T3NNB	-	5'pGEX y atΔC1Ex2 pGEX4T3NNB_rv; y 5'pGEX y atΔC2Ex2 pGEX4T3NNB_rv	3'pGEX_rv
atUvr1Ex2_ pGEX4T3NNB	atUvr1Ex2 pGEX4T3NNB_fw y atUvr1Ex2 pGEX4T3NNB_rv	atpEx2_ pET21d	pGEX4T3NNB	<i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>	-	-	-	atUvr1Ex2 pGEX4T3NNB_fw y atUvr1Ex2 pGEX4T3NNB_rv	5'pGEX_fw

**Tabla 9.** Construcción de los vectores utilizados en el Apartado 2 de los Resultados. Abreviatura: Oligos, oligonucleótidos.

Plásmido	Clonación clásica		Mutagénesis dirigida		TA Cloning®		Reacción LR Gateway®		Selección del plásmido positivo		Secuenciación
	Oligos para amplificar el inserto, y ADN molde	Vector, y digestión con las enzimas	Oligos para amplificar el vector	ADN molde	Oligos	ADN molde	Vector de entrada	Vector de destino	Aislamiento del ADN plasmídico y digestión con las enzimas	Oligos de la PCR de colonias	Oligos
atpEx1_ pMDC83	-	-	-	-	-	-	atpEx1_ pCR8/GW/ TOPO	pMDC83	<i>SacI</i>	-	pMDC83Ex1_ rv y pMDC83_rv
atpEx2_ pMDC83	-	-	-	-	-	-	atpEx2_ pCR8/GW/ TOPO	pMDC83	<i>SacI</i>	-	pMDC83Ex2_ rv y pMDC83_rv
atpEx1_ 35S-pSPYCE	-	-	-	-	-	-	atpEx1_ pCR8/GW/ TOPO	35S- pSPYCE	<i>SacI</i>	-	35Sprom_fw y SPYCE_rv
atpEx2_ 35S-pSPYCE	-	-	-	-	-	-	atpEx2_ pCR8/GW/ TOPO	35S- pSPYCE	<i>SacI</i>	-	35Sprom_fw y SPYCE_rv

atpEx1_ 35S-pSPYNE	-	-	-	-	-	-	atpEx1_ pCR8/GW/ TOPO	35S- pSPYNE	<i>SacI</i>	-	35Sprom_fw y SPYNE_rv
atpEx2_ 35S-pSPYNE	-	-	-	-	-	-	atpEx2_ pCR8/GW/ TOPO	35S- pSPYNE	<i>SacI</i>	-	35Sprom_fw y SPYNE_rv
atpΔC3Ex1_ pCR8/GW/ TOPO	-	-	atpΔC3Ex1 pCR8/GW/ TOPO_fw y atpΔC3Ex1 pCR8/GW/ TOPO_rv	atpEx1_ pCR8/GW/TOPO	-	-	-	-	<i>XhoI</i>	-	M13_fw y M13_rv
atpΔC3Ex1_ pMDC83	-	-	-	-	-	-	atpΔC3Ex1_ pCR8/GW/ TOPO	pMDC83	-	35Sprom_ fw y atΔC2Ex1 pET21d_rv	pMDC83Ex1_ rv y pMDC83_rv
atpΔC3Ex1_ 35S-pSPYCE	-	-	-	-	-	-	atpΔC3Ex1_ pCR8/GW/ TOPO	35S- pSPYCE	<i>SacI</i>	-	35Sprom_fw
atpΔC3Ex1_ 35S-pSPYNE	-	-	-	-	-	-	atpΔC3Ex1_ pCR8/GW/ TOPO	35S- pSPYNE	<i>SacI</i>	-	35Sprom_fw
atpEx1_ p2GWY7	-	-	-	-	-	-	atpEx1_ pCR8/GW/ TOPO	p2GWY7	<i>NcoI</i>	35Sprom_ fw e YFP_rv	
atpEx2_ p2GWY7	-	-	-	-	-	-	atpEx2_ pCR8/GW/ TOPO	p2GWY7	<i>NcoI</i>	35Sprom_ fw e YFP_rv	
atpEx1_ pENTR11	atpEx1 pENTR11_fw y atpEx1 pENTR11_rv, atpEx1_pCR8 /GW/TOPO	pENTR11, y <i>NcoI</i> y <i>XhoI</i>	-	-	-	-	-	-	-	atAN4Ex1 pET21d_ fw y pENTR11_rv	pMDC83Ex1_r v, atEx1_5fw, atEx1_2fw, y pENTR11_rv

atpEx1_ pB7YWG2	-	-	-	-	-	-	atpEx1_ pENTR11	pB7YWG2	-	atAN4Ex1 pET21d_fw e YFP_rv	35Sprom_fw e YFP_rv
atpEx2_ pB7YWG2	-	-	-	-	-	-	atpEx2_ pCR8/GW/ TOPO	pB7YWG2	-	35Sprom_fw y atUvr1Ex2 pGEX4T3NNB _rv	35Sprom_fw e YFP_rv
atPend_ pCR8/GW/ TOPO	-	-	-	-	atPend_fw y atPend_rv	ADNc de A. <i>thaliana</i>	-	-	-	-	M13_rv
atPgl35_ pCR8/GW/ TOPO	-	-	-	-	atPgl35_fw y atPgl35_rv	ADNc de A. <i>thaliana</i>	-	-	<i>XhoI</i>	-	M13_fw y M13_rv
atPend_ pB7YWG2	-	-	-	-	-	-	atPend_ pCR8/GW/ TOPO	pB7YWG2	-	prom35S_fw y Pend_rv	35Sprom_fw
atPgl35_ pB7YWG2	atPgl35_ pCR8/GW/ TOPO digerido con <i>EcoRI</i>	atpEx2_ pB7YWG2 digerido con <i>EcoRI</i>	-	-	-	-	-	-	-	prom35S_fw y Pgl35_rv	35Sprom_fw e YFP_rv
atpEx1_ pB7CWG2	-	-	-	-	-	-	atpEx1_ pCR8/GW/ TOPO	pB7CWG2	<i>SacI</i>	-	35Sprom_fw e CFP_rv
atPend_ pB7CWG2	atPend_ pCR8/GW/ TOPO digerido con <i>EcoRI</i>	atpEx1_ pB7CWG2, digerido con <i>EcoRI</i>	-	-	-	-	-	-	-	atPend_fw y CFP_rv	35Sprom_fw
atPgl35_ pB7CWG2	atPgl35_ pCR8/GW/ TOPO digerido con <i>EcoRI</i>	atpEx1_ pB7CWG2, digerido con <i>EcoRI</i>	-	-	-	-	-	-	-	atPgl35_fw y CFP_rv	35Sprom_fw y CFP_rv

**Tabla 10.** Construcción de los vectores utilizados en el Apartado 3 de los Resultados. Abreviatura: Oligos, oligonucleótidos.

Plásmido	Clonación clásica				Selección del plásmido positivo		Secuenciación
	Oligos para amplificar el inserto	ADN molde	Vector	Digestión con las enzimas	Aislamiento del ADN plasmídico y digestión con las enzimas	Oligos de la PCR de colonias	Oligos
promotorEx1_pBII01	promotorEx1_fw y promotorEx1_rv	ADN genómico de <i>A. thaliana</i>	pBII01	<i>SalI</i>	<i>BamHI</i>	promEx1sq1_fw y gus_rv	pBII01_fw, gus_rv, y promEx1sq2_fw
promotorEx2_pBII01	promotorEx2_fw y promotorEx2_rv	ADN genómico de <i>A. thaliana</i>	pBII01	<i>BamHI</i>	<i>HindIII</i>	promEx2sq1_fw y gus_rv	pBII01_fw, gus_rv, promEx2sq1_fw, y promEx2sq2fw

## 20. Electroforesis en geles desnaturalizantes y reductores de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de las proteínas se realizó mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (dodecilsulfato sódico), SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrilamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli 1970).

Se prepararon mini geles de un grosor de 0.75 mm entre dos cristales según el protocolo del fabricante. El gel separador estaba compuesto por 12 al 17 % (p/v) de acrilamida, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.07 % (p/v) APS (persulfato de amonio), y 0.05 % (v/v) TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina). La composición del gel concentrador fue de 4 % (p/v) de acrilamida, 25 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.1 % (p/v) APS, y 0.1 % (v/v) de TEMED.

Una vez polimerizados los geles entre los cristales, estos se colocaron en la cubeta de electroforesis Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra Cell (Bio-Rad), y se cubrieron con el tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1 % (p/v) SDS, pH 8.3) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras de proteína se resuspendieron en el tampón de carga o de Laemmli (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 5 % (v/v) glicerol, 1.5 % (p/v) SDS, 2.5 % (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol, y 0.005 % (p/v) azul de bromofenol). Se incubaron a 95 °C durante 5 minutos, y se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad en una centrífuga de mesa. El sobrenadante de las muestras se cargó en los pocillos del gel concentrador con ayuda de una jeringa Hamilton. Los marcadores Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific) de 14.4 kDa a 116 kDa, y Unstained Low Range Protein Ladder (Thermo Scientific) de 3.4 a 100 kDa se escogieron en función de la masa molecular de la proteína de interés.

La electroforesis se llevó a cabo a una intensidad de corriente eléctrica constante de 17 mA/gel en el gel concentrador, y 25 mA/gel en el gel separador; y a 200 V a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (50 % (v/v) de metanol, 10 % de ácido acético, y 0.18 % (p/v) de azul de Coomassie) en agitación durante 1 hora, y se destiñeron en agitación con la disolución 45 % (v/v) de metanol y 5 % (v/v) de ácido acético hasta observar las bandas.

## 21. Cuantificación de las proteínas

La concentración de las proteínas recombinantes purificadas se determinó en el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000 que cuantifica la concentración de proteínas en mg/mL, y calcula el ratio  $A_{260}/A_{280}$  que muestra la pureza de la muestra de proteína. El coeficiente de extinción molar y la masa molecular de cada proteína se obtuvo a través del software Vector NTI<sup>®</sup> (Invitrogen by Life technologies).

## 22. Sobreexpresión y purificación de proteínas recombinantes

### 22.1. Expresión de proteínas recombinantes en *E.coli* cepa Rosetta, BL21, C43, y Origami

Se inocularon varias colonias transformadas con el vector de expresión, que contiene el gen de interés insertado en el plásmido pET21d o pGEX6P2 o pGEX4T3NNB, en 50 mL de medio LB con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina y, en la cepa Rosetta, con 34  $\mu$ g/mL de cloranfenicol además de añadir ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL. El precultivo se incubó a 37 °C con una agitación de 200 rpm de 3 a 16 horas. Una vez crecido el precultivo, se añadió un volumen



de 10 mL a 800 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y, en el caso de Rosetta, cloranfenicol (34 µg/mL). Se incubó a 37 °C a 200 rpm durante unas 3 horas o hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica medida a 600 nm (paso óptico de 1 cm) de 0.8. Se recogió una muestra del cultivo para posterior análisis (muestra pre-inducción). Para inducir la expresión de la proteína, se añadió IPTG al cultivo a una concentración final de 0.1 mM. Este cultivo se incubó con una agitación de 200 rpm a 15-22 °C durante 14-15 horas o a 37 °C durante 3-4 horas. Una vez pasado ese tiempo, se tomó una muestra del cultivo (muestra post-inducción). El cultivo se centrifugó a 4 °C a 2.500 xg durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en hielo con 10-20 mL de tampón de lisis. Para el cultivo que contiene la proteína con la cola de 6 histidinas, el tampón de lisis fue 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.5 % (v/v) Triton™ X-100 y 10 % (v/v) glicerol. Para el cultivo que contiene la proteína fusionada a GST, el tampón de lisis fue el tampón fosfato salino PBS-Na/K (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado a pH 7.3 con NaOH), 1 mM EDTA, y 0.5 % (v/v) de Triton™ X-100. Una vez resuspendidas las células, se les añadió el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1.25 mM, y se lisaron las células con un sonicador Virsonic 300 (Virtis). El extracto se centrifugó a 35.000 xg durante 30 minutos a 4 °C. Se recogió una muestra de la fracción soluble, y otra de la fracción insoluble. Se cargaron cada una de las muestras preparadas (pre- y post-inducción, soluble e insoluble), junto con el marcador de masas moleculares conocidas, en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE siguiendo el protocolo del Apartado 20. Una vez desteñido el gel, se comprobó la expresión y la solubilidad de la proteína de interés.

## **22.2. Expresión de proteínas recombinantes en *E.coli* cepa Arctic Express**

Se inocularon varias colonias transformadas con el vector de expresión en 3.5 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y 20 µg/mL de gentamicina. El precultivo se incubó a 37 °C con una agitación de 200 rpm durante unas 16 horas. Una vez crecido el precultivo, se añadió un volumen de 1 mL a 50 mL de medio LB sin antibióticos y se incubó a 30 °C durante 3 horas con una agitación de 200 rpm. La producción de la proteína se indujo igual que en el apartado anterior, y el cultivo se incubó con una agitación de 200 rpm a 13 °C durante 24 horas. Las muestras del cultivo pre- y post-inducción, la fracción soluble e insoluble se prepararon igual que en el apartado anterior.

## **22.3. Purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a GST mediante cromatografía de afinidad con Glutación sefarosa**

Las proteínas recombinantes se purificaron a partir de la fracción soluble mediante cromatografía de afinidad. Las proteínas fusionadas a Glutación S-transferasa (GST) se purificaron en columnas de Glutación sefarosa. Todas las disoluciones que se utilizaron en la cromatografía de afinidad se filtraron previamente a través de membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore).

Se añadió un volumen de columna (VC) de la matriz de afinidad a GST (Glutación sefarosa 4B, GE Healthcare) a una columna, se lavó con 10 VC de agua Milli-Q, y se equilibró con 10 VC del tampón de lisis (PBS-Na/K pH 7.3, 1 mM EDTA, y 0.5 % (v/v) Triton™ X-100). La fracción soluble se pasó a través de un filtro de 0.45 µm, y se incubó con la matriz en agitación a 4 °C durante 4-5 horas. La matriz se lavó con 40 VC del tampón de lisis y con 40 VC del tampón de lavado (PBS-Na/K pH 7.3, 1 mM EDTA) para eliminar las proteínas que se unieron inespecíficamente a la matriz. Para eliminar la GST de la proteína de interés, la proteína

de fusión unida a la matriz se digirió con trombina (Calbiochem®) en el tampón 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, y 2 mM CaCl<sub>2</sub> a 22 °C durante unas 15-16 horas. Se recogió la proteína de interés. Se hicieron varios lavados con el tampón 20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 150 mM NaCl hasta que no se detectó proteína medida a 280 nm. La GST se eluyó de la matriz Glutación sefariosa con varios lavados del tampón 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, y 10 mM de glutatión reducido. La matriz se regeneró según las instrucciones del fabricante.

### **22.4. Expresión y purificación de la proteínas recombinante atm2Ex1-His<sub>6</sub> en *E. coli* con chaperonas**

La formación de cuerpos de inclusión de la proteína de interés puede ser debida a un plegamiento incorrecto de las proteínas expresadas. Se ha demostrado que las chaperonas moleculares están involucradas en el proceso de plegamiento. El vector pGro7 (Takara Bio Inc.) contiene los genes que codifican para la chaperona groES-groEL bajo el promotor *araB* inducido por arabinosa, y el vector pG-Tf2 (Takara Bio Inc.) contiene los genes que codifican para la chaperona groES-groEL-tig bajo el control del promotor *Pzt-1* inducido por tetraciclina.

Se transformaron químicamente células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), previamente transformadas con el vector pGro7 y con el vector pG-Tf2 por separado, con el vector de expresión atm2Ex1\_pET21d. Se inocularon varias colonias en 2 mL de medio LB con 50 µg/mL de carbenicilina (el gen de la β-lactamasa confiere resistencia tanto a la ampicilina como a la carbenicilina) y 20 µg/mL de cloranfenicol. Este precultivo se incubó a 37 °C con una agitación de 200 rpm durante toda la noche. A continuación, se añadieron 200 µL del precultivo saturado a 40 mL de medio LB suplementado con los antibióticos carbenicilina (50 µg/mL) y cloranfenicol (20 µg/mL), y los inductores de las chaperonas: L-arabinosa (0.5 mg/mL) en pGro7, y tetraciclina (5 ng/mL) en pG-Tf2. Se incubó a 37 °C a 200 rpm durante unas 3 horas o hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica medida a 600 nm (paso óptico de 1 cm) de 0.5. Se recogió una muestra del cultivo (muestra pre-inducción). Para inducir la expresión de la proteína, se añadió IPTG al cultivo a una concentración final de 0.5 mM. Este cultivo se incubó con una agitación de 200 rpm a 37 °C durante 2 horas. Seguidamente, se tomó una muestra del cultivo después de la inducción (muestra post-inducción). El cultivo se centrifugó a 4 °C a 3000 xg durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en hielo con 30 mL de tampón de lisis (50 mM de fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, 0.2 mM TCEP, 1 % (v/v) Triton™ X-100, pH 8.0). Una vez resuspendidas las células, se añadió al tampón lisozima y EDTA a una concentración final de 0.2 mg/mL y 1 mM, respectivamente. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lisaron las células con un sonicador. El extracto se centrifugó a 48.000 xg durante 20 minutos a 4 °C.

La fracción insoluble, que contiene los cuerpos de inclusión y las membranas, se resuspendió en la disolución de solubilización (50 mM de fosfato de sodio, 8 M urea, 0.5 M NaCl, pH 8.0), y se incubó en agitación suave toda la noche a temperatura ambiente.

Tanto la fracción soluble como la insoluble se purificaron por separado a través de una columna His GraviTrap™ (GE Healthcare). La fracción soluble se incubó en la columna, previamente lavada con tampón de equilibrado (20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol pH 8.0). Tras incubar con el tampón de lavado (20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, 40 mM imidazol, pH 8.0), la proteína fusionada a His<sub>6</sub> se eluyó con el tampón de elución (20 mM fosfato de sodio, 0.5 M NaCl, 40 mM imidazol, pH 7.5). De la misma manera, se purificó la fracción insoluble incluyendo 8 M de urea en cada tampón.

Las muestras recogidas durante la purificación se cargaron junto con el marcador de masas moleculares conocidas, en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE siguiendo el protocolo del Apartado 20. Una vez desteñido el gel, se comprobó la expresión y la solubilidad de la proteína de interés.

## **23. Cuerpos de inclusión**

### **23.1. Lavado de los cuerpos de inclusión**

Para solubilizar las proteínas de las membranas o asociadas a las membranas que se encuentran en la fracción insoluble se llevó a cabo el lavado de los cuerpos de inclusión. La fracción insoluble se resuspendió en el tampón de lavado con detergente (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 % (p/v) NP40, 2 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7.5), se incubó en hielo durante 10 minutos, y se centrifugó a 21.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, y se repitió el lavado de los cuerpos de inclusión. El precipitado se resuspendió en el tampón de lavado con Triton™ X-100 (20 mM Tris, 0.5 % (v/v) Triton™ X-100, 2 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7.5), se incubó en hielo durante 10 minutos, y se centrifugó a 21.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, y se repitió el lavado de los cuerpos de inclusión con el tampón de lavado con Triton™ X-100. A continuación, se hicieron dos lavados en los que se resuspendieron los cuerpos de inclusión con el tampón Tris (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0), y se centrifugó a 21.000 xg durante 15 minutos a 4 °C. Por último, el precipitado se resuspendió en el tampón Tris. Las muestras recogidas se analizaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Apartado 20).

### **23.2. Solubilización de los cuerpos de inclusión**

Los cuerpos de inclusión–resuspendidos en el tampón de lisis o los cuerpos de inclusión lavados según el Apartado anterior–se centrifugaron a 18.000 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en el tampón de solubilización con urea (8 M urea, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0), y se incubaron a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. Se volvió a centrifugar a 18.000 xg durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se recogió el sobrenadante.

### **23.3. Purificación de la proteína recombinante solubilizada a partir de los cuerpos de inclusión.**

La purificación se realizó con la resina de níquel Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare), que se equilibró previamente con el tampón de solubilización con urea. La muestra de los cuerpos de inclusión solubilizados se incubó con la resina de níquel en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó con el tampón de lavado (8 M urea, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM imidazol, pH 8.0) para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente a la resina. La proteína fusionada a His<sub>6</sub> se eluyó con el tampón de elución con urea (8 M urea, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8.0).

### **23.4. Ensayos de renaturalización de las proteínas recombinantes purificadas mediante dilución (*refolding*)**

La determinación de las condiciones óptimas en las que una proteína se renaturaliza, se llevó a cabo mediante ensayos de renaturalización mediante la dilución de la proteína frente a disoluciones con diferentes condiciones.

Las proteínas atΔN1Ex1-His<sub>6</sub> y atΔN2Ex1-His<sub>6</sub> se añadieron a las disoluciones 1-9 (Tabla 11) a una concentración final de 0.07-0.1 mg/mL aprox. en un volumen final de 500 μL. En cambio, las proteínas atmEx1-His<sub>6</sub> y atmEx2-His<sub>6</sub> se añadieron a las disoluciones 1-13 (Tabla 11) a una concentración final de 0.6 mg/mL en un volumen final de 100 μL. Como control, las proteínas se diluyeron en el tampón de solubilización con urea (8 M urea, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0). Todas las muestras se incubaron a 20 °C durante toda la noche.

**Tabla 11.** Disoluciones utilizadas en la renaturalización de las proteínas mediante dilución.

	Tris-HCl pH 8.2 (mM)	MES pH 6.8 (mM)	NaCl (mM)	KCl (mM)	PEG3350 (% (p/v))	Cloruro de guanidinio (mM)	EDTA (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Sacarosa (mM)	Arginina (mM)
1	55		264	11	0.055	550	1.1			440	550
2	55		10.56	0.44	0.055	550	1.1			440	550
3	55		264	11	0.055	550		2.2	2.2	440	550
4	55		10.56	0.44	0.055	550		2.2	2.2	440	550
5		55	264	11	0.055	550	1.1			440	550
6		55	10.56	0.44	0.055	550	1.1			440	550
7		55	264	11	0.055	550		2.2	2.2	440	550
8		55	10.56	0.44	0.055	550		2.2	2.2	440	550
9	55		10.56								
10	55		264	11	0.055	550				440	
11	55		10.56	0.44	0.055	550					550
12	55		264	11	0.055	550				440	
13	55		10.56	0.44	0.055	550					550

Para evaluar la solubilidad de la proteína en las diferentes condiciones, se monitorizó la turbidez de las muestras midiendo la densidad óptica a 350, 400, 450, y 500 nm con el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000. Los aminoácidos aromáticos de la proteína no absorben la luz a estas longitudes de onda. Si la proteína es soluble en la nueva condición, no se detecta absorbancia. Sin embargo, si se forman agregados insolubles, se detecta absorbancia debida a la dispersión de la luz (“*light scattering*”).

#### **Refolding de atmEx1-His<sub>6</sub> en una de las condiciones**

La proteína atmEx1-His<sub>6</sub> no mostró una formación de agregados insolubles en la disolución 10 (Tabla 11), por lo que se realizó un ensayo a mayor escala dializando la proteína en un volumen final de 208 mL, a una concentración final de 0.06 mg/mL, en agitación, a 4 °C, y durante 72 °C.

#### **24. Diálisis de las muestras de proteína**

La diálisis se llevó a cabo para eliminar solutos de bajo peso molecular como las sales o para intercambiar el tampón de la muestra a uno diferente. Se utilizó la membrana Spectra/Por® Dialysis Membrane (Spectrum Labs) con un tamaño de poro (*cut-off*) seleccionado en función del tamaño de la proteína (el *cut-off* elegido debe ser una tercera parte de la masa molecular (kDa) de la proteína). Las muestras se dializaron frente a un volumen de tampón de 100 a 1000

veces el volumen de la muestra, en agitación a 4 °C durante 16 horas. En algunos casos se hicieron varios cambios de tampón cada 2-4 horas.

## 25. Concentración de muestras de proteínas.

Una vez purificadas las proteínas, se concentraron mediante ultrafiltración en tubos Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices (Millipore). Se escogió un tamaño de poro tres veces menor que la masa molecular (kDa) de la proteína.

## 26. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular con la columna HiPrep™ 16/60 Sephacryl S-300 HR de 120 mL (GE Healthcare) se realizó para purificar las proteínas después de la cromatografía de afinidad. En cambio, la cromatografía de exclusión molecular con la columna Superdex 200 10/300 GL de 24 mL (GE Healthcare) se utilizó para la caracterización del estado oligomérico de las proteínas. Ambas columnas se acoplaron al equipo de cromatografía AKTA Prime Plus (GE Healthcare).

Las muestras se centrifugaron a 21.000 xg a 4 °C durante 15 min, y el sobrenadante se cargó en la columna previamente equilibrada en el tampón. En la columna 16/60 Sephacryl S-300 HR se utilizó un flujo de 1 mL/min y se recogieron fracciones de 1.5 mL, mientras que en la columna Superdex 200 10/300 GL se utilizó un flujo de 0.5 mL/min, y se recogieron fracciones de 0.5 mL. Las muestras recogidas se analizaron en geles SDS-PAGE siguiendo el protocolo del Apartado 20. Las fracciones en las que se detectó la proteína se concentraron según el Apartado 25. Se utilizaron los marcadores de masa molecular conocida de 1.35 a 670 kDa de Bio-Rad (Gel Filtration Standard, 151-1901) para realizar la recta de calibrado.

### 26.1. Ensayo de interacción mediante cromatografía de exclusión molecular

Las proteínas y las mezclas de proteínas purificadas en el tampón PBS-Na/K pH 7.3 (Tabla 12) se incubaron durante 6 horas a temperatura ambiente. A continuación, se cargaron 100 µL de cada mezcla de proteínas en la columna Superdex 200 10/300 GL de 24 mL (GE Healthcare) equilibrada previamente con el tampón PBS-Na/K pH 7.3. Se utilizó un flujo de 0.5 mL/min, y se recogieron fracciones de 0.5 mL.

**Tabla 12.** Ensayo de interacción en la columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare).

Carrera	Proteínas	Concentración
1	atΔC3Ex1	200 µM
2	atΔC1Ex2	200 µM
3	atΔC3Ex1 + atΔC1Ex2	200 µM + 200 µM
4	atΔC3Ex1	50 µM
5	atΔC1Ex2	350 µM
6	atΔC3Ex1 + atΔC1Ex2	50 µM + 350 µM

## 27. Ensayos de cristalización de proteínas

Los ensayos de cristalización de las proteínas atΔC3Ex1 (3, 10, y 20 mg/mL), atΔC3Ex1-His<sub>6</sub> (7 mg/mL), y atΔC1Ex2 (7 mg/mL) se realizaron utilizando el método de difusión de vapor en gota sentada en placas de 96 pocillos, a 4 °C y a temperatura ambiente. Las proteínas se

dializaron previamente frente al tampón 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl. Estos ensayos se llevaron a cabo en Centro de Investigación del Cáncer (CIC) de Salamanca en colaboración con los Dres. Rubén Martínez (USAL) y José M. de Pereda (CIC). Para encontrar las condiciones de cristalización de la proteína, se utilizaron las siguientes condiciones iniciales de cristalización: Wizard I y II (Emerald Biosciences), Cryo I y II (Emerald Biosciences), Salt Rx (Hampton Research), PACT I y II (Emerald Biosciences) y Crystal Screen I y II (Hampton Research). La gota se obtuvo mezclando 1  $\mu$ L de la proteína con 1  $\mu$ L de la disolución de cristalización y se equilibró frente a 80  $\mu$ L de la misma disolución de cristalización en el reservorio.

### Optimización de las condiciones de cristalización

La condición de cristalización 30 % (v/v) PEG3000, 0.1 M Tris pH 7.0, 0.2 M NaCl de Wizard fue la más prometedora en el caso de la proteína **atAC1Ex2**, por lo que se optimizó para tratar de conseguir cristales. En una placa de 24 pocillos se mantuvieron constantes la concentración de la sal (0.2 M NaCl) y la concentración del tampón (0.1 M Tris); y se varió el pH del tampón (pH 6.8, 7.0, 7.2, y 7.4) y la concentración de PEG3000 (22, 24, 26, 28, 30, y 32 %), siendo un total de 24 condiciones. El ensayo de cristalización se volvió a realizar mediante el método en gota sentada, a temperatura ambiente, y partiendo de la proteína a una concentración de 7 mg/mL en el tampón 20 mM Tris-HCl pH 8.0. Se preparó una gota de 1.5  $\mu$ L de proteína con 1.5  $\mu$ L de la disolución de cristalización, y 1 mL de la disolución de cristalización en el reservorio.

## 28. Entrecruzamiento (*cross-linking*) químico de proteínas

Los experimentos de entrecruzamiento químico (*chemical cross-linking*) con los *cross-linkers* glutaraldehído y DSS (disuccinimidil suberato) se llevaron a cabo para proporcionar información preliminar sobre el estado oligomérico de una proteína y las interacciones proteína-proteína.

### 28.1. Entrecruzamiento químico de proteínas mediado por glutaraldehído

El *cross-linker* homobifuncional—que posee el mismo grupo reactivo en cada extremo—glutaraldehído, posee dos grupos aldehído que reaccionan con grupos amino cercanos en el espacio, formando enlaces covalentes.

Se preparó una muestra de proteína en el tampón PBS-Na/K (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado a pH 7.3 con NaOH). A continuación, se añadió el *cross-linker* glutaraldehído (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.05 % (v/v), y se incubó a 25 °C durante 1 hora, 30 minutos, 5 minutos, 1 minuto, y 30 segundos. La reacción se paró añadiendo el tampón Tris-HCl pH 8.0 a una concentración final de 90 mM. La misma muestra de proteína se procesó igual que el resto de muestras pero sin glutaraldehído, y se utilizó como control negativo. Las muestras recogidas se cargaron junto con el marcador de masas moleculares conocidas, en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE siguiendo el protocolo del Apartado 20.

### 28.2. Entrecruzamiento químico de proteínas mediado por DSS

El *cross-linker* homobifuncional DSS posee dos grupos reactivos ester N-hidroxisuccinimida (NHS-éster) que reaccionan con aminas primarias cercanas en el espacio, la cadena lateral de los residuos lisina y el N-terminal de los polipéptidos, y las conecta mediante la formación de

enlaces amida estables liberando el N-hydroxysuccinimidil. La distancia del entrecruzamiento introducido por el DSS es de 11.4 Å.

Se preparó una muestra de proteína en el tampón PBS-Na/K (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado a pH 7.3 con NaOH) y se incubó a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se añadió el *cross-linker* DSS (Pierce, Thermo Scientific) previamente disuelto en DMF a una concentración final de 1 mM, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se paró añadiendo el tampón Tris-HCl pH 7.6 a una concentración final de 45 mM. La misma muestra de proteína se procesó igual que el resto de muestras pero sin DSS, y se utilizó como control negativo. Las muestras recogidas se cargaron junto con el marcador de masas moleculares conocidas, en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE siguiendo el protocolo del Apartado 20.

### 29. Geles de poliacrilamida sin SDS (*native PAGE*)

La separación de proteínas mediante la electroforesis en condiciones no desnaturizantes se llevó a cabo para detectar interacciones proteína-proteína. La composición de los geles, el tampón de electroforesis, y el tampón de carga fueron los mismos que en el SDS-PAGE (Apartado 20) excepto que no llevaban SDS. La electroforesis y la tinción de los geles se realizaron con las mismas disoluciones y de la misma forma que para el SDS-PAGE.

### 30. Transformación de las hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante agroinfiltración

La transformación en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) con *Agrobacterium tumefaciens* cepa C58C1 se llevó a cabo mediante la técnica de agroinfiltración.

Se preparó un preinóculo a partir de una única colonia de *Agrobacterium* (transformada con el vector de interés) en un volumen de 3.5 mL de medio LB con rifampicina (50 µg/mL) y el antibiótico correspondiente (al cuál es resistente el ADN plasmídico). Se incubó a 28 °C durante toda la noche con una agitación de 200 rpm. Se tomaron 50 µL del precultivo, y se añadieron a un volumen de 10 mL de medio LB suplementado con rifampicina (50 µg/mL) y el antibiótico correspondiente. El cultivo creció a 28 °C con una agitación de 200 rpm durante 15-16 horas o hasta que la densidad óptica medida a 600 nm (paso óptico de 1 cm) fue de 1.0 para cada cultivo. Se centrifugó a 3000 xg a temperatura ambiente (22 °C) durante 15 minutos, y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 10 mL de la disolución de infiltración (10 mM MES-KOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM acetosiringona, pH 5.6), y se incubaron a temperatura ambiente sin agitación durante 3-5 horas en oscuridad. Esta suspensión de bacterias se mezcló con el mismo volumen de la suspensión de *Agrobacterium* transformado con p19. p19 es una proteína represora del silenciamiento post-transcripcional del ARN de *Tomato bushy stunt virus* (virus del enanismo arbustivo del tomate). Se ha demostrado que actúa como supresor del silenciamiento evitando que la propia planta degrade la proteína que se quiere expresar (Voinnet *et al.* 2003). En el caso del ensayo de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) y del ensayo de colocalización, se añadió el mismo volumen de cada una de las dos construcciones y de p19. Las mezclas se infiltraron con una jeringa en el envés de las hojas de *Nicotiana benthamiana*, contrarrestando la presión con el dedo en el haz de la hoja. Las plantas estuvieron en el invernadero durante 72 horas. Por último, se cortaron las regiones de las hojas infiltradas, se pasaron a un portaobjetos, y se observaron a través del microscopio confocal.

### **31. Aislamiento de protoplastos de *Nicotiana benthamiana***

Los protoplastos de *Nicotiana benthamiana* se aislaron a partir de las regiones transformadas de las hojas 72 horas después de su agroinfiltración. Primero se preparó la disolución enzimática (1 % (p/v) de celulosa Onozuka R10 (Serva), 0.3 % (p/v) de macerozima R10 (Serva), 4.4 g/L de MS (Murashige and Skoog Basal Medium with Gamborg's vitamins, Sigma), 20 mM MES-KOH, 130 g/L sacarosa, pH 5.8), se calentó a 55 °C durante 10 minutos para inactivar proteasas y mejorar la solubilidad, se enfrió a temperatura ambiente, se le añadió BSA a una concentración final de 0.1 % (p/v), y se esterilizó a través de un filtro de 0.45 µm. En llama, las regiones transformadas se cortaron en tiras de unos 0.5-1.0 mm de ancho y se añadieron a una placa de Petri de 40 mm de diámetro que contenía 10 mL de la disolución enzimática. Se hizo el vacío durante 30 minutos en oscuridad para facilitar la penetración de la disolución en los trozos de hoja. Los protoplastos se incubaron durante 3 horas en agitación horizontal (40 rpm) en oscuridad a temperatura ambiente, y se liberaron agitando la placa a 80 rpm durante 1 minuto. En llama, la suspensión de protoplastos se filtró con una red de nylon de 100 µm sobre un embudo a un tubo de 12 mL de fondo redondo. Se añadieron 2 mL de la disolución F-PCN (4.4 g/L de MS (Murashige and Skoog Basal Medium with Gamborg's vitamins, Sigma), 20 mM MES-KOH, 80 g/L glucosa, pH 5.8) previamente esterilizada a través de un filtro de 0.45 µm. Se centrifugó a 100 xg durante 2 minutos a temperatura ambiente sin desaceleración. Los protoplastos intactos se recogieron entre la disolución enzimática y la disolución F-PCN, y se lavaron con 10 mL del tampón W5 (150 mM NaCl, 125 mM KCl, 2 mM MES-KOH pH 5.7) previamente esterilizado a través de un filtro de 0.45 µm. Se centrifugaron a 100 xg sin desaceleración, se descartó el sobrenadante y los protoplastos se resuspendieron en 500 µL del tampón W5. Se añadieron unas gotas de los protoplastos a un portaobjetos y se visualizaron a través del microscopio confocal.

### **32. Aislamiento y transformación de protoplastos de *Arabidopsis***

#### **32.1. Aislamiento de protoplastos de *Arabidopsis***

El aislamiento de los protoplastos de *Arabidopsis thaliana* se hizo a partir de hojas de plantas de 3-4 semanas que no hubieran florecido. Se preparó la disolución enzimática (1 % (p/v) de celulosa Onozuka R10 (Serva), 0.3 % (p/v) de macerozima R10 (Serva), 400 mM manitol, 20 mM KCl, 20 mM MES-KOH pH 5.7), se calentó a 55 °C durante 10 minutos para inactivar proteasas y mejorar la solubilidad, se enfrió a temperatura ambiente, y se añadió CaCl<sub>2</sub> y BSA a unas concentraciones finales de 10 mM y 0.1 % (p/v) respectivamente. La disolución enzimática se esterilizó a través de un filtro de 0.45 µm, y se añadió a una placa de Petri de 40 mm de diámetro. En llama, las hojas se cortaron en tiras de 0.5-1.0 mm de ancho y se añadieron a la placa de Petri que contenía 10 mL de la disolución enzimática. Se hizo el vacío durante 30 minutos en oscuridad para facilitar la infiltración de la disolución en las hojas cortadas. Se incubó la placa de Petri durante unas 3 horas con una agitación suave en oscuridad a temperatura ambiente. En llama, se filtraron los protoplastos a través de una red de nylon de 100 µm sobre un embudo a un tubo de fondo redondo de 12 mL. La muestra se centrifugó a 100 xg con una aceleración máxima de 9 y una desaceleración de 5 durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, y se resuspendió en 10 mL del tampón W5 frío (154 mM NaCl, 5 mM KCl, 125 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MES-KOH pH 5.7). Se volvió a centrifugar a 100 xg con una aceleración de 9 y una desaceleración de 5 durante 2 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 5 mL del tampón W5 frío. Los protoplastos se incubaron durante 30 minutos en hielo, y se estimó la concentración de protoplastos. Se



volvieron a centrifugar los protoplastos a 100 xg con una aceleración de 9 y una desaceleración de 5 durante 2 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante, y se resuspendieron en un volumen del tampón MMg (400 mM manitol, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM MES-KOH pH 5.7) para tener una concentración final de  $4 \cdot 10^5$  protoplastos/mL.

### **32.2. Transformación transitoria de protoplastos de *Arabidopsis***

Los protoplastos se transformaron de forma transitoria mediante PEG y calcio. A un tubo de 2 mL de fondo rendo se añadieron 10 µL de unos 20-40 µg de ADN plasmídico, 110 µL de protoplastos, junto con 110 µL de la disolución fresca PEG/Ca (40 % (p/v) PEG4000, 0.2 M manitol, 0.1 M Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Esta mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 440 µL del tampón W5 (utilizado en el Apartado anterior 32.1), se centrifugó a 100 xg durante 1 min a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante. Los protoplastos se resuspendieron en 1 mL del tampón W5, y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante unas 12 horas. Se añadieron unas gotas de la suspensión de protoplastos en un portaobjetos, y se observaron a través del microscopio confocal.

### **33. Visualización en el microscopio confocal**

Las imágenes se tomaron en el microscopio confocal Leica SP2 del CIALE (Centro Hispano Luso de Investigaciones Agrarias, Universidad de Salamanca), Leica SP2 del IRNASA-CSIC mediante el software LCS (Leica Confocal Software) Lite 2.5, y Leica SP5 del CIC-CSIC (Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca). El Leica SP2 utilizó el software LCS Lite 2.5, y el Leica SP5 el software Leica LAS AF<sup>®</sup> Lite.

La localización de las proteínas fluorescentes GFP e YFP con la clorofila se realizó con la fuente de excitación láser de Argón a 488 nm. Los filtros utilizados para la detección de la GFP y de la YFP se limitaron a un rango de 500 a 540 nm; y para la clorofila se escogió un rango de emisión de 650 a 743 nm.

La colocación CFP/YFP/clorofila se hizo en modo secuencial. Primero se excitó la proteína YFP y la clorofila a 514 nm con el láser de Argón, y se recogió la emisión de la YFP de 525 a 588 nm y la emisión de la autofluorescencia de la clorofila de 670 a 707 nm. A continuación, se excitó la proteína CFP a 458 nm con el láser de Argón, y se recogió la emisión de la CFP de 470 a 510 nm.

El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ.

### **34. Extracción de proteínas de hojas de *Nicotiana benthamiana* transformadas**

Para la extracción de proteínas totales de las hojas de tabaco infiltradas y no infiltradas se congelaron las hojas en nitrógeno líquido, se homogeneizó el tejido en nitrógeno líquido, y se pesaron 50 mg. Se añadieron 200 µL del tampón de muestra Urea-SDS (8 M urea, 2 % (p/v) SDS, 0.1 M DTT, 20 % (v/v) glicerol, 0.1 M Tris-HCl, 0.004 % (p/v) azul de bromofenol, pH 6.8), se incubó 5 minutos a 95 °C, se centrifugó a 21.000 xg durante 5 minutos, y se recogió el sobrenadante.

### **35. Análisis por Western blot**

Las muestras preparadas según el Apartado 34, se cargaron en un gel SDS-PAGE (Apartado 20). La transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa se hizo en una célula

electroforética de transferencia semi-seco (Bio-Rad) con el tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20 % (v/v) metanol). La membrana se tiñó con la disolución Ponceau S. (0.3 % (p/v) Ponceau S., 1% (v/v) ácido acético) para comprobar la transferencia de las proteínas del gel en la membrana, y se lavó con agua destilada. Una vez eliminado el Ponceau S., la membrana se incubó con el tampón de bloqueo (0.3 % (p/v) leche desnatada, 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4). A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo a 4 °C durante toda la noche en agitación. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata  $\alpha$ -HA conjugado con peroxidasa (Roche), y un anticuerpo monoclonal de ratón  $\alpha$ -c-myc conjugado con peroxidasa (Roche). La membrana se reveló mediante quimioluminiscencia. Se utilizaron las disoluciones de revelado Amersham ECL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **36. Obtención de plantas transgénicas estables *promotorEx1-GUS* y *promotorEx2-GUS* de *Arabidopsis thaliana***

#### **36.1. Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana***

Se obtuvieron plantas transgénicas estables de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 mediante el método “*floral dip*” basado en el protocolo de (Davis *et al.* 2009) con alguna modificación. Se inocularon colonias de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 transformadas con el vector de expresión en medio YEBS suplementado con 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de gentamicina (para la selección de la cepa GV3101) y con kanamicina (para la selección del vector introducido). Se incubaron durante 24 horas a 28 °C con una agitación de 200 rpm. Se añadieron 5 mL del preinóculo en 250 mL de medio YEBS con los antibióticos, y se incubó a 28 °C durante 11 horas con una agitación de 200 rpm. Se añadió el surfactante Silwet L-77 a una concentración final de 0.03 % (v/v). Las plantas florecidas, crecidas a 22-23 °C a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con un fotoperiodo de día largo (16 horas luz/8 horas oscuridad) y una humedad relativa del 70 %, se sumergieron en los cultivos durante 30 segundos (*floral dip*). Las plantas infiltradas se mantuvieron con una alta humedad en oscuridad durante menos de 24 horas, y se continuaron creciendo en las mismas condiciones de antes de ser transformadas.

#### **36.2. Selección de las líneas transgénicas homocigotas**

Las semillas obtenidas de las plantas transformadas por *Agrobacterium* (T1) se esterilizaron y se sembraron en placas con medio MS suplementado con kanamicina siguiendo la metodología del Apartado 5, y crecieron con un fotoperiodo de día largo 22-23 °C a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  con una humedad relativa del 70 %. Las plantas T1, resistentes a kanamicina, se transfirieron al sustrato individualmente 10 días después de haber germinado. Las semillas T2, procedentes de las plantas T1 por autofecundación, se sembraron en placas con medio MS suplementado con kanamicina. Las plantas T2 con una única copia de la inserción del transgén mostraron un ratio de segregación 3:1 (resistentes:sensibles a kanamicina). Las plantas T2 con una única inserción y resistentes a kanamicina se transfirieron al sustrato proporcionando las semillas T3. Las semillas T3 se sembraron en placas con medio MS suplementado con kanamicina, y se seleccionaron las líneas homocigotas, es decir, las que el 100 % de los descendientes T3 eran resistentes a kanamicina. Finalmente, se escogieron dos líneas T3 homocigotas independientes para cada transgén.

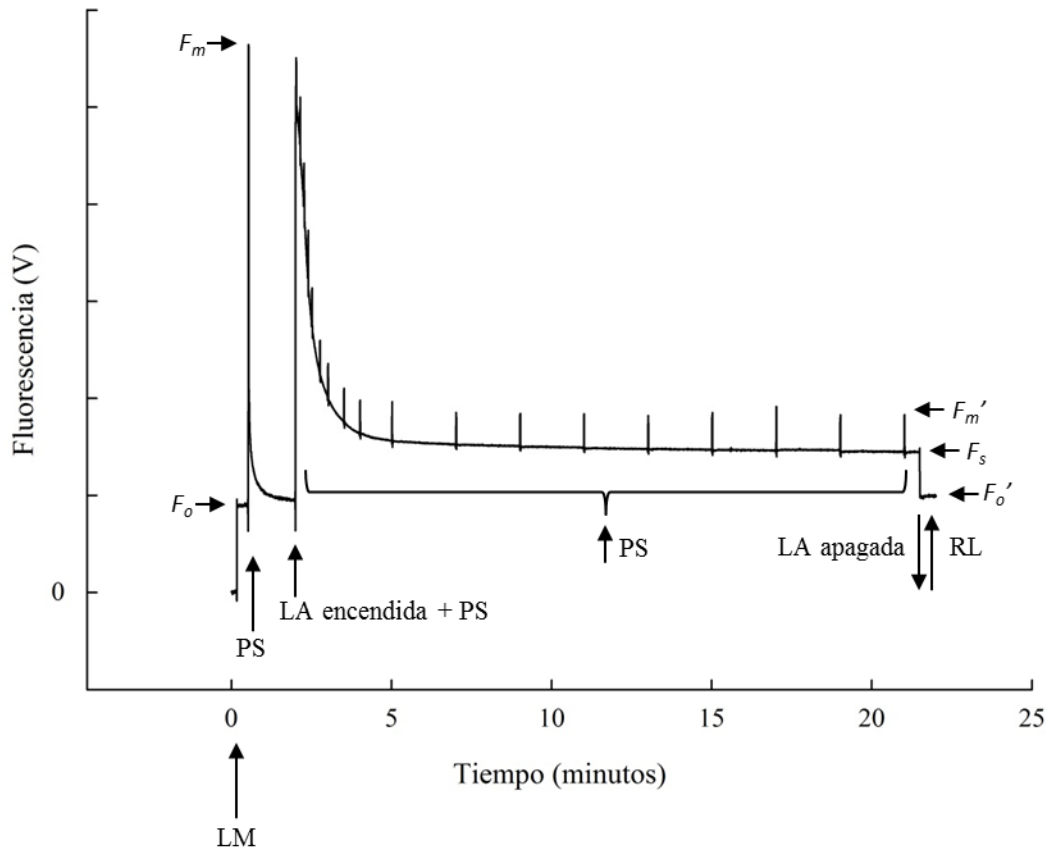
### 37. Tinción histoquímica de la actividad $\beta$ -glucuronidasa

La tinción histoquímica de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) de *E. coli* se llevó a cabo según el protocolo de (Jefferson *et al.* 1986) con alguna modificación. Las plantas transgénicas, que expresan la enzima GUS bajo el control del promotor de interés, se sumergieron en el tampón de tinción GUS (1 mM del sustrato X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide) disuelto previamente en DMF (dimetilformamida), 0.5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 0.5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 0.1 % (v/v) Tritón X-100, 100 mM  $Na_3PO_4$ , pH 7.0). A continuación, se aplicó el vacío durante 15 minutos para que el tampón se infiltrara en los tejidos, y las muestras se incubaron a 37 °C de 12 a 24 horas. Por último, la muestra se transfirió en etanol al 70 % (v/v) y se incubó a 37 °C varias veces hasta que se eliminó la clorofila por completo. Las muestras se almacenaron en etanol al 70 % (v/v), se visualizaron con el microscopio estereoscópico SMZ1500 de Nikon compuesto por una cámara digital DS-Fi1, y se tomaron las imágenes a través del software NIS Elements F3.0.

### 38. Medidas de la fluorescencia de la clorofila

La fluorescencia de la clorofila *a* se midió con el fluorímetro de pulsos de amplitud modulada Dual-PAM-100 (Heinz Walz) en las hojas de las plantas. Las plantas se adaptaron a la oscuridad durante 15 minutos para que los centros de reacción del fotosistema II (PSII) estuvieran “abiertos”, es decir, con la quinona  $Q_A$  completamente oxidada. La hoja se expuso a una luz modulada de medida muy débil de  $9 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , para continuar con la  $Q_A$  oxidada, y se determinó la fluorescencia mínima ( $F_o$ ). A continuación, se aplicó un pulso saturante de luz a  $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 0.8 s, que provocó el “cierre” de los centros de reacción del PSII (quedando la  $Q_A$  completamente reducida), y se registró la fluorescencia máxima en el estado adaptado a la oscuridad ( $F_m$ ). Posteriormente, las hojas se iluminaron con una luz actínica a  $660 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 20 minutos que indujo el transporte de electrones a través del PSII (Baker 2008). En presencia de la luz actínica, se aplicaron pulsos saturantes de  $3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de 0.8 segundos a diversos intervalos (5 pulsos cada 7.5 segundos, 2 pulsos cada 15 segundos, 2 pulsos cada 30 segundos, 1 pulso a los 60 segundos, 8 pulsos cada 120 segundos, y 1 pulso a los 30 segundos) hasta estabilizar los valores de la fluorescencia obteniendo la fluorescencia en el estado estable adaptado a la luz ( $F_s$ ) antes del pulso saturante. Inmediatamente después del pulso saturante se determinó la fluorescencia máxima en el estado adaptado a la luz ( $F_m'$ ). Seguidamente, se apagó la luz actínica mientras se aplicó un pulso de luz en el rojo lejano, que volvió a “abrir” los centros de reacción del PSII, lo que permitió determinar la fluorescencia mínima en el estado adaptado a la luz ( $F_o'$ ) (Figura 32).

La eficiencia fotoquímica máxima del PSII se expresó como  $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$  según el modelo de (Butler 1978). El rendimiento cuántico del transporte de electrones en el PSII se determinó según (Genty *et al.* 1989) como  $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$ . El coeficiente NPQ se calculó con la ecuación de Stern-Volmer como  $\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$  (Bilger y Bjorkman 1990), que estima la velocidad constante de la disipación en forma de calor del PSII (Murchie y Lawson 2013). Por último, se determinó la presión de excitación del PSII como  $1 - qP = (F_s - F_o')/(F_m' - F_o')$  (Bilger y Bjorkman 1990), que muestra una indicación de la proporción de los centros de reacción del PSII cerrados (Maxwell y Johnson 2000).



**Figura 32.** Cinética de la inducción de la fluorescencia de la clorofila *a*, que muestra las exposiciones a los distintos tipos de luz: luz modulada de medida (LM), luz actínica (LA), pulso saturante de luz (PS), y luz en el rojo lejano (RL); y los parámetros obtenidos: fluorescencia mínima en el estado adaptado a la oscuridad ( $F_o$ ), fluorescencia máxima en el estado adaptado a la oscuridad ( $F_m$ ), fluorescencia en el estado estable adaptado a la luz ( $F_s$ ), fluorescencia máxima en el estado adaptado a la oscuridad ( $F_m'$ ), y fluorescencia mínima en el estado adaptado a la luz ( $F_o'$ ).

### 39. Aislamiento de las proteínas solubles del estroma de *Arabidopsis*

La extracción de proteínas solubles del estroma se realizó según el protocolo (Hall *et al.* 2011) a 4 °C. Primero, se cortaron y se pesaron las hojas de *Arabidopsis*. En un batidora de vaso, se añadieron 170 mL del tampón de extracción de cloroplastos (20 mM Tricina-NaOH pH 8.4, 300 mM sorbitol, 10 mM KCl, 10 mM Na-EDTA, 0.25 % (p/v) BSA, 4.5 mM ascorbato de sodio, y 5 mM L-cisteína) por cada 20 g de hojas, y se homogeneizaron 5 veces durante 1 segundo. El homogeneizado se pasó a través de cuatro capas de una membrana de nylon con un tamaño de poro de 22  $\mu\text{m}$  para que los cloroplastos—que tienen un tamaño de 1-10  $\mu\text{m}$ —pasen a través de la membrana; y en cambio, el núcleo, las células intactas, y los fragmentos más grandes queden retenidos en la membrana. Los cloroplastos se centrifugaron a 1000  $\times g$  durante 2 minutos a 4 °C, y se resuspendieron en un volumen del tampón de lavado (20 mM HEPES-NaOH pH 7.8, 300 mM sorbitol, 10 mM KCl, 2.5 mM Na-EDTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) equivalente al del tampón de extracción. A continuación, se centrifugaron 2 minutos a 1000  $\times g$  a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Los cloroplastos se resuspendieron en un pequeño volumen de tampón de lavado, y se añadió un volumen del tampón de choque osmótico (10 mM pirofosfato de sodio-NaOH pH 7.8) tres veces el volumen del tampón de lavado añadido, para romper los cloroplastos. La suspensión se mezcló con el homogeneizador de vidrio Potter de 40 mL con el pestillo A, se

centrifugó a 7500 xg a 4 °C durante 5 minutos, y se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas solubles del estroma. Para eliminar las membranas tilacoidales residuales del sobrenadante, se centrifugó a 100.000 xg a 4 °C durante 1 hora en la ultracentrífuga. Las proteínas solubles del estroma se concentraron mediante ultrafiltración con tubos Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units de 10K (Millipore) hasta un volumen final de 1-2 mL. La cuantificación de proteína en las muestras se realizó mediante el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

#### **40. Depleción de la proteína Rubisco**

Para realizar la depleción de la D-Ribulosa 1,5-Difosfato Carboxilasa (Rubisco), la proteína mayoritaria del estroma, se utilizó la columna Seppro® Rubisco Spin Columns (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en una columna de afinidad que contiene anticuerpos inmovilizados específicos IgY capaces de retener la proteína Rubisco, enriqueciendo la muestra con proteínas menos abundantes.

Las muestras recogidas se concentraron mediante ultrafiltración con los tubos Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units de 10K (Millipore) hasta un volumen final de 1-2 mL. La determinación de la concentración de proteína en las muestras se hizo por el método Bradford (Bradford 1976) empleando como estándar la albúmina de suero bovino (BSA).

#### **41. Electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE)**

La electroforesis bidimensional diferencial en gel 2D-DIGE (*Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis*) se llevó a cabo para detectar las diferencias en los niveles de expresión de proteínas entre dos tratamientos lumínicos y tres genotipos. Para ello, las muestras de proteína soluble del estroma del cloroplasto de los seis tratamientos se marcaron con fluorocromos, se separaron las proteínas en la electroforesis bidimensional, y se identificaron las proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas.

##### **41.1. Marcaje de las muestras**

Se precipitaron 300 µg de proteína soluble de las muestras del estroma del cloroplasto con acetona pura fría, siendo el volumen añadido de acetona el correspondiente a cuatro veces el volumen de la muestra. Se incubó a -20 °C durante 16 horas, y se centrifugó a 20.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. A continuación, se añadió 1 mL de acetona pura, y se volvió a centrifugar a 20.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, y se dejaron secar las muestras durante 15 minutos hasta que se evaporó la acetona. Cada muestra se resuspendió en 62 µL de tampón de marcaje (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 M tiourea, 7 M urea, y 2 % (p/v) CHAPS) durante 30 minutos, y se centrifugó a 21.000 xg durante 10 minutos para eliminar el material insoluble, quedando una concentración final de proteína de cada muestra de 5 µg/µL.

Los fluorocromos G-Dye100, G-Dye200 y G-Dye300 (DyeAGNOSTICS) se utilizaron para marcar una pequeña parte de los aminoácidos lisina de cada proteína. Se añadieron 400 pmol de fluorocromos por cada 50 µg de proteína. La reacción de marcaje se incubó durante 30 minutos en hielo en oscuridad, y se detuvo por la adición de L-lisina a una concentración final de 0.83 mM seguido de una incubación de 10 minutos en hielo en oscuridad. Cada uno de los 6 grupos experimentales se marcó con los fluorocromos G-Dye200 y G-Dye300 por separado, y el estándar interno, que incluía todas las muestras del experimento en la misma cantidad, se

marcó con el fluorocromo G-Dye100 (Tabla 13). En un mismo tubo se mezclaron 50 µg de proteína de la muestra A marcada con G-Dye200, 50 µg de proteína de la muestra B marcada con G-Dye300, y 50 µg de proteína del estándar interno marcado con G-Dye100, quedando un total de 150 µg de proteína por tira de gradiente de pH inmovilizado (IPG, *Immobilized pH gradient*, GE Healthcare). El uso del estándar interno limita la variación experimental entre geles, normaliza los volúmenes de los “spots” de proteínas de cada muestra dentro del mismo gel, y, como es el mismo en todos los geles, permite comparar las muestras entre diferentes geles.

**Tabla 13.** Diseño experimental de los geles 2D-DIGE. Se utilizaron tres fondos genéticos: plantas silvestres Col-0 (WT), y las plantas mutantes *executer1* (*ex1*) y *executer2* (*ex2*), en dos tratamientos lumínicos: alta intensidad de luz (HL) y condiciones normales de luminosidad (NL). El estándar interno, compuesto por una mezcla a partes iguales de todas las muestras (WT NL, WT HL, *ex1* NL, *ex1* HL, *ex2* NL, y *ex2* HL), se incluyó en todos los geles y se marcó con G-Dye100. Se realizaron cuatro réplicas por cada tratamiento: dos réplicas con G-Dye200 y dos réplicas con G-Dye300.

Gel	G-Dye100	G-Dye200	G-Dye300
1	estándar interno	WT NL	<i>ex1</i> NL
2	estándar interno	WT NL	<i>ex1</i> NL
3	estándar interno	<i>ex1</i> NL	WT NL
4	estándar interno	<i>ex1</i> NL	WT NL
5	estándar interno	WT <u>HL</u>	<i>ex1</i> <u>HL</u>
6	estándar interno	WT <u>HL</u>	<i>ex1</i> <u>HL</u>
7	estándar interno	<i>ex1</i> <u>HL</u>	WT <u>HL</u>
8	estándar interno	<i>ex1</i> <u>HL</u>	WT <u>HL</u>
9	estándar interno	<i>ex2</i> NL	<i>ex2</i> NL
10	estándar interno	<i>ex2</i> NL	<i>ex2</i> NL
11	estándar interno	<i>ex2</i> <u>HL</u>	<i>ex2</i> <u>HL</u>
12	estándar interno	<i>ex2</i> <u>HL</u>	<i>ex2</i> <u>HL</u>

#### 41.2. Primera dimensión: Enfoque isoelectrico

Las proteínas se diluyeron 15 veces en el tampón de hidratación compuesto por 2 M de tiourea, 7 M de urea, 2 % (p/v) de CHAPS, 0.002 % (p/v) de azul de bromofenol, 20 mM de DTT, y 0.5 % (v/v) del tampón de anfólitos IPG con un rango de pH de 3 a 11 no lineal (NL) (GE Healthcare). Las muestras se aplicaron a las tiras de gel de acrilamida IPG de 24 cm con un gradiente no lineal de pH 3.0-11.0 (Immobiline DryStrip gels, GE Healthcare). Las tiras de IPG se rehidrataron pasivamente a 0 V durante 2 horas y activamente a 30 V durante 10 horas en una unidad para el enfoque isoelectrico IPGphor II (GE Healthcare). A continuación, el isoelectroenfoque se llevó a cabo en la misma unidad a 500 V durante 1 hora, de 500 V a 1000 V en gradiente durante 1 hora, de 1000 V a 8000 V en gradiente durante 3 horas, y a 8000 V durante 7 horas.

Las tiras IPG—con las proteínas separadas en función de sus puntos isoelectricos y antes de ser separadas en la segunda dimensión SDS-PAGE—se equilibraron durante 15 minutos en el tampón de equilibrado (75 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 2 % (p/v) SDS, 30 % (v/v) glicerol,

0.002 % (p/v) azul de bromofenol) con 1 % (p/v) de DTT para conservar el estado reducido de las proteínas, y durante otros 15 minutos en el tampón de equilibrado 2.5 % (p/v) iodoacetamida para prevenir que las proteínas se vuelvan a oxidar.

#### 41.3. Segunda dimensión: SDS-PAGE

La separación de las proteínas en la segunda dimensión se llevó a cabo según (Laemmli 1970) en geles del 12 % de poliacrilamida con SDS que se prepararon en el sistema Ettan DALTSix Gel Caster (GE Healthcare). La disolución de los geles (12 % acrilamida, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % (p/v) SDS, 0.05 % (p/v) APS, y 0.05 (v/v) TEMED) se transfirió al sistema quedando entre los cristales de baja fluorescencia, y se añadió isopropanol en la parte superior hasta que polimerizaron. Una vez polimerizados, se eliminó el isopropanol, se lavó con agua, y se añadió la disolución de almacenaje (375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % (p/v) SDS).

Se retiró la disolución de almacenaje de los geles, y las tiras IPG se colocaron en la parte superior de los geles de poliacrilamida del 12 % con SDS de 26 cm de ancho, que se sellaron con 0.5 % (p/v) de agarosa y 0.002 % (p/v) de azul de bromofenol en el tampón de electroforesis con SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1 % (p/v) SDS).

En la unidad Ettan Daltsix electrophoresis unit (GE Healthcare), se añadieron 5 L del tampón del ánodo (tampón de electroforesis: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.1 % (p/v) SDS), se colocaron los geles, y por último se añadieron 1.5 L del tampón del cátodo (tampón de electroforesis 2X: 50 mM Tris, 384 mM glicina, 0.2 % (p/v) SDS). La electroforesis se llevó a cabo a 1 W/gel, 10 mA/gel, y 80 V durante 40 minutos; y a 13 W/gel, 40 mA/gel, y 500 V durante 4-5 horas o hasta que el frente llegó por encima del final del gel.

#### 41.4. Preparación de geles bidimensionales para la identificación de las proteínas expresadas diferencialmente en 2D-DIGE

Se precipitaron 500 µg de proteína de la muestra del estándar interno con acetona pura fría, y se incubó a -20 °C durante 16 horas. Las proteínas precipitadas se centrifugaron a 20.000 xg durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y el precipitado se lavó con acetona pura fría. Se volvió a centrifugar a 20.000 xg durante 10 minutos a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar la muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente, se resuspendió en el tampón de hidratación (2 M de tiourea, 7 M de urea, 2 % (p/v) de CHAPS, 0.002 % (p/v) de azul de bromofenol, 20 mM de DTT, y 0.5 % (v/v) del tampón de anfólitos IPG con un rango de pH de 3 a 11 no lineal (NL) (GE Healthcare)). Los cristales de los geles se trataron con una disolución *Bind-Silane* (80 % (v/v) etanol, 2 % (v/v) ácido acético glacial, 0.1 % (v/v) *Bind-Silane*) para que los geles se pegaran al cristal cuando se escindieran los “spots” con el robot, y se le pegaron dos puntos fluorescentes como referencia para el robot. La electroforesis bidimensional se realizó según los Apartados 41.2 y 41.3. Los geles se fijaron en una disolución de 30 % (v/v) de etanol y 10 % (v/v) de ácido acético, y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue (CBB).

#### 41.5. Análisis de las imágenes

Los geles 2D-DIGE se escanearon con el equipo Typhoon<sup>TM</sup> 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare) a una resolución de 100 µm, y con un voltaje del detector PMT (tubo fotomultiplicador) óptimo para obtener píxeles con intensidad máxima sin que se produzca una saturación en los “spots”. Las proteínas marcadas con G-Dye100 se excitaron con un láser a 488

nm, y su emisión se recogió con un filtro de 520 BP 40; las marcadas con G-Dye200 se excitaron a 535 nm y su emisión se recogió con un filtro de 580 BP 30; y las marcadas con G-Dye300 se excitaron a 633 nm y su emisión se recogió con un filtro de 670 BP 30. Las imágenes se acotaron con el software ImageQuant™ v.5.2 (GE Healthcare) para eliminar zonas externas. La detección de “spots”, el emparejamiento de los “spots” entre los geles, y el análisis estadístico de los geles 2D-DIGE se llevó a cabo con el software Redfind 3 (Ludesi). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con todos los “spots” de todos los geles 2D-DIGE para separar los grupos experimentales en función de las variaciones entre los proteomas. Se consideraron “spots” con cambios significativos en los niveles de expresión aquellos cuyo valor p es inferior a 0.001 en el test ANOVA (análisis de la varianza), y cuyo valor p es inferior a 0.05 en el test de Mann-Whitney. A continuación, se seleccionaron las proteínas con un volumen medio normalizado de “spot” igual o superior a 200, y con un ratio de volumen medio normalizado del “spot” entre grupos experimentales igual o superior a 2.0 (*fold-change* igual o superior a 2.0).

Los geles teñidos con CBB se escanearon con el software Labscan (GE Healthcare), y el software Redfind 3 (Ludesi) se utilizó en el emparejamiento de los “spots” seleccionados entre los geles DIGE y los geles teñidos con CBB.

### **41.6. Digestión enzimática de las proteínas incluidas en el gel o digestión trípica en gel**

Los “spots” seleccionados se escindieron automáticamente de los geles teñidos con CBB con el equipo Ettan Spotpicker™ acoplado a un cabezal de 1.4 mm de diámetro (GE Healthcare). Los fragmentos del gel se deshidrataron y se destiñeron con 20 mM de bicarbonato de amonio en 35 % (v/v) de acetonitrilo. La disolución se eliminó, y los fragmentos del gel se secaron añadiendo y descartando dos veces acetonitrilo puro. Una vez secos, los fragmentos del gel se volvieron a hidratar durante 1 hora en hielo con 2 ng/μL de tripsina (Promega), 20 mM de bicarbonato de amonio, y 10 % (v/v) de acetonitrilo. La digestión trípica en gel se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Para la espectrometría de masas, las proteínas digeridas en el gel con tripsina se prepararon mediante el método “*dried-droplet preparation*” (Kusmann *et al.* 1997) utilizando una disolución matriz compuesta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (Agilent Technologies).

### **41.7 Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

El análisis de espectrometría de masas de los fragmentos digeridos en el gel se llevó a cabo en el equipo MALDI-TOF Voyager-DE™ STR Bio Spectrometry Workstation (Applied Biosystems). El procesamiento de los datos y la generación de la lista de las masas peptídicas, llamada huella peptídica, se realizaron mediante el software Data Explorer de Applied Biosystems. La identificación de las proteínas se hizo comparando las huellas peptídicas experimentales con las depositadas en las bases de datos *Arabidopsis* TAIR9 y Swissprot a través del servidor Mascot de Matrix Science ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) con licencia en la Universidad de Umeå. En las búsquedas, se aceptó un error de tolerancia de 50 ppm en la masa peptídica, y se especificaron como modificaciones variables: la carbamidometilación de la cisteína y la oxidación de la metionina.



# Resultados



## Resultados

### 1. Análisis estructural de las proteínas Executer

A partir de estudios basados en genómica reversa, se identificaron las dos proteínas cloroplastídicas Executer1 y Executer2 que podrían actuar como mediadoras en la señalización retrógrada originada por el oxígeno singlete en las células de la planta. Sin embargo, aún no se conoce nada acerca de las propiedades bioquímicas y estructurales de Executer1 y Executer2. El objetivo de este apartado es la caracterización estructural de las proteínas Executer y el análisis de la interacción propuesta entre las dos proteínas.

#### 1.1. Identificación y distribución de las secuencias Executer

Para la descripción de la familia de proteínas Executer se realizó un análisis de secuencia con el objetivo de analizar la organización modular, de reconocer motivos funcionales y de caracterizar estructuralmente a los miembros de la familia.

Se realizó una búsqueda en las bases de datos biológicas públicas de secuencias homólogas de las proteínas Executer1 y de Executer2 utilizando las secuencias de *Arabidopsis thaliana* como punto de partida. Se identificaron representantes de la familia Executer exclusivamente en plantas verdes. No se ha identificado ningún gen con similitud a *Executer* en cianobacterias, ancestros de las plantas, ni en algas rojas o en glaucofitas (Tabla 14). Esto sugiere que la familia Executer surgió en plantas después del proceso endosimbiótico en la rama verde.

A partir de las proteínas seleccionadas, se realizó un alineamiento múltiple de secuencia para evaluar la conservación de los residuos (Figura A1 del Anexo), y analizar la relación filogenética entre los miembros de la familia (Figura 33). En el alineamiento múltiple de secuencia de proteínas se observa una región muy poco conservada en el extremo N-terminal, y dos regiones más conservadas conectadas por una región central con baja conservación de secuencia y longitud variable (Figura A1 del Anexo).

#### 1.2. Análisis filogenético

Para la construcción del árbol filogenético, se eliminaron las zonas menos conservadas del alineamiento múltiple de secuencia utilizando el *software* Gblocks. El análisis filogenético realizado muestra una clara separación entre las subfamilias Executer1 y Executer2 en plantas terrestres. Estas surgieron seguramente como consecuencia de una duplicación del gen presente en algas verdes durante la evolución a plantas terrestres (Figura 33). La mayoría de las plantas vasculares poseen una única versión de la proteína Ex1 y otra versión de la proteína Ex2. Sin embargo, existen excepciones como *Populus* que contiene dos formas de Ex2; *Linum usitatissimum*, que contiene dos formas de Ex1; y *Glycine max* y *Zea mays* que contienen dos formas de Ex1 y dos formas de Ex2 (Tabla 14 y Figura 33). La planta no vascular *Physcomitrella patens* (PHYPA) contiene cuatro formas, mientras que la planta vascular sin semillas *Selaginella moellendorffii* (SELMO) contiene dos formas de la proteína Executer que pertenecen al mismo clado, y agrupan con la subfamilia de Ex1 (Figura 33). En estos organismos parece que la sola presencia de Ex1 es suficiente para desempeñar su función en la vida terrestre.



*lyrata subsp. lyrata*; BOEST, *Boechera stricta*; GLYMA, *Glycine max*; PHAVU, *Phaseolus vulgaris*; MEDTR, *Medicago truncatula*; EUCGR, *Eucalyptus grandis*; CUCME, *Cucumis melo*; CUCSA, *Cucumis sativus*; ZEAMA, *Zea mays*; SETIT, *Setaria italica*; ORYSA, *Oryza sativa*; PHYPA, *Physcomitrella patens*; SELMO, *Selaginella moellendorffii*; VOLCA, *Volvox carteri*; y CHLRE, *Chlamydomonas reinhardtii*.

**Tabla 14.** Presencia o ausencia de las proteínas Executer en organismos oxifotosintéticos.

PHYLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	Especie	Abreviatura	Ex1	Ex2
Cyanobacteria	Gloeobacteria	Gloeobacterales		<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	GLOVI	0	
		Chroococcales		<i>Synechococcus</i> sp JA-2-3B'a(2-13)	SYNJA2	0	
				<i>Synechococcus</i> sp. JA-3-3Ab	SYNJA3	0	
		Prochlorales	Prochlorococcaceae	<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9313	PROMI	0	
				<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. marinus str. CCMP1375	PROSS	0	
				<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. pastoris str. CCMP1986	PROME	0	
		Nostocales	Nostocaceae	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	NOSSP	0	
	Chroococcales		<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	SYNSP	0		
	Glaucocystophyceae		Cyanophoraceae	<i>Cyanophora paradoxa</i>	CYAPA	0	
		Gloeochaetales	Gloeochaetaceae	<i>Gloeochaete wittrockiana</i>	GLOWI	0	
		Glaucocystophyceae	Glaucocystaceae	<i>Glaucocystis nostochinearum</i>	GLANO	0	
Rhodophyta	Bangiophyceae	Cyanidales	Cyanidiaceae	<i>Cyanidioschyzon merolae</i> strain 10D	CYAME	0	
Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Chlamydomonadaceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CHLRE	1	
			Volvocaceae	<i>Volvox carteri</i>	VOLCA	1	
			Coccomyxaceae	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169	COCSU	1	
	Mamiellophyceae	Mamiellales	Mamiellaceae	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	MICPU	1	
				<i>Micromonas</i> sp. RCC299	MICRC	1	
		Mamiellales	Bathycoccaceae	<i>Ostreococcus</i> sp. RCC809	OSTSP	1	
	Trebouxiophyceae	Chlorellales	Chlorellaceae	<i>Chlorella</i> SP.NC64A o <i>Chlorella variabilis</i>	CHLVA	1	
Streptophyta	Bryopsida	Funariales	Funariaceae	<i>Physcomitrella patens</i>	PHYPA	4	0

	Lycopsida	Selaginellales	Selaginellaceae	<i>Selaginella moellendorffii</i>	SELMO	2	0
	Magnoliopsida	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ARATH	1	1
				<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	ARALY	1	1
				<i>Capsella rubella</i>	CAPRU	1	1
				<i>Capsella grandiflora</i>	CAPGR	1	1
				<i>Boechera stricta</i>	BOEST	1	1
				<i>Eutrema salsugineum</i>	EUTSA	1	1
				<i>Brassica rapa</i>	BRARA	1	1
				<i>Tarenaya hassleriana</i>	TARHA	1	1
		Malpighiales	Salicaceae	<i>Populus trichocarpa</i>	POPTR	1	2
				<i>Populus euphratica</i>	POPEU	1	2
			Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	LINUS	2	1
			Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	RICCO	1	1
		Myrtales	Myrtaceae	<i>Eucalyptus grandis</i>	EUCGR	1	1
		Malvales	Malvaceae	<i>Theobroma cacao</i>	THECA	1	1
		Solanales	Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	SOLLY	1	1
				<i>Solanum tuberosum</i>	SOLTU	1	1
		Vitales	Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	VITVI	1	1
		Cucurbitales	Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	CUCSA	1	1
				<i>Cucumis melo</i>	CUCME	1	1
		Rosales	Rosaceae	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	FRAVE	1	1
	<i>Prunus persica</i>			PRUPE	1	1	
	<i>Prunus mume</i>			PRUMU	1	1	
	Fabales	Fabaceae	<i>Glycine max</i>	GLYMA	2	2	

				<i>Medicago truncatula</i>	MEDTR	1	1
				<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHAVU	1	1
	Liliopsida	Poales	Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	ORYSA	1	1
				<i>Setaria italica</i>	SETIT	1	1
				<i>Zea mays</i>	ZEAMA	2	2



### 1.3. Comparación y características de secuencia de la familia de proteínas Executer

La localización cloroplastídica de las proteínas Ex1 y Ex2 (Wagner *et al.* 2004, Lee *et al.* 2007) sugiere la presencia de un péptido de tránsito (TP) en el extremo N-terminal, gracias al cual la proteína se transporta al cloroplasto una vez sintetizada en el citosol (Figura 34). En general, las secuencias de los péptidos de tránsito son muy diversas en cuanto a longitud, composición, y organización. Se caracterizan por no estar conservadas (Bruce 2000, Zybailov *et al.* 2008), y por carecer de elementos definidos de estructura secundaria (Krimm *et al.* 1999, Wienk *et al.* 2000). La longitud del péptido de tránsito se analizó con los programas ChloroP y TargetP, que confirman que tanto Ex1 como Ex2 contienen un péptido de tránsito, y predicen una longitud del péptido de tránsito de 46 y 80 aminoácidos, respectivamente (Figura 35). La predicción a partir de los servidores se complementó con un análisis de conservación de secuencia a partir del alineamiento múltiple generado (Figura A1 del Anexo) junto con una predicción de estructura secundaria (Figura 35). En el extremo N-terminal de Executer, se predice una zona desordenada (posición 1 a 150, Figura 35) que corresponde al péptido de tránsito predicho. A continuación, en la región 220-305 se predicen cinco hélices  $\alpha$  seguidas de tres láminas  $\beta$ , una hélice  $\alpha$ , y dos láminas  $\beta$  en la posición 305-380 (Figura 35). De la posición 380 a la 440, y de 490 a 535 se predicen dos zonas desordenadas; y entre medias de esas dos zonas (440-490) se predice una lámina  $\beta$  entre dos hélices  $\alpha$  (Figura 35). De la posición 540 a la 650 se predice una lámina  $\beta$ , dos hélices  $\alpha$ , una zona desordenada y tres hélices  $\alpha$  (Figura 35). En el extremo C-terminal (posición 650-815) se predicen diez láminas  $\beta$  y una zona desordenada de la posición 690 a la 700 (Figura 35).

Las secuencias a partir de los residuos 110 y 84 de Ex1 y Ex2, respectivamente (posición 221 en el alineamiento de la Figura 36) están altamente conservadas en la familia de proteínas; además, a partir de estos residuos se predice con alta fiabilidad un conjunto de hélices  $\alpha$  (Figura 36 y A1 del Anexo). Con este análisis, además, se detectó que la secuencia de Ex1 contiene una región aminoacídica a partir del residuo 64 (posición 152 en el alineamiento de la Figura 36) altamente conservada en todos los miembros de la subfamilia Ex1, pero no presente en Ex2 (Figura A1 del Anexo), en la que se predice una hélice  $\alpha$  con alta fiabilidad (posición 157-175 en el alineamiento mostrado en la Figura 36). Esto sugiere que pueden existir diferencias entre las dos subfamilias, Ex1 y Ex2, en la región N-terminal de la proteína madura.

Analizando la conservación de secuencia de la familia y, junto con los resultados obtenidos a partir de las bases de datos Pfam e InterPro, se identificaron dos dominios en Executer. En la región N-terminal, se encontraron dos repeticiones del motivo denominado Uvr, mientras que en la región C-terminal se identificó un dominio de función desconocida (DUF3506; DUF, *domain of unknown function*) (Figura 34). En la zona central se aprecia una muy baja conservación de secuencia, con una alta proporción de residuos S, P, Q, K, y E, comunes en regiones desestructuradas (Yruela y Contreras-Moreira 2012). Esta predicción se confirmó empleando herramientas como DISOPRED3 (Jones y Cozzetto 2015). Por tanto, nuestros análisis indican que Executer son proteínas bimodulares conectadas por una zona con características de región intrínsecamente desordenada (IDR) (Figura 35). En un análisis del genoma completo de *Arabidopsis*, se identificaron otras proteínas que contienen los motivos Uvr, cuya localización se predice mayoritariamente en el plastidio (datos no mostrados). Sin embargo, no se detectó ninguna otra proteína con el dominio DUF3506. Al incluir la información de las secuencias de todos los genomas, se detectaron los motivos Uvr en proteínas de todos los dominios de vida (arqueas, bacterias y eucariotas) siendo las secuencias Uvr de Executer más similares a las Uvr de bacterias (Figura 44A). En cambio, el dominio DUF3506

## Resultados

únicamente se encuentra en hongos (Figura 36). Sin embargo, en el análisis realizado con los genomas secuenciados hasta la fecha, no se detectó ninguna otra proteína, aparte de Executer, que contenga los dominios (Uvr y DUF3506) juntos en su cadena aminoacídica.

Los servidores de predicción de estructura secundaria muestran que los dos motivos Uvr son predominantemente hélices  $\alpha$ , mientras que el dominio DUF3506 está formado principalmente por láminas  $\beta$  (Figura 35).

Estas proteínas tienen una alta acumulación de aminoácidos aromáticos conservados, tanto en el dominio N-terminal como en el C-terminal (marcados en la Figura 36 y 37). En el dominio N-terminal se observa una secuencia WxWxxW antes de la región Uvr en las proteínas Executer, que sugiere una posible importancia funcional de los triptófanos en este dominio. El dominio C-terminal tiene una longitud de entre 131 a 148 aminoácidos, y se caracteriza por la presencia de un motivo muy conservado KLTGD (Figura A1 del Anexo). Las mutaciones que provocan la pérdida de función de Ex1 en el mutante *flu* corresponden a los aminoácidos glutámico-244 (E244), fenilalanina-528 (F528), y glicina-646 (G646) (Wagner *et al.* 2004). Si mapeamos estos residuos en la secuencia de Ex1, observamos que el residuo E244 está totalmente conservado tanto en Ex1 como en Ex2, y es el único aminoácido con carga que forma parte de una lámina  $\beta$  altamente hidrofóbica (P/A-L-F-E-I/F/V-F/Y) (Figura 35). Los otros dos residuos forman parte del dominio DUF3506. El residuo F528, altamente conservado en los miembros de las subfamilias Ex1 y Ex2, forma parte de la secuencia T-X-F-X-R-I y de una lámina  $\beta$  (Figura 35). El residuo G646, totalmente conservado en todos los organismos, forma parte de la secuencia W-V/I-X-G-X-L-L/L en los miembros de las subfamilias Ex1 y Ex2 (Figura 35 y A1 del Anexo).

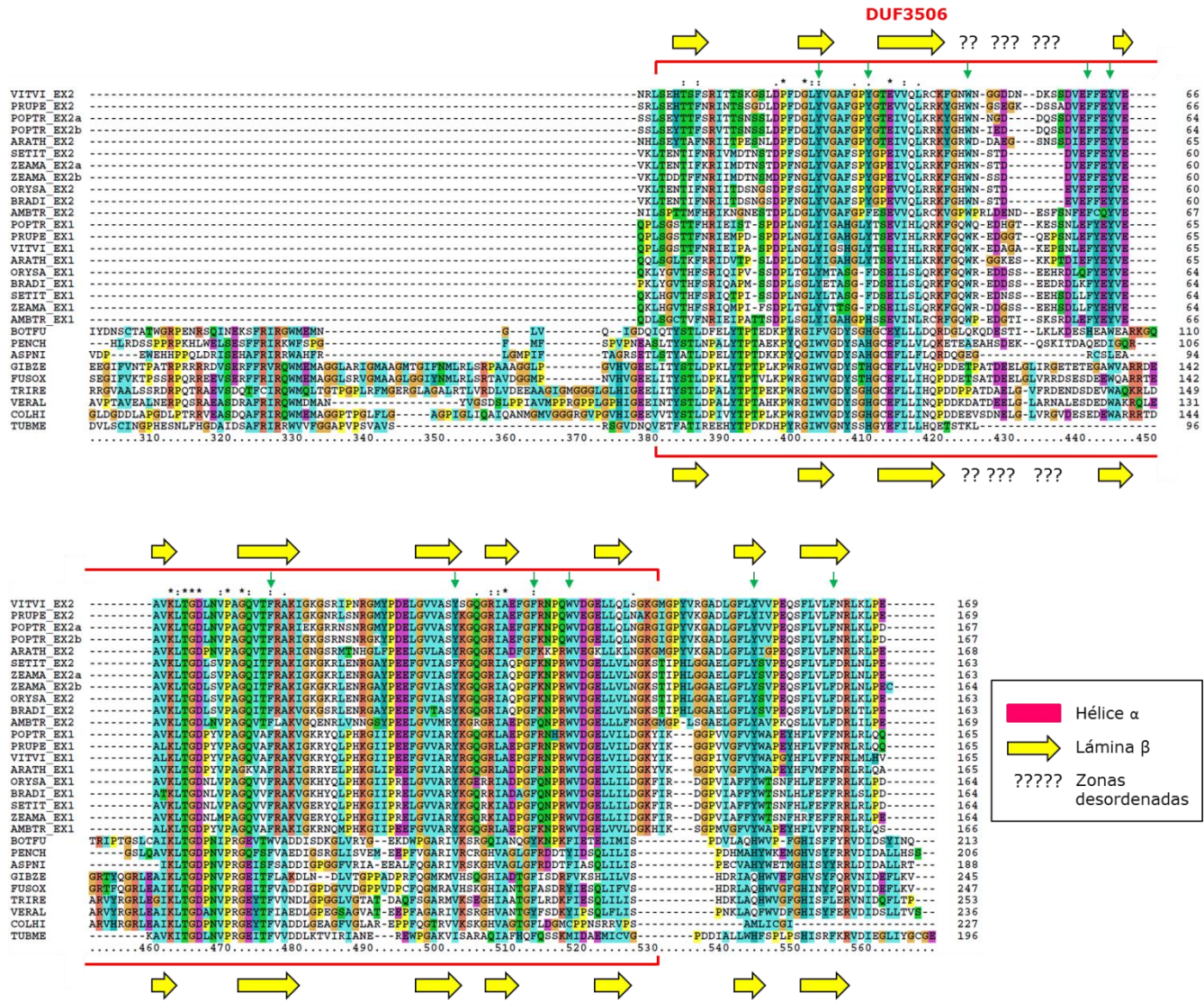


**Figura 34.** Esquema de las proteínas Executer con péptido de tránsito (TP, *transit peptide*), y dos dominios conservados: dos motivos Uvr y un dominio de función desconocida DUF3506 (*domain of unknown function*).









**Figura 37.** Alineamiento del dominio C-terminal de las proteínas Ex1 y Ex2 de los organismos *Vitis vinifera* (VITVI), *Prunus persica* (PRUPE), *Populus trichocarpa* (POPTR), *Arabidopsis thaliana* (ARATH), *Setaria italica* (SETIT); *Zea mays* (ZEAMA), *Oryza sativa* (ORYSA), *Brachypodium distachyon* (BRADI), *Amborella trichopoda* (AMBTR), *Penicillium chrysogenum* (PENCH), *Verticillium alfalfae* (VERAL), *Fusarium oxysporum* (FUSOX), *Trichoderma reesei* (TRIRE), *Aspergillus niger* (ASPNI), *Colletotrichum higginsianum* (COLHI), *Tuber melanosporum* (TUBME), *Botryotinia fuckeliana* (BOTFU), y *Gibberella zeae* (GIBZE). El software ClustalX2.1 colorea los aminoácidos según sus propiedades (Thompson *et al.* 1997), señalando con un asterisco (\*) las posiciones totalmente conservadas, con dos puntos (:) las altamente conservadas, y con un punto (·) las menos conservadas. La predicción de estructura secundaria se muestra en la leyenda. Los aminoácidos aromáticos conservados en Ex1 y Ex2 se muestran con flechas verdes.

### 1.3.1. Diseño y obtención de las proteínas recombinantes maduras Ex1 y Ex2 y de sus módulos N- y C-terminal

El diseño de los límites de secuencia de las proteínas maduras de *Arabidopsis thaliana* Ex1 y Ex2 se basó en las estimaciones de la longitud del péptido de tránsito del apartado anterior. La primera versión de la proteína madura Ex1 (atmEx1) se construyó a partir del residuo 111, y la segunda versión denominada atm2Ex1, a partir del residuo 65 (Figura 38). La única versión de la proteína madura Ex2 (atmEx2) se diseñó a partir del residuo 85 (Figura 38).

En primer lugar, los vectores que contienen los genes que codifican para las preproteínas Ex1 y Ex2 de *A. thaliana* en pET21d (atpEx1\_pET21d y atpEx2\_pET21d, respectivamente) se utilizaron para preparar los vectores que contienen las proteínas maduras atmEx1\_pET21d, atmEx1\_pGEX6P2, atm2Ex1\_pET21d, y atmEx2\_pET21d (Tabla 15 y 16). Las proteínas recombinantes se produjeron en el citosol de *E. coli* fusionadas a una etiqueta de 6 histidinas (His<sub>6</sub>) en el extremo C-terminal de la proteína—si estaban clonadas en pET21d—y a la etiqueta GST en el extremo N-terminal de la proteína—si estaban clonadas en pGEX6P2 o en pGEX4T3NNB—. Asimismo, se utilizaron diferentes cepas de *E. coli* como BL21, Rosetta, C43, y Origami; diferentes medios de cultivo como LB y TB; diferentes temperaturas (37, y 15°C); e incluso un sistema con chaperonas en células de la cepa BL21. Sin embargo, todos los ensayos realizados resultaron en la producción de proteínas insolubles (Tabla 15 y 16). Además, los cuerpos de inclusión se solubilizaron con urea y se llevó a cabo la renaturalización de las proteínas atmEx1-His<sub>6</sub> y atmEx2-His<sub>6</sub> mediante dilución (*refolding*). Sin embargo, en todos los ensayos realizados se formaron agregados insolubles de las proteínas. Las conformaciones dinámicas y flexibles de las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs, *intrinsically disordered proteins*) y las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs, *intrinsically disordered regions*) tienden a agregarse, aunque no es el único factor que contribuye a la formación de agregados de las proteínas recombinantes (Lebediker y Danieli 2014). Por esa razón, se decidió sustituir la región central (266-407 aa) por la secuencia aminoacídica GSGSG (atm3Ex1, Figura 38), que es un *linker* con una gran flexibilidad intrínseca. La predicción de una hélice  $\alpha$  y de una lámina  $\beta$  en el fragmento del residuo 317 al 347 condujo al diseño del constructo atm4Ex1 en el que se sustituyeron los fragmentos 266-317 aa y 347-407 aa por la secuencia GSGSG (Figura 38). La proteína GST-atm3Ex1 se produjo en las cepas Rosetta y Arctic Express, y la proteína GST-atm4Ex1 en Arctic Express, pero ambas fueron insolubles en todos los ensayos (Tabla 15).

Otra estrategia utilizada para expresar una proteína grande con múltiples dominios de forma soluble es el diseño de una serie de formas truncadas para producir los dominios por separado (Lebediker y Danieli 2014). Por ello, los resultados anteriores condujeron hacia el diseño de nuevos constructos del dominio N- y C-terminal de las proteínas Ex1 y Ex2 (Figura 39 y 40, respectivamente). El primer constructo del dominio N-terminal at $\Delta$ C1Ex1 se diseñó desde el residuo 111 al 264 debido a la alta conservación de secuencia (Figura A1 del Anexo), a la presencia de elementos de estructura secundaria, y a que termina en una lámina  $\beta$  predicha (Figura 39). La proteína at $\Delta$ C1Ex1-His<sub>6</sub> no se obtuvo en la fracción soluble (Tabla 15). Por esta razón, en el segundo constructo se eliminó la zona de láminas  $\beta$  del extremo C-terminal de at $\Delta$ C1Ex1, terminando en una hélice  $\alpha$  (at $\Delta$ C2Ex1, 111-189, Figura 39). Este constructo tampoco fue soluble (Tabla 15), por lo que el tercero se delimitó tomando como referencia el primer residuo la proteína madura atm2Ex1 y el último residuo de la proteína at $\Delta$ C2Ex1 (at $\Delta$ C3Ex1, 65-189 aa, Figura 39 y A1 del Anexo). Finalmente las proteínas at $\Delta$ C3Ex1-His<sub>6</sub> y GST-at $\Delta$ C3Ex1 sí se obtuvieron de forma soluble (Tabla 15). Para tratar de caracterizar una

mayor parte del dominio N-terminal de Ex1, se diseñaron dos nuevos constructos at $\Delta$ C4Ex1 y at $\Delta$ C5Ex1 que comienzan en el mismo residuo que at $\Delta$ C3Ex1. El constructo at $\Delta$ C4Ex1 termina en el residuo 234, cuyo anterior residuo está altamente conservado en todos los miembros de las subfamilias Ex1 y Ex2 (Figura A1 del Anexo), y acaba en una hélice  $\alpha$  (Figura 39). En cambio, el constructo at $\Delta$ C5Ex1 llega hasta el residuo 246 que está muy conservado en los miembros de las subfamilias Ex1 y Ex2 (Figura A1 del Anexo), y finaliza en una lámina  $\beta$  (Figura 39). Sin embargo, ninguna de las dos últimas proteínas se produjeron en la fracción soluble de *E. coli* (Tabla 15). Por último, se diseñó un constructo que comienza en el residuo 121 y termina en el residuo 163 que comprende el primer motivo Uvr, y contiene dos hélices  $\alpha$  (Figura 39).

Para el dominio N-terminal de Ex2 se diseñó un primer constructo at $\Delta$ C1Ex2 utilizando como referencia el primer residuo de la proteína madura atmEx2. El último residuo es el 163 que está muy conservado en los miembros de la subfamilia Ex2 (Figura A1 del Anexo) y termina en la última hélice  $\alpha$  del segundo motivo Uvr (Figura 39). La proteína GST-at $\Delta$ C1Ex2 sí fue soluble (Tabla 16), por lo que—al igual que en el diseño de constructos del dominio N-terminal Ex1—se trató de ampliar el nuevo constructo hacia el extremo C-terminal. En este caso, la proteína at $\Delta$ C2Ex2 comienza en el mismo residuo que el constructo at $\Delta$ C1Ex2, y termina en el residuo 222 que equivale al último residuo del constructo at $\Delta$ C5Ex1 (Figura A1 del Anexo, y 39). En cambio, en este caso la proteína GST-at $\Delta$ C2Ex2 no se obtuvo en la fracción soluble (Tabla 16). Por último, se diseñó un constructo que es equivalente al constructo atUvr1Ex2 (Figura 78).

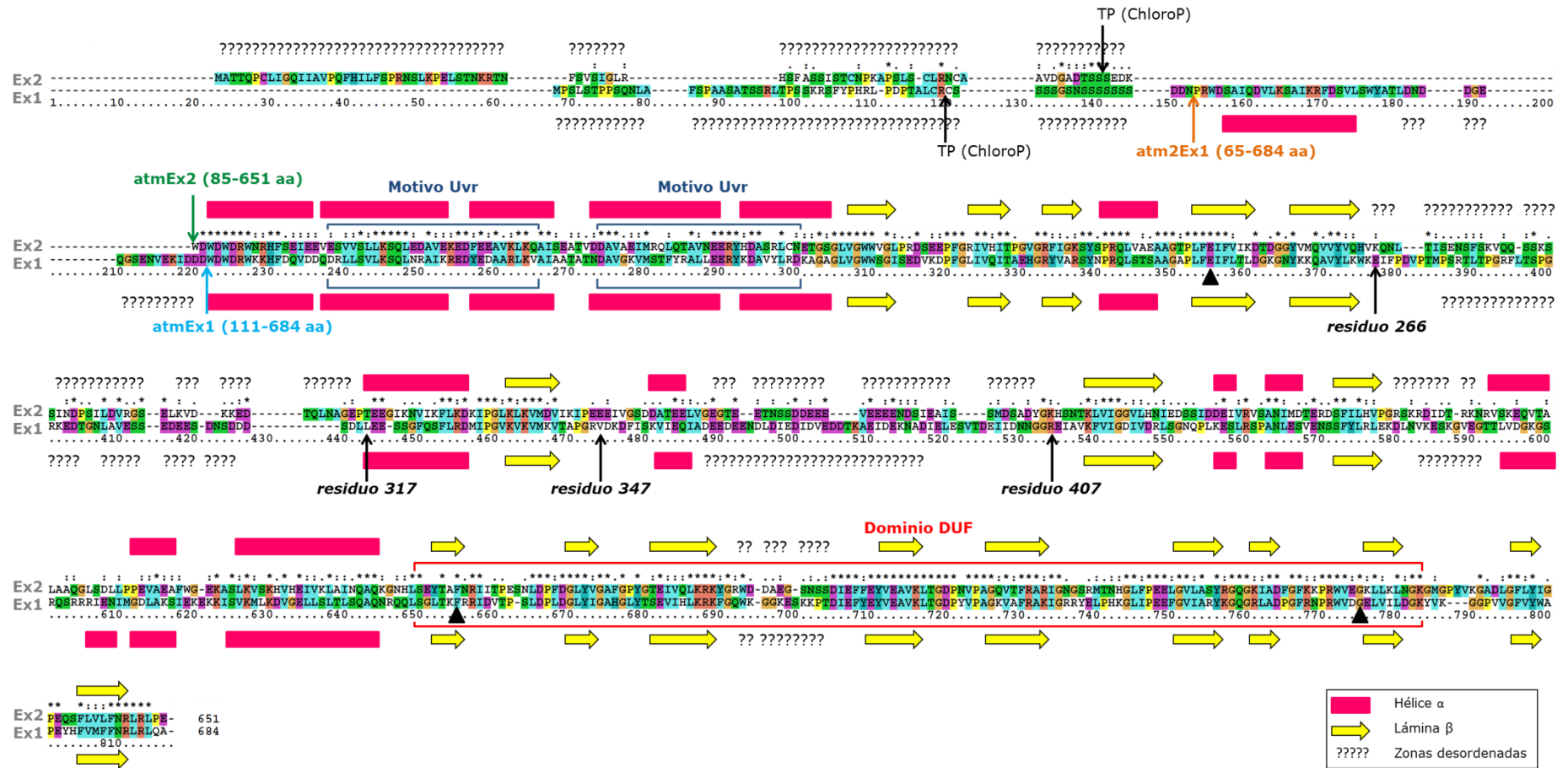
Únicamente las proteínas at $\Delta$ C3Ex1-His<sub>6</sub>, GST-at $\Delta$ C3Ex1, GST-atUvr1Ex1, GST-at $\Delta$ C1Ex2, y GST-atUvr1Ex2 se produjeron en la fracción soluble (Tabla 15 y 16). at $\Delta$ C3Ex1 y at $\Delta$ C1Ex2 comprenden una región muy conservada, y contienen 6 y 5 hélices  $\alpha$  respectivamente. La proteína at $\Delta$ C3Ex1, a diferencia de at $\Delta$ C1Ex2, contiene una hélice  $\alpha$  en el extremo N-terminal (Figura 39). La insolubilidad de at $\Delta$ C2Ex1 y la solubilidad de at $\Delta$ C3Ex1 sugieren que la hélice  $\alpha$  N-terminal (65-92 aa) es un elemento estructural necesario para la estabilidad del dominio N-terminal de Ex1 (Figura 39 y 45B-C). atUvr1Ex1 y atUvr1Ex2, a diferencia del resto, contienen las dos hélices  $\alpha$  del primer motivo Uvr (Figura 39).

El primer constructo del dominio C-terminal de Ex1 (at $\Delta$ N1Ex1) se diseñó desde el residuo 485, cuyo siguiente residuo está muy conservado en los miembros de las subfamilias Ex1 y Ex2 (Figura A1 del Anexo) y comienza en una hélice  $\alpha$  (Figura 40), hasta el último residuo de Ex1. Debido a la insolubilidad de la proteína at $\Delta$ N1Ex1-His<sub>6</sub> (Tabla 15), se diseñaron nuevos constructos más pequeños. En el segundo constructo (at $\Delta$ N2Ex1) se eliminó la zona que contiene varios aminoácidos hidrofóbicos (A, I, L, M, y V) respecto al anterior constructo comenzando en el residuo 523 (Figura A1 del Anexo), comienza en el dominio DUF3506, y en una lámina  $\beta$  (Figura 40), pero tampoco fue soluble (Tabla 15). Al tercer constructo se le eliminó el fragmento del residuo 523 al 537 respecto al segundo constructo. Esta zona (523-537 aa), aunque está conservada en los miembros de las subfamilias Ex1 y Ex2, está menos conservada en algas verdes que el fragmento del residuo 538 al 684 (at $\Delta$ N3Ex1) (Figura A1 del Anexo). Además, coincide con el comienzo de una lámina  $\beta$  predicha (Figura 40). No obstante, tampoco fue soluble (Tabla 15). El cuarto constructo (at $\Delta$ N4Ex1) se diseñó eliminando el fragmento del residuo 538 al 580 de at $\Delta$ N3Ex1, en el que en algas verdes la proteína tiene una delección en esa zona, y la secuencia está poco conservada en plantas (Figura A1 del Anexo). Asimismo, se eliminó una zona desordenada (del residuo 570 al 580 aprox.). Sin embargo, los ensayos realizados resultaron en la producción de proteína insoluble (Tabla 15). El diseño del quinto constructo, que incluye el constructo at $\Delta$ N1Ex1 junto con el fragmento

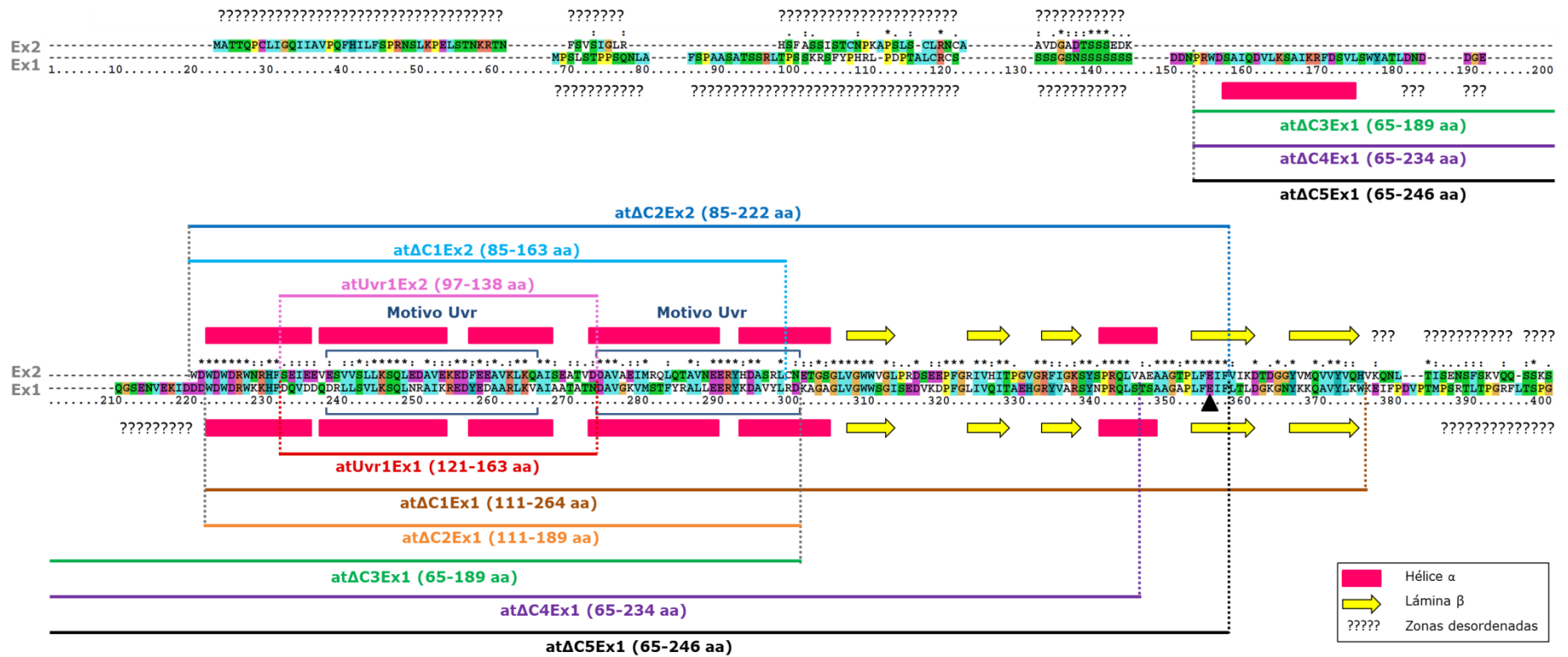
## Resultados

del residuo 410 al 484, se basó en la predicción de estructura secundaria. Este constructo (at $\Delta$ N5Ex1) comienza en una lámina  $\beta$  después de la zona central desordenada (Figura 40), aunque tampoco resultó en la producción de proteína soluble. Por último, se diseñó el constructo at $\Delta$ N6Ex1 (523-654 aa) que comprende justo el dominio DUF3506 (Pfam12014) (Figura 40), pero también resultó insoluble (Tabla 15). Por ello, se llevó a cabo la solubilización con urea de los cuerpos de inclusión y la renaturalización de las proteínas at $\Delta$ N1Ex1-His<sub>6</sub>, y at $\Delta$ N2Ex1-His<sub>6</sub> mediante dilución (*refolding*). Sin embargo, en todos los ensayos realizados se formaron agregados insolubles de las proteínas.





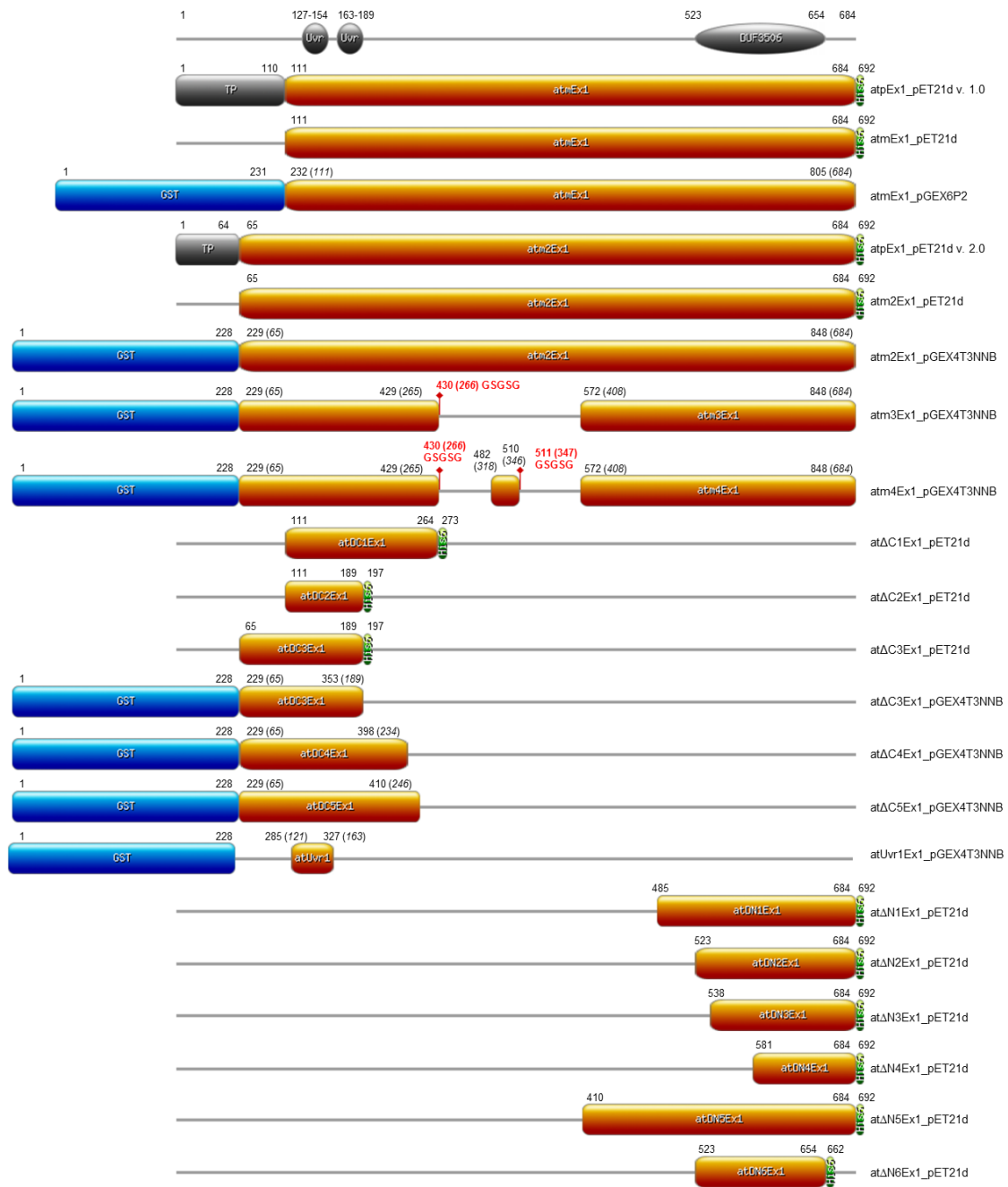
**Figura 38.** Alineamiento de las proteínas Ex1 y Ex2 de *Arabidopsis thaliana*. En la imagen se muestra la longitud de los péptidos de tránsito de Ex1 y de Ex2 predichos por la herramienta ChloroP; donde comienzan las versiones de las proteínas maduras atmEx1, atm2Ex1, y atmEx2; y donde se sitúan los residuos 266 y 407 de atm3Ex1 y atm4Ex1, y 317 y 347 de atm4Ex1.



**Figura 39.** Alineamiento del dominio N-terminal de las proteínas Ex1 y Ex2 de *Arabidopsis thaliana*. En la imagen se muestra la longitud de los péptidos de tránsito de Ex1 y de Ex2 predichos por la herramienta ChloroP, y las formas truncadas del dominio N-terminal incluidas en este trabajo.



## Resultados



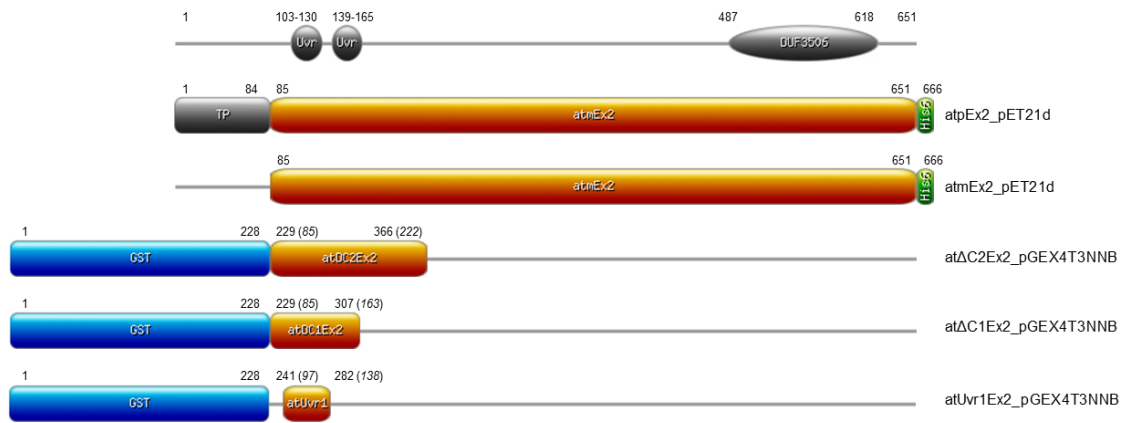
**Figura 41.** Esquema de las proteínas recombinantes de Ex1 utilizadas en este trabajo (Tabla 15). Abreviaturas: TP, péptido de tránsito (*transit peptide*), v., (versión).

**Tabla 15.** Resumen de las proteínas recombinantes de Ex1 de *A. thaliana* producidas en *E. coli* (Figura 39, 40 y 41). Abreviaturas: C-His<sub>6</sub>, cola de seis histidinas en el extremo C-terminal de la proteína; N-GST, proteína GST en el extremo N-terminal de la proteína.

Vector	Etiqueta	Aminoácidos	Expresión	Soluble
atpEx1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	1-684	-	-
atmEx1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	111-684	Sí (células: BL21, Rosetta, C43, Origami; T: 37 °C y 15°C; medio: LB y TB)	No
atmEx1_pGEX6P2	N-GST	111-684	Sí (células: BL21, Rosetta, C43; T: 15°C; medio LB)	No
atm2Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	65-684	Sí (células: Rosetta; T: 15 °C; medio LB; y expresión con chaperonas en células BL21 (Apartado 22.4))	No
atm3Ex1_pGEX4T3NNB	N-GST	65-684-D (266-407) /GSGSG	Sí (células: Rosetta; T: 15 °C; medio LB, y en células Arctic Express a 13 °C)	No
atm4Ex1_pGEX4T3NNB	N-GST	65-684-D (266-317) /GSGSG-D (347-407) /GSGSG	Sí (células Arctic Express a 13 °C)	No
atΔC1Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	111-264	Sí (células: BL21, C43, Rosetta; T: 15°C; medio LB)	No
atΔC2Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	111-189	Sí (células: Rosetta, T: 22°C; medio LB; y en células Arctic Express a 13 °C)	No
atΔC3Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	65-189	Sí (células: BL21 y Rosetta; T: 15 °C; medio: LB)	Sí
atΔC3Ex1_pGEX4T3NNB	N-GST	65-189	Sí (células Rosetta, T: 15 y 22 °C; medio: LB)	Sí
atΔC4Ex1_pGEX4T3NNB	N-GST	65-234	Sí (células Rosetta, T: 15 y 22 °C; medio: LB)	No
atΔC5Ex1_pGEX4T3NNB	N-GST	65-246	Sí (células Rosetta, T: 15 y 22 °C; medio: LB)	No
atUvr1Ex1_pGEX4T3NNB	N-GST	121-163	Sí (células Rosetta, T: 22 °C; medio: LB)	Sí
atΔN1Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	485-684	Sí (células: BL21, Rosetta, C43, Origami; T: 15°C; medio: LB)	No
atΔN2Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	523-684	Sí (células: BL21, C43, Rosetta; T: 15°C; medio LB)	No
atΔN3Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	538-684	Sí (células: BL21, C43, Rosetta; T: 15°C; medio LB)	No
atΔN4Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	581-684	Sí (células: BL21, C43, Rosetta; T: 15°C; medio LB)	No
atΔN5Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	410-684	Sí (células: BL21, C43, Rosetta; T: 15°C; medio LB)	No

## Resultados

atΔN6Ex1_pET21d	C-His <sub>6</sub>	523-654	Sí (células Rosetta, T: 15 y 22°C; medio: LB)	No
-----------------	--------------------	---------	--	----



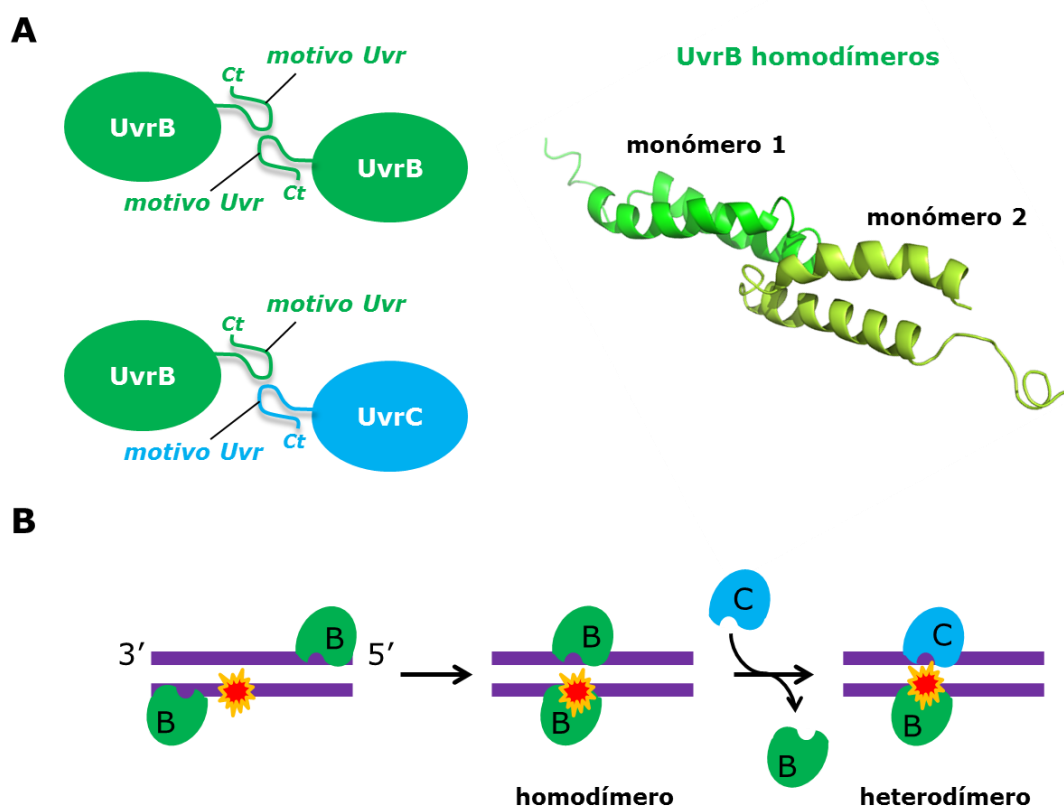
**Figura 42.** Esquema de las proteínas recombinantes de Ex2 utilizadas en este trabajo (Tabla 16). Abreviaturas: TP, péptido de tránsito (*transit peptide*).

**Tabla 16.** Resumen de las proteínas recombinantes de Ex2 de *A. thaliana* producidas en *E. coli* (Figura 39, 40 y 42). Abreviaturas: C-His<sub>6</sub>, cola de seis histidinas en el extremo C-terminal de la proteína; N-GST, proteína GST en el extremo N-terminal de la proteína.

Vector	Etiqueta	Aminoácidos	Expresión	Soluble
atpEx2_pET21d	C-His <sub>6</sub>	1-651	-	-
atmEx2_pET21d	C-His <sub>6</sub>	85-651	Sí (células: BL21, C43, Rosetta y Origami; T: 15°C; medio LB)	No
atΔC1Ex2_pGEX4T3NNB	N-GST	85-163	Sí (células Rosetta; T: 22°C; medio LB)	Sí
atΔC2Ex2_pGEX4T3NNB	N-GST	85-222	Sí (células Rosetta; T: 22 °C; medio LB)	No
atUvr1Ex2_pGEX4T3NNB	N-GST	97-138	Sí (células Rosetta; T: 15 °C; medio LB)	Sí

### 1.3.2. Análisis del estado oligomérico del dominio N-terminal de Ex1 y de Ex2

El motivo Uvr se identificó en el dominio C-terminal de las proteínas UvrB y UvrC de bacterias (Moolenaar *et al.* 1995) (Figura 43A). El motivo Uvr está formado por dos hélices  $\alpha$  antiparalelas separadas por un *loop* a través del cual dos subunidades interaccionan (Alexandrovich *et al.* 2001). Durante el proceso de chequeo y reparación del ADN, las proteínas UvrB interaccionan a través del motivo Uvr formando homodímeros (Hildebrand y Grossman 1999) (Figura 43A). Por un mecanismo análogo, se ha propuesto que, durante el proceso de reparación, el motivo Uvr de UvrB interacciona con el motivo Uvr homólogo de UvrC formando un heterodímero (Verhoeven *et al.* 2002) (Figura 43B). Sin embargo, se ha observado que el motivo Uvr también puede interaccionar con otras proteínas que no contienen el motivo Uvr. Este es el caso de la chaperona ClpC y la proteína adaptadora MecA que interaccionan en bacterias (Frees *et al.* 2004, Frees *et al.* 2007). MecA es un dímero en solución y consiste en dos dominios conectados por un *loop* flexible (Persuh *et al.* 1999). Aunque no contiene ningún motivo Uvr, interacciona con ClpC a través del dominio C-terminal de MecA, induciendo un cambio conformacional que permite al dominio N-terminal unirse al factor transcripcional ComK (Persuh *et al.* 1999). Esto sugiere que el motivo Uvr está involucrado en general en interacciones proteína-proteína.

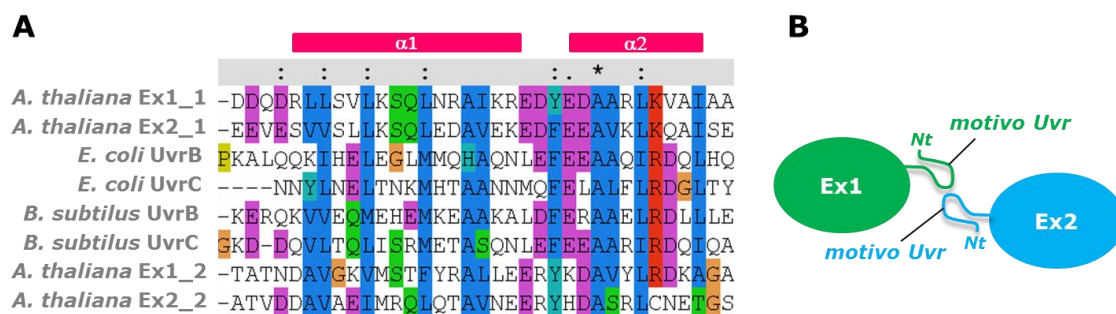


**Figura 43.** Estructura del motivo Uvr de la proteína UvrB, y su interacción con el motivo Uvr de la proteína UvrC. **A)** Las proteínas UvrB y UvrC contienen un motivo Uvr en su extremo C-terminal. La formación de homodímeros en UvrB sucede a través del dominio C-terminal (código PDB 1e52). Cada monómero del motivo Uvr de la proteína UvrB está formado por dos hélices antiparalelas separadas por un *loop*, a través del cual interaccionan formando un homodímero. **B)** Modelo de interacción propuesto entre las subunidades UvrB y UvrC del complejo UvrABC en bacterias, durante el proceso de chequeo y reparación del ADN por excisión de nucleótidos, adaptado de (Pakotiprapha *et al.* 2012).



## Resultados

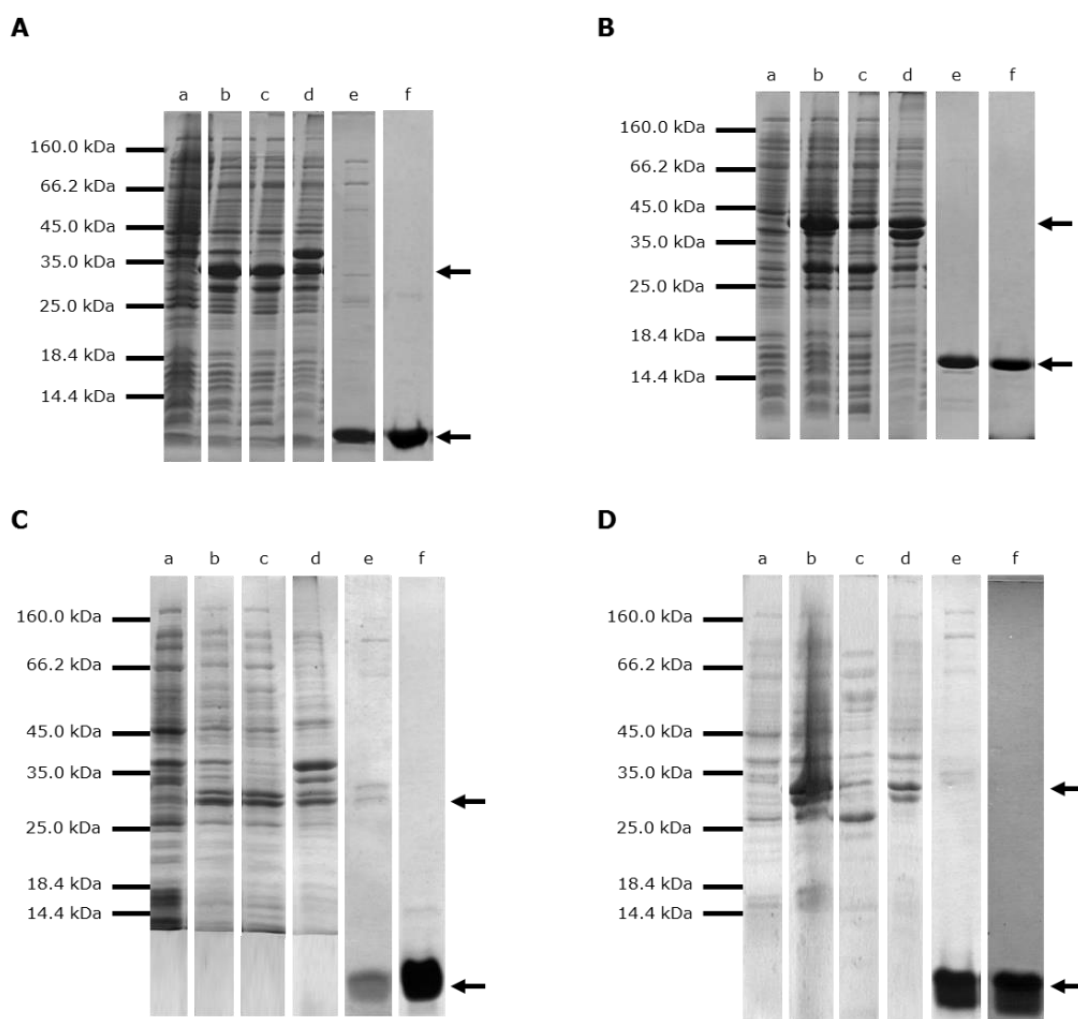
En la figura 44A se muestra un alineamiento de los motivos Uvr de Ex1 y de Ex2 de *Arabidopsis thaliana* junto con los motivos Uvr de las proteínas UvrB y UvrC de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. En *E. coli*, este motivo forma un dominio plegado y soluble en disolución a partir del cual se han realizado estudios estructurales y funcionales (Sohi *et al.* 2000). Debido a la interacción propuesta de las proteínas Ex1 y Ex2 de *Arabidopsis* (Lee *et al.* 2007), la asociación homo-/heterodimérica de proteínas homólogas mediada por el motivo Uvr puede ser un modelo adecuado para probar la relación funcional entre miembros de la familia Executer (Figura 44B). Para comprobar esta hipótesis, se purificaron y se caracterizaron los dominios N-terminal de las proteínas Ex1 y Ex2 (atΔC3Ex1, atUvr1Ex1, atΔC1Ex2, y atUvr1Ex2; Figura 39).



**Figura 44.** Comparación de los motivos Uvr de bacterias con los de Ex1 y Ex2. **A)** Alineamiento múltiple de secuencia de los dos motivos Uvr de Ex1 y Ex2 de *Arabidopsis thaliana*, y del motivo Uvr de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Los rectángulos de color magenta muestran las dos hélices  $\alpha$  predichas por los softwares de predicción de estructura secundaria. El software Clustal X colorea los aminoácidos según sus propiedades (Thompson *et al.* 1997), señalando con un asterisco (\*) las posiciones totalmente conservadas, con dos puntos (:) las altamente conservadas, y con un punto (·) las menos conservadas. **B)** Modelos propuestos para la formación de homodímeros para Ex1 de *Arabidopsis thaliana* a través del motivo Uvr, y para la formación de heterodímeros entre Ex1 y Ex2 de *Arabidopsis thaliana* a través del motivo Uvr.

Las proteínas atΔC3Ex1, atUvr1Ex1, atΔC1Ex2, y atUvr1Ex2 se purificaron a partir del extracto soluble de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad, y se digirieron con la proteasa trombina para eliminar la etiqueta GST (Apartado 22.3 de Materiales y Métodos). Por último, se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular con la columna HiPrep<sup>TM</sup> 16/60 Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare) (Apartado 26 de Materiales y Métodos) (Figura 45 A y C). Asimismo, se realizaron ensayos de cristalización de las proteínas atΔC3Ex1 y de atΔC1Ex2 (Apartado 27 de Materiales y Métodos), pero hasta la fecha no se han obtenido cristales.





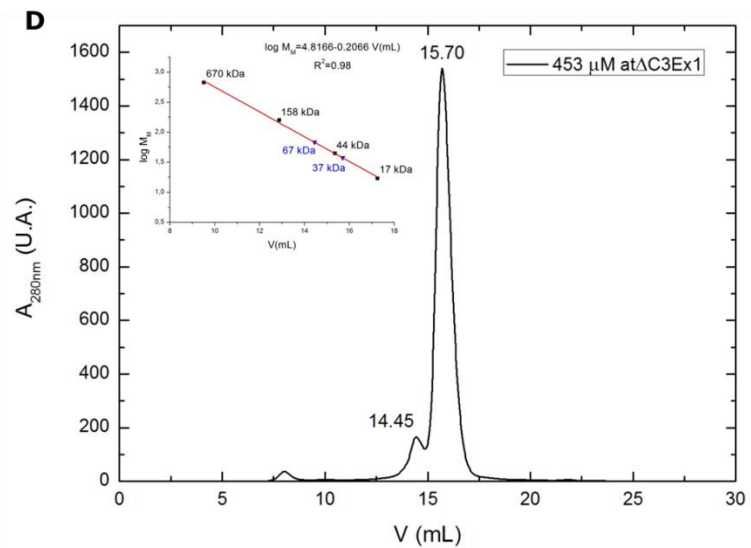
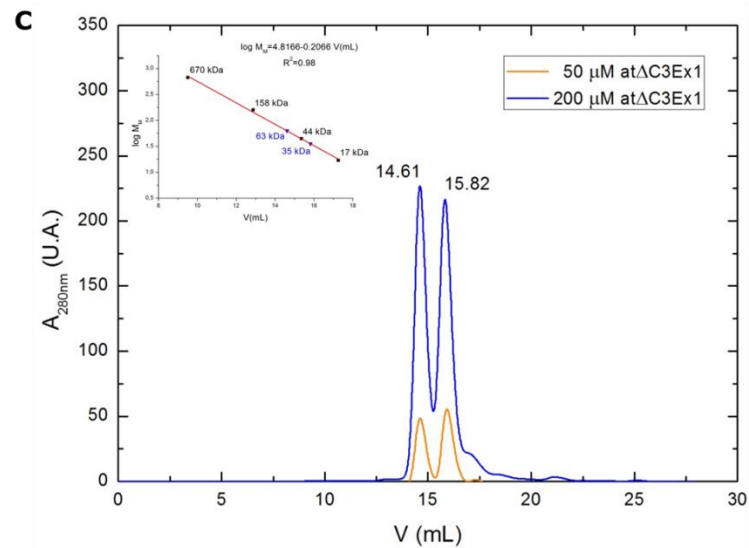
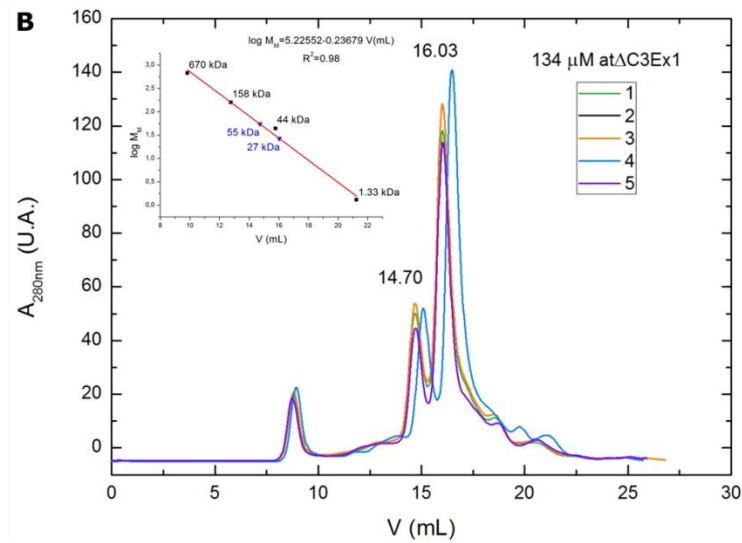
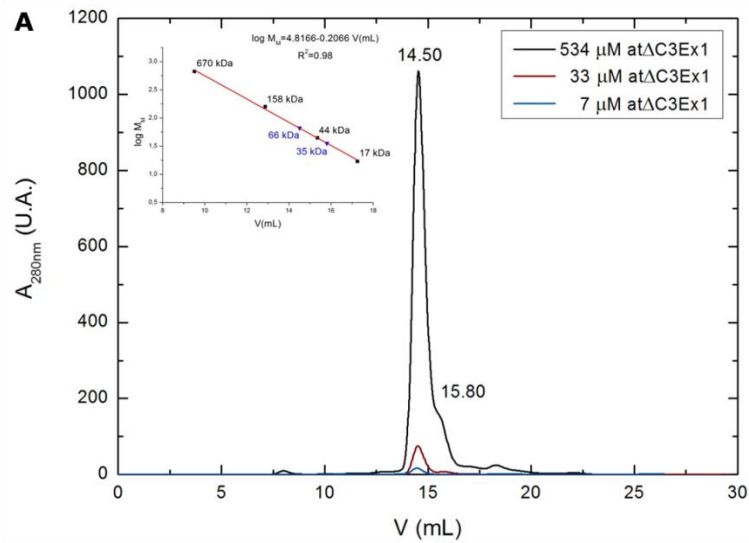
**Figura 45.** 15 % SDS-PAGE que muestra el extracto total de proteínas de *E. coli* (a) antes y (b) después de la inducción con IPTG, las proteínas de la fracción (c) soluble e (d) insoluble después de la lisis y de la centrifugación de las células, (e) la proteína purificada mediante cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa y digerida con trombina, y (f) la proteína purificada mediante cromatografía de exclusión molecular. (A) atΔC1Ex2 (85-163 aa; 10 kDa; 36 kDa con GST); (B) atΔC3Ex1 (65-189 aa; 15 kDa; 42 kDa con GST); (C) atUvr1Ex1 (121-163 aa; 5 kDa; 31 kDa con GST); y (D) atUvr1Ex2 (97-138 aa; 5 kDa; 32 kDa).

El estado de oligomerización de las proteínas atΔC3Ex1 y atΔC1Ex2 se analizó por cromatografía de exclusión molecular (o filtración en gel) en combinación con experimentos de entrecruzamiento químico, en los cuales se estabilizaron por enlace covalente aquellas especies que interaccionan, tras lo cual se analizan convenientemente por SDS-PAGE. Mientras que nuestros experimentos muestran que atΔC1Ex2 forma predominantemente monómeros en disolución, con cierta tendencia a formar dímeros a altas concentraciones de proteínas (Figura 47 y 48B), los resultados obtenidos al analizar atΔC3Ex1 no fueron concluyentes. Durante la realización de los experimentos con atΔC3Ex1 observamos que el dominio N-terminal de Ex1 tiene tendencia a asociarse en forma de dímeros y tetrámeros, y que su proporción variaba al comparar diferentes preparaciones de proteínas. Aunque se siguió en todo momento el mismo protocolo de purificación, los resultados tras la cromatografía de exclusión no fueron reproducibles. En algunos casos, el cromatograma mostraba una especie mayoritaria que correspondía a una proteína de 64 kDa, y por tanto, a un tetrámero de atΔC3Ex1 (Figura 46A, tamaño del monómero de 15 kDa); en el cromatograma, además, aparecía un segundo pico que

## Resultados

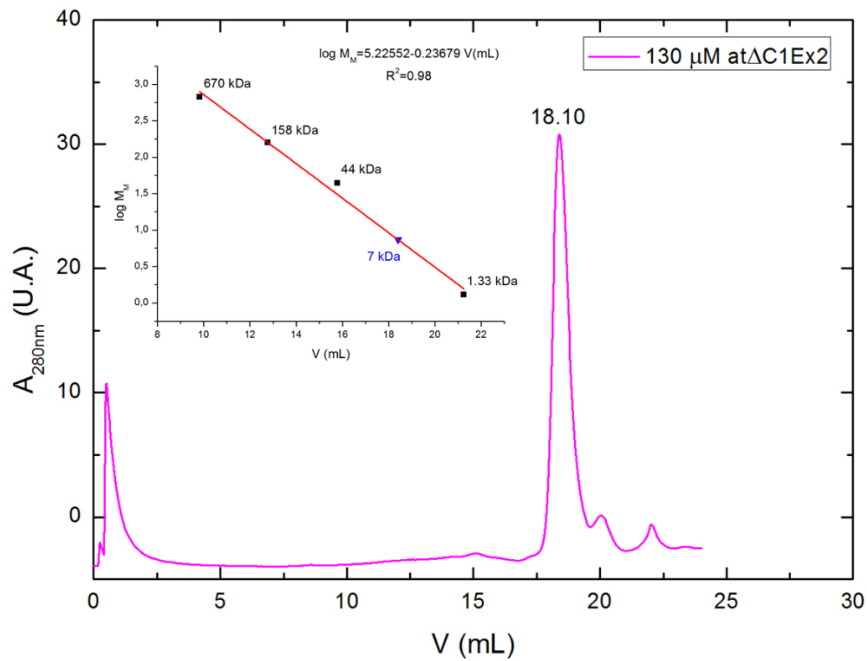
corresponde a una proteína de 35 kDa, y por tanto, a la especie dimérica de at $\Delta$ C3Ex1. Se comprobó, además, que la relación entre picos no cambiaba con la concentración (Figura 46A). La asociación en forma de dímeros y tetrámeros se confirmó por experimentos de entrecruzamiento químico (Figura 48A). Durante otras purificaciones, en cambio, at $\Delta$ C3Ex1 aparecía predominantemente en forma de dímeros durante la filtración en gel con una tendencia minoritaria a asociarse en tetrámeros (Figura 46B). La proporción entre especies variaba con el *stock* de proteína utilizada (Figura 46 A, B, C, y D). En un intento de describir el mecanismo de asociación, se analizó el efecto del pH (7.6-8.5), fuerza iónica (150-500 mM NaCl) y tipo de tampón (Tris-HCl o fosfato). Ninguna de las condiciones analizadas perturbaron la proporción obtenida de especies. Es posible que otros factores (e.g. cinéticos, iones divalentes, agentes cosmotrópicos o caotrópicos, etc.), hasta la fecha desconocidos y no controlados en nuestros experimentos, estén afectando a la formación de especies oligoméricas en at $\Delta$ C3Ex1.

Para analizar si los motivos Uvr están implicados en la dimerización, se produjo y se purificó el primero de los motivos Uvr predichos (Figura 49) tanto para Ex1 (atUvr1Ex1) como para Ex2 (atUvr1Ex2). La interacción se analizó por entrecruzamiento químico. Los resultados demuestran que en ambos casos, las proteínas tienen tendencia a asociarse en forma de homodímeros.

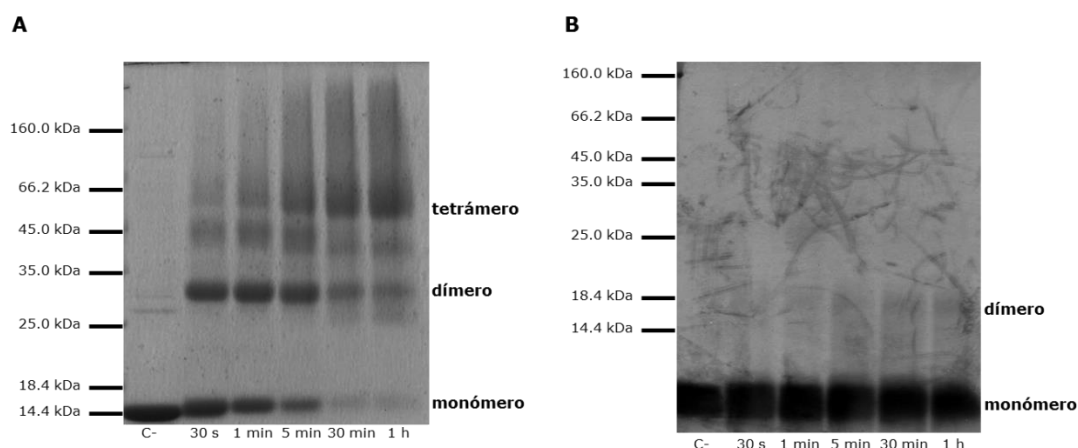


**Figura 46.** Cromatogramas de exclusión molecular de la proteína at $\Delta\text{C3Ex1}$  utilizando una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) con los tampones (**A** y **B1**) 20 mM Tris-HCl pH 7.6 y 150 mM NaCl, (**B2**) 20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 150 mM NaCl, (**B3**) 20 mM Tris-HCl pH 8.5 y 150 mM NaCl, (**B4**) 20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 500 mM NaCl, (**B5** y **C**) PBS-Na/K pH 7.3, y (**D**) 20 mM Tris-HCl pH 7.5 y 150 mM NaCl. El volumen de retención de cada pico se muestra encima de él. La columna se calibró mediante la determinación de los volúmenes de retención de marcadores estándar de masa molecular conocida (Biorad). Las masas moleculares estimadas aparecen marcadas de color azul en la recta de calibrado.

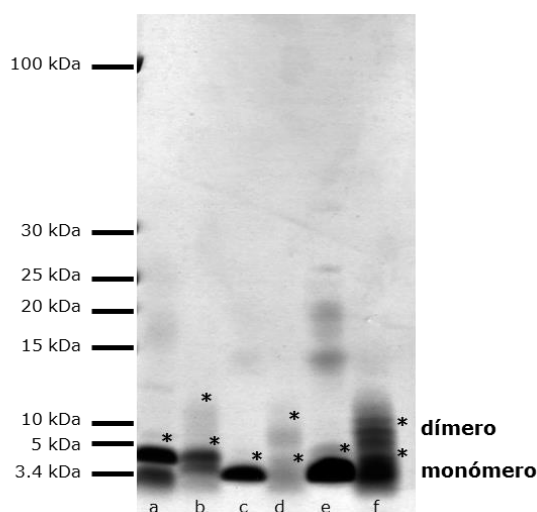
## Resultados



**Figura 47.** Cromatograma de exclusión molecular de la proteína atΔC1Ex2 utilizando una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), que se calibró previamente con estándares de masa molecular de Biorad. La proteína atΔC1Ex2 eluyó en un pico principal con un volumen de retención de 18.10, que corresponde a una masa molecular aparente de 7 kDa.



**Figura 48.** Entrecruzamiento químico del dominio N-terminal de Ex1 y de Ex2 por separado para determinar su estado oligomérico. **A)** 12 % SDS-PAGE del entrecruzamiento químico de atΔC3Ex1 (50  $\mu$ M) (monómero, 15 kDa aprox.; dímero, 30 kDa aprox.; y tetrámero, 60 kDa aprox.) con glutaraldehído. **C)** 12 % SDS-PAGE del entrecruzamiento químico de atΔC1Ex2 (50  $\mu$ M) (monómero, 10 kDa aprox.; dímero, 20 kDa aprox.) con glutaraldehído. **A y C)** C-: control negativo de las muestras que no se han tratado con el *crosslinker* glutaraldehído; y 30 s, 1 min, 5 min, 30 min, y 1 h es el tiempo de incubación con glutaraldehído.



**Figura 49.** Entrecruzamiento químico con DSS de atUvr1Ex1 y de atUvr1Ex2 por separado. **(a)** atUvr1Ex1 (40  $\mu$ M) sin DSS, **(b)** atUvr1Ex1 (40  $\mu$ M) con DSS, **(c)** atUvr1Ex2 (40  $\mu$ M) sin DSS, **(d)** atUvr1Ex2 (40  $\mu$ M) con DSS, **(e)** atUvr1Ex2 (200  $\mu$ M) sin DSS, y **(f)** atUvr1Ex2 (200  $\mu$ M) con DSS. Las proteínas se separaron en un 4-12 % NuPAGE Bis-Tris Mini Gel (Invitrogen). Las posiciones del monómero (5 kDa aprox.), y el dímero (10 kDa aprox.) se indican en la imagen.

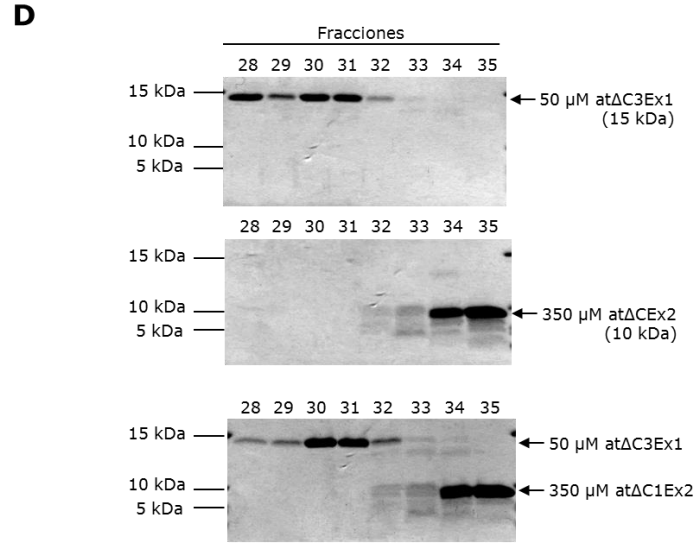
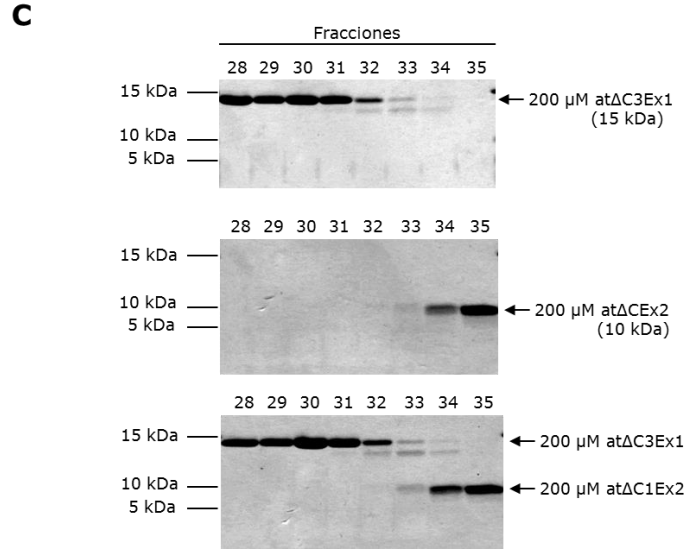
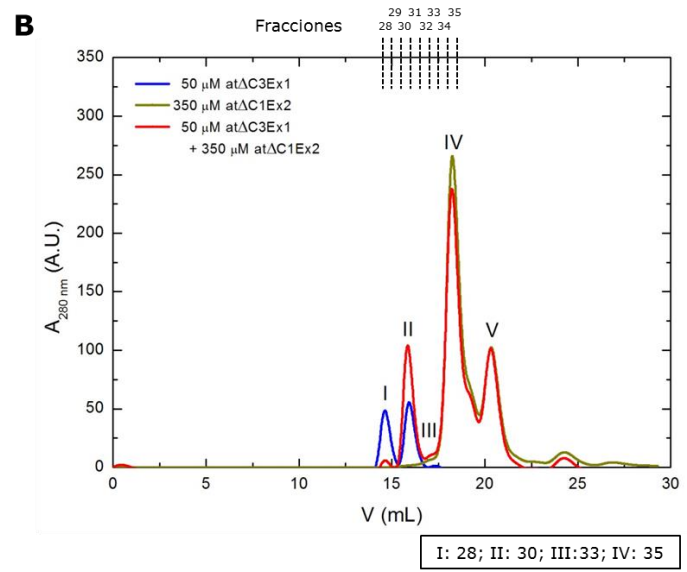
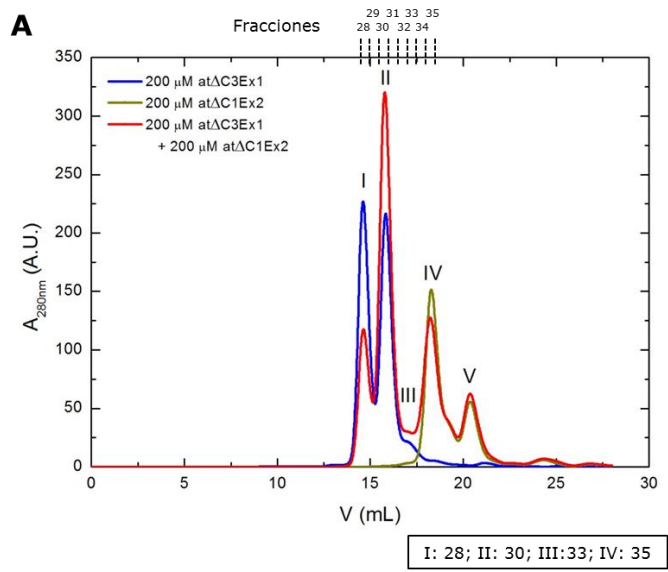
### 1.3.3. Análisis de la interacción *in vitro* de Ex1 y Ex2 a través del dominio N-terminal

La interacción entre el dominio N-terminal de Ex1 y el dominio N-terminal de Ex2 se analizó mediante el análisis de la formación del complejo Ex1-Ex2 por cromatografía de exclusión molecular. Para ello, se llevaron a cabo dos ensayos: uno donde se mezclaron cantidades equimoleculares de atΔC3Ex1 y atΔC1Ex2 (200  $\mu$ M atΔC3Ex1 junto con 200  $\mu$ M atΔC1Ex2), y otro añadiendo atΔC1Ex2 en exceso (350  $\mu$ M) con respecto a atΔC3Ex1 (50  $\mu$ M). Observamos que en el ensayo de cantidades equimoleculares, el equilibrio de las especies de atΔC3Ex1 se

## Resultados

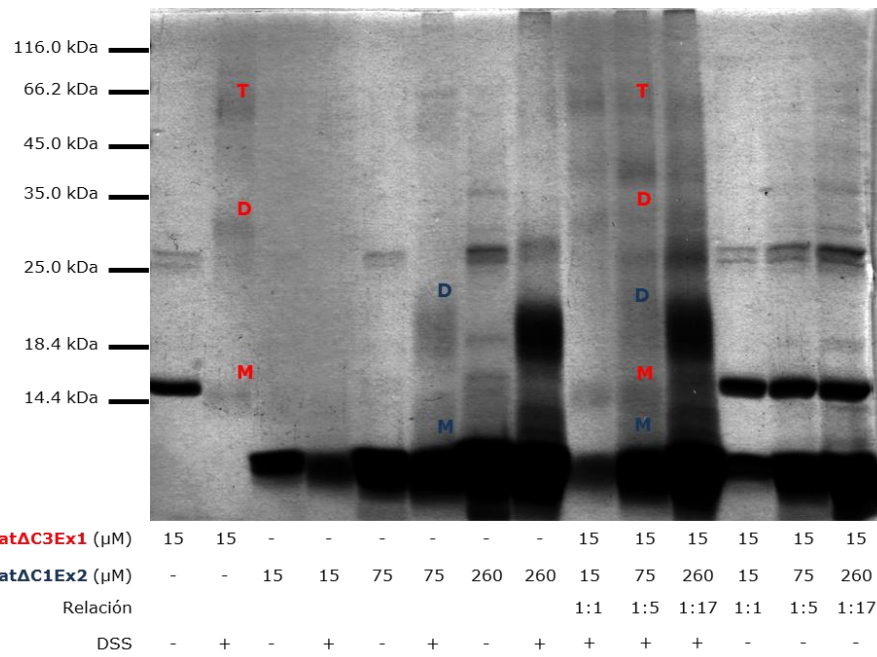
desplaza del tetrámero (I) al dímero (II) en presencia de at $\Delta$ C1Ex2, y una pequeña parte se desplaza hacia la formación de monómero (Figura 50A y C). En el ensayo en el que at $\Delta$ C1Ex2 está en exceso, el comportamiento de at $\Delta$ C3Ex1 como el de at $\Delta$ C1Ex2 es el mismo que en el ensayo de cantidades equimoleculares (Figura 50 B y D). Este ensayo sugiere que, aunque no parece que se forme un complejo estable entre los dominios N-terminal de Ex1 y de Ex2, sí que se observa que la distribución de especies en at $\Delta$ C3Ex1 se altera en presencia de at $\Delta$ C1Ex2. Para comprobar si el complejo que se forma es débil o transitorio, este se analizó mediante un ensayo de entrecruzamiento químico con DSS ya que puede estabilizar las interacciones débiles o transitorias (Perkins *et al.* 2010). Sin embargo, no se detectó ninguna banda correspondiente a la formación del complejo (Figura 51).

Además, se analizó la interacción entre las proteínas at $\Delta$ C3Ex1, at $\Delta$ C1Ex2, atUvr1Ex1, y atUvr1Ex2 mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida sin SDS (*native PAGE*) (Figura 52 A y B). Los resultados obtenidos confirman la formación de una especie mayoritaria en at $\Delta$ C1Ex2, y de dos especies en at $\Delta$ C3Ex1 (Figura 52A). Considerando los datos anteriores, asumimos que estas especies representan monómeros, en el caso de at $\Delta$ C1Ex2, y dímeros/tetrámeros en el caso de at $\Delta$ C3Ex1. No se detectó la formación de un complejo entre at $\Delta$ C3Ex1 y at $\Delta$ C1Ex2, entre atUvr1Ex1 y atUvr1Ex2, entre at $\Delta$ C3Ex1 y atUvr1Ex1, entre at $\Delta$ C3Ex1 y atUvr1Ex2, entre at $\Delta$ C1Ex2 y atUvr1Ex1, ni entre at $\Delta$ C1Ex2 y atUvr1Ex2 (Figura 52). Estos resultados sugieren que no se produce la interacción entre los constructos del dominio N-terminal de Ex1 y Ex2. No obstante, en la combinación de at $\Delta$ C3Ex1 con at $\Delta$ C1Ex2 se observa una disminución del tetrámero junto con un aumento del dímero de at $\Delta$ C3Ex1 cuando se incrementa la concentración de at $\Delta$ C1Ex2 (Figura 52), al igual que se observó en el experimento de cromatografía de exclusión molecular (Figura 50).



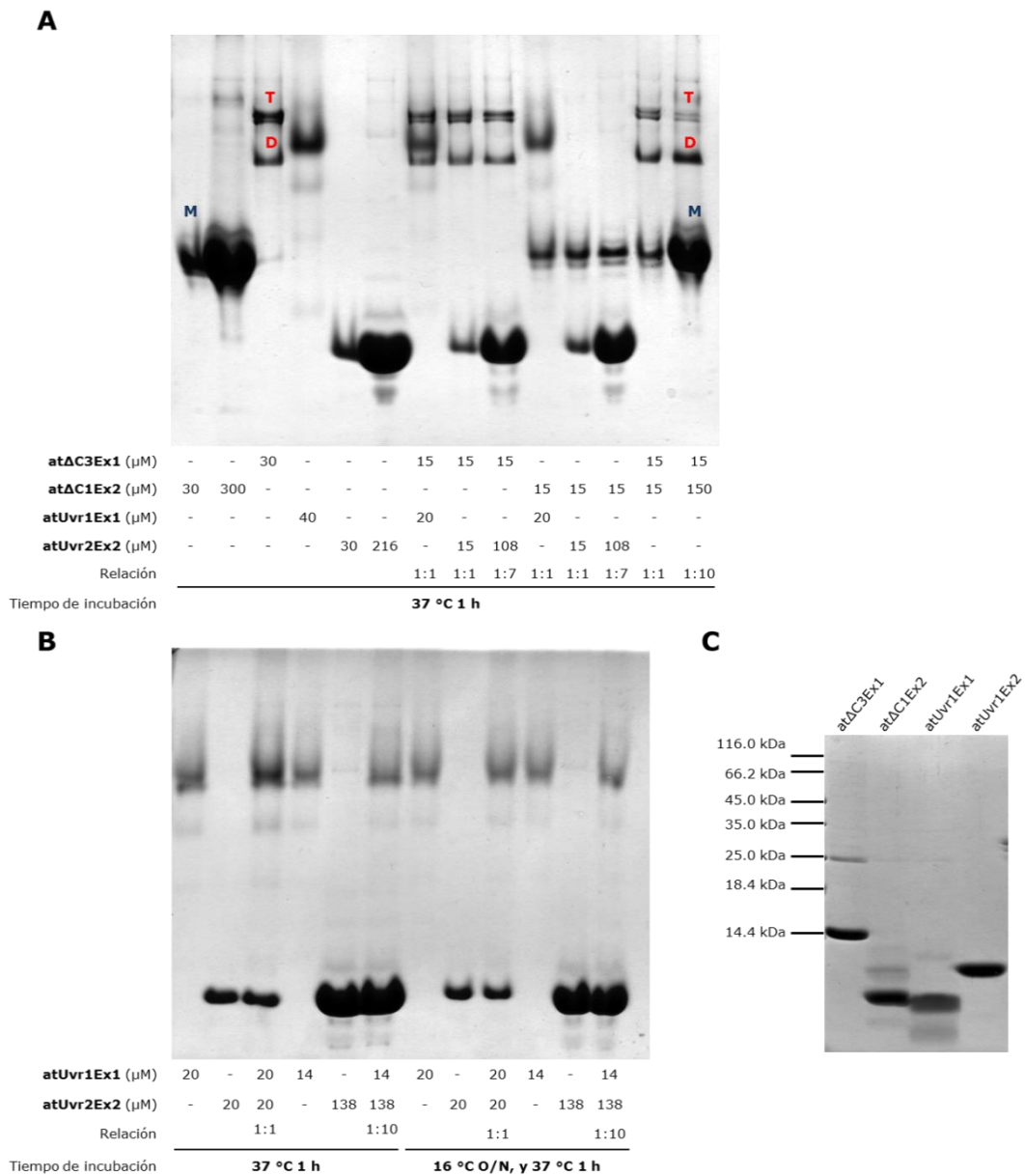
**Figura 50.** Ensayo de interacción de los dominios N-terminal de Ex1 y de Ex2 mediante cromatografía de exclusión molecular. **A)** Cromatograma de las proteínas at $\Delta\text{C3Ex1}$  (200  $\mu\text{M}$ ), at $\Delta\text{C1Ex2}$  (200  $\mu\text{M}$ ), y la mezcla de at $\Delta\text{C3Ex1}$  (200  $\mu\text{M}$ ) y at $\Delta\text{C1Ex2}$  (200  $\mu\text{M}$ ). **B)** Cromatograma de las proteínas at $\Delta\text{C3Ex1}$  (50  $\mu\text{M}$ ), at $\Delta\text{C1Ex2}$  (350  $\mu\text{M}$ ), y la mezcla de at $\Delta\text{C3Ex1}$  (50  $\mu\text{M}$ ) y at $\Delta\text{C1Ex2}$  (350  $\mu\text{M}$ ). El pico I corresponde al tetrámero de at $\Delta\text{C3Ex1}$ ; el pico II, al dímero de at $\Delta\text{C3Ex1}$ ; el “hombro” III, al monómero de at $\Delta\text{C3Ex1}$ ; el pico IV, al monómero de at $\Delta\text{C1Ex2}$ ; y el pico V, a un producto de degradación de at $\Delta\text{C1Ex2}$ . **C)** 17 % SDS-PAGE de las fracciones 28-35 de las tres cromatografías que se muestran en A. **D)** 17 % SDS-PAGE de las fracciones 28-35 de las tres cromatografías que se muestran en B.

## Resultados



**Figura 51.** 15 % SDS-PAGE del entrecruzamiento químico de atΔC3Ex1 y atΔC1Ex2 con DSS. Las letras M, D, y T corresponden al monómero, dímero, y tetramero de atΔC3Ex1 (en rojo), y de atΔC1Ex2 (azul). En la parte inferior se indican las concentraciones de las proteínas atΔC3Ex1 y atΔC1Ex2, la relación entre las concentraciones [atΔC3Ex1]:[atΔC1Ex2], y la presencia o ausencia de DSS (+ o -, respectivamente).

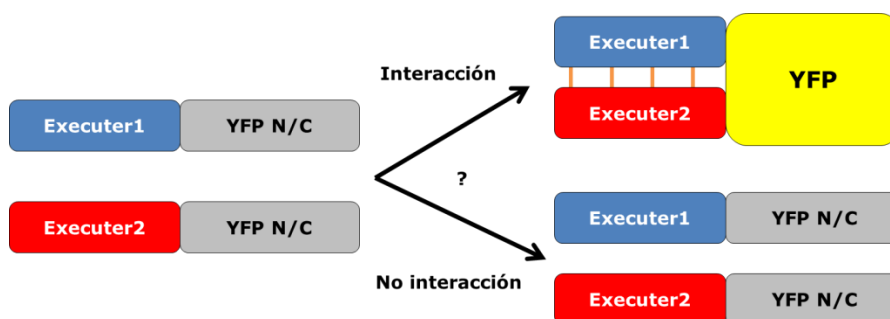




**Figura 52.** 15 % native-PAGE (**A**) de las proteínas atΔC3Ex1, atΔC1Ex2, atUvr1Ex1, y atUvr1Ex2, y (**B**) de las proteínas atUvr1Ex1 y atUvr1Ex2. En la parte inferior de los geles se muestra la concentración de cada proteína, la relación entre las concentraciones y el tiempo de incubación. La letra M corresponden al monómero de atΔC1Ex2 (azul), y las letras D y T, al dímero y al tetrámero de atΔC3Ex1 (en rojo). (**C**) 15 % SDS-PAGE con 4 M urea de las proteínas atΔC3Ex1, atΔC1Ex2, atUvr1Ex1, y atUvr1Ex2 desnaturizadas.

## 2. Visualización de las proteínas Ex1 y Ex2 fusionadas a proteínas fluorescentes en células de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana benthamiana* mediante microscopía confocal

Para evaluar la interacción de las proteínas Ex1 y Ex2 de *Arabidopsis in vivo*, se llevó a cabo un ensayo de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Esta técnica se basa en la reconstitución del fragmento N- y C-terminal de la proteína YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), dos fragmentos que no solapan y que no son fluorescentes. El gen que codifica para el fragmento N-terminal (YFP-N) se clona en fase con el gen que codifica para una de las proteínas de interés en el vector comercial 35S-pSPYNE, y el gen que codifica para el fragmento C-terminal (YFP-C) se clona en fase con el gen que codifica para la otra proteína de interés en el vector 35S-pSPYCE. En el caso de que Ex1 y Ex2 interactuen, YFP-C e YFP-N interactúan, la proteína YFP se reconstituye, y emite fluorescencia. La emisión de la fluorescencia de YFP se puede visualizar mediante microscopía confocal (Ohad *et al.* 2007). Sin embargo, si Ex1 y Ex2 no interactúan, la proteína YFP no se reconstituye, y no se detecta fluorescencia (Figura 53).



**Figura 53.** Las proteínas Executer1 y Executer2 fusionadas al fragmento N- (YFP-N) o C-terminal (YFP-C) de la proteína fluorescente YFP en un ensayo BiFC. Si Ex1 y Ex2 interactúan, la proteína YFP se reconstituye, y emite fluorescencia que se puede detectar. En cambio, si Ex1 y Ex2 no interactúan, la proteína YFP no se reconstituye, y no emite fluorescencia.

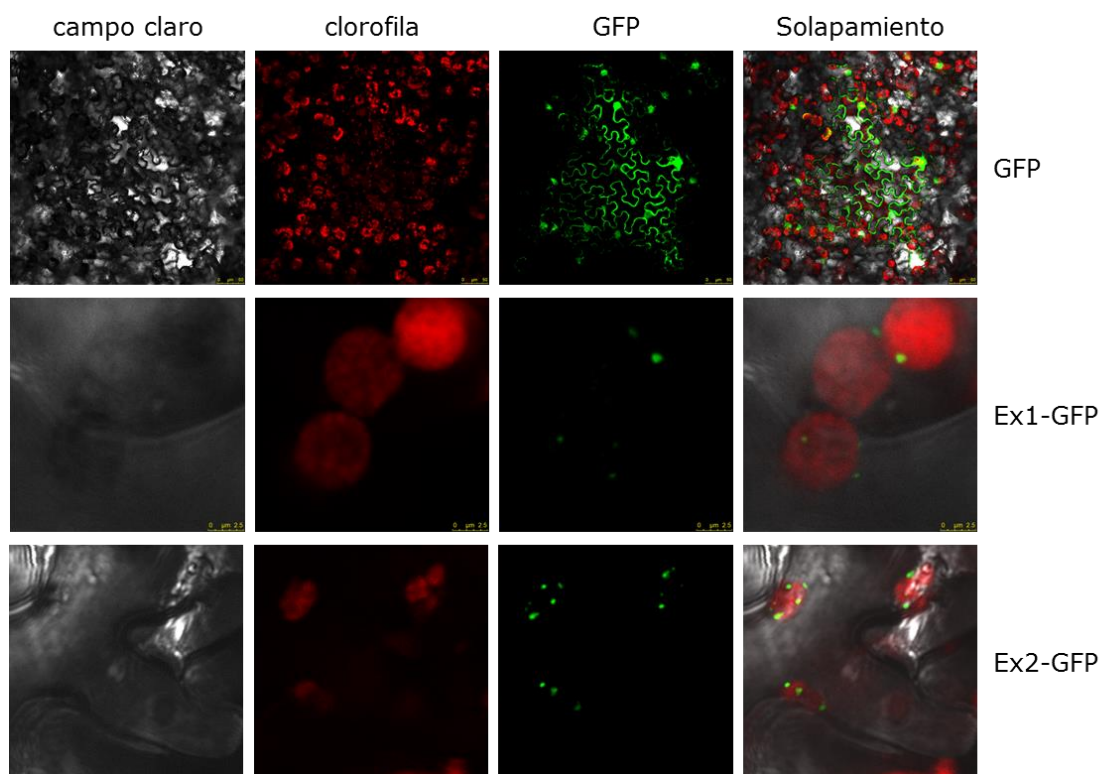
### 2.1. Localización subcelular de Ex1 y Ex2 en plantas de *Nicotiana benthamiana*

Antes de analizar la interacción Ex1-Ex2, se evaluó la idoneidad del sistema de tabaco para el estudio de las proteínas de *Arabidopsis* Ex1 y Ex2. Para ello, se realizó un ensayo de localización subcelular de las proteínas Ex1 y Ex2 mediante la transformación de las hojas por agroinfiltración.

Se construyeron los vectores atpEx1\_pMDC83 y atpEx2\_pMDC83 (Tabla 17) que expresan las proteínas Ex1 y Ex2 de *A. thaliana* con su péptido de tránsito y que tienen fusionado a su extremo C-terminal la proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*). Estos vectores se usaron para transformar plantas de *Nicotiana benthamiana* mediante la infiltración de *A. tumefaciens* en sus hojas (Apartado 30 de Materiales y Métodos). Como control positivo se utilizó una hoja transformada con el vector pMDC83 que expresa la proteína GFP. La expresión de la proteína GFP se localizó tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 54). En cambio, la expresión de las proteínas Ex1-GFP y Ex2-GFP colocaliza con la autofluorescencia de la clorofila en los cloroplastos de tabaco (Figura 54). Esta colocalización corrobora la localización subcelular de Ex1 y Ex2 ya detectada en el cloroplasto de *Arabidopsis* (Lee *et al.* 2007). Asimismo, este resultado indica que las hojas de *N. benthamiana* son adecuadas para el ensayo de interacción proteína-proteína propuesto.

**Tabla 17.** Vectores utilizados en la expresión de proteínas en *A. thaliana* y en *N. benthamiana*.

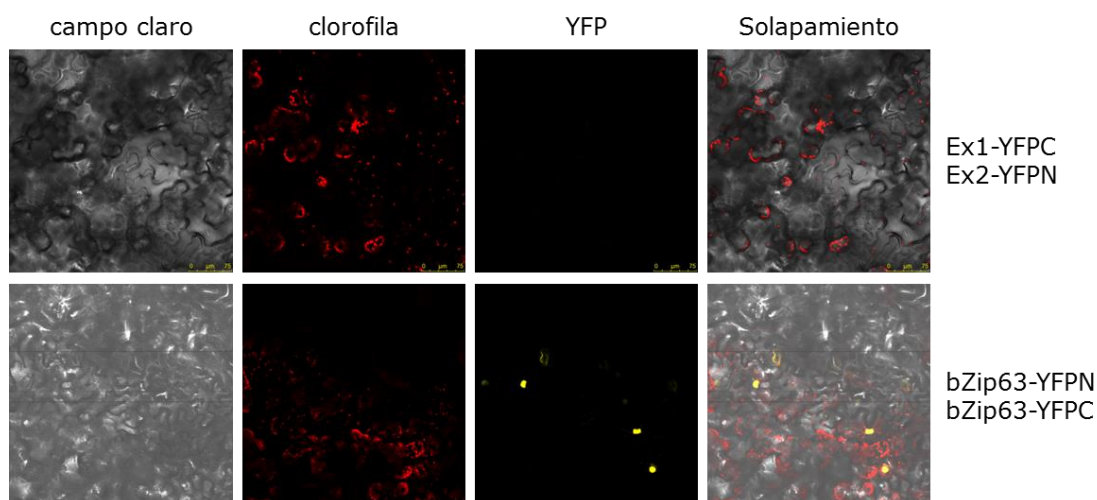
Vector	Organismo	Promotor	Terminador	Proteína de interés	Proteína fluorescente	Etiqueta de afinidad
atpEx1_pMDC83	<i>N. benthamiana</i>	2x 35S	nosT	atpEx1	GFP	-
atpEx2_pMDC83	<i>N. benthamiana</i>	2x 35S	nosT	atpEx2	GFP	-
bZip63_35S-pSPYCE	<i>N. benthamiana</i>	35S	nosT	bzip63	YFP-C	HA
bZip63_35S-pSPYNE	<i>N. benthamiana</i>	35S	nosT	bzip63	YFP-N	c-myc
atpEx1_35S-pSPYCE	<i>N. benthamiana</i>	35S	nosT	atpEx1	YFP-C	HA
atpEx2_35S-pSPYCE	<i>N. benthamiana</i>	35S	nosT	atpEx2	YFP-C	HA
atpEx1_35S-pSPYNE	<i>N. benthamiana</i>	35S	nosT	atpEx1	YFP-N	c-myc
atpEx2_35S-pSPYNE	<i>N. benthamiana</i>	35S	nosT	atpEx2	YFP-N	c-myc
atpΔC3Ex1_pMDC83	<i>N. benthamiana</i>	2x 35S	nosT	atpΔC3Ex1	GFP	-
atpΔC3Ex1_35S-pSPYCE	<i>N. benthamiana</i>	35S	nosT	atpΔC3Ex1	YFP-C	HA
atpΔC3Ex1_35S-pSPYNE	<i>N. benthamiana</i>	35S	nosT	atpΔC3Ex1	YFP-N	c-myc
atpEx1_p2GWY7	<i>A. thaliana</i>	35S	35S	atpEx1	YFP	-
atpEx2_p2GWY7	<i>A. thaliana</i>	35S	35S	atpEx2	YFP	-
atpEx1_pB7YWG2	<i>N. benthamiana</i>	35S	35S	atpEx1	YFP	-
atpEx2_pB7YWG2	<i>N. benthamiana</i>	35S	35S	atpEx2	YFP	-
atPend_pB7YWG2	<i>N. benthamiana</i>	35S	35S	atPend	YFP	-
atPgl35_pB7YWG2	<i>N. benthamiana</i>	35S	35S	atPgl35	YFP	-
atPend_pB7CWG2	<i>N. benthamiana</i>	35S	35S	atPend	CFP	-
atPgl35_pB7CWG2	<i>N. benthamiana</i>	35S	35S	atPgl35	CFP	-



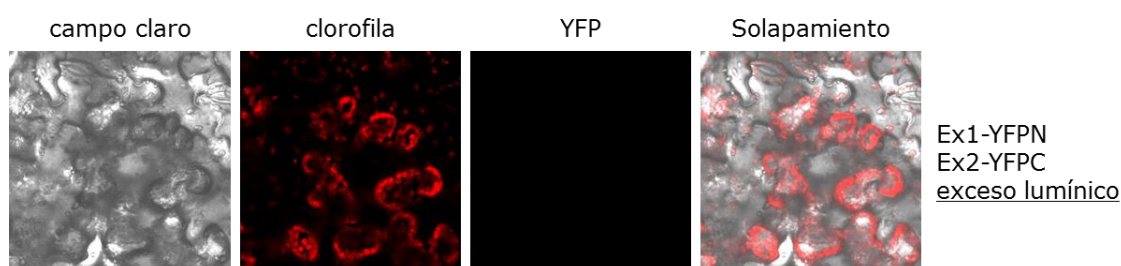
**Figura 54.** Expresión transitoria de las proteínas de fusión Ex1-GFP y Ex2-GFP, y la proteína GFP en hojas de *Nicotiana benthamiana*. La fluorescencia de las proteínas de fusión GFP, la autofluorescencia de la clorofila, y el campo claro o transmitancia se detectó en las hojas transformadas mediante microscopía confocal. El solapamiento corresponde a la superposición de los canales campo claro, clorofila, y GFP.

## 2.2. Ensayo de interacción proteína-proteína mediante BiFC en hojas de *Nicotiana benthamiana*

La detección de la interacción Ex1-Ex2 se realizó mediante el ensayo de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC) en plantas de tabaco. Para ello, se construyeron los vectores atpEx1\_35S-pSPYCE, atpEx2\_35S-pSPYCE, atpEx1\_35S-pSPYNE, y atpEx2\_35S-pSPYNE (Tabla 17) que expresan las proteínas Ex1 y Ex2 de *A. thaliana* con su péptido de tránsito y que tienen fusionado a su extremo C-terminal el fragmento N- o C-terminal de la proteína fluorescente YFP (YFPN o YFPC) en plantas de tabaco. Como control positivo, se utilizaron los vectores bZip63\_35S-pSPYCE y bZip63\_35S-pSPYNE (Tabla 17) que expresan los factores de transcripción bZip63-YFPC y bZip63-YFPN (bZip, *basic leucine zipper*). Esta proteína homodimeriza en el núcleo, y mediante microscopía confocal, se detecta la fluorescencia de YFP en el núcleo (Walter *et al.* 2004). En total, se llevaron a cabo tres experimentos de coexpresión transitoria con las proteínas Ex1-YFPC y Ex2-YFPN, las proteínas Ex1-YFPN y Ex2-YFPC, y el control positivo con las proteínas bZip63-YFPC y bZip63-YFPN. Sin embargo, no detectamos la fluorescencia debida a la YFP en los experimentos Ex1-YFPN y Ex2-YFPC (Figura 55), Ex1-YFPC y Ex2-YFPN (datos no mostrados), aunque sí detectamos la fluorescencia de la YFP en el núcleo debida a la coexpresión de bZip63-YFPC y bZip63-YFPN (Figura 55). Además, para favorecer la interacción de las proteínas Ex1 y Ex2, una hoja transformada de una planta se sometió a un exceso de luz blanca durante 10 minutos (imágenes no mostradas) y durante 2 horas (Figura 56), pero tampoco se detectó la fluorescencia.



**Figura 55.** Expresión transitoria de las proteínas de fusión Ex1-YFPN y Ex2-YFPC, y el control positivo bZip63-YFPC y bZip63-YFPN en hojas de *Nicotiana benthamiana*. La fluorescencia de las proteínas de fusión YFP, la autofluorescencia de la clorofila, y el campo claro o transmitancia se detectó en las hojas transformadas mediante microscopía confocal. El solapamiento corresponde a la superposición de los canales campo claro, clorofila, e YFP.



**Figura 56.** Expresión transitoria de las proteínas de fusión Ex1-YFPN y Ex2-YFPC en hojas de *Nicotiana benthamiana* sometidas a un exceso de luz blanca durante 2 horas. La fluorescencia de las proteínas de fusión YFP, la autofluorescencia de la clorofila, y el campo claro o transmitancia se detectó en las hojas transformadas mediante microscopía confocal. El solapamiento corresponde a la superposición de los canales campo claro, clorofila, e YFP.

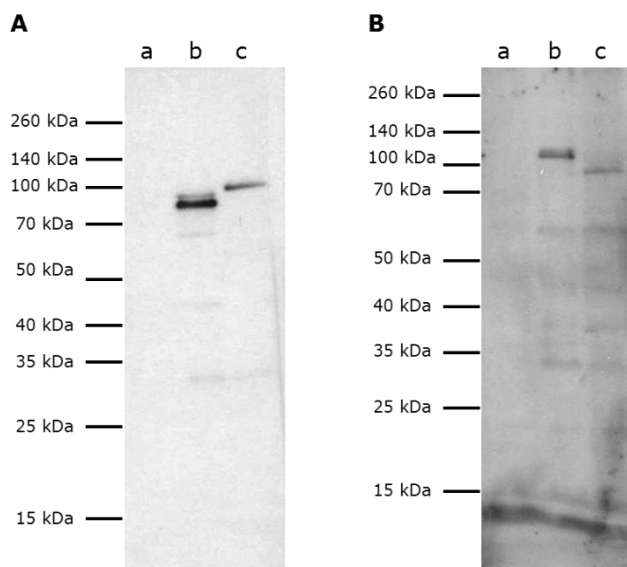
En estos ensayos se comprobó los niveles de expresión de las proteínas mediante inmunodetección en extractos de proteínas preparados a partir de las hojas de tabaco transformadas. Las proteínas de fusión YFPN e YFPC contienen los epítomos c-myc y HA, respectivamente. El anticuerpo monoclonal que reconoce el epítomo c-myc ( $\alpha$ -c-myc) detecta la presencia de las proteínas Ex1-YFPN, y Ex2-YFPN; mientras que el anticuerpos monoclonal que reconoce el epítomo HA ( $\alpha$ -HA) detecta la presencia de las proteínas Ex1-YFPC y Ex2-YFPC.

En la figura 91 se observa que el anticuerpo  $\alpha$ -HA reconoce una banda con una masa molecular de 80 kDa aprox. (Figura 57A, calle b), que corresponde a la proteína Ex2-YFPC con una masa molecular estimada de 77 kDa. En la calle c (Figura 57A), el anticuerpo  $\alpha$ -HA reconoce una banda de 100 kDa, que corresponde a la proteína Ex1-YFPC que tiene una masa molecular estimada de 84 kDa. El anticuerpo  $\alpha$ -c-myc reconoce una banda de una masa molecular de 120-130 kDa aprox. (Figura 57B, calle b), que corresponde a la proteína Ex1-YFPN con una masa molecular estimada de 92 kDa. En la calle c (Figura 57B), el anticuerpo  $\alpha$ -c-myc reconoce una banda de 95 kDa aprox., que corresponde a la proteína Ex2-YFPN con una



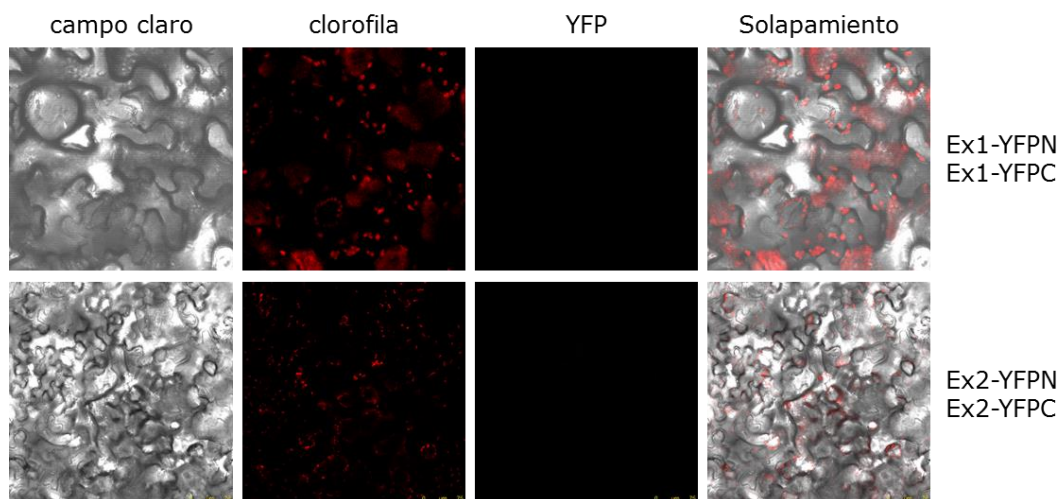
## Resultados

masa molecular estimada de 85 kDa. Estos resultados muestran que, en estas condiciones de estudio, no se produce una interacción Ex1-Ex2 detectable.



**Figura 57.** Inmunodetección con el anticuerpo (A)  $\alpha$ -HA y (B)  $\alpha$ -c-myc y revelado mediante quimioluminiscencia ECL. La calle **a** corresponde a la muestra de una hoja sin transformar, la calle **b** corresponde a la muestra de una hoja cotransformada con los vectores atpEx1\_35S-pSPYNE y atpEx2\_35S-pSPYCE (proteínas Ex2-YFPC (77 kDa) y Ex1-YFPN (92 kDa)), y la calle **c** corresponde a la muestra de una hoja cotransformada con los vectores atpEx2\_35S-pSPYNE y atpEx1\_35S-pSPYCE (proteínas Ex2-YFPN (85 kDa) y Ex1-YFPC (84 kDa)).

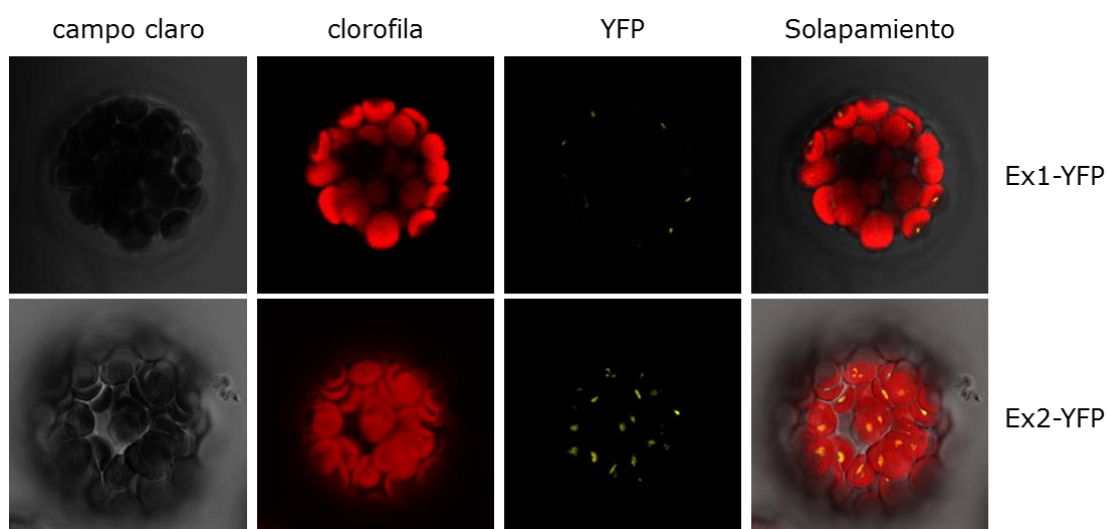
La posibilidad de homodimerización se analizó tanto en Ex1 como en Ex2, también mediante experimentos de coexpresión transitoria, con las proteínas Ex1-YFPN y Ex1-YFPC; y las proteínas Ex2-YFPN y Ex2-YFPC. En ninguno de los dos experimentos se detectó la fluorescencia debida a la proteína YFP (Figura 58).



**Figura 58.** Expresión transitoria de las proteínas de fusión Ex1-YFPN y Ex1-YFPC, y Ex2-YFPC y Ex2-YFPN en hojas de *N. benthamiana*. La fluorescencia de las proteínas de fusión YFP, la autofluorescencia de la clorofila, y el campo claro o transmitancia se detectó en las hojas transformadas mediante microscopía confocal. El solapamiento corresponde a la superposición de los canales campo claro, clorofila, e YFP.

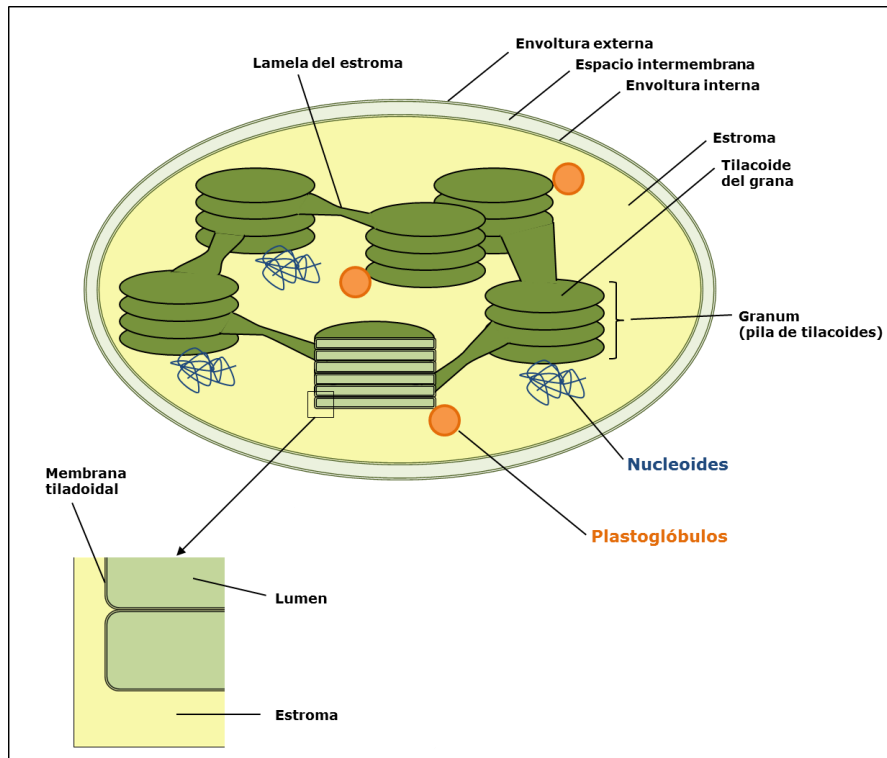
### 2.3. Colocalización de las proteínas Ex1 y Ex2 en nucleoides y plastoglóbulos

La expresión de las proteínas de fusión Ex1-GFP y Ex2-GFP de *A. thaliana* en las células de tabaco mostró un patrón punteado característico que colocaliza con los cloroplastos. Este patrón punteado es muy diferente al observado en las células de los cotiledones de *Arabidopsis* (Figura 22), en las que la fluorescencia debida a Ex1-GFP y a Ex2-GFP se acumula en los cloroplastos y parece estar asociada a las membranas tilacoidales (Lee *et al.* 2007). Para comprobar si el patrón punteado también ocurría en *Arabidopsis*, se construyeron los vectores atpEx1\_p2GWY7 y atpEx2\_p2GWY7 (Tabla 17), se prepararon protoplastos de *A. thaliana*, y se transformaron con los plásmidos construidos con una disolución de PEG y Calcio. Nuestros resultados muestran que las proteínas Ex1-YFP e Ex2-YFP muestran el patrón punteado en protoplastos de *Arabidopsis* (Figura 59) similar al encontrado en las células de tabaco.



**Figura 59.** Expresión transitoria de las proteínas de fusión Ex1-YFP y Ex2-YFP en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. La fluorescencia de las proteínas de fusión YFP, la autofluorescencia de la clorofila, y el campo claro o transmitancia se detectó en las hojas transformadas mediante microscopía confocal. El solapamiento corresponde a la superposición de los canales campo claro, clorofila, e YFP.

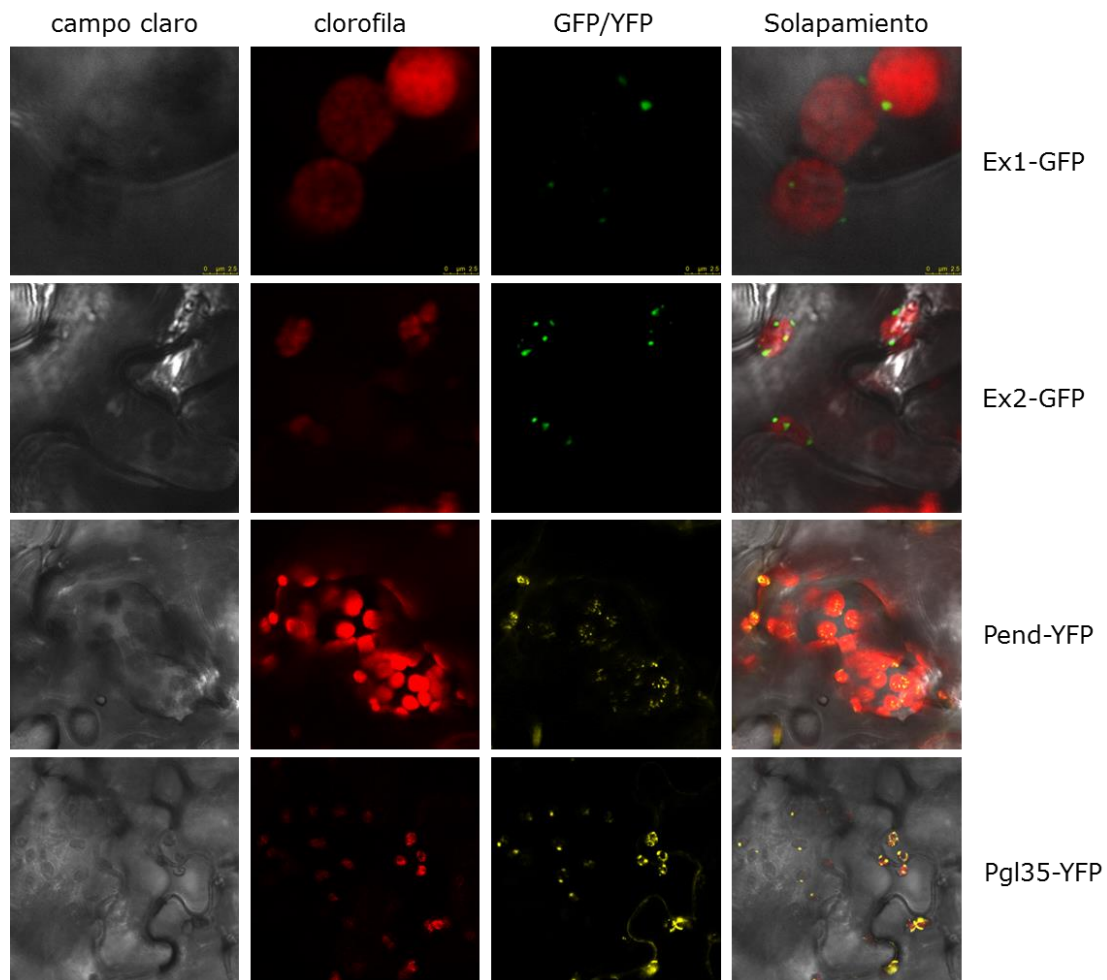
Este patrón punteado recuerda al patrón observado en proteínas asociadas a nucleoides (Terasawa y Sato 2005, Newell y Gray 2010), y a plastoglóbulos (Vidi *et al.* 2006) en otros estudios. Los **nucleoides** del cloroplasto son el genoma plastídico que se organiza en complejos ADN-proteína (Sakai *et al.* 2004), y es muy similar a los nucleoides procariotas (Sato *et al.* 2003). En los plastidios, los nucleoides se distribuyen en el estroma como pequeñas partículas asociadas a las membranas tilacoidales (Sakai *et al.* 2004) (Figura 60). Los **plastoglóbulos** son cuerpos lipídicos globulares asociados a las zonas “curvadas” de las membranas tilacoidales (Austin *et al.* 2006) (Figura 60). La superficie de la membrana lipídica contiene proteínas ancladas (Kessler *et al.* 1999), que pertenecen a tres grupos funcionales: proteínas estructurales denominadas fibrilinas o plastoglobulinas, enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, y proteínas sin caracterizar (Grennan 2008, Eugeni Piller *et al.* 2012).



**Figura 60.** Representación esquemática de la estructura de un cloroplasto adaptada de (Taiz y Zeiger 2010) que muestra los plastoglóbulos y nucleoides asociados a las membranas tilacoidales.

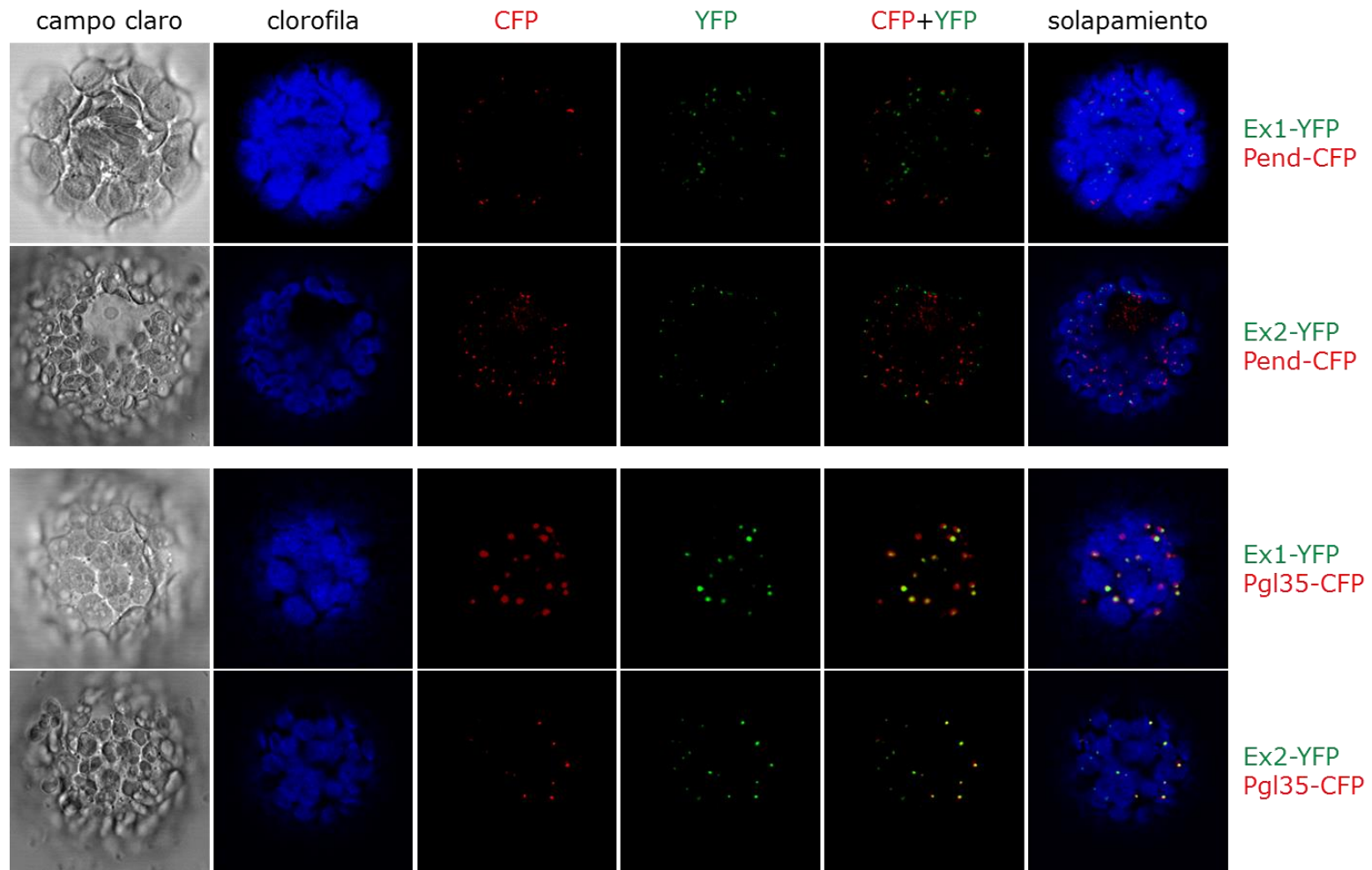
Para averiguar si las proteínas Ex1 y Ex2 de *Arabidopsis* se localizan en nucleoides, en plastoglóbulos, o en ninguno de ellos, se llevó a cabo un experimento de colocación mediante microscopía confocal. Los nucleoides y los plastoglóbulos se pueden visualizar mediante la fusión de una proteína fluorescente a una proteína asociada a nucleoides o a plastoglóbulos. Se escogió el dominio N-terminal de la proteína de unión a ADN de la envoltura del plastidio **Pend** (*Plastid envelope DNA binding protein*) que se localiza en los **nucleoides**, eliminando el dominio C-terminal transmembrana que dirige a la proteína a la envoltura del cloroplasto (Terasawa y Sato 2005). Pend muestra el patrón punteado característico en protoplastos de guisante y en plantas de *Arabidopsis* (Terasawa y Sato 2005), y en células de tabaco (Myouga *et al.* 2008). Por otra parte, se escogió la proteína fibrilina o plastoglobulina **Pgl35** debido a su localización en **plastoglóbulos**. Pgl35 muestra un patrón punteado característico en los cloroplastos de las células de la epidermis de la hoja de *Arabidopsis* (Zbierzak *et al.* 2010), y en protoplastos de *Arabidopsis* (Vidi *et al.* 2006). Las proteínas de *Arabidopsis* Pend y Pgl35 fusionadas a YFP (Tabla 17) se localizan en los cloroplastos de tabaco y muestran un patrón punteado similar al de las proteínas Ex1-YFP y Ex2-YFP (Figura 61).





**Figura 61.** Expresión transitoria de las proteínas de fusión Ex1-GFP, Ex2-GFP, Pend-YFP, y Pgl35-YFP en hojas de *N. benthamiana*. La fluorescencia de las proteínas de fusión GFP e YFP, la autofluorescencia de la clorofila, y el campo claro o transmitancia se detectó en las hojas transformadas mediante microscopía confocal. El solapamiento corresponde a la superposición de los canales campo claro, clorofila, e GFP o YFP.

La coexpresión de Ex1-YFP con Pend-CFP (Tabla 17), y Ex2-YFP con Pend-CFP en protoplastos de tabaco muestra que ni Ex1 ni Ex2 colocaliza con la proteína asociada a nucleoides (Figura 62). Sin embargo, la coexpresión de Ex1-YFP con Pgl35-CFP (Tabla 17), y Ex2-YFP con Pgl35-CFP indica que el patrón punteado de Ex1-YFP y Ex2-YFP colocaliza con el patrón punteado de la proteína asociada a plastoglobulos (Figura 62).



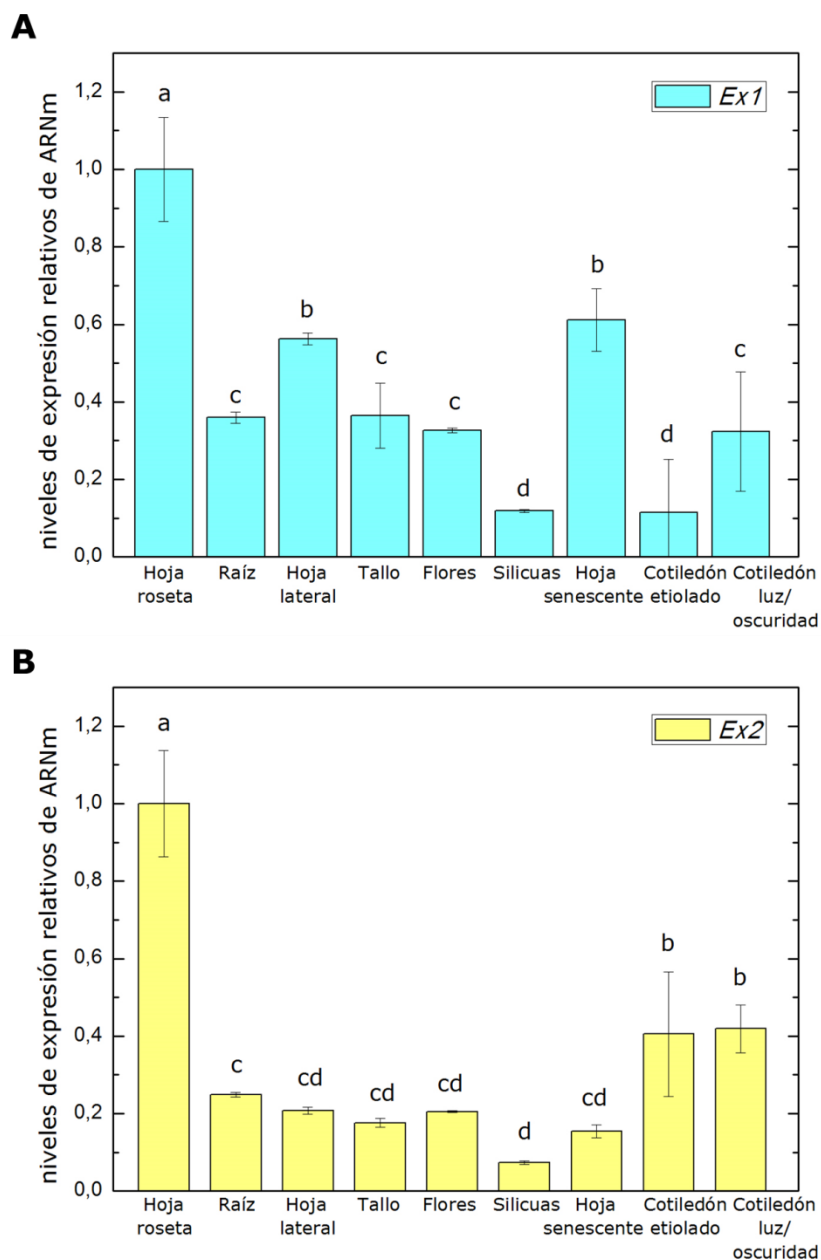
**Figura 62.** Expresión transitoria de las proteínas de fusión Ex1-YFP y Pend-CFP, Ex2-YFP y Pend-CFP, Ex1-YFP y Pgl35-CFP, y Ex2-YFP y Pgl35-CFP en protoplastos de *N. benthamiana*. La fluorescencia de las proteínas de fusión YFP y CFP, la autofluorescencia de la clorofila, y el campo claro o transmitancia se detectó en las hojas transformadas mediante microscopía confocal. El solapamiento corresponde a la superposición de los canales clorofila, CFP e YFP.

### 3. Patrón espacio-temporal de la expresión de los genes *Ex1* y *Ex2*

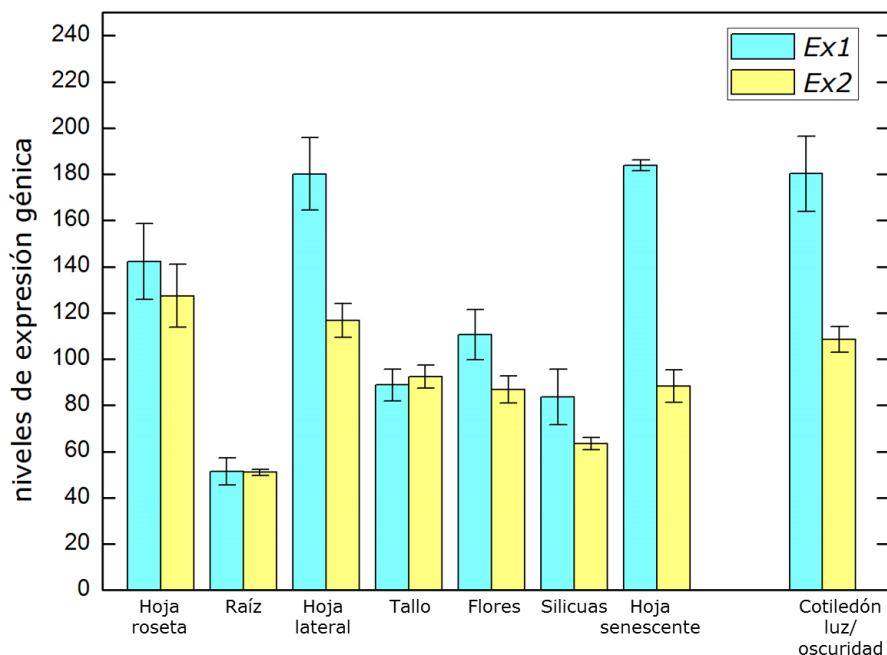
Para obtener más información acerca de la función de la familia de proteínas de *Executer*, se realizó un análisis del patrón de expresión de los genes *Executer1* y *Executer2*. Por una parte, se analizaron los niveles de transcritos de los diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana* a diferentes estadios mediante cuantificación relativa de PCR a tiempo real (qRT-PCR). Además, se obtuvieron plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan el gen que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) bajo el control de los promotores de los genes *Ex1* y *Ex2* (*patEx1::GUS* y *patEx2::GUS*) para analizar la localización de la expresión de los promotores en la planta.

#### 3.1. Análisis de la expresión génica de *Ex1* y *Ex2* mediante qRT-PCR

El análisis por qRT-PCR muestra un patrón de expresión similar de los genes *Ex1* y *Ex2*. Los transcritos son más abundantes en los órganos verdes, incluyendo hojas, tallo, flores, y hojas senescentes (Figura 63). Estos valores son comparables a los obtenidos en la base de datos AtGenExpress (Figura 64). El análisis de la varianza de la expresión del gen *Ex1* mostró que se expresa mayoritariamente en la hoja roseta, seguido de la hoja lateral y la hoja senescente. Su expresión es menor en órganos como la raíz, el tallo, las flores y el cotiledón crecido en luz/oscuridad. Por último, mostró una expresión aún menor en las silicuas y los cotiledones etiolados (Figura 63A). Por otra parte, el análisis de la varianza de la expresión del gen *Ex2* también mostró diferencias significativas entre los diferentes órganos. De igual modo que para el gen *Ex1*, se observó una mayor expresión en la hoja roseta. Los cotiledones etiolados y crecidos en luz/oscuridad mostraron también una mayor expresión que el resto de los órganos, aunque mucho menor que comparado con las hojas roseta. Los otros órganos estudiados tuvieron una expresión baja, destacando entre ellos la expresión en la raíz y siendo más baja en las silicuas (Figura 63B).



**Figura 63.** Expresión de los genes (A) *Ex1* y (B) *Ex2* en los diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*. Las hojas roseta y la raíz de plantas de 10 días post-germinación, la hoja lateral, el tallo (2° internodo), las flores, las silicuas (silicuas completas con semillas en estadio globular y corazón) y las hojas senescentes de plantas de 5-6 semanas se recogieron a las 6 horas de luz. Los cotiledones de plantas de 2 días post-germinación crecidas en oscuridad (etiolado) recogidos a las 9 h de luz, y en 16 h luz/8 h oscuridad recogidos a las 12 horas y 30 minutos de luz. Los niveles de transcritos se normalizaron respecto al gen que codifica para el ARN ribosómico 18S. Los cambios de expresión entre órganos se evaluaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, utilizando diferentes letras para indicar las diferencias significativas según el test LSD ( $P < 0.001$ ). En la gráfica se muestran los valores normalizados de cada órgano con respecto a la hoja roseta, y las barras de error corresponden a la desviación estándar.

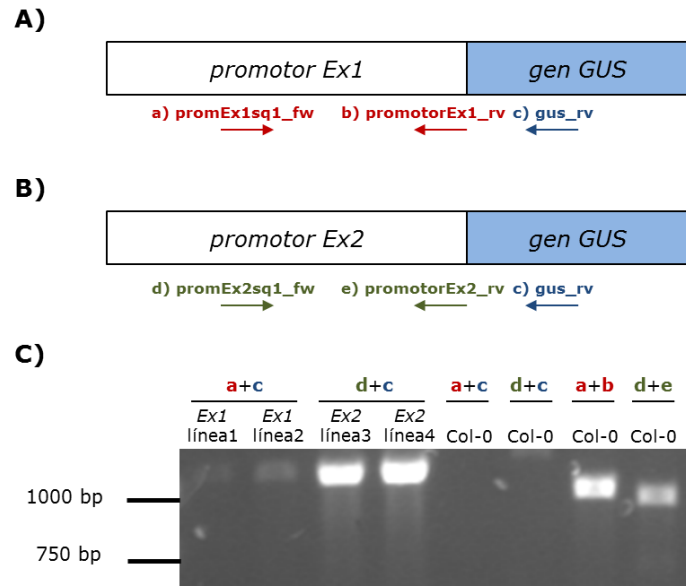


**Figura 64.** Expresión de los genes *Ex1* (At4g33630) y *Ex2* (At1g27510) en los órganos de *Arabidopsis*. Los valores proceden de la base de datos atGenExpress (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter *et al.* 2007). Los niveles de expresión génica se muestran en valores absolutos con su desviación estándar.

Además, se llevó a cabo otro análisis *in silico* de la variación en la expresión de *Ex1* y *Ex2*, aunque en este caso en plantas de *Arabidopsis* expuestas a diferentes tratamientos hormonales y de estrés abiótico y biótico, para determinar la modulación en la expresión de los miembros de *Executer* en respuesta a los cambios en el medio ambiente (Tabla A1 del Anexo). Sin embargo, únicamente se encontraron cambios de expresión importantes en el gen *Ex1* en dos de los 36 tratamientos: con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{AgNO}_3$  (un inhibidor del etileno) durante 3 horas ( $\log_2$  ratio = -1.1), y con 10  $\mu\text{M}$  de PNO8 (un inhibidor de la fotosíntesis) durante 3 horas ( $\log_2$  ratio = -0.9). En los dos tratamientos, la expresión de *Ex1* está disminuida casi la mitad en cada tratamiento respecto a cada control. En cambio, no se detectaron diferencias apreciables en la expresión de *Ex2* en ninguna de las 36 condiciones.

### 3.2. Expresión de *patEx1::GUS* y *patEx2::GUS* en plantas transgénicas

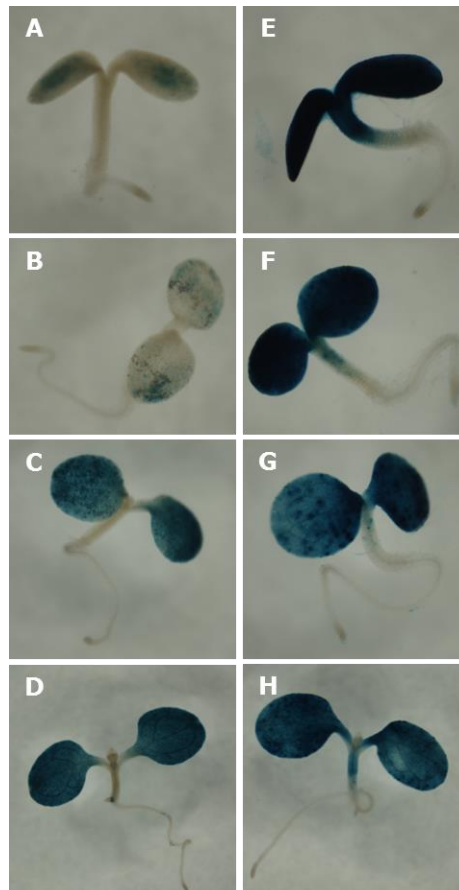
La generación de plantas transgénicas que expresan el gen que codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) bajo el control del promotor *Ex1* y del promotor *Ex2* respectivamente, se llevó a cabo mediante el Apartado 36 de Materiales y Métodos. Para ello, las plantas se transformaron con células competentes de *Agrobacterium* que contenían los plásmidos promotorEx1\_pBI101 y promotorEx2\_pBI101 (Figura 65). El fragmento de cada uno de los promotores consta de 1995 pb desde el codón de inicio (ATG). Una vez obtenidas las líneas homocigotas de la generación T3, el ADN genómico se aisló de las plantas (Apartado 7.2.2 de Materiales y Métodos), y la presencia del transgén se confirmó mediante PCR (Figura 65). La expresión de GUS bajo el control del promotor del gen *Ex1* y bajo el control del promotor del gen *Ex2*, independientemente, se visualizó mediante la tinción histoquímica GUS (Apartado 37 de Materiales y Métodos) de las plantas transgénicas.



**Figura 65.** Comprobación de la inserción del transgén *patEx1::GUS* en las líneas homocigotas 1 y 2, y del transgén *patEx2::GUS* en las líneas homocigotas 3 y 4. En el esquema **A**, las flechas muestran las posiciones de anillamiento de los oligonucleótidos a) *promEx1sq1\_fw*, b) *promotorEx1\_rv*, y c) *gus\_rv* en el transgén *patEx1::GUS*. En el esquema **B**, las flechas indican las posiciones de anillamiento de los oligonucleótidos d) *promEx2sq1\_fw*, e) *promotorEx2\_rv*, y c) *gus\_rv* en el transgén *patEx2::GUS*. (**C**) El producto de los oligonucleótidos a y c muestran la inserción del *patEx1::GUS*, mientras que el producto de los oligonucleótidos d y c muestran la inserción del *patEx2-GUS*. Las plantas Col-0 se utilizaron como control negativo en el que no se amplifica el producto de los oligonucleótidos a con c, ni d con c; y como control positivo en el que se amplifica el promotor del gen Ex1 con los oligonucleótidos a y b, y el promotor del gen Ex2 con los oligonucleótidos d y e.

### 3.2.1. Expresión en tejido aéreo durante la emergencia del cotiledón y del hipocotilo

En las plantas de 1-4 días post-germinación, se observa una fuerte expresión de *patEx2::GUS* en el tejido no vascular de cotiledones e hipocotilo (Figura 66). La expresión de *patEx1::GUS* en cambio es muy débil en plantas de 1-2 días post-germinación (Figura 66, A-B), pero se iguala a la de *patEx2::GUS* a los 3-4 días post-germinación (Figura 66, C-D).



**Figura 66.** Localización histoquímica de la actividad GUS en plantas (A-D) *patEx1::GUS*, y (E-H) *patEx2::GUS* recogidas después de 6 horas del periodo de luz. Las plantas tienen (A y E) 1 día, (B y F) 2 días, (C y G) 3 días, y (D y H) 4 días post-germinación.

### 3.2.2. Expresión en tejido aéreo durante la emergencia y maduración de roseta

A los 6 días post-germinación, emergen un par de hojas roseta del meristemo apical, además de las raíces laterales y pelos radiculares en las raíces primarias. Entre los 6-12 días post-germinación, la expresión *patEx1::GUS* y *patEx2::GUS* es muy similar. Se observa una fuerte expresión en los cotiledones que se mantiene a lo largo del desarrollo (Figura 67). En hojas roseta jóvenes, la expresión es baja y se limita a la zona apical (Figura 67, A-B, hojas 1-2); sin embargo, la expresión va aumentando progresivamente a medida que la hoja madura (Figura 67, C-D, hojas 1 y 2). Cada nueva hoja roseta emergente, sigue un patrón de expresión similar (Figura 67 y 68). Asimismo, en las hojas adultas en las que se detecta la expresión de *GUS* en toda la hoja completa, en el peciolo de estas también se detecta. En cambio, en las hojas jóvenes no se observa expresión de *GUS* (Figura 67 y 68).

A diferencia de las plantas *patEx1::GUS* (Figura 67 C, G, y K), las plantas *patEx2::GUS* muestran expresión en el hypocotilo (Figura 68 D, H y L).

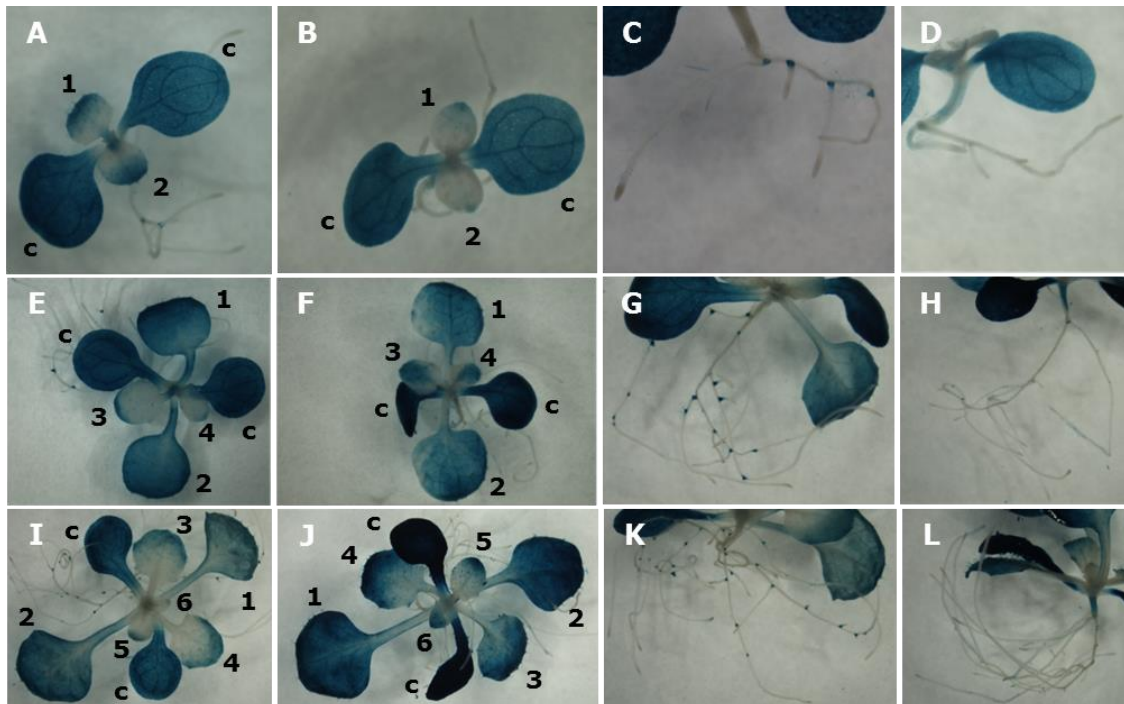
### 3.2.3. Expresión en raíces

A los 4 días post-germinación de *patEx1::GUS* se detecta expresión en la unión de la primera raíz secundaria a la raíz principal (Figura 66D, ver apartado 3.2.1). Las plantas *patEx1::GUS* de 6-12 días post-germinación muestran actividad GUS en las raíces. Esta expresión se centra en el primordio de cada raíz lateral, en las raíces laterales emergentes, y en la base de las raíces

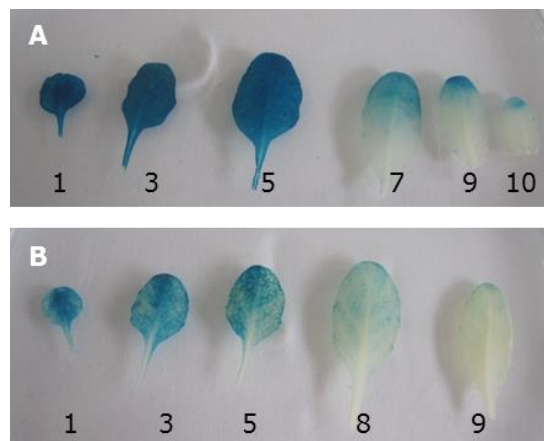


## Resultados

laterales más alargadas (Figura 67 C, G, y K; y Figura 69). Esta expresión en raíces no se observa en *patEx2::GUS* (Figura 67 D, H, y L; y Figura 66H).

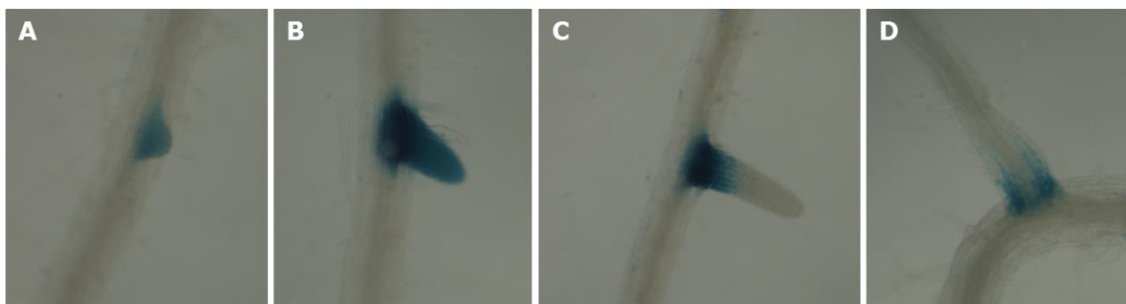


**Figura 67.** Localización histoquímica de la actividad GUS en plantas que expresan (A, C, E, G, I, y K) el *patEx1::GUS*, y (B, D, F, H, J, y L) el *patEx2::GUS* recogidas después de 6 horas del periodo de luz. Las plantas tienen (A, B, C, y D) 6 días, (E, F, G, y H) 10 días, y (I, J, K, y L) 12 días post-germinación. Las imágenes A, B, E, F, I, y J muestran la parte vegetativa (las hojas), y las imágenes C, D, G, H, K y L muestran las raíces.



**Figura 68.** Localización histoquímica de la actividad GUS en las hojas roseta de plantas de 24 días que contienen (A) el transgén *patEx1::GUS*, y (B) el transgén *patEx2::GUS*, recogidas después de 6 horas del periodo de luz. Los números situados debajo de las hojas indican el número de hoja roseta al que corresponden.



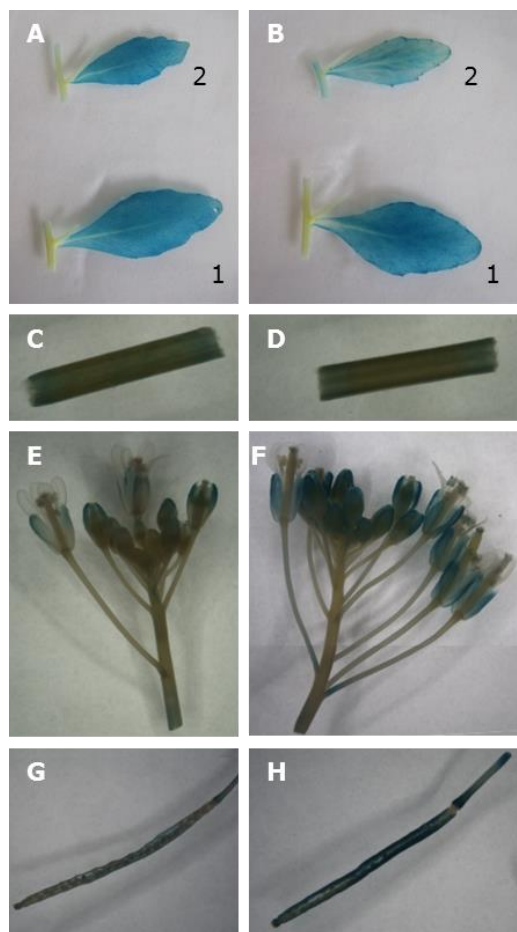


**Figura 69.** Localización histoquímica de la actividad GUS en las raíces de las plantas *patEx1::GUS* de 10 y 12 días, recogidas después de 6 horas del periodo de luz. *patEx1::GUS* se expresa (A) en el primordio de una raíz lateral, (B) en una raíz lateral emergente, (C y D) en la base de raíces laterales más prolongadas.

### 3.2.4. Expresión en la aparición del tallo floral

A las tres semanas, la mayoría de las hojas roseta se han desarrollado y están completamente expandidas, y se alarga el tallo principal. A las cuatro semanas, surgen las hojas laterales o caulinares. La expresión de *patEx1::GUS* y *patEx2::GUS* es homogénea tanto en la primera como en la segunda hoja lateral (Figura 70 A y B, respectivamente). El fragmento del segundo internodo del tallo muestra una expresión muy débil en las plantas *patEx1::GUS* y del *patEx2::GUS* (Figura 70 C y D, respectivamente).

Asimismo, la expresión de *patEx1::GUS* y *patEx2::GUS* se detectó en los sépalos de los botones florales y de las flores—los tejidos verdes de los órganos reproductores—estando los sépalos de las plantas *patEx2::GUS* más teñidos que los de las plantas *patEx1::GUS* (Figura 70 E y F). Por último, la tinción GUS de las silicuas *patEx1::GUS* es más débil que en las silicuas *patEx2::GUS*. En ambas plantas, la expresión se concentra en el ovario, en el estilo, en el estigma, y en el pedúnculo (Figura 70 E y H).



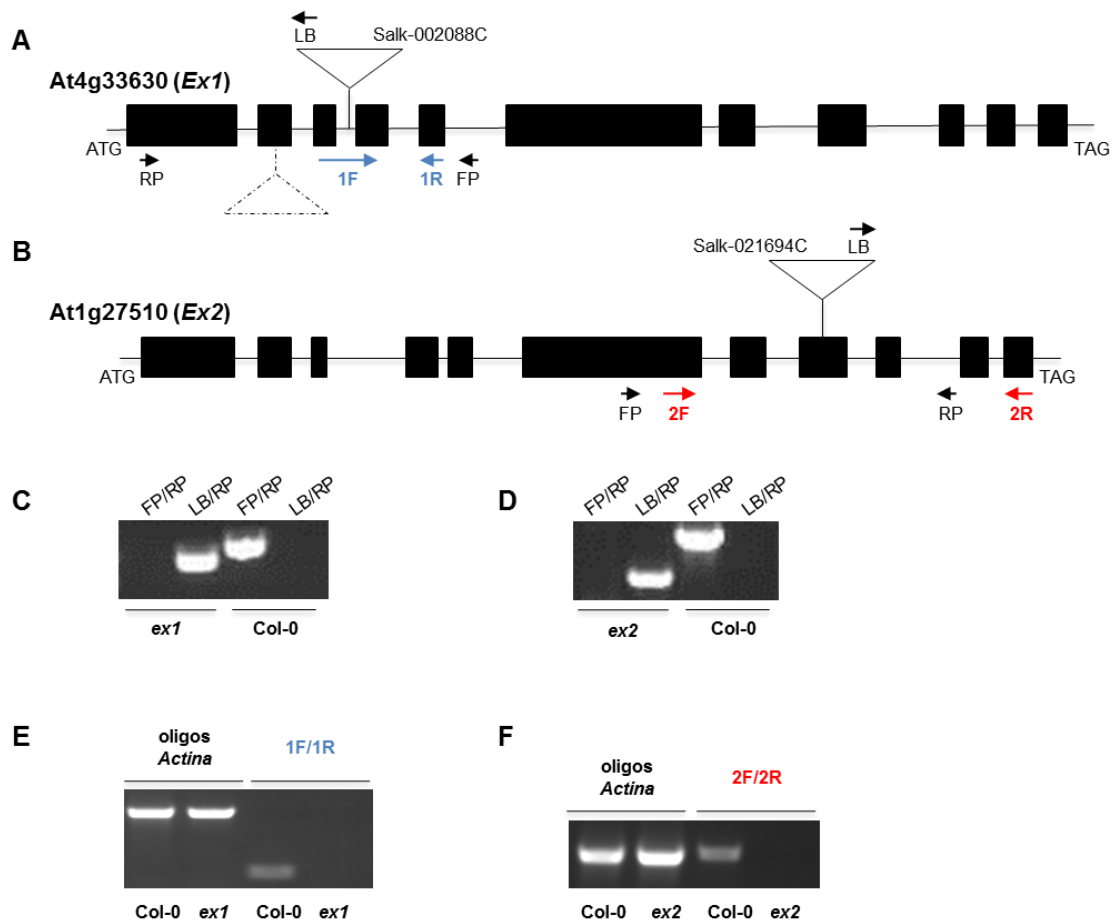
**Figura 70.** Localización histoquímica de la actividad GUS en órganos de plantas de 5-6 semanas que contienen (A, C, E, y G) el transgén *patEx1::GUS*, y (B, D, F, y H) el transgén *patEx2::GUS*, recogidas después de 6 horas del periodo de luz. Las imágenes A y B corresponden (1) a la primera y (2) a la segunda hoja lateral; las imágenes C y D, a un fragmento del segundo internodo del tallo; las imágenes E y F, a los botones florales y a las flores; y las imágenes G y H, a las silicuas.

### 3.3. Análisis del fenotipo en plantas mutantes

#### 3.3.1. Líneas mutantes

Para determinar como afecta la pérdida de *Ex1* y de *Ex2* en la planta, se analizó el fenotipo de las plantas mutantes *executer1* (*ex1*) y *executer2* (*ex2*). Para ello, se utilizaron dos líneas independientes de inserción de T-DNA que inactivan los genes *Ex1* y *Ex2*. La línea Salk-002088C contiene la inserción del T-DNA en el intrón 3 del gen *Ex1* (triángulo con línea discontinua de la Figura 71A), y la línea Salk-021694C contiene la inserción del T-DNA en el exón 8 del gen *Ex2* (Figura 71B) según la base de datos SIGnAL T-DNA Express. La presencia de las inserciones de T-DNA en homocigosis se confirmó mediante PCR a partir del ADN genómico aislado en plantas silvestres y mutantes *ex1* y *ex2* según el Apartado 7.2.1. En las plantas mutantes se amplificó el fragmento de ADN con los oligonucleótidos RP y LB, y no lo hizo con RP y FP; mientras que en las plantas silvestres sucedió lo contrario (Figura 71 C y D). La secuenciación con el oligonucleótido LB de la PCR (Figura 71C mutante *ex1* LB/RP, y D mutante *ex2* LB/RP) confirmó la inserción del T-DNA en el exón 8, y mostró que la inserción del T-DNA de la línea Salk-002088C en realidad se encuentra en el exón 2 (triángulo continuo Figura 71A), y no en el intrón 3 como señalaban las bases de datos. Por último, se aisló el

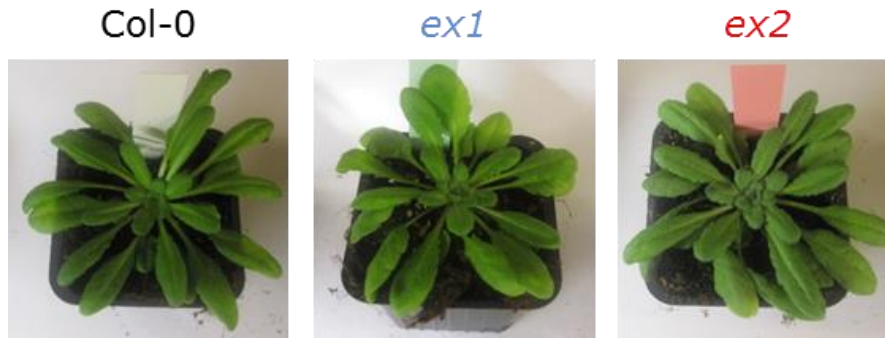
ARNm de las plantas Col-0, *ex1*, y *ex2* según el Apartado 7.3.1, y se sintetizó a ADN complementario según el Apartado 10.1. La ausencia de los transcritos de *Ex1* y de *Ex2* en las líneas de inserción de T-DNA se analizó mediante PCR utilizando oligonucleótidos que anillan alrededor de la inserción de los genes (Figura 71 E y F).



**Figura 71.** Comprobación de las líneas de inserción de T-DNA en homocigosis en los genes *Ex1* y *Ex2*, respectivamente. Los esquemas de los genes (A) *Ex1* y (B) *Ex2* muestran la organización génica. Las cajas negras son los exones, las flechas muestran las posiciones de los oligonucleótidos, y los triángulos indican las posiciones de las inserciones del T-DNA. (C y D) Productos de PCR obtenidos con las combinaciones de oligonucleótidos LB + RP y FP + RP a partir de ADN genómico. (E y F) Los niveles de transcritos se detectaron mediante PCR con los oligonucleótidos 1F + 1R en el caso de *Ex1*, y 2F + 2R en el caso de *Ex2* a partir de ADN complementario. Como control se utilizaron los oligonucleótidos del gen *Actina*.

### 3.3.2. Análisis del fenotipo de las hojas roseta

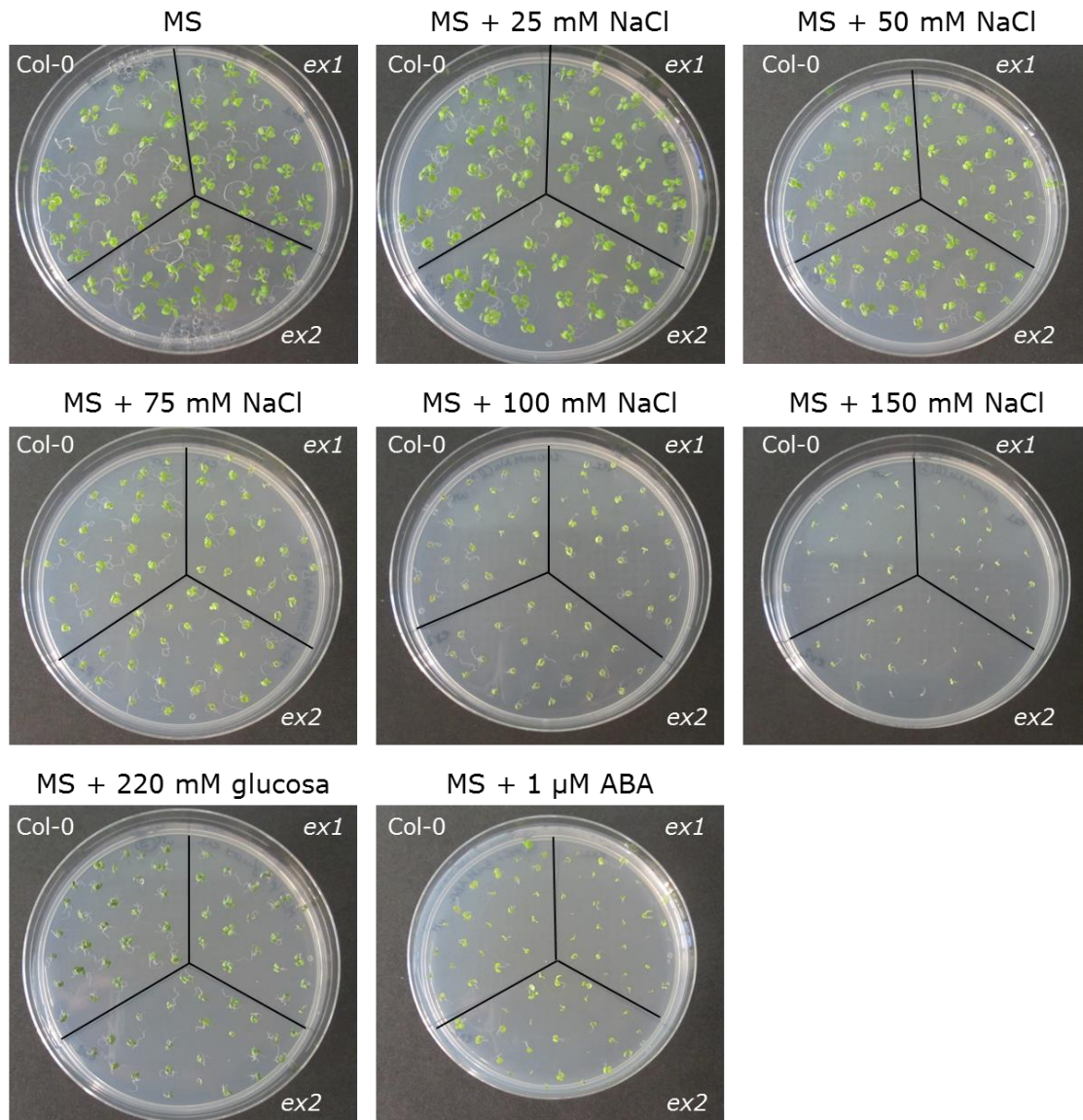
Tanto el gen *Ex1* como el gen *Ex2* se expresan en hojas roseta según el análisis de cuantificación relativa qRT-PCR y el ensayo de tinción GUS. Para ver si las plantas mutantes *ex1* y *ex2* muestran un fenotipo diferente al de las plantas silvestres, se crecieron plantas durante 6-8 semanas en condiciones controladas. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia en el fenotipo de las plantas (Figura 72). Las plantas mutantes *ex1* y *ex2* muestran un crecimiento y un desarrollo muy similar a las plantas silvestres, tal y como se observó previamente en otros trabajos (Wagner *et al.* 2004, Lee *et al.* 2007, Kim y Apel 2013a).



**Figura 72.** Plantas de *Arabidopsis silvestres* (Col-0) y mutantes *ex1* y *ex2* crecidas con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 horas oscuridad a 21 °C a  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 8 semanas.

### 3.3.3. Análisis de plantas en estadio cotiledón en diferentes condiciones

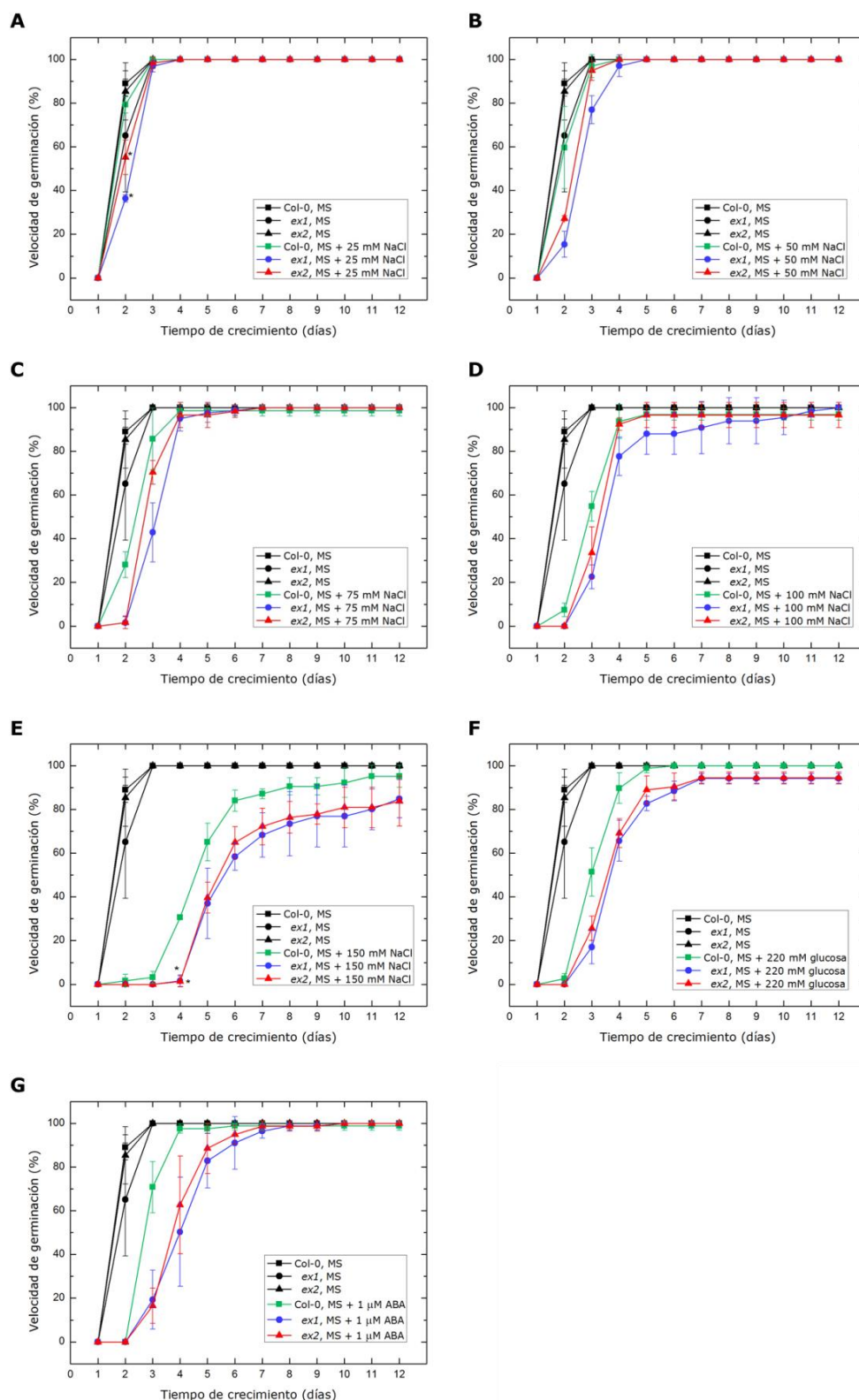
Como las plantas mutantes *ex1* y *ex2* no muestran ningún fenotipo característico en condiciones normales, se llevaron a cabo ensayos de germinación para ver cómo responden las plantas al estrés iónico osmótico (25, 50, 75, 100, y 150 mM NaCl), a los azúcares (220 mM glucosa), o a la señalización por estrés abiótico (1  $\mu\text{M}$  ABA) (Figura 73). Se observó que en condiciones normales las plantas silvestres y los mutantes germinan a la misma velocidad (Figura 74, medio MS), y la cotiledones verdes aparecen a un tiempo similar (Figura 75, medio MS). En medio MS con NaCl, glucosa, y ABA, las plantas mutantes también germinan de forma comparable a las silvestres (Figura 74), y los cotiledones verdes aparecen a un tiempo similar (Figura 75). Únicamente se detectaron diferencias significativas (test t de Student,  $P < 0.001$ ) entre las plantas mutantes *ex1* y de *ex2* y las silvestres en la velocidad de germinación el día 2 en 25 mM NaCl, y el día 4 en 150 mM NaCl (Figura 74); y en la aparición de los cotiledones verdes el día 7 y 8 en 220 mM glucosa (Figura 75). Por lo que estos resultados sugieren que las proteínas Ex1 y Ex2 no están involucradas en la respuesta a estrés iónico osmótico, en la percepción y señalización por azúcares, ni en la señalización por estrés abiótico mediada por ABA.



**Figura 73.** Plantas de *Arabidopsis silvestres* (Col-0) y mutantes *ex1* y *ex2* de 12 días crecidas con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 horas oscuridad a 22 °C a  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en placas estériles con medio MS con NaCl, glucosa, y ABA.

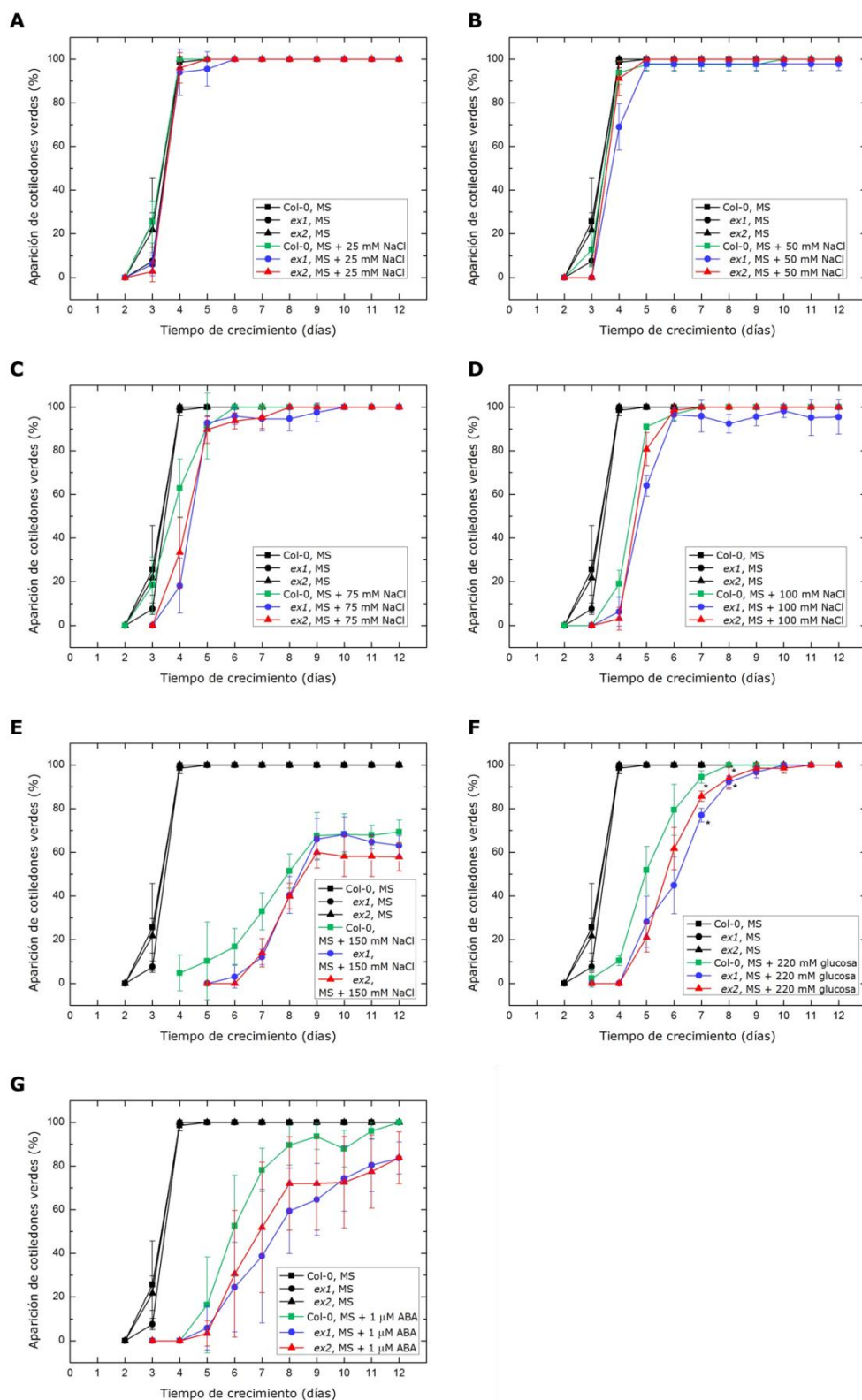


## Resultados



**Figura 74.** Velocidad de germinación y aparición de los cotiledones verdes en plantas de *Arabidopsis silvestres* (Col-0) y mutantes *ex1* y *ex2* crecidas durante 12 días con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 horas oscuridad a 22 °C a  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en placas estériles con medio MS con (A) 25 mM NaCl, (B) 50 mM NaCl, (C) 75 mM NaCl, (D) 100 mM NaCl, (E) 150 mM NaCl, (F) 220 mM glucosa, y (G) 1  $\mu\text{M}$  de ABA. Los datos representados en las gráficas corresponden a la media, y las barras de error indican la desviación estándar de tres réplicas biológicas con 20 plantas cada una (60 plantas en total). Los asteriscos del gráfico indican los porcentajes de germinación de los mutantes *ex1* y *ex2* que son

significativamente diferentes a las plantas silvestres con una probabilidad inferior al 0.001 (test t de Student).



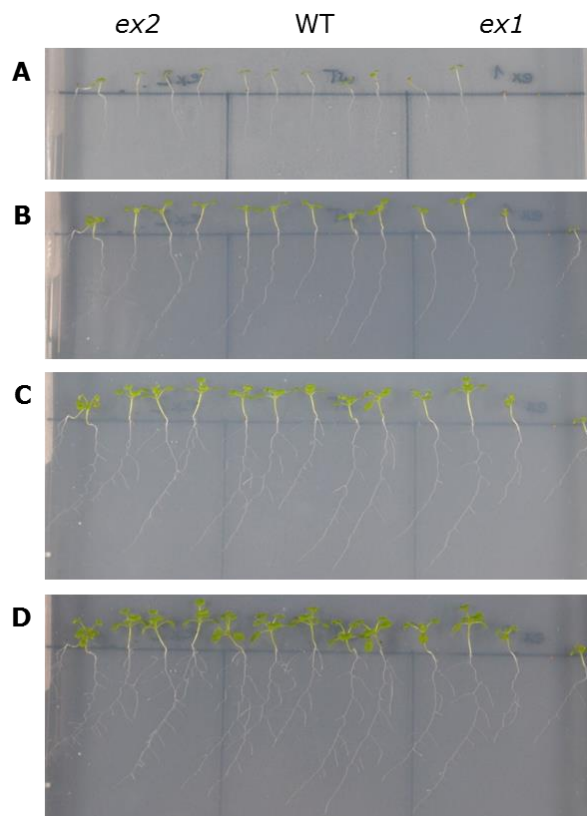
**Figura 75.** Porcentaje de plántulas de *Arabidopsis silvestres* (Col-0) y mutantes *ex1* y *ex2* con los cotiledones verdes crecidas durante 12 días con un fotoperíodo de 8 horas luz y 16 horas oscuridad a 22 °C a  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en placas estériles con medio MS con NaCl, glucosa, y ABA. Los datos representados en las gráficas corresponden a la media, y las barras de error indican la desviación estándar

## Resultados

de tres réplicas biológicas con 20 plantas cada una (60 plantas en total). Los asteriscos del gráfico indican los porcentajes de plántulas con los cotiledones verdes de los mutantes *ex1* y *ex2* que son significativamente diferentes a las plantas silvestres con una probabilidad inferior al 0.001 (test t de Student).

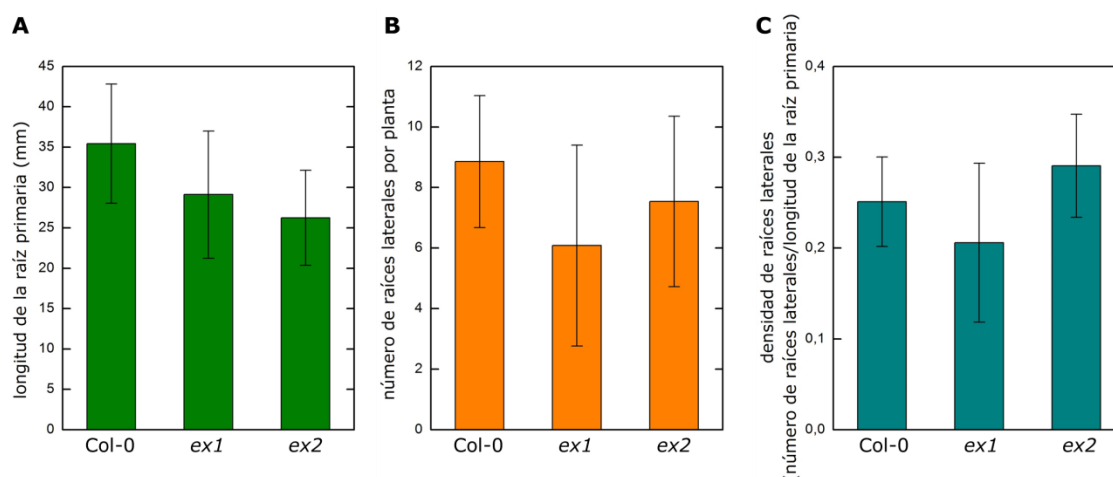
### 3.3.4. Análisis en raíces

Debido a la expresión en raíces del gen *Ex1* detectada mediante qRT-PCR y en las plantas *patEx1::GUS*, y del gen *Ex2* encontrada en los análisis qRT-PCR aunque no en las plantas *patEx2::GUS*, se analizó el efecto de la pérdida de *Ex1* y de *Ex2* en el crecimiento de las raíces. Se realizaron medidas de la longitud de la raíz primaria, del número de raíces laterales por planta, y de la densidad de raíces laterales en plantas silvestres y mutantes *ex1* y *ex2*. Sin embargo, los resultados no muestran ninguna diferencia entre las raíces de las plantas mutantes y de las silvestres crecidas con un fotoperiodo corto (8 h luz/16 h oscuridad) durante 21 días (Figura 76 y 77). Esto indica que las proteínas *Ex1* y *Ex2* no son esenciales para el crecimiento de la raíces ni en la formación de raíces laterales.



**Figura 76.** Plantas de *Arabidopsis* silvestres (Col-0) y mutantes *ex1* y *ex2* de 21 días crecidas con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 horas oscuridad a 22 °C a  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  en placas estériles con medio MS durante 21 días. Las imágenes muestran las plantas a los (A) 6, (B) 12, (C) 17, y (D) 21 días.





**Figura 77.** **A)** Longitud de la raíz primaria de 14 plantas silvestres (Col-0), de 12 plantas mutantes *ex1*, y de 15 plantas mutantes *ex2*. **B)** Número de raíces laterales por planta de 14 plantas silvestres (Col-0), de 12 plantas mutantes *ex1*, y de 13 plantas mutantes *ex2*. **C)** Densidad de raíces laterales de 14 plantas silvestres (Col-0), de 12 plantas mutantes *ex1*, y 13 plantas mutantes *ex2*. Las plantas crecieron durante 21 días con un fotoperiodo de 8 horas luz y 16 horas oscuridad a 22 °C a 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en placas estériles con medio MS. Los datos representados en las gráficas corresponden a la media, y las barras de error a la desviación estándar.

#### 4. Análisis proteómico del cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*

El objetivo de este Apartado es analizar la respuesta del proteoma soluble del cloroplasto de plantas de 8 semanas de *Arabidopsis* crecidas en luz normal (NL) y a continuación expuestas a una intensidad alta de luz (HL), con una densidad de flujo de fotones cinco veces mayor a la condición NL. Se utilizaron las plantas mutantes *executer1* y *executer2* junto con las plantas silvestres para tratar de averiguar la relación entre las proteínas Executer y la respuesta de aclimatación de las plantas una vez expuestas al tratamiento lumínico.

##### 4.1. Rendimiento fotosintético de las plantas mutantes *ex1* y *ex2* en comparación con las silvestres

Se analizó el papel que desempeñan las proteínas Executer en la respuesta del cloroplasto a un cambio en la intensidad de la luz utilizando tres genotipos diferentes de *A. thaliana* (ecotipo silvestre Col-0 y mutantes *ex1* y *ex2*) en dos tratamientos lumínicos diferentes (una intensidad de luz normal y otra alta). Se sugirió que las proteínas Executer pueden estar localizadas cerca del centro del reacción del fotosistema II (Kim y Apel 2013b). Por esta razón, se evaluó el rendimiento del fotosistema II a través de las medidas de la fluorescencia de la clorofila *a* a temperatura ambiente en hojas de las plantas silvestres Col-0 y mutantes *executer* expuestas a dos intensidades de luz diferentes (NL y HL) durante 6 horas. Se calculó el ratio de la fluorescencia variable respecto a la fluorescencia máxima ( $F_v/F_m$ ), el rendimiento cuántico del transporte de electrones en el PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), el grado de atenuación no fotoquímica (NPQ, *non-photochemical quenching*), y la presión de excitación del PSII ( $1-qP$ ) y no se observaron diferencias entre las plantas mutantes y las silvestres (Tabla 18). El tratamiento HL supuso una disminución del 5 % del  $F_v/F_m$  tanto de las plantas mutantes como de las plantas silvestres.

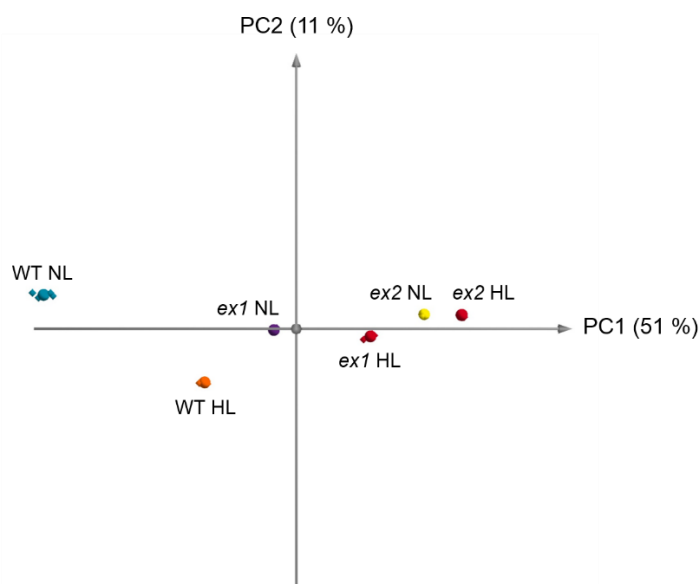
**Tabla 18.** El rendimiento del PSII de hojas intactas de plantas silvestres y plantas mutantes *executer* expuestas a los tratamientos lumínicos NL y HL se examinó mediante medidas de la fluorescencia de la clorofila *a* utilizando el fluorímetro de pulsos de amplitud modulada Dual-PAM-100 (Heinz Walz). A partir de los datos obtenidos se calcularon los siguientes parámetros: la eficiencia fotoquímica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ), el rendimiento cuántico del transporte de electrones en el PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), el grado de *quenching* no fotoquímico (NPQ), y la presión de excitación del PSII ( $1-qP$ ). Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. Según el análisis de la varianza (ANOVA), no se encontraron diferencias significativas entre las plantas silvestres y las mutantes expuestas al mismo tratamiento lumínico.

Parámetro	WT NL	WT HL	<i>ex1</i> NL	<i>ex1</i> HL	<i>ex2</i> NL	<i>ex2</i> HL
$F_v/F_m$	0.82 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.02	0.83 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.01	0.75 $\pm$ 0.04
NPQ	1.79 $\pm$ 0.10	1.53 $\pm$ 0.25	1.53 $\pm$ 0.13	1.22 $\pm$ 0.18	1.63 $\pm$ 0.16	1.24 $\pm$ 0.03
$\Phi_{\text{PSII}}$	0.18 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.04
$1-qP$	0.72 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.04	0.76 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.05

#### 4.2. Análisis 2D-DIGE del proteoma soluble del cloroplasto

Para evaluar cómo afecta la pérdida de las proteínas *Executer* a los cloroplastos, se analizó el efecto de la luz en el proteoma soluble del cloroplasto tanto en plantas mutantes *executer* como en las plantas silvestres. Las plantas crecieron a  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 8 semanas. A continuación, las plantas se expusieron a una alta intensidad de luz ( $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante 6 horas (Apartado 5.2 de Materiales y Métodos), y se aislaron las proteínas solubles del cloroplasto a partir de las hojas roseta (Apartado 39 y 40 de Materiales y Métodos). El extracto de proteína soluble del cloroplasto se analizó mediante 2D-DIGE (Apartado 41 de Materiales y Métodos) siguiendo el diseño experimental de la Tabla 13.

El análisis DIGE revela diferencias significativas entre las plantas mutantes *executer* y las plantas silvestres, en la condición de luz normal (WT NL, *ex1* NL, y *ex2* NL), y en respuesta a la exposición a una alta intensidad lumínica (WT HL, *ex1* HL, y *ex2* HL). Las diferencias del proteoma soluble del cloroplasto se observan en el análisis de componentes principales (PCA) (Figura 78). Existe una gran diferencia entre las plantas silvestres en condiciones normales de luz (NL) y a alta intensidad de luz (HL), y entre las plantas mutantes *executer* y las silvestres según el primer componente principal (PC1) (Figura 78).



**Figura 78.** El análisis de componentes principales (PCA) del conjunto de todos los datos muestra una clara separación de los grupos experimentales: las plantas silvestres WT y mutantes *executer* (*ex1* y *ex2*) en los dos tratamientos lumínicos (NL y HL). El primer componente principal (PC1) indica la dirección de máxima variabilidad de los datos, es decir, que explica la mayor diversidad de los datos debido a que los datos se dispersan de una forma máxima en esa dirección. El segundo componente principal (PC2)–cuya dirección es ortogonal respecto al PC1–explica la variabilidad restante, menor a la del PC1. Las siguientes componentes principales (PC3, PC4... PCn) explican mucha menor variabilidad de los datos, por lo que no están representadas en el gráfico. En este caso, el PC1 explica el 51 % de la variabilidad, y el PC2 el 11 % de variabilidad. En el PCA se observa una separación del proteoma cada genotipo después del tratamiento lumínico. En la dimensión PC1, los genotipos mutantes *ex1* y *ex2* tienden hacia valores más positivos que el silvestre. En cambio, en la dimensión PC2 las diferencias de cada genotipo entre el tratamiento NL y HL son muy pequeñas.

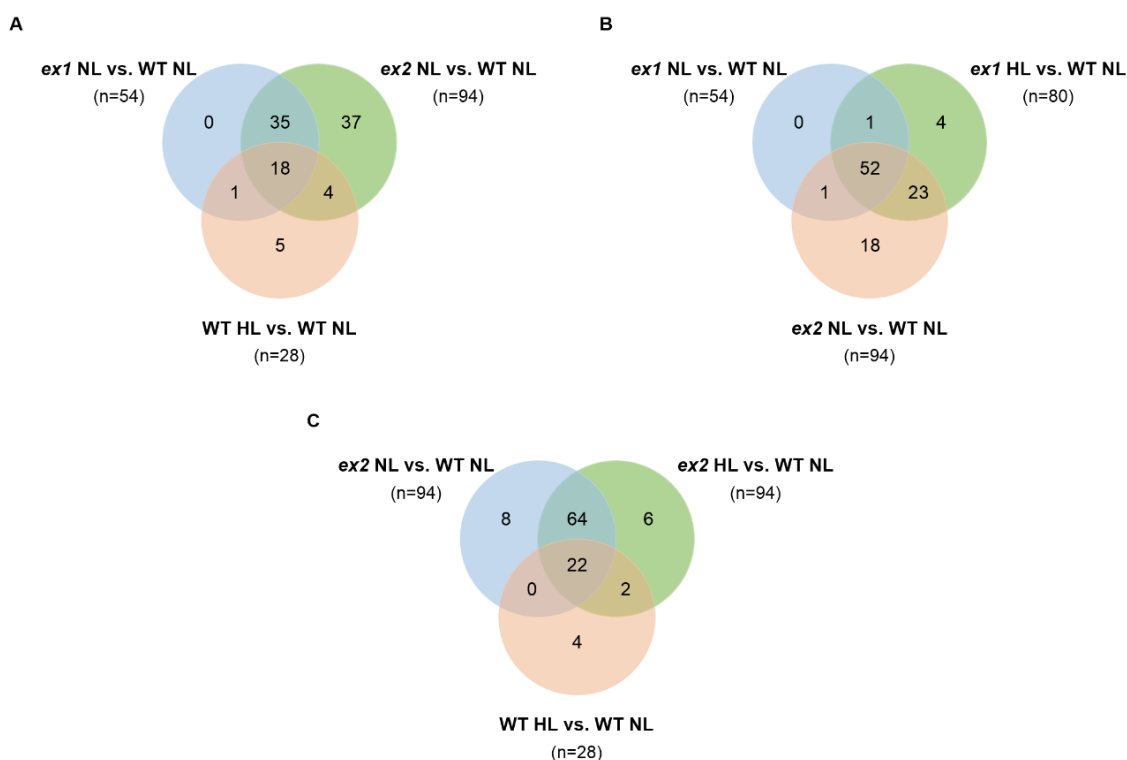
La Tabla 19 muestra el número de proteínas del cloroplasto soluble que tienen alterado su nivel de expresión en las plantas de *Arabidopsis* silvestres, *ex1*, y *ex2* en las dos condiciones lumínicas NL y HL. La mayoría de los cambios observados en el proteoma son proteínas activadas, independientemente del genotipo o del tratamiento lumínico, siendo el proteoma de *ex2* en el que mayores son los cambios.

**Tabla 19.** Número de “spots” diferencialmente expresados (activados o inhibidos) en respuesta al genotipo (plantas silvestres (WT), mutantes *ex1* y *ex2*) y al tratamiento lumínico (NL y HL), con un fold-change superior a 2, y un valor p inferior a 0.001 en el test ANOVA.

Comparación de grupos	Número total de "spots" que cambian	Número de "spots" activados	Número de "spots" inhibidos
WT HL vs. WT NL	28	23	5
<i>ex1</i> NL vs. WT NL	54	40	14
<i>ex2</i> NL vs. WT NL	94	64	30
<i>ex1</i> HL vs. WT NL	80	53	27
<i>ex2</i> HL vs. WT NL	94	65	29

## Resultados

En condiciones de luz normal (NL), se detectaron 54 y 94 “spots” de proteínas que cambian en *ex1* NL y en *ex2* NL respecto a WT NL, respectivamente (Tabla 19). En el diagrama de Venn, donde se comparan las plantas mutantes *executer* en condiciones de luz normal respecto a las plantas silvestres en luz normal, se detectaron 41 “spots” (37+4) exclusivos de plantas *ex2* en condiciones normales de luz (Figura 79A). A las 6 horas de exposición de las plantas silvestres a una alta intensidad de luz, se detectaron 28 “spots” (1+18+4+5) que se expresan diferencialmente respecto a las plantas silvestres crecidas en luz normal (Figura 79A). 23 “spots” (1+18+4)–que representan más del 82 % (23/28\*100)–se expresan diferencialmente en plantas silvestres a altas intensidades de luz (WT HL vs. WT NL), y en las plantas mutantes en condiciones normales de luz (*ex1* NL vs. WT NL y/o *ex2* NL vs. WT NL) (Figura 79A). Cuando las plantas *ex1* se exponen a una alta intensidad de luz durante 6 horas (*ex1* HL vs. WT NL) se detectaron 27 “spots” (23+4) que no se expresan diferencialmente en plantas *ex1* crecidas en luz normal (*ex1* NL vs. WT NL) (Figura 79B). Sorprendentemente, se encontraron 23 spots que comparten en común *ex1* HL vs. WT NL y *ex2* NL vs. WT NL, y no aparecen en *ex1* NL vs. WT NL (Figura 79B). Se encontraron pocas diferencias entre los grupos experimentales *ex2* NL vs. WT NL y *ex2* HL vs. WT NL, porque comparten el 91 % ((64+22)/94\*100) de “spots” (Figura 79C). En resumen, se observaron 37 “spots” diferencialmente expresados únicamente en el mutante *ex2* respecto a las plantas silvestres (*ex2* NL vs. WT NL, Figura 79A), y 18 “spots” diferencialmente expresados únicamente en las plantas *ex2* (*ex2* NL vs. WT NL, Figura 79B).



**Figura 79.** Los análisis de los diagramas de Venn muestran la distribución de los “spots” de proteínas comunes y diferenciales obtenidos de la aproximación DIGE en preparaciones del estroma de plantas de *Arabidopsis* según el genotipo y el tratamiento lumínico. La referencia que se utiliza en todas las comparaciones es la muestra de plantas silvestres crecidas en condiciones normales de luz (WT NL). (A) Solapamiento de las proteínas diferencialmente expresadas en las plantas silvestres después de estar expuestas a una alta intensidad de luz (WT HL), y las mutantes *executer* crecidas en luz normal (*ex1* NL y *ex2* NL, respectivamente). (B) Solapamiento de las proteínas diferencialmente expresadas en las plantas

*ex2* después del tratamiento de alta intensidad de luz (*ex2* HL), y las plantas *executer* crecidas en condiciones normales de luz (*ex1* NL y *ex2* NL, respectivamente). (C) Solapamiento de las proteínas diferencialmente expresadas en las plantas silvestres expuestas a una alta intensidad lumínica (WT HL), y las plantas *executer2* expuestas a condiciones de luz normal (*ex2* NL) y de alta intensidad de luz (*ex2* HL).

### 4.3. Identificación y análisis de las proteínas diferencialmente expresadas

Se detectaron 107 “spots” a partir del análisis de imagen cuantitativo que se expresan diferencialmente entre los genotipos y los tratamientos lumínicos. De los 107 “spots” diferencialmente expresados, se consiguieron escindir 90 “spots” de los geles teñidos con CBB, que se analizaron mediante espectrometría de masas. Se descartaron los “spots” correspondientes a la albúmina de suero bovino (BSA) y a las mezclas de proteínas. Se encontraron varios “spots” distintos de las mismas proteínas que corresponden a diferentes isoformas o proteínas diferencialmente modificadas en los extractos proteicos o a productos de degradación. Finalmente, se identificaron 47 “spots” que corresponden a 29 proteínas (Tablas 20 y 21, Figura 80 y 81). Las proteínas identificadas se clasificaron en los siguientes grupos funcionales: fotosíntesis y fijación de carbono, generación de energía, metabolismo de ARN, plegamiento de proteínas, y otros procesos metabólicos como el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de tetrapirroles, además de proteínas de función desconocida.

#### Cadena de transporte de electrones fotosintético

La isoforma 2 de la proteína Ferredoxina-NADP reductasa, que media la transferencia de electrones de la ferredoxina al NADP, y dos proteínas del complejo de fotólisis/oxidación del agua o complejo productor de oxígeno (OEC, *oxygen evolving complex*) del fotosistema II—las isoformas de PsbO (PsbO-1 y PsbO-2) y PsbP—son más abundantes en la fracción soluble del cloroplasto de las plantas mutantes *executer* que en la fracción soluble de las plantas silvestres. Se observa un patrón similar en WT HL vs. WT NL, excepto para las proteínas OEC. Las dos subunidades periféricas alfa y beta de la ATP sintasa están afectadas significativamente en las plantas mutantes, con un incremento en la cantidad de la subunidad alfa (ATP  $\alpha$ ) en el estroma y con un patrón multiexpresión de la subunidad beta (ATP  $\beta$ ), por lo que no se puede clasificar ni en el grupo de proteínas activadas ni en el de inhibidas. Por otra parte, la subunidad gamma (ATP  $\gamma$ ) del estroma se acumula a altas intensidades de luz y no en condiciones de luz normal.

#### Metabolismo primario y secundario

Las enzimas del ciclo de Calvin-Benson fructosa-bifosfato aldolasa 2, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa B, fosfoglicerato quinasa, fosforibuloquinasa, transquetolasa, y Rubisco activasa se acumulan en las plantas mutantes *executer* en comparación con WT NL. Sin embargo, las enzimas ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa, fructosa-bifosfato aldolasa 1, y ribosa 5-fosfato isomerasa están inhibidas en las plantas mutantes. Estas enzimas del ciclo de Calvin-Benson, excepto la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa B, responden de igual forma en WT HL. La enzima del estroma glutamina sintetasa 2 (involucrada en el metabolismo del nitrógeno) y la glutamato-1-semialdehído 2,1-aminomutasa (implicada en la síntesis de tetrapirroles) están activadas en las plantas mutantes *executer* en condiciones de luz normal, y en las plantas silvestres y *executer* en condiciones de alta intensidad de luz. La cantidad de la proteína anhidrasa carbónica 1 aumenta en las plantas *executer* e incrementa un poco su cantidad después de la exposición a alta intensidad de luz. La glicerato 3-quinasa, proteína involucrada en el ciclo de la fotorespiración, aumenta en las plantas *ex2* y no varía en las plantas *ex1* NL ni en WT HL.

### **Síntesis de proteínas del cloroplasto y homeostasis**

Las subunidades alfa y beta de CPN60—una chaperona molecular que participa en el plegamiento de proteínas en los cloroplastos—aumenta en las plantas *executer* y aumenta un poco menos en las plantas WT HL respecto a las plantas WT NL. Las proteínas de unión *stem-loop* del cloroplasto de 41 kDa (CSP41A y CSP41B), y la proteína ribosómica específica de plastidio 2 (PSRP-2), relacionadas con el metabolismo del ARN, aumentan significativamente sus niveles de expresión en las plantas *executer* y no en las plantas WT HL. En cambio, las ribonucleoproteínas cloroplastídicas CP29B y CP31A incrementan sus cantidades de proteínas en las plantas mutantes en condiciones de luz normal, y en las plantas silvestres y mutantes expuestas a altas intensidades de luz.

### **Otras proteínas**

Las dos proteínas cloroplastídicas de función desconocida (Tabla 21) aumentan en las plantas mutantes *executer*. Los “spots” 122 y 183 corresponden a una proteína que contiene la región repetida tetratricopéptido (TPR)—que media en interacción proteína-proteína y está involucrado en el ensamblaje de complejos multiproteicos—según el análisis de secuencia de la proteína (Ishikawa *et al.* 2005). El spot 200 es una proteína de 19 kDa localizada en el lumen del cloroplasto (Schubert *et al.* 2002).

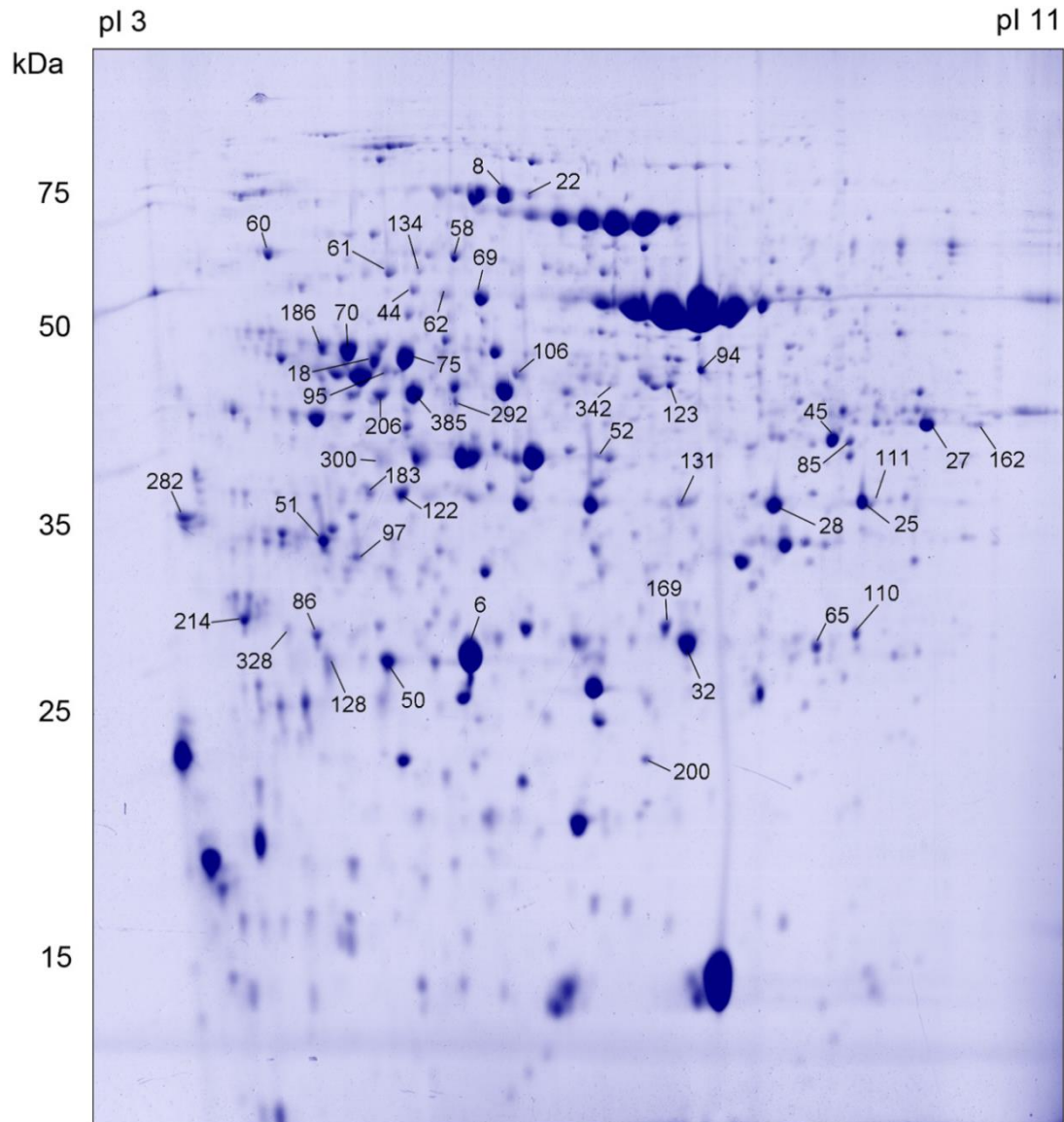
**Tabla 20.** Proteínas diferencialmente expresadas identificadas mediante espectrometría de masas.

Spot <sup>a</sup>	Gen	Anotación	Masa [Da]	Puntuación MASCOT	Péptidos identificados	Cobertura de secuencia (%)
6	AT1G06680.1	PSBP-1 (Fotosistema II subunidad P)	28078	105	10	47.0
8	AT3G60750.1	TKL (Transquetolasa)	79918	89	13	21.7
18	AT5G35630.1	GS2 (Glutamina sintetasa 2)	47381	136	17	39
22	AT3G60750.1	TKL (Transquetolasa)	79918	97	13	17.8
25	AT1G20020.1	FNR2 (Ferredoxina-NADP(+)-oxidoreductasa 2)	41142	156	21	55.0
27	AT1G09340.1	CSP41B (proteína de unión <i>stem-loop</i> del cloroplasto de 41 kDa, subunidad B)	42593	250	25	49.7
28	AT1G20020.1	FNR2 (Ferredoxina-NADP(+)-oxidoreductasa 2)	41142	156	20	55.0
32	AT3G01500.1	CA1 (Anhidrasa carbónica 1)	29485	162	13	52
44	ATCG00480.1	ATPB (ATPasa subunidad $\beta$ )	53900	62	9	24.7
45	AT3G63140.1	CSP41A (proteína de unión <i>stem-loop</i> del cloroplasto de 41 kDa, subunidad A)	43903	147	18	39.9
50	AT1G06680.2	PSBP-1 (Fotosistema II subunidad P)	23744	101	10	56
51	AT5G66570.1	PSBO-1(Fotosistema II subunidad O)	35121	214	18	50
52	AT4G38970.2	FBA-2 (Fructosa-bifosfato aldolasa 2)	41318	87	10	20.2
58	AT1G55490.1	CPN60B (Chaperonina 60 subunidad $\beta$ )	63770	228	24	46.7
60	AT2G28000.1	CPN60A (Chaperonina 60 subunidad $\alpha$ )	62034	247	25	43
61	ATCG00120.1	ATPA (ATPasa subunidad $\alpha$ )	55294	278	26	36.9
62	ATCG00480.1	ATPB (ATPasa subunidad $\beta$ )	53900	150	17	51.6
65	AT5G61410.1	RPE (Ribulosa-fosfato-3-epimerasa)	29990	117	12	44.5
69	ATCG00480.1	ATPB (ATPasa subunidad $\beta$ )	53900	108	13	38.6
70	AT2G39730.1	RCA (Rubisco activasa)	51948	138	14	37.8
75	AT5G35630.1	GS2 (Glutamina sintetasa 2)	47381	144	18	50
85	AT4G04640.1	ATPCI (ATPasa subunidad $\gamma$ )	40886	172	19	46.4
86	AT3G04790.1	RPI (Ribosa 5-fosfato isomerasa)	29287	99	7	22.8

94	AT1G42970.1	GAPB (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa subunidad B)	47630	205	22	36.0
95	AT5G35630.1	GS2 (Glutamina sintetasa 2)	47381	130	14	23
97	AT3G50820.1	PSBO-2 (Fotosistema II subunit O-2)	34998	108	11	39
106	AT1G56190.2	PGK (Fosfoglicerato quinasa)	42589	115	13	37
110	AT3G01500.1	CA1 (Anhidrasa carbónica 1)	29485	86	10	24
111	AT1G20020.1	FNR2 (Ferredoxina-NADP(+)-oxidoreductasa 2)	41142	97	11	26.8
122	AT1G55480.1	Desconocida	37387	282	29	62.1
123	AT3G48730.1	GSA2 (Glutamato-1-semialdehído 2 1-aminomutasa)	50109	165	25	44
128	AT1G06680.2	PSBP-1 (Fotosistema II subunit P-1)	23744	59	6	36
131	AT1G20020.1	FNR2 (Ferredoxina-NADP(+)-oxidoreductasa 2)	41142	106	14	28.5
134	ATCG00120.1	ATPA (ATPasa subunidad $\alpha$ )	55294	195	19	31.4
162	AT1G09340.1	CSP41B (proteína de unión <i>stem-loop</i> del cloroplasto de 41 kDa, subunidad B)	42593	73	10	31.7
169	AT3G52150.1	PSRP-2 (proteína ribosómica específica del plastidio 2)	27731	85	9	30.0
183	AT1G55480.1	Desconocida	37387	166	18	47.2
186	AT2G39730.1	RCA (Rubisco activasa)	51948	145	17	32.9
200	AT3G63525.1	TL19 (proteína del lumen tilacoidal 19 kDa)	19867	120	11	44.1
206	AT1G32060.1	PRK (Fosforibuloquinasa)	44436	164	20	48.6
214	AT2G37220.1	CP29B (ribonucleoproteína cloroplastídica de 29 kDa)	30699	193	15	33
282	AT4G24770.1	CP31A (proteína de unión a ARN de 31 kDa)	35766	102	10	24
292	AT1G80380.3	GLYK (D-glicerato 3-quinasa)	40794	133	15	36.5
300	AT2G21330.3	FBA-1 (Fructosa-bifosfato aldolasa 1)	41781	66	9	26.0
328	AT3G04790.1	RPI (Ribosa 5-fosfato isomerasa)	29287	71	6	18.1
342	AT3G48730.1	GSA2 (Glutamato-1-semialdehído 2 1-aminomutasa)	43903	66	18	24
385	AT1G32060.1	PRK (Fosforibuloquinasa)	44436	262	29	74

<sup>a</sup> Número de spot que se correlaciona con los números de la Tabla 21.





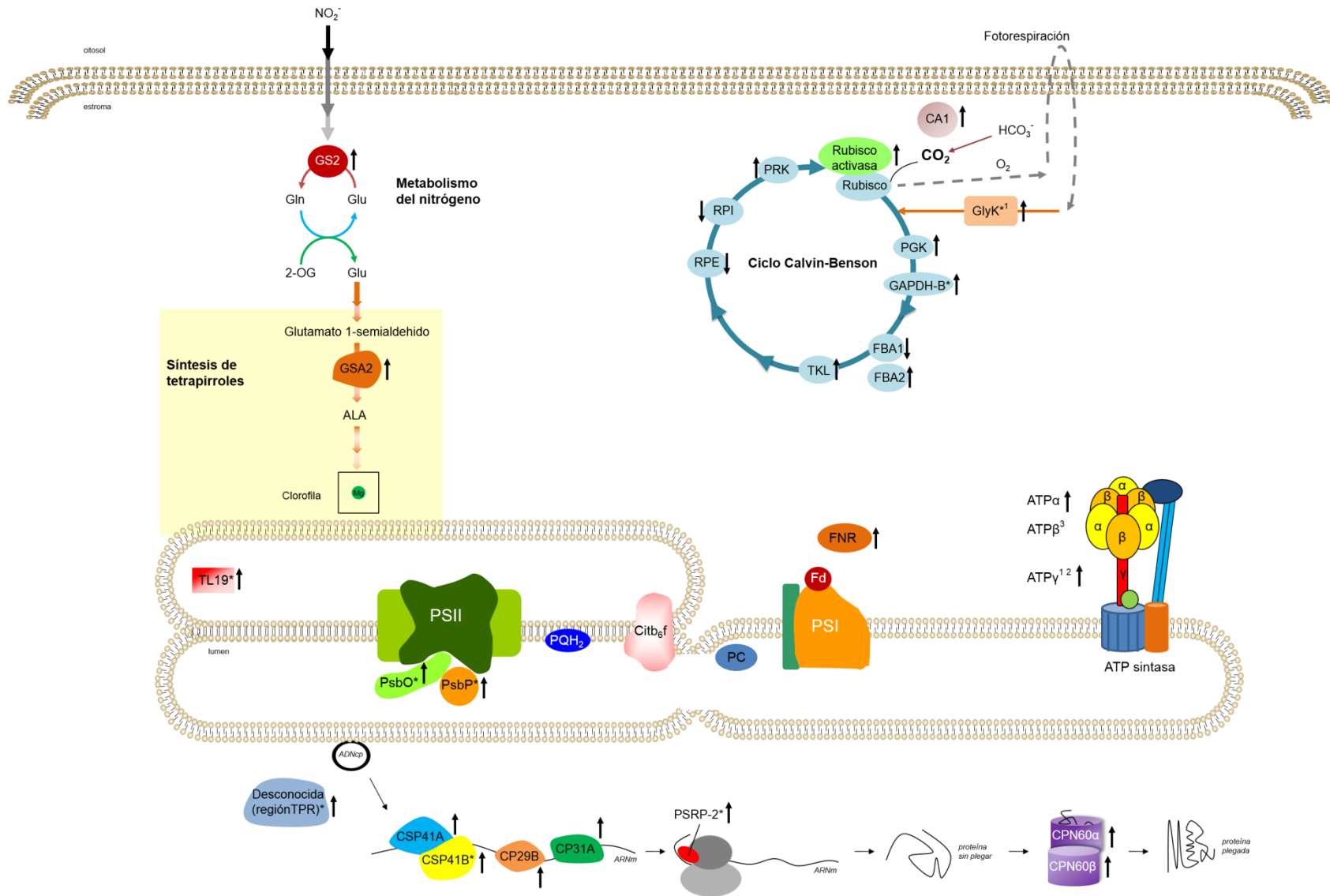
**Figura 80.** Gel bidimensional teñido con CBB del proteoma soluble del cloroplasto de *Arabidopsis thaliana*. Las posiciones y los números de los 47 spots identificados de la Tabla 21 se muestran en la imagen.

## Resultados

**Tabla 21.** Resumen de las proteínas diferencialmente expresadas identificadas por espectrometría de masas. La clasificación funcional (GRUPO) y el número de acceso de los genes (GEN). El *fold-change* de las proteínas se representa en un código de color, los valores >1 o <1 indican el aumento o la disminución de la cantidad de proteína, respectivamente. Abreviaturas: TCA, ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

GRUPO	PROTEÍNA	GEN	Número de "spot"	WT HL	ex1 NL	ex2 NL	ex1 HL	ex2 HL
Fotosíntesis. Ciclo de Calvin-Benson.	Ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa	At5g61410	65					
	Fructosa-bifosfato aldolasa 1	At2g21330	300					
	Fructosa-bifosfato aldolasa 2	At4g38970	52					
	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa B	At1g42970	94					
	Fosfoglicerato quinasa	At1g56190	106					
	Fosforibuloquinasa	At1g32060	206 385					
	Ribosa 5-fosfato isomerasa	At3g04790	86 328					
	Transquetolasa	At3g60750	8, 22					
	Rubisco activasa	At2g39730	70, 186					
	Fotosíntesis. Reacciones lumínicas.	PsbP	At1g06680	6, 50, 128				
PsbO-1		At5g66570	51					
PsbO-2		At3g50820	97					
FNR-2		At1g20020	25, 28, 131 111					
TCA,	Anhidrasa carbónica 1	At3g01500	32, 110					
Fotorespiración	D-glicerato 3-quinasa	At1g80380	292					
Metabolismo del ATP	ATP- $\alpha$	ATCG00120	61, 134					
	ATP- $\beta$	ATCG00480	44					
			62					
			69					
ATP- $\gamma$	At4g04640	85						
Metabolismo del nitrógeno	Glutamina sintetasa-2	At5g35630	18					
			75, 95					
Metabolismo del ARN	CSP41A (RAP41)	At3g63140	45					
	CSP41B (RAP38)	At1g09340	27					
			162					
	PSRP-2	At3g52150	169					
	CP29B	At2g37220	214					
CP31A	At4g24770	282						
Plegamiento de proteínas	CPN60 $\alpha$	At2g28000	60					
	CPN60 $\beta$	At1g55490	58					
Síntesis de tetrapirroles	Glutamato-1-semialdehído 2 1-aminomutasa 2	At3g48730	123					
			342					
Otros	Desconocida	At1g55480	122, 183					
	TL19	At3g63540	200					





## Resultados

**Figura 81.** Representación esquemática de las proteínas cloroplásticas afectadas en las plantas silvestres después del tratamiento de alta intensidad de luz (WT HL), y las mutantes *executer* expuestas a luz normal (*ex1* NL y *ex2* NL) y a alta intensidad de luz lumínico (*ex1* HL y *ex2* HL) en comparación con las plantas silvestres crecidas en luz normal (WT NL), como se muestra en la Tabla 21. Un asterisco (\*) indica que la proteína no está diferencialmente expresada en WT HL, <sup>1</sup> indica que la proteína no se expresa diferencialmente en *ex1* NL, <sup>2</sup> indica que la proteína no se expresa diferencialmente en *ex2* NL y, <sup>3</sup> indica una patrón multiexpresión. Abreviaturas: ATP $\alpha$ , ATP $\beta$  y ATP $\gamma$ , las subunidades de ATPasa alfa, beta y gamma, respectivamente; CA1, Anhidrasa carbónica 1; CP29B, ribonucleoproteína cloroplastídica de 29 kDa; CP31A, proteína de unión a ARN de 31 kDa; CPN60 $\alpha$  y CPN60 $\beta$ , subunidades alfa y beta de la chaperonina 60, respectivamente; CSP41A y CSP41B, subunidades A y B de la proteína de unión a ARN *stem-loop* cloroplastídica de 41 kDa, respectivamente; FBA1 y FBA2, subunidades 1 y 2 de la Fructosa-bifosfato aldolasa, respectivamente; FNR2, Ferredoxina-NADP(+)-oxidoreductasa 2; GAPDH-B, subunidad B de Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; GS2, Glutamina sintetasa-2; GSA2, Glutamato-1-semialdehído 2 1-aminomutasa; PGK, Fosfoglicerato quinasa; PRK, Fosforibuloquinasa; PsbO and PsbP, subunidades O y P del fotosistema II, respectivamente; PSRP-2, proteína ribosómica específica del plastidio 2; RCA, Rubisco activasa; RPE, Ribulosa-fosfato-3-epimerasa; RPI, Ribosa 5-fosfato isomerasa; TKL, Transquetolasa; TL19, proteína del lumen tilacoidal 19 kDa; GlyK, D-glicerato 3-quinasa; PQH<sub>2</sub>, Plastoquinol; cytb6f, Complejo Citocromo b6f; PC, Plastocianina; Fd, Ferredoxina; Gln, glutamina; Glu, glutamato; 2-OG, 2-oxoglutarato; ALA, 5-ácido aminolevulínico; PSII, Fotosistema II; and PSI, Fotosistema I.

# Discusión



## Discusión

El concepto de señalización retrógrada en plantas implica que señales emitidas por el cloroplasto (o la mitocondria) pueden regular la expresión de genes nucleares involucrados en la biogénesis del orgánulo o su funcionalidad. Aunque durante los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de los efectos de la señalización en la regulación de la expresión de genes nucleares, aún se desconocen muchos aspectos relacionados con el inicio y la transmisión de la señal en el orgánulo, así como sobre su modo de acción (Leister 2012, Estavillo *et al.* 2013). En cloroplastos, las señales propuestas más relevantes derivan de diversas fuentes como son ROS, el estado redox del plastidio, la expresión génica del orgánulo o de la ruta de biosíntesis de tetrapirroles. Recientemente, se ha propuesto además que metabolitos específicos pueden participar en algunas vías de señalización.

Los centros de reacción del PSI y PSII son el foco mayoritario de generación de ROS durante la fotosíntesis, y a su vez esta generación está altamente afectada por factores fisiológicos y ambientales. La luz es la fuente fundamental de energía para la fotosíntesis por lo que representa uno de los factores ambientales más importantes para los organismos fotosintéticos. En condiciones naturales, la mayoría de los organismos fotosintéticos están expuestos a cambios constantes de intensidad de luz, que incluso pueden variar en diversos órdenes de magnitud como consecuencia de cambios que ocurren a corto plazo (de segundos a minutos) como a largo plazo (de horas a meses). Para optimizar la fotosíntesis en diferentes condiciones de intensidad lumínica, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de adaptación y aclimatación que favorecen, por una parte, la eficiencia de la luz absorbida en condiciones de baja luminosidad, y por otra parte, minimizan el daño oxidativo como consecuencia de un exceso de luz (Apel y Hirt 2004, Kangasjärvi *et al.* 2009, Karpiński *et al.* 2013). Entre las estrategias y mecanismos de defensa desarrollados por los cloroplastos ante un cambio de intensidad de luz se encuentran cambios en la composición del tilacoide y en la estructura celular, lo que conlleva, entre otros, modificaciones en la síntesis de proteínas y de componentes fotosintéticos implicados en la coordinación de pigmentos.

Se ha demostrado que el oxígeno singlete es la principal ROS generada en cloroplastos sometidos a alta intensidad de luz (Fryer *et al.* 2002, Krieger-Liszkay *et al.* 2008). Estudios genéticos han señalado a las proteínas Executer como participantes de una de señalización mediada por la producción de oxígeno singlete en el PSII de plantas (Kim y Apel 2013b). Sin embargo, aún se desconoce su función específica en señalización y cuáles son las características que hacen que Executer sean importantes para la respuesta a estrés en plantas.

**Executer son proteínas específicas de plantas verdes.** Es ampliamente aceptada la idea de que la línea eucariota fotosintética, que incluye a las plantas, surgió como consecuencia de un único evento evolutivo que se inició con la incorporación de una cianobacteria en un protista no fotosintético. Tras este proceso de endosimbiosis primaria, las plantas evolucionaron en tres líneas, que incluyen las rodofitas, glaucofitas y plantas verdes. Posteriormente, las plantas verdes se dividieron en clorofitas o algas verdes, y en otra línea que dió lugar a las estreptofitas. Las estreptofitas dieron lugar a las carofitas y a las plantas terrestres (embriofitas), que incluyen tanto a las plantas vasculares como no vasculares. El análisis comparativo de secuencias utilizando la información de los genomas depositados en las bases de datos biológicas públicas muestran que las proteínas Executer no se encuentra en cianobacterias, algas rojas o glaucofitas. El gen de Executer, en cambio, es común en algas verdes y embriofitas, lo que ubica el origen de esta familia en el ancestro de estas líneas, es decir, en el origen de plantas verdes. Esto

sugiere que esta familia de proteínas estén relacionadas con función del cloroplasto y fotosíntesis y que la aparición de Executer contribuyó a la adaptación de plantas verdes a la vida terrestre.

**La expansión de la familia Executer ocurrió con la aparición de espermatofitas.** En *Arabidopsis* se describió que la familia de proteínas Executer está compuesta por dos subfamilias, que incluyen Ex1 y Ex2. En nuestro análisis hemos detectado que algas verdes contienen una única forma de Executer. Curiosamente, plantas no vasculares como el musgo *Physcomitrella* y plantas vasculares sin semillas como *Selageniella* contienen cuatro y dos proteínas Executer, respectivamente, que según los análisis filogenéticos pertenecen a la subfamilia Executer 1. Todas las plantas vasculares con semillas, denominadas espermatofitas, contienen al menos un representante de las dos subfamilias, Ex1 y Ex2. Nuestro análisis sugiere que ocurrió una duplicación del gen Executer con la aparición de espermatofitas, probablemente como consecuencia de la especialización de plantas vasculares con semillas. Por tanto, es posible que la familia de proteínas Executer se expandiera en paralelo con la evolución de la vida multicelular. Esto está de acuerdo con la mayor complejidad reguladora que los organismos evolutivamente más superiores muestran en procesos biológicos específicos. Por otra parte, es posible que estas proteínas evolucionaran como consecuencia de la colonización terrestre, en respuesta a la necesidad de las plantas para desarrollar nuevas redes reguladoras y afrontar los desafíos asociados con un estilo de vida sésil.

**La función de Ex1 y Ex2 está asociada con tejidos verdes/órganos fotosintéticos.** En general, la duplicación de genes puede resultar en al menos tres consecuencias funcionales: (i) los genes duplicados conservan la misma función que antes de la duplicación (subfuncionalización); (ii) uno de los genes duplicados adquiere una nueva función (neofuncionalización); o, (iii) uno de los genes duplicados se convierte en no funcional (Lynch y Conery 2000).

*Ex1* y *Ex2* muestran un patrón de expresión muy similar en los órganos y estadíos de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* según el análisis de cuantificación relativa de PCR a tiempo real (qRT-PCR) y la tinción histoquímica de las plantas transgénicas que expresan GUS bajo el control de los promotores de los genes *Ex1* y *Ex2*, lo que sugiere que *Ex1* y *Ex2* no tienen funciones redundantes. Los genes *Ex1* y *Ex2* se expresan mayoritariamente en tejidos fotosintéticos como los cotiledones, las hojas roseta, lateral y senescente, el tallo, los sépalos de los botones florales y de las flores, y en las silicuas. En nuestros ensayos no detectamos actividad GUS en la parte basal de las hojas jóvenes emergentes. Inicialmente, el crecimiento de una hoja se sustenta por proliferación celular y, posteriormente, por expansión celular que se inicia en la punta de la hoja y se expande hacia la parte basal de la hoja (Pogson y Albrecht 2011, Andriankaja *et al.* 2012). La diferenciación a cloroplastos a partir de proplastidios en hojas está estrechamente asociada con el comienzo de la expansión celular en hojas en desarrollo (Andriankaja *et al.* 2012). Durante este proceso, los plastidios adquieren una forma más alargada, y aumenta la membrana del tilacoide formándose los grana (Sakamoto *et al.* 2008). Se ha encontrado, además, que durante el desarrollo de la hoja ocurre una señalización retrógrada en la punta que es donde la mayoría de los cloroplastos están diferenciados, en lugar de la base donde los plastidios aún están sin diferenciar (Andriankaja *et al.* 2012). Es posible, por tanto, que tanto *Ex1* como *Ex2* formen parte de esta señalización retrógrada asociada con el desarrollo de hojas durante el proceso de expansión celular.



Se ha encontrado que en el doble mutante de *Arabidopsis ex1/ex2* el desarrollo del cloroplasto está afectado en los cotiledones (Kim *et al.* 2009). Este efecto no se observó en los mutantes sencillos *ex1* y *ex2*. Se comprobó que los cloroplastos de los cotiledones del doble mutante se asemejaban a proplastidios sin diferenciar y eran más pequeños que los de las plantas silvestres. En este estudio se propuso que la inactivación de las proteínas Ex1 y Ex2 bloqueaba la señalización retrógrada mediada por oxígeno singlete antes de la dormición de las semillas, y afecta al desarrollo normal de los plastidios en plantas en estadio cotiledón (Kim *et al.* 2009). En cambio, no se observó ningún efecto en hojas de las plantas maduras del doble mutante. En este punto, es interesante recordar que el desarrollo de cloroplastos ocurre de manera diferente en cotiledones y hojas verdaderas. Estudios futuros determinarán la posible diferencia funcional de Executer en cotiledones y hojas.

En nuestro estudio hemos apreciado algunas diferencias en la expresión de Ex1 y Ex2. El análisis de la expresión GUS muestra que en estadios iniciales (1-2 días post-germinación) *Ex2* se expresa más que *Ex1* en cotiledones. La detección de la expresión del *patEx1::GUS* en tejidos no fotosintéticos como las raíces sugiere una nueva función de Ex1 durante la iniciación y la emergencia de las raíces laterales. En las raíces, se encuentran los plastidios no fotosintéticos, donde tiene lugar la biosíntesis de almidón, de ácidos grasos, y la asimilación del nitrógeno inorgánico en aminoácidos (Neuhaus y Emes 2000). Sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento de raíces muestran que ni Ex1 ni Ex2 afectan al desarrollo del crecimiento de la raíz primaria ni a la formación de raíces laterales en plantas de *Arabidopsis* crecidas durante 21 días con un fotoperiodo corto (8 h luz/16 h oscuridad) a 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Sería interesante para experimentos futuros explorar una posible función reguladora de Ex1 en plastidios no fotosintéticos.

**Las proteínas Executer se asocian con plastoglóbulos en cloroplastos.** Las proteínas Executer contienen un péptido de tránsito que es necesario y suficiente para su localización funcional en cloroplastos. Estudios previos han localizado a estas proteínas en plastidios de cebolla (Wagner *et al.* 2004). Nuestros estudios confirman la localización de Ex1 y Ex2 en cloroplastos. Hemos observado, además, que tanto Ex1-GFP y Ex2-GFP en células de hojas de tabaco como Ex1-YFP y Ex2-YFP en protoplastos de *Arabidopsis* muestran un patrón punteado muy característico, que recuerda al patrón observado con proteínas que se asocian funcionalmente con nucleoides o plastoglóbulos. El análisis de colocalización llevado a cabo en este trabajo sitúa a Ex1 y Ex2 asociadas a plastoglóbulos. Los plastoglóbulos son partículas lipídicas que contienen proteínas y están asociadas a la membrana del tilacoide. Los plastoglóbulos tienen un papel central en el metabolismo del cloroplasto y están implicados en la biosíntesis y acumulación de pigmentos y en la biogénesis de la membrana tilacoidal (Leitner-Dagan *et al.* 2006, Rottet *et al.* 2015). Además, la mayoría de las proteínas identificadas en plastoglóbulos están involucradas en respuesta a estrés (Bréhélin y Nacir 2013). Por ejemplo, la enzima tocoferol ciclasa (VTE1), localizada en los plastoglóbulos, cataliza del segundo al último paso de la síntesis de  $\alpha$ -tocoferol (Porfirova *et al.* 2002). Los tocoferoles protegen los lípidos de membrana frente a la peroxidación y preservan el fotosistema II de la fotoinactivación (Havaux *et al.* 2005). VTE1 también cataliza la conversión de la prenilquinona plastoquinona (PQH<sub>2</sub>-9) en plastocromanol (PC-8) (Szymańska y Kruk 2010, Zbierzak *et al.* 2010). La inactivación de las quinasas de tipo ABC1 en *Arabidopsis* aumenta la sensibilidad de las plantas al exceso de luz (las hojas se blanquean y no son capaces de acumular antocianinas) (Lundquist *et al.* 2013). La enzima NDC1 (NAD(P)H quinona deshidrogenasa 1), también localizada en plastoglóbulos, cataliza la reducción de la plastoquinona (PQ) en el plastoquinol

que se encuentra en los plastoglóbulos (Eugeni Piller *et al.* 2011). Además de en respuesta a estrés, los plastoglóbulos están involucrados en senescencia, biogénesis del plastidio y proteólisis, regulación redox, fotoaclimatación, y biosíntesis de isoprenoides (Lundquist *et al.* 2013). Aunque Ex1 y Ex2 no se hayan identificado en los estudios hasta la fecha publicados del proteoma de plastoglóbulos (Vidi *et al.* 2006, Ytterberg *et al.* 2006), tanto Ex1 como Ex2 se han identificado previamente como componentes periféricos asociados a la membrana del tilacoide (Wagner *et al.* 2004). En este punto es interesante destacar que ni Ex1 ni Ex2 son proteínas comúnmente detectadas por estudios proteómicos, según la base de datos PPDB (<http://ppdb.tc.cornell.edu/>). Esto sugiere que son proteínas poco abundantes, lo que estaría de acuerdo con un papel regulador.

**La ausencia de Ex1 o Ex2 no afecta a la actividad del PSII.** En nuestro estudio no se ha detectado ningún fenotipo visible en plantas de *Arabidopsis* con pérdida de función de Ex1 o Ex2. Como estudios previos han asociado a las proteínas Executer con el PSII en plantas (Kim y Apel 2013b), se analizó el efecto de la ausencia de las proteínas Executer en la funcionalidad del PSII. Nuestros resultados muestran que la actividad fotoquímica del PSII no se ve afectada por la ausencia de Ex1 o Ex2, ni en condiciones normales ni cuando las plantas se someten a un exceso de intensidad lumínica que favorecería la formación de oxígeno singlete por el PSII.

**Ex1 y Ex2 tienen funciones no redundantes y participan en la misma ruta de señalización.** Nuestro estudio ha mostrado que Ex1 y Ex2 tienen una expresión máxima en hojas maduras y además sugiere un papel en el metabolismo del cloroplasto. Puesto que Executer se ha asociado con señalización celular en respuesta a la generación de oxígeno singlete por el PSII (Zhang *et al.* 2014), se analizó la respuesta molecular del cloroplasto en plantas de *Arabidopsis* con pérdida de función de las proteínas Executer. Como aproximación, en este estudio se detectaron diferencias de expresión en las proteínas de la fracción soluble del cloroplasto mediante 2D-DIGE. Se analizaron plantas en condiciones normales de crecimiento y en plantas expuestas a una intensidad lumínica elevada que favorece la formación de ROS, particularmente oxígeno singlete, pero no promueve un estrés fotooxidativo.

Como era de esperar, el tratamiento lumínico afectó significativamente al proteoma soluble del cloroplasto de las plantas silvestres. Nuestros resultados mostraron que el proteoma soluble de plantas *ex1* es muy similar al de plantas *ex2*, tanto en condiciones normales como en intensidad lumínica elevada. Sin embargo, se encontró que los dos genotipos mutantes *executer* crecidos en condiciones normales de luz son diferentes a las plantas silvestres en las mismas condiciones, pero que comparten un gran número de proteínas diferencialmente expresadas con plantas silvestres sometidas a condiciones de alta luminosidad. De hecho, el tratamiento lumínico en las plantas mutantes tuvo un efecto menor en el proteoma que en plantas silvestres. Debido a que en ausencia de Ex1 se expresan diferencialmente proteínas que también se expresan en ausencia de Executer2, y viceversa, se deduce que la presencia de una no compensa la ausencia de la otra, y por tanto sus funciones parecen no ser redundantes.

**La ausencia de Executer en cloroplastos desencadena procesos de aclimatación.** El análisis 2D-DIGE junto con la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas reveló que las proteínas diferencialmente expresadas después del tratamiento lumínico en plantas silvestres pertenecen a rutas metabólicas (del metabolismo del carbono, principalmente), a la síntesis de proteínas, y a la producción de energía (Tabla 21). Se detectó un aumento en la cantidad de la proteína FNR-2, cuya función es la transferencia de electrones de la ferredoxina a NADP<sup>+</sup> para formar NADPH (poder reductor) que se utiliza en la fijación del carbono, el

metabolismo del nitrógeno, y la biosíntesis de clorofila y lípidos (Lintala *et al.* 2009). Además, se detectó un aumento de tres subunidades periféricas de ATP sintasa en respuesta a la luz. En cloroplastos, la proteína ATP sintasa está regulada por luz y por factores metabólicos (Kohzuma *et al.* 2013), y particularmente las ROS muestran una influencia directa en su actividad biológica (Buchert y Forreiter 2010, Buchert *et al.* 2012). Se detectó la alteración de enzimas del ciclo de Calvin-Benson como la epimerasa, la aldolasa, la isomerasa y la transquetolasa que catalizan reacciones reversibles y que no son susceptibles a la regulación por tioredoxinas (Raines 2003, Michelet *et al.* 2013). Asimismo, dos isoformas de la aldolasa (FBA1 y FBA2) mostraron diferentes patrones de expresión, lo que sugiere algún tipo de especialización funcional. Las actividades de las enzimas aldolasa y transquetolasa controlan el flujo de carbono y son importantes para la aclimatación de la fotosíntesis en respuesta a variaciones en las condiciones del medio ambiente (Haake *et al.* 1998, Haake *et al.* 1999, Henkes *et al.* 2001, Raines 2003, Uematsu *et al.* 2012). Del mismo modo, los sustratos y los productos de estas enzimas actúan como precursores de procesos metabólicos como la síntesis de aminoácidos y de ácidos grasos, y por eso un cambio en las cantidades de las proteínas puede afectar a otras rutas del cloroplasto (Henkes *et al.* 2001, Tetlow *et al.* 2005). Por otra parte, las enzimas epimerasa e isomerasa disminuyen significativamente en respuesta al tratamiento lumínico. Nuestro estudio muestra que la enzima fosforibuloquinasa (PRK), que desempeña un papel importante en la regulación del flujo de carbohidratos a través del ciclo de Calvin-Benson, se activa en el tratamiento lumínico. La enzima PRK puede ser limitante cuando las plantas crecidas a bajas intensidades de luz se exponen a altas intensidades de luz (Paul *et al.* 2000). Las enzimas rubisco activasa (Portis 2003) y anhidrasa carbónica 1  $\beta$  (CA) (Fett y Coleman 1994)—que desempeñan una función definida en la modulación de la fijación del carbono—también aumentan después del tratamiento a altas intensidades de luz. Otras proteínas metabólicas como la glutamina sintetasa-2—una enzima central del metabolismo del nitrógeno que, junto con otras enzimas clave, mantiene el balance del metabolismo del carbono y del nitrógeno (Mifflin y Habash 2002)—y la glutamato-1-semialdehído 2 1-aminomutasa o GSA aminotransferasa—que participa en el metabolismo de los tetrapirroles (Tanaka *et al.* 2011)—se inducen a altas intensidades de luz. El aumento detectado en los niveles de las proteínas relacionadas con el plegamiento de proteínas y el metabolismo del ARN es debido a que, en presencia de luz, la velocidad de la síntesis de proteínas aumenta, que es cuando la maquinaria traduccional del cloroplasto es más activa (Marín-Navarro *et al.* 2007). Todos estos cambios están asociados a procesos dinámicos de aclimatación que provocan un aumento en la eficiencia de la fotosíntesis en condiciones de luz no saturante, en las que se modifica la capacidad fotosintética de la planta. Esto provoca un impacto en procesos como la fijación de carbono, la síntesis de clorofila, y el metabolismo del nitrógeno.

La expresión de la mayoría de las proteínas mencionadas en el párrafo anterior también varía en las plantas mutantes *executer* en condiciones normales de luz. Incluso se detecta la variación de algunas proteínas en las plantas mutantes, pero no en plantas silvestres tratadas con alta intensidad de luz. A continuación se comentan algunas de estas proteínas que alteran su expresión como consecuencia de la pérdida de función de *Executer*. Las enzimas del ciclo de Calvin-Benson gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa B y gوسفoglicerato quinasa aumentan significativamente en las plantas mutantes, sobre todo en las plantas *ex2*. Dos de las proteínas del complejo de fotólisis/oxidación del agua o complejo productor de oxígeno (OEC, *oxygen evolving complex*) del fotosistema II (Ettinger y Theg 1991, Bricker *et al.* 2012) se acumulan en la fracción soluble de los cloroplastos de *executer* en comparación con los cloroplastos de las plantas silvestres. Las cantidades de dos endoribonucleasas de la familia CSP41 (Qi *et al.* 2012),

y de la proteína ribosómica específica de plastidio 2 (PSRP-2) (Yamaguchi y Subramanian 2003) están incrementadas en las plantas *executer*, lo que indica que existe una actividad transcripcional y traduccional diferente a la de las plantas silvestres en condiciones normales de luz. Dos proteínas de función desconocida, la proteína con un dominio TPR predicho y la proteína del lumen tilacoidal que pertenece a la superfamilia PsbP, muestran un aumento en los niveles de expresión de las plantas mutantes.

Estos resultados muestran diferencias significativas entre las plantas silvestres y las plantas *executer*. En cambio, el solapamiento encontrado entre las plantas silvestres sometidas a una alta intensidad de luz y las plantas *executer* en condiciones normales es muy interesante. Aunque las proteínas Executer son prescindibles en el crecimiento normal, al menos en plantas crecidas en laboratorio, en nuestro trabajo se detecta un cambio molecular en el nivel basal de las plantas *executer*. Parece que la pérdida de función de las proteínas Executer conduce a una reorientación del metabolismo central del cloroplasto que se asemeja a la respuesta de aclimatación a una luz moderada. Una posible interpretación de estos resultados es que las proteínas Executer fijan el umbral de la intensidad de luz que desencadena la respuesta en condiciones de intensidad de luz moderada. De este modo, el umbral de las plantas *executer* es inferior al de las plantas silvestres, es decir, en condiciones normales de luz, las plantas *executer* responden como si estuvieran expuestas a intensidades lumínicas moderadas. Aunque la función de las proteínas Executer todavía no está definida, se propone que las proteínas Executer forman parte de una red reguladora que coordina los estímulos medioambientales y la adaptación metabólica, determinando la respuesta de aclimatación en los cloroplastos. Un dato interesante es que la ausencia de Executer2 tiene un mayor impacto en el proteoma soluble de los cloroplastos que la de Executer1. Nuestros resultados son consistentes con otros estudios en los que se observa una aclimatación al estrés dependiente de Executer en hojas verdes de plantas maduras. En el trabajo de (Wagner *et al.* 2004) se produce una supresión de la muerte celular en plantas *ex1* tratadas con DCMU, en el de (Ramel *et al.* 2012) las plantas *ex1* son resistentes al estrés oxidativo, y en el de (Mur *et al.* 2010) se detecta un pequeño aumento en la resistencia a patógenos en las plantas *ex2*. Nuestros resultados sugieren que las proteínas Executer forman parte de una red de señalización para la percepción de los cambios medio ambientales en las plantas, y que participan en la represión basal de las respuestas de defensa en los cloroplastos en condiciones lumínicas normales.

**Ex1 y Ex2 no parecen formar una interacción estable en condiciones normales.** Parece que la función de las proteínas Ex1 y Ex2 es no redundante. Estudios genéticos han propuesto que la Ex2 modula la función de Ex1 mediante una interacción proteína-proteína que aún no se ha demostrado (Lee *et al.* 2007). En este trabajo hemos abordado el estudio de la interacción de estas dos proteínas *in vivo* mediante la técnica BiFC. En nuestras condiciones de estudio (condiciones normales de crecimiento, y exposición a un exceso de luz durante 10 min y 2 horas), no hemos detectado una asociación estable entre Ex1 y Ex2. Sin embargo, sería interesante un estudio más exhaustivo de la interacción ya que esta puede ser transitoria o para identificar en qué condiciones esta interacción se puede producir. Es posible, no obstante, que Ex2 module la función de Ex1 sin una interacción física directa. Son necesarios más experimentos para analizar el efecto de Ex2 sobre Ex1, por ejemplo, mediante el análisis *in vitro* de la interacción. Uno de los requisitos para este análisis es la obtención de cantidades homogéneas de las proteínas a analizar. En este trabajo, hemos intentado obtener preparaciones de proteínas recombinantes de Ex1 y Ex2 utilizando *E. coli*. Sin embargo, hasta la fecha, no hemos conseguido estas preparaciones, principalmente debido a problemas de solubilidad. Es

posible que Ex1 y Ex2 necesiten de proteína(s) u otros factores específicos del cloroplasto para su plegamiento y/o estabilidad.

**Executer son proteínas bimodulares con características de IDP.** La información estructural sobre las proteínas Executer es muy limitada. Ex1 y Ex2 son proteínas homólogas, y muestran más de un 80 % de similitud de secuencia. En este trabajo, hemos detectado una diferencia estructural interesante entre Ex1 y Ex2, y es la presencia de una hélice  $\alpha$  en el extremo N-terminal de la subfamilia Ex1, no detectada en Ex2. Se ha encontrado que las proteínas Executer se caracterizan por la presencia de dos motivos Uvr conectados mediante una región IDP a un dominio muy conservado, pero de función hasta la fecha desconocida, denominada DUF3506. El motivo Uvr se ha involucrado en interacción proteína-proteína. En el extremo C-terminal, el dominio DUF3506 que está muy conservado en hongos. Por lo tanto, Executer parece derivar tras el proceso endosimbiótico como el resultado de la fusión de dos dominios: uno probablemente de origen bacteriano, y otro de origen eucariota, conectado por una larga región desordenada. Esta región desordenada se caracteriza por una baja conservación de secuencia y una alta presencia de aminoácidos cargados negativamente. Las dos funciones más características de las regiones desordenadas en proteínas son la mediación de interacción proteína-proteína y la conexión mediante regiones flexibles de elementos de unión en proteínas (Oldfield y Dunker 2014, Wright y Dyson 2015). Este tipo de elementos se encuentran comúnmente en proteínas involucradas en señalización. Por otra parte, las proteínas Executer muestran una alta conservación de aminoácidos aromáticos, principalmente triptófanos, en el dominio N-terminal. Entre otras funciones, los triptófanos son dianas específicas de ROS y, particularmente, del oxígeno singlete (Jensen *et al.* 2012). Se ha propuesto que la oxidación de triptófanos en proteínas puede ser un marcador del estado oxidativo del compartimento celular reconocido por el sistema de control de calidad. Será muy interesante analizar en un futuro el posible papel funcional de los triptófanos conservados en la familia Executer.

**La formación de homodímeros está favorecida frente a la formación de heterodímeros.** Con la información estructural obtenida por métodos computacionales, diseñamos nuevos constructos para la producción de formas truncadas de las proteínas Executer en *E. coli*. Hasta la fecha, solo hemos conseguido preparaciones de formas truncadas, tanto de Ex1 como de Ex2, que incluyen parte del dominio N-terminal. Este dominio es muy interesante porque contiene el motivo Uvr que está involucrado en interacción proteína-proteína, y sería un buen modelo para analizar la posible interacción homo- y heteromolecular entre miembros de la familia Executer.

Nuestros resultados muestran diferencias entre el dominio N-terminal de Ex1 y Ex2 en *Arabidopsis*. Mientras que Ex1 forma predominantemente homodímeros y homotetrámeros, y el dominio N-terminal de Ex2 forma mayoritariamente monómeros, con tendencia a formar homodímeros. Los experimentos con los motivos aislados Uvr de Ex1 y Ex2 sí sugieren una homodimerización mediada por estos motivos. Considerando la alta similitud de secuencia entre los dominios N-terminal de Ex1 y Ex2, es posible que la diferencia observada en la homoasociación de Ex1 (formación de tetrámeros) sea debida a la presencia de la  $\alpha$ -hélice N-terminal, no presente en Ex2. En contra de la hipótesis inicialmente planteada, según la cual los motivos Uvr podrían estar involucrados en la interacción Ex1-Ex2, no se ha detectado una interacción *in-vitro* entre los dominios N-terminal de las dos proteínas. Sí hemos encontrado una influencia de Ex2 en la oligomerización de Ex1, aunque no hemos conseguido definir ni identificar los factores que controlan la distribución del dominio N-terminal de Ex1 en varios estados de asociación. Estas variables, no ha estado controladas en nuestros experimentos y han ido cambiando entre las diferentes muestras de nuestro trabajo, influyendo en el equilibrio de

## Discusión

distribución de las especies. Experimentos futuros establecerán cuáles son los factores que modulan la asociación de Ex1, y esclarecer si el ensamblaje y el desensamblaje dinámico de los oligómeros desempeñan algún papel en la regulación de la actividad de la proteína.

# Conclusiones

## Conclusiones



## Conclusiones

### Primera

El origen del gen *Executer* se sitúa en el ancestro común de las algas verdes y de las embriofitas, lo que sugiere que su aparición contribuyó a la adaptación de las plantas verdes en la vida en la Tierra.

### Segunda

Con la aparición de las espermatofitas tuvo lugar la duplicación del gen *Executer*, posiblemente favoreciendo los requerimientos específicos como consecuencia de la especialización de las plantas vasculares con semillas.

### Tercera

El patrón de expresión de los genes *Executer1* y *Executer2* de *Arabidopsis thaliana* en dirección basipétalo (de la punta de las hojas jóvenes a la zona basal de las hojas maduras) sugiere que ambas proteínas forman parte de la señalización retrógrada que se produce durante la transición de la proliferación a la expansión celular en las hojas.

### Cuarta

Las proteínas *Executer1* y *Executer2* de *Arabidopsis thaliana* se localizan en los plastoglobulos, cuerpos lipídicos que se asocian a las membranas tilacoidales y que contienen proteínas de respuesta a estrés.

### Quinta

Las plantas mutantes *executer1* y *executer2* crecidas en condiciones normales de luz no tienen afectado el rendimiento fotosintético en comparación con las plantas silvestres, según los parámetros fotosintéticos analizados.

### Sexta

Las funciones de *Executer1* y *Executer2* no son redundantes, debido a que la presencia de una no compensa la pérdida de la otra, y debido a la similitud de sus proteomas en condiciones normales de luz, se sugiere que las proteínas *Executer1* y *Executer2* participan en la misma ruta de señalización.

### Séptima

Se propone que las proteínas *Executer* participan en una red de señalización que responde a variaciones del medio ambiente, promoviendo una respuesta de aclimatación equilibrada que consiste en ajustar los niveles de determinadas proteínas que forman parte del metabolismo central del cloroplasto (fotosíntesis, fijación de carbono, generación de energía, metabolismo del nitrógeno, síntesis de tetrapirroles, metabolismo del ARN, y plegamiento de proteínas, entre otros).

### **Octava**

En nuestras condiciones de trabajo, no hemos detectado una interacción física Executer1-Executer2.

### **Novena**

Las proteínas Executer contienen en su extremo N-terminal dos motivos Uvr–involucrados en interacción proteína-proteína–conectados a través de una región con características de proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP) con el extremo C-terminal, que contiene dominio de función desconocida DUF3506 muy conservado en hongos. Executer parece derivar de la fusión de estos dos dominios después del proceso endosimbiótico.

### **Décima**

El dominio N-terminal de Executer1 forma homodímeros y homotetrámeros, mientras que el dominio N-terminal de Executer2 forma monómeros con tendencia a formar homodímeros. Es posible que estas diferencias encontradas en el estado oligomérico sean debidas a la presencia de la  $\alpha$ -hélice N-terminal de Executer1, ausente en Executer2.

### **Undécima**

Aunque Executer2 parece influir en la oligomerización de Executer1, en nuestras condiciones de trabajo no se ha detectado la interacción *in vitro* entre los dominios N-terminal de Executer1 y de Executer2 que contienen los motivos Uvr implicados en interacción proteína-proteína.

# Bibliografía

## Bibliografía

## Bibliografía

- Adhikari, N. D., Froehlich, J. E., Strand, D. D., Buck, S. M., Kramer, D. M. y Larkin, R. M.** (2011). GUN4-Porphyrin complexes bind the ChlH/GUN5 subunit of Mg-Chelatase and promote chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(4): 1449-1467.
- Alboresi, A., Dall'Osto, L., Aprile, A., Carillo, P., Roncaglia, E., Cattivelli, L. y Bassi, R.** (2011). Reactive oxygen species and transcript analysis upon excess light treatment in wild-type *Arabidopsis thaliana* vs a photosensitive mutant lacking zeaxanthin and lutein. *BMC Plant Biol* 11(1): 62.
- Alexandrovich, A., Czisch, M., Frenkiel, T. A., Kelly, G. P., Goosen, N., Moolenaar, G. F., Chowdhry, B. Z., Sanderson, M. R. y Lane, A. N.** (2001). Solution structure, hydrodynamics and thermodynamics of the UvrB C-terminal domain. *J Biomol Struct Dyn* 19(2): 219-236.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Lisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. y Ecker, J. R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301(5633): 653-657.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-410.
- Allen, J. F., de Paula, W. B. M., Puthiyaveetil, S. y Nield, J.** (2011). A structural phylogenetic map for chloroplast photosynthesis. *Trends Plant Sci* 16(12): 645-655.
- Andriankaja, M., Dhondt, S., De Bodt, S., Vanhaeren, H., Coppens, F., De Milde, L., Muhlenbock, P., Skirycz, A., Gonzalez, N., Beemster, G. T. y Inze, D.** (2012). Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: a not-so-gradual process. *Dev Cell* 22(1): 64-78.
- Ankele, E., Kindgren, P., Pesquet, E. y Strand, Å.** (2007). In vivo visualization of Mg-protoporphyrinIX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast. *Plant Cell* 19(6): 1964-1979.
- Apel, K. y Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Üstün, Ş., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. y Börnke, F.** (2010). Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 22(5): 1498-1515.
- Asada, K.** (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141(2): 391-396.

- Austin, J. R., Frost, E., Vidi, P.-A., Kessler, F. y Staehelin, L. A.** (2006). Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* 18(7): 1693-1703.
- Baier, M. y Dietz, K.-J.** (1999). Protective function of chloroplast 2-Cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 119(4): 1407-1414.
- Baier, M. y Dietz, K.-J.** (2005). Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *J Exp Bot* 56(416): 1449-1462.
- Baier, M., Ströher, E. y Dietz, K.-J.** (2004). The acceptor availability at Photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin-A in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45(8): 997-1006.
- Baker, N. R.** (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* 59(1): 89-113.
- Balsera, M., Soll, J. y Bölter, B.** (2009). Protein import machineries in endosymbiotic organelles. *Cel Mol Life Sci* 66(11-12): 1903-1923.
- Barajas-López, J. d. D., Blanco, N. E. y Strand, Å.** (2013). Plastid-to-nucleus communication, signals controlling the running of the plant cell. *Biochim Biophys Acta - Molecular Cell Research* 1833(2): 425-437.
- Barkan, A. y Small, I.** (2014). Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol* 65(1): 415-442.
- Baruah, A., Šimková, K., Apel, K. y Laloi, C.** (2009). *Arabidopsis* mutants reveal multiple singlet oxygen signaling pathways involved in stress response and development. *Plant Mol Biol* 70(5): 547-563.
- Becker, B. y Marin, B.** (2009). Streptophyte algae and the origin of embryophytes. *Ann Bot-London* 103(7): 999-1004.
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G. y Rochaix, J.-D.** (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433(7028): 892-895.
- Berry, J., Yerramsetty, P., Zielinski, A. y Mure, C.** (2013). Photosynthetic gene expression in higher plants. *Photosynth Res* 117(1-3): 91-120.
- Bilger, W. y Bjorkman, O.** (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25(3): 173-185.
- Blankenship, R. E.** (2014). Molecular mechanisms of photosynthesis, 2nd Edition. *John Wiley & Sons, Ltd.*
- Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P. y Leister, D.** (2005). Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* 437(7062): 1179-1182.

- Borisova, M. M., Kozuleva, M. A., Rudenko, N. N., Naydov, I. A., Klenina, I. B. y Ivanov, B. N.** (2012). Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1817(8): 1314-1321.
- Bradbeer, J. W., Atkinson, Y. E., Borner, T. y Hagemann, R.** (1979). Cytoplasmic synthesis of plastid polypeptides may be controlled by plastid-synthesised RNA. *Nature* 279(5716): 816-817.
- 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.
- Bräutigam, K., Dietzel, L., Kleine, T., Ströher, E., Wormuth, D., Dietz, K.-J., Radke, D., Wirtz, M., Hell, R., Dörmann, P., Nunes-Nesi, A., Schauer, N., Fernie, A. R., Oliver, S. N., Geigenberger, P., Leister, D. y Pfannschmidt, T.** (2009). Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21(9): 2715-2732.
- Bréhélin, C. y Nacir, H.** (2013). When proteomics reveals unsuspected roles: the plastoglobule example. *Front Plant Sci* 4.
- Bricker, T. M., Roose, J. L., Fagerlund, R. D., Frankel, L. K. y Eaton-Rye, J. J.** (2012). The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1817(1): 121-142.
- Bruce, B. D.** (2000). Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol* 10(10): 440-447.
- Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K. y Jones, D. T.** (2013). Scalable web services for the PSIPRED protein analysis workbench. *Nucleic Acids Res* 41(W1): W349-W357.
- Buchert, F. y Forreiter, C.** (2010). Singlet oxygen inhibits ATPase and proton translocation activity of the thylakoid ATP synthase CF<sub>1</sub>CF<sub>o</sub>. *FEBS Lett* 584(1): 147-152.
- Buchert, F., Schober, Y., Römpp, A., Richter, M. L. y Forreiter, C.** (2012). Reactive oxygen species affect ATP hydrolysis by targeting a highly conserved amino acid cluster in the thylakoid ATP synthase  $\gamma$  subunit. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1817(11): 2038-2048.
- Butler, W. L.** (1978). Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol* 29(1): 345-378.
- Castresana, J.** (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* 17(4): 540-552.
- Claeyssen, É. y Rivoal, J.** (2007). Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* 68(6): 709-731.
- Cole, C., Barber, J. D. y Barton, G. J.** (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 36(suppl 2): W197-W201.

- 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.
- Chamovitz, D., Pecker, I. y Hirschberg, J.** (1991). The molecular basis of resistance to the herbicide norflurazon. *Plant Mol Biol* 16(6): 967-974.
- Chen, S., Kim, C., Lee, J. M., Lee, H.-A., Fei, Z., Wang, L. y Apel, K.** (2015). Blocking the Q<sub>B</sub>-binding site of photosystem II by tenuazonic acid, a non-host-specific toxin of *Alternaria alternata*, activates singlet oxygen-mediated and EXECUTER-dependent signalling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 38(6): 1069-1080.
- Chi, W., Sun, X. y Zhang, L.** (2013). Intracellular signaling from plastid to nucleus. *Annu Rev Plant Biol* 64(1): 559-582.
- Chow, W. S., Melis, A. y Anderson, J. M.** (1990). Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. *P Natl Acad Sci USA* 87(19): 7502-7506.
- Dall'Osto, L., Bressan, M. y Bassi, R.** (2015). Biogenesis of light harvesting proteins - Bioenergetics. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics in press*.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. y Posada, D.** (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27(8): 1164-1165.
- Davies, M. J.** (2003). Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Co* 305(3): 761-770.
- Davis, A., Hall, A., Millar, A., Darrah, C. y Davis, S.** (2009). Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* 5(1): 3.
- Demmig-Adams, B. y Adams, W. W.** (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43(1): 599-626.
- Deng, X.-W. y Gruissem, W.** (1987). Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* 49(3): 379-387.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M. y Gascuel, O.** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36(suppl 2): W465-W469.
- Dyall, S. D., Brown, M. T. y Johnson, P. J.** (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304(5668): 253-257.
- Escoubas, J. M., Lomas, M., LaRoche, J. y Falkowski, P. G.** (1995). Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *P Natl Acad Sci USA* 92(22): 10237-10241.
- Estavillo, G. M., Crisp, P. A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C., Giraud, E., Whelan, J., David, P., Javot, H., Brearley, C., Hell, R., Marin, E. y Pogson, B.**



- J.** (2011). Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23(11): 3992-4012.
- Estavillo, G. M., Chan, K. X., Phua, S. Y. y Pogson, B. J.** (2013). Reconsidering the nature and mode of action of metabolite retrograde signals from the chloroplast. *Front Plant Sci* 3(300).
- Ettinger, W. F. y Theg, S. M.** (1991). Physiologically active chloroplasts contain pools of unassembled extrinsic proteins of the photosynthetic oxygen-evolving enzyme complex in the thylakoid lumen. *J Cell Biol* 115(2): 321-328.
- Eugeni Piller, L., Abraham, M., Dörmann, P., Kessler, F. y Besagni, C.** (2012). Plastid lipid droplets at the crossroads of prenylquinone metabolism. *J Exp Bot* 63(4): 1609-1618.
- Eugeni Piller, L., Besagni, C., Ksas, B., Rumeau, D., Bréhélin, C., Glauser, G., Kessler, F. y Havaux, M.** (2011). Chloroplast lipid droplet type II NAD(P)H quinone oxidoreductase is essential for prenylquinone metabolism and vitamin K1 accumulation. *P Natl Acad Sci USA* 108(34): 14354-14359.
- Facchinelli, F. y Weber, A. P. M.** (2011). The metabolite transporters of the plastid envelope: an update. *Front Plant Sci* 2.
- Fett, J. P. y Coleman, J. R.** (1994). Characterization and expression of two cDNAs encoding carbonic anhydrase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 105(2): 707-713.
- Fey, V., Wagner, R., Braütigam, K., Wirtz, M., Hell, R., Dietzmann, A., Leister, D., Oelmüller, R. y Pfannschmidt, T.** (2005). Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 280(7): 5318-5328.
- Finazzi, G., Rappaport, F. y Goldschmidt-Clermont, M.** (2003). From light to life: an interdisciplinary journey into photosynthetic activity. *EMBO Rep* 4(8): 752-756.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J. y Punta, M.** (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42(D1): D222-D230.
- Floyd, S. y Bowman, J.** (2007). The ancestral developmental tool kit of land plants. *Int J Plant Sci* 168: 1-35.
- Flugge, U. y Heldt, H. W.** (1991). Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42(1): 129-144.
- Foudree, A., Putarjunan, A., Kambakam, S., Nolan, T., Fussell, J., Pogorelko, G. y Rodermeil, S.** (2012). The mechanism of variegation in *immutans* provides insight into chloroplast biogenesis. *Front Plant Sci* 3.
- Foyer, C. H., Bloom, A. J., Queval, G. y Noctor, G.** (2009). Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annu Rev Plant Biol* 60(1): 455-484.

- Foyer, C. H., Karpinska, B. y Krupinska, K.** (2014). The functions of WHIRLY1 and REDOX-RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 in cross tolerance responses in plants: a hypothesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369(1640): 20130226.
- Foyer, C. H., Neukermans, J., Queval, G., Noctor, G. y Harbinson, J.** (2012). Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. *J Exp Bot* 63(4): 1637-1661.
- Foyer, C. H. y Noctor, G.** (2008). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Sign* 11(4): 861-905.
- Foyer, C. H. y Noctor, G.** (2013). Redox signaling in plants. *Antioxid Redox Sign* 18(16): 2087-2090.
- Foyer, C. H. y Shigeoka, S.** (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiol* 155(1): 93-100.
- Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sørensen, K., Hill, P., Msadek, T. y Ingmer, H.** (2004). Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 54(5): 1445-1462.
- Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P. y Ingmer, H.** (2007). Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 63(5): 1285-1295.
- Fryer, M. J., Ball, L., Oxborough, K., Karpinski, S., Mullineaux, P. M. y Baker, N. R.** (2003). Control of *Ascorbate Peroxidase 2* expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of *Arabidopsis* leaves. *Plant J* 33(4): 691-705.
- Fryer, M. J., Oxborough, K., Mullineaux, P. M. y Baker, N. R.** (2002). Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J Exp Bot* 53(372): 1249-1254.
- Fujita, Y.** (2005). Chlorophylls. *Encyclopedia of Life Science (eLS)*, John Wiley & Sons, Ltd.
- Gadjev, I., Vanderauwera, S., Gechev, T. S., Laloi, C., Minkov, I. N., Shulaev, V., Apel, K., Inze, D., Mittler, R. y Van Breusegem, F.** (2006). Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141(2): 436-445.
- Galvez-Valdivieso, G., Fryer, M. J., Lawson, T., Slattery, K., Truman, W., Smirnov, N., Asami, T., Davies, W. J., Jones, A. M., Baker, N. R. y Mullineaux, P. M.** (2009). The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. *Plant Cell* 21(7): 2143-2162.
- Galvez-Valdivieso, G. y Mullineaux, P. M.** (2010). The role of reactive oxygen species in signalling from chloroplasts to the nucleus. *Physiol Plantarum* 138(4): 430-439.
- Genty, B., Briantais, J.-M. y Baker, N. R.** (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta - General Subjects* 990(1): 87-92.

- Gigolashvili, T., Geier, M., Ashykhmina, N., Frerigmann, H., Wulfert, S., Krueger, S., Mugford, S. G., Kopriva, S., Haferkamp, I. y Flüggé, U.-I.** (2012). The *Arabidopsis* thylakoid ADP/ATP carrier TAAC has an additional role in supplying plastidic phosphoadenosine 5'-phosphosulfate to the cytosol. *Plant Cell* 24(10): 4187-4204.
- Gill, S. S. y Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48(12): 909-930.
- Gollnick, K.** (1968). Type II photooxygenation reactions in solution. *Adv Photochem*, John Wiley & Sons, Inc. 6: 1-122.
- Gorman, A. A. y Rodgers, M. A. J.** (1992). New trends in photobiology: current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *J Photoch Photobio B* 14(3): 159-176.
- Gouy, M., Guindon, S. y Gascuel, O.** (2010). SeaView Version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27(2): 221-224.
- Govindjee, K., Kern, J. F., Messinger, J. y Whitmarsh, J.** (2010). Photosystem II. *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Graham, L. E., Cook, M. E. y Busse, J. S.** (2000). The origin of plants: body plan changes contributing to a major evolutionary radiation. *P Natl Acad Sci USA* 97(9): 4535-4540.
- Green, B. R.** (2011). Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant J* 66(1): 34-44.
- Grennan, A. K.** (2008). Plastoglobule proteome. *Plant Physiol* 147(2): 443-445.
- Grieshaber, N. A., Fischer, E. R., Mead, D. J., Dooley, C. A. y Hackstadt, T.** (2004). *Chlamydia* histone-DNA interactions are disrupted by a metabolite in the methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *P Natl Acad Sci USA* 101(19): 7451-7456.
- Grieshaber, N. A., Sager, J. B., Dooley, C. A., Hayes, S. F. y Hackstadt, T.** (2006). Regulation of the *Chlamydia trachomatis* histone H1-like protein Hc2 is IspE dependent and IhtA independent. *J Bacteriol* 188(14): 5289-5292.
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. y Gascuel, O.** (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59(3): 307-321.
- Guindon, S. y Gascuel, O.** (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52(5): 696-704.
- Haake, V., Geiger, M., Walch-Liu, P., Of Engels, C., Zrenner, R. y Stitt, M.** (1999). Changes in aldolase activity in wild-type potato plants are important for acclimation to growth irradiance and carbon dioxide concentration, because plastid aldolase exerts control over the ambient rate of photosynthesis across a range of growth conditions. *Plant J* 17(5): 479-489.
- Haake, V., Zrenner, R., Sonnewald, U. y Stitt, M.** (1998). A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J* 14(2): 147-157.

- Hall, M., Mishra, Y. y Schröder, W.** (2011). Preparation of stroma, thylakoid membrane, and lumen fractions from *Arabidopsis thaliana* chloroplasts for proteomic analysis. *Chloroplast Research in Arabidopsis*. R. P. Jarvis, Humana Press. 775: 207-222.
- Halliwell, B.** (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141(2): 312-322.
- Hartley, J. L., Temple, G. F. y Brasch, M. A.** (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10(11): 1788-1795.
- Havaux, M., Dall'Osto, L. y Bassi, R.** (2007). Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol* 145(4): 1506-1520.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P. y Dörmann, P.** (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17(12): 3451-3469.
- Havaux, M., Ksas, B., Szewczyk, A., Rumeau, D., Franck, F., Caffarri, S. y Triantaphylides, C.** (2009). Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress. *BMC Plant Biol* 9(1): 130.
- Heiber, I., Ströher, E., Raatz, B., Busse, I., Kahmann, U., Bevan, M. W., Dietz, K.-J. y Baier, M.** (2007). The *redox imbalanced* mutants of *Arabidopsis* differentiate signaling pathways for redox regulation of chloroplast antioxidant enzymes. *Plant Physiol* 143(4): 1774-1788.
- Heineke, D., Riens, B., Grosse, H., Hoferichter, P., Peter, U., Flügge, U.-I. y Heldt, H. W.** (1991). Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiol* 95(4): 1131-1137.
- Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R. y Stitt, M.** (2001). A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 13(3): 535-551.
- Hess, W. R., Müller, A., Nagy, F. y Börner, T.** (1994). Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. *Mol Gen Genet* 242(3): 305-312.
- Hess, W. R., Schendel, R., Börner, T. y Rüdiger, W.** (1991). Reduction of mRNA level for two nuclear encoded light regulated genes in the barley mutant *albostrians* is not correlated with phytochrome content and activity. *J Plant Physiol* 138(3): 292-298.
- Hideg, É., Barta, C., Kálai, T., Vass, I., Hideg, K. y Asada, K.** (2002). Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol* 43(10): 1154-1164.
- Hildebrand, E. L. y Grossman, L.** (1999). Oligomerization of the UvrB nucleotide excision repair protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274(39): 27885-27890.

- Hohmann-Marriott, M. F. y Blankenship, R. E.** (2011). Evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 62(1): 515-548.
- Isemer, R., Mulisch, M., Schäfer, A., Kirchner, S., Koop, H.-U. y Krupinska, K.** (2012). Recombinant Whirly1 translocates from transplastomic chloroplasts to the nucleus. *FEBS Lett* 586(1): 85-88.
- Ishikawa, A., Tanaka, H., Kato, C., Iwasaki, Y. y Asahi, T.** (2005). Molecular characterization of the ZKT gene encoding a protein with PDZ, K-Box, and TPR motifs in *Arabidopsis*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(5): 972-978.
- Jahns, P. y Holzwarth, A. R.** (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1817(1): 182-193.
- Jarvis, P.** (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol* 179(2): 257-285.
- Jarvis, P. y Lopez-Juez, E.** (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(12): 787-802.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. y Hirsh, D.** (1986).  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *P Natl Acad Sci USA* 83(22): 8447-8451.
- Jensen, R. L., Arnbjerg, J. y Ogilby, P. R.** (2012). Reaction of singlet oxygen with tryptophan in proteins: a pronounced effect of the local environment on the reaction rate. *J Am Chem Soc* 134(23): 9820-9826.
- Johanningmeier, U.** (1988). Possible control of transcript levels by chlorophyll precursors in *Chlamydomonas*. *Eur J Biochem* 177(2): 417-424.
- Johanningmeier, U. y Howell, S. H.** (1984). Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein mRNA accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Possible involvement of chlorophyll synthesis precursors. *J Biol Chem* 259(21): 13541-13549.
- Jones, D. T.** (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices1. *J Mol Biol* 292(2): 195-202.
- Jones, D. T. y Cozzetto, D.** (2015). DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics* 31(6): 857-863.
- Jung, H.-S. y Chory, J.** (2010). Signaling between chloroplasts and the nucleus: can a systems biology approach bring clarity to a complex and highly regulated pathway? *Plant Physiol* 152(2): 453-459.
- Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.-S., Terauchi, R. y Inaba, T.** (2009). Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant Physiol* 151(3): 1339-1353.
- Kangasjärvi, S., Nurmi, M., Tikkanen, M. y Aro, E.-M.** (2009). Cell-specific mechanisms and systemic signalling as emerging themes in light acclimation of C3 plants. *Plant Cell Environ* 32(9): 1230-1240.

- Karimi, M., De Meyer, B. y Hilson, P.** (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci* 10(3): 103-105.
- Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G. y Mullineaux, P.** (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284(5414): 654-657.
- Karpiński, S., Szechyńska-Hebda, M., Wituszyńska, W. y Burdiak, P.** (2013). Light acclimation, retrograde signalling, cell death and immune defences in plants. *Plant Cell Environ* 36(4): 736-744.
- Kauss, D., Bischof, S., Steiner, S., Apel, K. y Meskauskiene, R.** (2012). FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg<sup>++</sup>-branch of this pathway. *FEBS Lett* 586(3): 211-216.
- Keeling, P. J.** (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1541): 729-748.
- Kelley, L. A. y Sternberg, M. J. E.** (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4(3): 363-371.
- Kessler, F., Schnell, D. y Blobel, G.** (1999). Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts. *Planta* 208(1): 107-113.
- Kim, C. y Apel, K.** (2013a). <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-mediated and EXECUTER-dependent retrograde plastid-to-nucleus signaling in norflurazon-treated seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 6(5): 1580-1591.
- Kim, C. y Apel, K.** (2013b). Singlet oxygen-mediated signaling in plants: moving from flu to wild type reveals an increasing complexity. *Photosynth Res* 116(2-3): 455-464.
- Kim, C., Lee, K. P., Baruah, A., Nater, M., Gobel, C., Feussner, I. y Apel, K.** (2009). <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-mediated retrograde signaling during late embryogenesis predetermines plastid differentiation in seedlings by recruiting abscisic acid. *P Natl Acad Sci USA* 106(24): 9920-9924.
- Kim, C., Meskauskiene, R., Apel, K. y Laloi, C.** (2008). No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO Rep* 9(5): 435-439.
- Kim, C., Meskauskiene, R., Zhang, S., Lee, K. P., Lakshmanan Ashok, M., Blajicka, K., Herrfurth, C., Feussner, I. y Apel, K.** (2012). Chloroplasts of *Arabidopsis* are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *Plant Cell* 24(7): 3026-3039.
- Kindgren, P., Kremnev, D., Blanco, N. E., de Dios Barajas López, J., Fernández, A. P., Tellgren-Roth, C., Small, I. y Strand, Å.** (2012). The plastid redox insensitive 2 mutant of *Arabidopsis* is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus. *Plant J* 70(2): 279-291.
- Kleine, T., Maier, U. G. y Leister, D.** (2009). DNA transfer from organelles to the nucleus: The idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annu Rev Plant Biol* 60(1): 115-138.

- Kohzuma, K., Dal Bosco, C., Meurer, J. y Kramer, D. M.** (2013). Light- and metabolism-related regulation of the chloroplast ATP synthase has distinct mechanisms and functions. *J Biol Chem* 288(18): 13156-13163.
- König, J., Baier, M., Horling, F., Kahmann, U., Harris, G., Schürmann, P. y Dietz, K.-J.** (2002). The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *P Natl Acad Sci USA* 99(8): 5738-5743.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. y Chory, J.** (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316(5825): 715-719.
- Kozaki, A. y Takeba, G.** (1996). Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* 384(6609): 557-560.
- Krieger-Liszkay, A.** (2005). Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56(411): 337-346.
- Krieger-Liszkay, A., Fufezan, C. y Trebst, A.** (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynth Res* 98(1-3): 551-564.
- Krimm, I., Gans, P., Hernandez, J.-F., Arlaud, G. J. y Lancelin, J.-M.** (1999). A coil-helix instead of a helix-coil motif can be induced in a chloroplast transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 265(1): 171-180.
- Kropat, J., Oster, U., Rüdiger, W. y Beck, C. F.** (1997). Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *P Natl Acad Sci USA* 94(25): 14168-14172.
- Kusmann, M., Nordhoff, E., Rahbek-Nielsen, H., Habel, S., Rossel-Larsen, M., Jakobsen, L., Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Kroll-Kristensen, A., Palm, L. y Roepstorff, P.** (1997). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J Mass Spectro* 32(6): 593-601.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laloi, C., Przybyla, D. y Apel, K.** (2006). A genetic approach towards elucidating the biological activity of different reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 57(8): 1719-1724.
- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I. y Apel, K.** (2007). Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *P Natl Acad Sci USA* 104(2): 672-677.
- Lang, D., Zimmer, A. D., Rensing, S. A. y Reski, R.** (2008). Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends Plant Sci* 13(10): 542-549.

- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. y Higgins, D. G.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Larkin, R. M., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Chory, J.** (2003). GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* 299(5608): 902-906.
- Lebendiker, M. y Danieli, T.** (2014). Production of prone-to-aggregate proteins. *FEBS Lett* 588(2): 236-246.
- Ledford, H. K., Chin, B. L. y Niyogi, K. K.** (2007). Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 6(6): 919-930.
- Lee, K. P., Kim, C., Landgraf, F. y Apel, K.** (2007). EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. *P Natl Acad Sci USA* 104(24): 10270-10275.
- Leister, D.** (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* 19(1): 47-56.
- Leister, D.** (2012). Retrograde signalling in plants: from simple to complex scenarios. *Front Plant Sci* 3(135).
- Leitner-Dagan, Y., Ovadis, M., Shklarman, E., Elad, Y., Rav David, D. y Vainstein, A.** (2006). Expression and functional analyses of the plastid lipid-associated protein CHRC suggest its role in chromoplastogenesis and stress. *Plant Physiol* 142(1): 233-244.
- Leliaert, F., Verbruggen, H. y Zechman, F. W.** (2011). Into the deep: new discoveries at the base of the green plant phylogeny. *Bioessays* 33(9): 683-692.
- Lemieux, C., Otis, C. y Turmel, M.** (2007). A clade uniting the green algae *Mesostigma viride* and *Chlorokybus atmophyticus* represents the deepest branch of the Streptophyta in chloroplast genome-based phylogenies. *BMC Biol* 5(1): 2.
- Lewis, L. A. y McCourt, R. M.** (2004). Green algae and the origin of land plants. *Am J Bot* 91(10): 1535-1556.
- Li, J., Li, C., Xiao, W., Yuan, D., Wan, G. y Ma, L.** (2008). Site-directed mutagenesis by combination of homologous recombination and DpnI digestion of the plasmid template in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 373(2): 389-391.
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B. y Niyogi, K. K.** (2009). Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* 60(1): 239-260.
- Lintala, M., Allahverdiyeva, Y., Kangasjärvi, S., Lehtimäki, N., Keränen, M., Rintamäki, E., Aro, E.-M. y Mulo, P.** (2009). Comparative analysis of leaf-type ferredoxin-NADP+ oxidoreductase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 57(6): 1103-1115.
- Long, S. P., Humphries, S. y Falkowski, P. G.** (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45(1): 633-662.
- Lundquist, P. K., Poliakov, A., Giacomelli, L., Friso, G., Appel, M., McQuinn, R. P., Krasnoff, S. B., Rowland, E., Ponnala, L., Sun, Q. y van Wijk, K. J.** (2013). Loss of



- plastoglobule kinases ABC1K1 and ABC1K3 causes conditional degreening, modified prenyl-lipids, and recruitment of the jasmonic acid pathway. *Plant Cell* 25(5): 1818-1839.
- Lynch, M. y Conery, J. S.** (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290(5494): 1151-1155.
- Mansfield, S. G. y Briarty, L. G.** (1996). The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. *Int J Plant Sci* 157(3): 280-295.
- Marín-Navarro, J., Manuell, A., Wu, J. y P. Mayfield, S.** (2007). Chloroplast translation regulation. *Photosynth Res* 94(2-3): 359-374.
- Maxwell, K. y Johnson, G. N.** (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51(345): 659-668.
- McCourt, R. M., Delwiche, C. F. y Karol, K. G.** (2004). Charophyte algae and land plant origins. *Trends Ecol Evol* 19(12): 661-666.
- Meskauskiene, R., Nater, M., Goslings, D., Kessler, F., op den Camp, R. y Apel, K.** (2001). FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *P Natl Acad Sci USA* 98(22): 12826-12831.
- Michelet, L., Zaffagnini, M., Morisse, S., Sparla, F., Pérez-Pérez, M. E., Francia, F., Danon, A., Marchand, C., Fermani, S., Trost, P. y Lemaire, S. D.** (2013). Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci* 4.
- Mifflin, B. J. y Habash, D. Z.** (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot* 53(370): 979-987.
- Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R. O. N.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33(4): 453-467.
- Mitchell, A., Chang, H.-Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S.-Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T. K., Sigrist, C. J. A., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D. A., Wu, C. H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas, P. D. y Finn, R. D.** (2015). The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res* 43(D1): D213-D221.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. y Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9(10): 490-498.
- Mochizuki, N., Brusslan, J. A., Larkin, R., Nagatani, A. y Chory, J.** (2001). *Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5)* mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *P Natl Acad Sci USA* 98(4): 2053-2058.

- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A. G., Tanaka, A. y Terry, M. J.** (2010). The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends Plant Sci* 15(9): 488-498.
- Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T. y Nagatani, A.** (2008). The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA* 105(39): 15184-15189.
- Moolenaar, G. F., Franken, K. L. M. C., Dijkstra, D. M., Thomas-Oates, J. E., Visse, R., van de Putte, P. y Goosen, N.** (1995). The C-terminal region of the UvrB protein of *Escherichia coli* contains an important determinant for UvrC binding to the preincision complex but not the catalytic site for 3'-incision. *J Biol Chem* 270(51): 30508-30515.
- Moulin, M., McCormac, A. C., Terry, M. J. y Smith, A. G.** (2008). Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *P Natl Acad Sci USA* 105(39): 15178-15183.
- Mullineaux, P. M. y Baker, N. R.** (2010). Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiol* 154(2): 521-525.
- Mur, L. A. J., Aubry, S., Mondhe, M., Alison, K.-S., Gallagher, J., Timms-Taravella, E., Caron, J., Papp, I., Hörtensteiner, S., Thomas, H. y Ougham, H.** (2010). Accumulation of chlorophyll catabolites photosensitizes the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *New Phytol* 188(1): 161-174.
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15(3): 473-497.
- Murchie, E. H. y Lawson, T.** (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp Bot* 64(13): 3983-3998.
- Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Iizumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., Shono, Y., Nagata, N., Ikeuchi, M. y Shinozaki, K.** (2008). A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20(11): 3148-3162.
- Neuhaus, H. E. y Emes, M. J.** (2000). Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 111-140.
- Newell, C. A. y Gray, J. C.** (2010). Binding of lac repressor-GFP fusion protein to lac operator sites inserted in the tobacco chloroplast genome examined by chromatin immunoprecipitation. *Nucleic Acids Res* 38(14): e145.
- Niyogi, K. K.** (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50(1): 333-359.
- Noctor, G. y Foyer, C. H.** (2000). Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. *J Exp Bot* 51(suppl 1): 347-356.

- Nøhr, J. y Kristiansen, K.** (2003). Site-directed mutagenesis. *Protein Misfolding and Disease*. P. Bross y N. Gregersen, Humana Press. 232: 127-131.
- Nott, A., Jung, H.-S., Koussevitzky, S. y Chory, J.** (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol* 57(1): 739-759.
- Oelmüller, R.** (1989). Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels. *Photochem Photobiol* 49(2): 229-239.
- Ohad, N., Shichrur, K. y Yalovsky, S.** (2007). The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiol* 145(4): 1090-1099.
- Oldfield, C. J. y Dunker, A. K.** (2014). Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annu Rev Biochem* 83(1): 553-584.
- op den Camp, R. G. L., Przybyla, D., Ochsenein, C., Laloi, C., Kim, C., Danon, A., Wagner, D., Hideg, É., Göbel, C., Feussner, I., Nater, M. y Apel, K.** (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15(10): 2320-2332.
- Ort, D. R. y Kramer, D.** (2009). Photosynthesis. *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*, John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Pakotiprapha, D., Samuels, M., Shen, K., Hu, J. H. y Jeruzalmi, D.** (2012). Structure and mechanism of the UvrA–UvrB DNA damage sensor. *Nat Struct Mol Biol* 19(3): 291-298.
- Paul, M. J., Driscoll, S. P., Andralojc, P. J., Knight, J. S., Gray, J. C. y Lawlor, D. W.** (2000). Decrease of phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: definition of the light environment under which phosphoribulokinase is not in large excess. *Planta* 211(1): 112-119.
- Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G. y Orengo, C.** (2010). Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure* 18(10): 1233-1243.
- Perrière, G. y Gouy, M.** (1996). WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78(5): 364-369.
- Persuh, M., Turgay, K., Mandic-Mulec, I. y Dubnau, D.** (1999). The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. *Mol Microbiol* 33(4): 886-894.
- Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Kleine, T., Wagner, R., Strissel, H., Ichnatowicz, 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.
- Pesaresi, P., Pribil, M., Wunder, T. y Leister, D.** (2011). Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: the roles of STN7, STN8 and TAP38. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1807(8): 887-896.

- Petrillo, E., Godoy Herz, M. A., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M. J., Simpson, C., Brown, J. W. S., Barta, A., Kalyna, M. y Kornblihtt, A. R.** (2014). A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science* 344(6182): 427-430.
- Pfalz, J., Liebers, M., Hirth, M., Gruebler, B., Holtzegel, U., Schroeter, Y., Dietzel, L. y Pfannschmidt, T.** (2012). Environmental control of plant nuclear gene expression by chloroplast redox signals. *Front Plant Sci* 3.
- Pfalz, J., Liere, K., Kandlbinder, A., Dietz, K.-J. y Oelmüller, R.** (2006). pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* 18(1): 176-197.
- Pfannschmidt, T.** (2003). Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci* 8(1): 33-41.
- Pfannschmidt, T.** (2010). Plastidial retrograde signalling – a true “plastid factor” or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci* 15(8): 427-435.
- Piippo, M., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Suoranta, U.-M., Battchikova, N. y Aro, E.-M.** (2006). Chloroplast-mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in the absence of light stress. *Physiol Genomics* 25(1): 142-152.
- Pogson, B. J. y Albrecht, V.** (2011). Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: an overview. *Plant Physiol* 155(4): 1545-1551.
- Pogson, B. J., Ganguly, D. y Albrecht-Borth, V.** (2015). Insights into chloroplast biogenesis and development. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics in press*.
- Pogson, B. J., Woo, N. S., Förster, B. y Small, I. D.** (2008). Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci* 13(11): 602-609.
- Porfirova, S., Bergmüller, E., Tropf, S., Lemke, R. y Dörmann, P.** (2002). Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *P Natl Acad Sci USA* 99(19): 12495-12500.
- Portis, A., Jr.** (2003). Rubisco activase – Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth Res* 75(1): 11-27.
- Pospíšil, P.** (2012). Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1817(1): 218-231.
- Przybyla, D., Göbel, C., Imboden, A., Hamberg, M., Feussner, I. y Apel, K.** (2008). Enzymatic, but not non-enzymatic, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids forms part of the EXECUTER1-dependent stress response program in the *flu* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 54(2): 236-248.
- Qi, Y., Armbruster, U., Schmitz-Linneweber, C., Delannoy, E., de Longevialle, A. F., Rühle, T., Small, I., Jahns, P. y Leister, D.** (2012). *Arabidopsis* CSP41 proteins form multimeric complexes that bind and stabilize distinct plastid transcripts. *J Exp Bot* 63(3): 1251-1270.

- Quintero, F. J., Garcíadeblás, B. y Rodríguez-Navarro, A.** (1996). The SAL1 gene of *Arabidopsis*, encoding an enzyme with 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. *Plant Cell* 8(3): 529-537.
- Raines, C.** (2003). The Calvin cycle revisited. *Photosynth Res* 75(1): 1-10.
- Raines, C. A.** (2011). Increasing photosynthetic carbon assimilation in C3 plants to improve crop yield: current and future strategies. *Plant Physiol* 155(1): 36-42.
- Ramel, F., Birtic, S., Ginies, C., Soubigou-Taconnat, L., Triantaphylidès, C. y Havaux, M.** (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *P Natl Acad Sci USA* 109(14): 5535-5540.
- Ramel, F., Ksas, B., Akkari, E., Mialoundama, A. S., Monnet, F., Krieger-Liszkay, A., Ravanat, J.-L., Mueller, M. J., Bouvier, F. y Havaux, M.** (2013). Light-induced acclimation of the *Arabidopsis chlorinal* mutant to singlet oxygen. *Plant Cell* 25(4): 1445-1462.
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P.-F., Lindquist, E. A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S.-i., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W. B., Barker, E., Bennetzen, J. L., Blankenship, R., Cho, S. H., Dutcher, S. K., Estelle, M., Fawcett, J. A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K. A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D. R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P. J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S.-H., Stueber, K., Theodoulou, F. L., Tu, H., Van de Peer, Y., Verrier, P. J., Waters, E., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A. C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B. D., Reski, R., Grigoriev, I. V., Quatrano, R. S. y Boore, J. L.** (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319(5859): 64-69.
- Rochaix, J.-D.** (2011). Reprint of: Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1807(8): 878-886.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Philippe, H., Brinkmann, H., Becker, B. y Melkonian, M.** (2007). Phylogenetic analyses of nuclear, mitochondrial, and plastid multigene data sets support the placement of Mesostigma in the Streptophyta. *Mol Biol Evol* 24(3): 723-731.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. y Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57(1): 675-709.
- Rottet, S., Besagni, C. y Kessler, F.** (2015). The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics in press*.
- Rumeau, D., Peltier, G. y Cournac, L.** (2007). Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* 30(9): 1041-1051.

- Sakai, A., Takano, H. y Kuroiwa, T.** (2004). Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. *Int Rev Cytol*, Academic Press. Volume 238: 59-118.
- Sakamoto, W., Miyagishima, S.-y. y Jarvis, P.** (2008). Chloroplast biogenesis: control of plastid development, protein import, division and inheritance. *The Arabidopsis Book*: e0110.
- Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K. y Kabeya, Y.** (2003). Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids. *Int Rev Cytol*, Academic Press. Volume 232: 217-262.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. y Tabata, S.** (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* 6(5): 283-290.
- Scheibe, R.** (2004). Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol Plantarum* 120(1): 21-26.
- Scheibe, R., Backhausen, J. E., Emmerlich, V. y Holtgreffe, S.** (2005). Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J Exp Bot* 56(416): 1481-1489.
- Schmittgen, T. D. y Livak, K. J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat Protoc* 3(6): 1101-1108.
- Schöttler, M. A. y Toth, S. Z.** (2014). Photosynthetic complex stoichiometry dynamics in higher plants: environmental acclimation and photosynthetic flux control. *Front Plant Sci* 5.
- Schubert, M., Petersson, U. A., Haas, B. J., Funk, C., Schröder, W. P. y Kieselbach, T.** (2002). Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277(10): 8354-8365.
- Shuman, S.** (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269(51): 32678-32684.
- Sies, H. y Menck, C. F. M.** (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res DNaging: Genet Instab Aging* 275(3-6): 367-375.
- Sohi, M., Alexandrovich, A., Moolenaar, G., Visse, R., Goosen, N., Vernede, X., Fontecilla-Camps, J. C., Champness, J. y Sanderson, M. R.** (2000). Crystal structure of *Escherichia coli* UvrB C-terminal domain, and a model for UvrB-UvrC interaction. *FEBS Lett* 465(2-3): 161-164.
- Stitt, M., Lunn, J. y Usadel, B.** (2010). *Arabidopsis* and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. *Plant J* 61(6): 1067-1091.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R. y Chory, J.** (2003). Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* 421(6918): 79-83.
- Sun, X., Feng, P., Xu, X., Guo, H., Ma, J., Chi, W., Lin, R., Lu, C. y Zhang, L.** (2011). A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nat Commun* 2: 477.

- Susek, R. E., Ausubel, F. M. y Chory, J.** (1993). Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development. *Cell* 74(5): 787-799.
- Suzuki, N. y Mittler, R.** (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol Plantarum* 126(1): 45-51.
- Szymańska, R. y Kruk, J.** (2010). Plastoquinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to high light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastochromanol by Tocopherol cyclase. *Plant Cell Physiol* 51(4): 537-545.
- Taiz, L. y Zeiger, E.** (2002). *Plant Physiology*, Sinauer Associates.
- Taiz, L. y Zeiger, E.** (2010). *Plant Physiology*, Fifth Edition.
- Tanaka, R., Kobayashi, K. y Masuda, T.** (2011). Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*: e0145.
- Tanaka, R. y Tanaka, A.** (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 58(1): 321-346.
- Teixeira, P. F. y Glaser, E.** (2013). Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta - Molecular Cell Research* 1833(2): 360-370.
- Terasawa, K. y Sato, N.** (2005). Visualization of plastid nucleoids *in situ* using the PEND-GFP fusion protein. *Plant Cell Physiol* 46(4): 649-660.
- Terry, M. J. y Smith, A. G.** (2013). A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis. *Front Plant Sci* 4.
- Tetlow, I. J., Rawsthorne, S., Raines, C. y Emes, M. J.** (2005). Plastid metabolic pathways. *Ann Plant Rev* 13: 60-125.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G.** (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24): 4876-4882.
- Timmis, J. N., Ayliffe, M. A., Huang, C. Y. y Martin, W.** (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* 5(2): 123-135.
- Trebst, A.** (2003). Function of  $\beta$ -carotene and tocopherol in photosystem II. *Z Naturforsch C* 58(9-10): 609-620.
- Triantaphylidès, C. y Havaux, M.** (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* 14(4): 219-228.
- Triantaphylidès, C., Krischke, M., Hoerberichts, F. A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F. y Mueller, M. J.** (2008). Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol* 148(2): 960-968.
- Uematsu, K., Suzuki, N., Iwamae, T., Inui, M. y Yukawa, H.** (2012). Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. *J Exp Bot* 63(8): 3001-3009.

- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R. y Kamiya, N.** (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature* 473(7345): 55-60.
- Verhoeven, E. E., Wyman, C., Moolenaar, G. F. y Goosen, N.** (2002). The presence of two UvrB subunits in the UvrAB complex ensures damage detection in both DNA strands. *EMBO J* 21(15): 4196-4205.
- Vidi, P.-A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J. R., Csucs, G., Dörmann, P., Kessler, F. y Bréhélin, C.** (2006). Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem* 281(16): 11225-11234.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. y Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33(5): 949-956.
- von Gromoff, E. D., Alawady, A., Meinecke, L., Grimm, B. y Beck, C. F.** (2008). Heme, a plastid-derived regulator of nuclear gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 20(3): 552-567.
- Wagner, D., Przybyla, D., Op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K. P., Wursch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E. y Apel, K.** (2004). The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 306(5699): 1183-1185.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. y Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40(3): 428-438.
- Waters, E. R.** (2003). Molecular adaptation and the origin of land plants. *Mol Phylogenet Evol* 29(3): 456-463.
- Waters, M. T. y Langdale, J. A.** (2009). The making of a chloroplast. *EMBO J* 28(19): 2861-2873.
- Weigel, D. y Glazebrook, J.** (2002). CTAB DNA miniprep. In: Curtis S, ed. *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA. *Cold Spring Harbor Protocols*: 165.
- Wienk, H. L. J., Wechselberger, R. W., Czisch, M. y de Kruijff, B.** (2000). Structure, dynamics, and insertion of a chloroplast targeting peptide in mixed micelles. *Biochemistry-US* 39(28): 8219-8227.
- Wilhelm, C. y Selmar, D.** (2011). Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: the physiological limits of improved photosynthesis. *J Plant Physiol* 168(2): 79-87.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V. y Provart, N. J.** (2007). An “Electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2(8): e718.



- Woodson, J. D. y Chory, J.** (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet* 9(5): 383-395.
- Woodson, Jesse D. y Chory, J.** (2012). Organelle signaling: how stressed chloroplasts communicate with the nucleus. *Curr Biol* 22(17): R690-R692.
- Woodson, Jesse D., Perez-Ruiz, Juan M. y Chory, J.** (2011). Heme synthesis by plastid Ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Curr Biol* 21(10): 897-903.
- Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M., Schmitz, R. J., Ecker, J. R. y Chory, J.** (2013). Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *Plant J* 73(1): 1-13.
- Wright, P. E. y Dyson, H. J.** (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16(1): 18-29.
- Xiao, Y., Savchenko, T., Baidoo, Edward E. K., Chehab, Wassim E., Hayden, Daniel M., Tolstikov, V., Corwin, Jason A., Kliebenstein, Daniel J., Keasling, Jay D. y Dehesh, K.** (2012). Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell* 149(7): 1525-1535.
- Xiong, L., Lee, B.-h., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. y Zhu, J.-K.** (2001). FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Gen Dev* 15(15): 1971-1984.
- Yamaguchi, K. y Subramanian, A. R.** (2003). Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. *Eur J Biochem* 270(2): 190-205.
- Yruela, I. y Contreras-Moreira, B.** (2012). Protein disorder in plants: a view from the chloroplast. *BMC Plant Biol* 12(1): 165.
- Ytterberg, A. J., Peltier, J.-B. y van Wijk, K. J.** (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol* 140(3): 984-997.
- Zbierzak, A. M., Kanwischer, M., Wille, C., Vidi, P. A., Giavalisco, P., Lohmann, A., Briesen, I., Porfirova, S., Brehelin, C., Kessler, F. y Dormann, P.** (2010). Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochem J* 425(2): 389-399.
- Zhang, S., Apel, K. y Kim, C.** (2014). Singlet oxygen-mediated and EXECUTER-dependent signalling and acclimation of *Arabidopsis thaliana* exposed to light stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369(1640): 20130227.
- Zhang, Z.-W., Yuan, S., Feng, H., Xu, F., Cheng, J., Shang, J., Zhang, D.-W. y Lin, H.-H.** (2011). Transient accumulation of Mg-protoporphyrin IX regulates expression of PhANGs – New evidence for the signaling role of tetrapyrroles in mature *Arabidopsis* plants. *J Plant Physiol* 168(7): 714-721.

## Bibliografía

**Zhang, Z.-W., Yuan, S., Xu, F., Yang, H., Zhang, N.-H., Cheng, J. y Lin, H.-H.** (2010). The plastid hexokinase pHXK: a node of convergence for sugar and plastid signals in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 584(16): 3573-3579.

**Zybaïlov, 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.

# Material suplementario



## Material suplementario

**Figura A1.** Alineamiento múltiple de secuencias de las proteínas Executer homólogas. El software Clustal X 2.1 colorea los aminoácidos según sus propiedades (Thompson *et al.* 1997), señalando con un asterisco (\*) las posiciones totalmente conservadas, con dos puntos (:) las altamente conservadas, y con un punto (·) las menos conservadas. Abreviaturas: ARATH, *Arabidopsis thaliana*; ARALY, *Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*; CAPRU, *Capsella rubella*; CAPGR, *Capsella grandiflora*; BOEST, *Boechera stricta*; EUTSA, *Eutrema salsugineum*; BRARA, *Brassica rapa*; FRAVE, *Fragaria vesca*; PRUPE, *Prunus persica*; SOLLY, *Solanum lycopersicum*; SOLTU, *Solanum tuberosum*; VITVI, *Vitis vinifera*; POPTR, *Populus trichocarpa*; POPEU, *Populus euphratica*; RICCO, *Ricinus communis*; THECA, *Theobroma cacao*; LINUS, *Linum usitatissimum*; CUCSA, *Cucumis sativus*; CUCME, *Cucumis melo*; EUCGR, *Eucalyptus grandis*; GLYMA, *Glycine max*; PHAVU, *Phaseolus vulgaris*; MEDTR, *Medicago truncatula*; ZEAMA, *Zea mays*; SETIT, *Setaria italica*; ORYSA, *Oryza sativa*; PHYP, *Physcomitrella patens*; SELMO, *Selaginella moellendorffii*; CHLRE, *Chlamydomonas reinhardtii*; y VOLCA, *Volvox carteri*.

Ex1

```

ARATH EX1 -----MPSLSTP----PSONLAFSPAAS--ATSSRLTTPSSKRSTFYF-----HRLDPDTALCRCSSSS--GSNSSS-----SSSDDN--P
ARALY EX1 -----MPSLSTP----PSONLAFSPAAS--ATSSRLTTPS-KRFFYP-----HRLDPDTALCRCSSSS--GSNSSS-----SSSDDN--P
CAPRU EX1 -----MPSLSTP----PSONLAFSPAAS--ATSSRLTTPS-RRFFYP-----HRLDPDTALCRCSSSS-----SSDDI--P
CAPGR EX1 -----MPSLSTP----PSONLAFSPAAS--ATSSRLTTPS-RRFFYP-----HRLDPDTALCRCSSSS-----SSDDI--P
BOEST EX1 -----MPSLSTP----PSONLAFSPAAS--ATSSRLTTPY-KLPSYF-----HRLLP--ALCRSSS-----DDN--P
EUTSA EX1 -----MPSLSTP----PSONLAFSPAAS--TSSRLTTP-KRFFYP-----QRLSDHAALCRCSSSS--SGGNPS-----SASDDN--P
BRARA EX1 -----MPSLSTP----PSONLAFSPAAS--ATSSRLTTP-KRFFYP-----HRLSDPAALCRCSSSS--GSNSSSA-----SSDDENPF
FRAVE EX1 -----MASISAP----PTPHNLTPSTPKS--YPSA-KSPFPSSS-----SRF-----CLCRNPS-----DSVW
PRUPE EX1 -----MASISAP----TPSPHKLHPSNRP--YPSVGRKRPFPSSSP-----SQTRFRFPDSSLCRCQNPSS-----SSESIOW
SOLLY EX1 -----MASLPPPTFDVNHKFNFSNPKF--TSRLKRSSSSFTLS-----TSHLLSRVSGSAFCRCRNGTCDGETVEFSPS-----VSNQSSSSSSW
SOLTU EX1 -----MASLAPPTFDVNHKFNFSNPKF--TSRLKRSSSSFTLS-----TSHLSRVSGSAFCRCRSGTCDGETVEFSPS-----VSNQSSSSSS-W
VITVI EX1 -----MASLSPPTFPSPHRSDVAACH--KLTHRNTPFSWRPPP-----LKPQPQPPPTFLFCSTHLRSLSDSVVCR-----CHGHGQLPGDDF
POPTR EX1 -----MASISPP--SP-YKLTFTTRKR--LPYSPKQFQPSRYF-----LRLLSDSLTCRCT-----DSNNPSIOW
POPEU EX1a -----MASISPP--SP-YKLTFTTRKR--LPYSPKQFQPSRYF-----LRLLSDSLTCRCT-----DSNNPSIOW
RICCO EX1 -----MASISPP--TP-HKLSFKKHKF--LPR--KQFVPSST-----SSSIYSTPSLRCRSTNA-----DDSSSIOW
THECA EX1 -----MASLPTP--TPR-HNLTPSPRP--PSL--KRFPYP-----PSRFDDSTLCRCNNP-----DSNSSSINW
LINUS EX1a -----MASISAP----TPPVNLIHSSHR--HPK--RRRSSLSPSF-----SRRFPDSSLRCNTN-----SSSDNQAW
LINUS EX1b -----MASISAP----TPPVNLIHSSHR--HPK--RRRSSLSPSF-----SRRFPDSSLRCNTN-----SSSDNQAW
CUCSA EX1 -----MASISPP--TP-HQLFFSTLKF--QHPFPLKPYAPSP-----SQHTICCHNPD-----PSPFSLPW
CUCME EX1 -----MASISPP--TP-HQLFFSTLKF--HYPPFPLKPYAPSP-----SQHTICCHNPD-----PSPFSLPW
EUCGR EX1 -----MASVIGP--SP-HQLMPPGARS--SPCAARRSLCPPPPS-----AFPSQSLSRAPDPSALCHRSGGSDAAPP-----PDDSALPRR
GLYMA EX1a MFPHLHPFPTAHILLQOHVYFSLMASSS--ISAPTLTPFQKL--AVPFAPTFSLLP-----FPQPCCRLASASDDRCSS-----AKRS
GLYMA EX1b -----MASSS--ISAPTLTPFQKL--AVPFAPTFSLLP-----FPLQSPCRLASASDDRCSS-----GAKR
PHAVU EX1 -----MAS--ISAPTLTPFQKL--AVPFA-RTFSLLP-----FPISSCRLAS--DDRS-----GAKR
MEDTR EX1 -----MASLSS--LS-PHLTPFQKL--STTFPLKRPSSLH-----FSPQLCLCLNSLSDNHSIN-----NNDADGNR
ZEAMA EX1a -----MASVYTA--RAPLPTVASSS-----SSARQVDNP--SGSR-FLAGRR--LRVVRLAGAAPS-----RRAPWVCYS-----ARPD-ADADGQRRR
ZEAMA EX1b -----MASVSTAP--RAPLPAASSS-----LSARQVDNP--SGSH-FLDGR--LRVVRLAGAAPS-----RRAPLVCCS-----ARPD-ADADGRRRR
SETIT EX1 -----MASVSTAP--RAPLPAASSS-----SSARQVDNP--SGNR-FLAARR--LRVVRLAGAAPS-----RRAPAVRCS-----ARPE-ADGGRRRR
ORYSA EX1 -----MAAAVSTAP--RAPLPAAGVSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSRIPLAARRERLRVVRLAGAAPAPPPRRVSSVVRCGGGG-----GVRPDDADAGSRRRR

```

Ex2

```

ARALY EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPOPHLLPSPKN-----SPIPELSTNKTNFVSIGLRHSFAS--ITWNPKKPSLCLR-NCPAVDGADTSCSCE-----
BOEST EX2 -----MAITHEPCLIG--HRISVPOPHLLPSPKS-----SPNPELSTNKRNFVSIGLRHSFAS--ITWNPKKPCLCLR-NCAAVDGADTSCSCE-----
ARATH EX2 -----MAITOPCLIG--QIIAVPOPHLLPSPRN-----SLKPELSTNKTNFVSIGLRHSFAS--ITCNPKAPSLCLR-NCAAVDGADTSCSCE-----
CAPRU EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPRHLLPSPKN-----SPNP--DPSNFVSIGLRHSFAS--ITCYPKTPSRCLR-NCAAVDDADTSCSCE-----
CAPGR EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPRHLLPSPKN-----SPNP--DPSNFVSIGLRHSFAS--ITCYPKTPSRCLR-NCAAVDDADTSCSCE-----
EUTSA EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPRHLLPSPKN-----SPNP--DPSNFVSIGLRHSFAS--ITCYPKTPSRCLR-NCAAVDDADTSCSCE-----
BRARA EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPRHLLPSPKN-----SPNP--DPSNFVSIGLRHSFAS--ITCYPKTPSRCLR-NCAAVDDADTSCSCE-----
SOLLY EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPRHLLPSPKN-----SPNP--DPSNFVSIGLRHSFAS--ITCYPKTPSRCLR-NCAAVDDADTSCSCE-----
SOLTU EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPRHLLPSPKN-----SPNP--DPSNFVSIGLRHSFAS--ITCYPKTPSRCLR-NCAAVDDADTSCSCE-----
VITVI EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPRHLLPSPKN-----SPNP--DPSNFVSIGLRHSFAS--ITCYPKTPSRCLR-NCAAVDDADTSCSCE-----
EUCGR EX2 -----MAITHEPCLIG--QRISVPRHLLPSPKN-----SPNP--DPSNFVSIGLRHSFAS--ITCYPKTPSRCLR-NCAAVDDADTSCSCE-----
POPTR EX2a -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
POPEU EX2a -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
POPTR EX2b -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
POPEU EX2b -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
RICCO EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
LINUS EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
THECA EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
CUCSA EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
CUCME EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
FRAVE EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
PRUPE EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
GLYMA EX2a -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
GLYMA EX2b -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
PHAVU EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
MEDTR EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
SETIT EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
ZEAMA EX2a -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
ZEAMA EX2b -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA
ORYSA EX2 -----MIVGNVGMG--QSITTVPOLRPFCCID-----FPAKSTNPSFLFGWCS--SPHNNKNSF--LNKT--RENSNLHCCYCYNSNNSP--SA

```

Ex1

```

PHYPA EXa -----MMAVGAVAAPLRVCTLPSSSPAQVCCINSHNASRCLMVAQAQPRGCS--FPHRIVKALDTRGNKQRLNNS--SFPACRC-----SASG
PHYPA EXc -----MMAVGAVAAPLRVCTLPSSSPAQVCCINSHNASRCLMVAQAQPRGCS--FPHRIVKALDTRGNKQRLNNS--SFPACRC-----SASG
PHYPA EXb -----MMAVGAVAAPLRVCTLPSSSPAQVCCINSHNASRCLMVAQAQPRGCS--FPHRIVKALDTRGNKQRLNNS--SFPACRC-----SASG
PHYPA EXd -----MMAVGAVAAPLRVCTLPSSSPAQVCCINSHNASRCLMVAQAQPRGCS--FPHRIVKALDTRGNKQRLNNS--SFPACRC-----SASG
SELMO EXa -----MMAALVSOAAAGLGRSSSSSSSLGGIGSSNLLACSSSRCHPFPVSAWISAGNVVRV--SRLRQVIRCOCAVDDNS-----EGNAETS
SELMO EXb -----MMAALVSOAAAGLGRSSSSSSSLGGIGSSNLLACSSSRCHPFPVSAWISAGNVVRV--SRLRQVIRCOCAVDDNS-----EGNAETS
CHLRE EX -----MRACHRHALSSNVLPAVFRGLTGPTRPRLPCCVVGRR-----SWACSAALSDGGSGQSAAVN-----PKLVAD-KAOL
VOLCA EX -----MDRVAMP--SARRPFC--FNVGOCCORLPRPLPCRPPFAMVALSRRG-----VSCSAALSDGGSGQSAAVN-----PKITGDSLSOL

```

Ex

1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150



Motivo Uvr

Motivo Uvr

ARATH EX1	RWDSAIQDVLKSAIKRFDVSLGWAT	-----LDNDGGE--	CGSENVEKIDD	-----	DWDWRKXKHFQVDDQDRLLSVLKS	LNRAIKREDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGKVMSTFYRALLEERYKDAVYLRKAGAGL	
ARALY EX1	RWDSAIQDVLKSAIKRFDVSLGWTTT	-----LDNDAG--	ENVEKIDD	-----	DWDWRKXKHFQVDDQDRLLSVLKS	LNRAIKREDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGKVMSTFYRALLEERYKDAVYLRKAGAGL	
CAPRU EX1	RWDSAIQDVLKSAIKRFDVSLGWSN	-----QDTDASYDVE	DSGNINKNED	-----	DWDWRKXKHFELVDDQDRLLSVLKS	LNRAIKREDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGKVMSTFYRAVLEERYKDAVYLRKAGAGL	
CAPGR EX1	RWDSAIQDVLKSAIKRFDVSLGWSN	-----QDTDASYDVE	DSGNINKNED	-----	DWDWRKXKHFELVDDQDRLLSVLKS	LNRAIKREDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGKVMSTFYRAVLEERYKDAVYLRKAGAGL	
BOEST EX1	RWDSAIQDVLKSAIKRFDVSLGWSN	-----QDNASDDVD	ESGNINKNED	-----	DWDWRKXKHFELVDDQDRLLSVLKS	LNRAIKREDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGKVMSTFYRALLEERYKDAVYLRKAGAGL	
EUTSA EX1	RWDSAIQDVLKSAIKRFDVSLGWSRS	-----QDKDAGDDVE	SGDIKIED	-----	DWDWRKXKHFQVDDQDRLLSVLKS	LNRAIKREDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGKVMSTFYRAVLEERYKDAVYLRKAGAGL	
BRARA EX1	RWDAAIQDVLKSAIKRFDVSLGWSSTTG	-----QDKDADVN	DVVLVEEQDES	-----	DWDWRKXKHFELVDDQDRLLSVLKS	LNRAIKREDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGKVMSTFYRAVLEERYKDAVYLRKAGAGL	
FRAVE EX1	RWDSALQDLVKTAMKRLDVSFNSNFPQD	-----	EEF	-----	DWDWRWRQHFLEVEEERLVSILKA	QLGRAVNVDFDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVIRLNTALQERYQEAFFRNAAAGL	
PRUPE EX1	RWDSALQGLIQNAIERFDSVFNFKPQD	-----	QNAFFE	S	GNRDEP	DWDWRWRQHFLEVEEERLVSILKA	QLGRAVNVDFDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVIRLNTALQERYQEAFFRNAAAGL
SOLLY EX1	RWDLAFQDAVNAMKLLDVSFNSK	-----	VLDERKS	E	IGVDDQ	DWDWRKXKHFSEVEEERLVSILKA	QLAHAISREYDAARLKVAIAAAT	KDVGVMSTFYRAVLEERYKDAVYLRKAGAGL
SOLTU EX1	RWDLAFQDAVNAMKLLDVSFNSK	-----	VLDERKS	E	IGVDDQ	DWDWRKXKHFSEVEEERLVSILKA	QLAHAISREYDAARLKVAIAAAT	KDVGVMSTFYRAVLEERYKDAVYLRKAGAGL
VITVI EX1	RWDSAIKQFLKNAIKRFDVSNVNRGAKDRSCVDVAERGN	-----	AAEDK	-----	DWDWRKXKHFSEVEEERLVSILKS	QLGHAVKEDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL	
POPTR EX1	RWDAALQAVFNKAIKSPDSVMNPKKGVG	-----	NKGVMEGETCEE	E	EEDDGT	VWDWRWRLHFDVDEQRLVSLK	SLGNAVNRDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL
POPEU EX1a	RWDAALQAVFNKAIKSPDSVMNPKKGVG	-----	NKGVMEGETCEE	E	EEDDGT	VWDWRWRLHFDVDEQRLVSLK	SLGNAVNRDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL
RICCO EX1	RWDAALQAVFNKAIKSPDSVMNPKKGVG	-----	NKGVMEGETCEE	E	EEDDGT	VWDWRWRLHFDVDEQRLVSLK	SLGNAVNRDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL
THECA EX1	RWDAALQAVFNKAIKSPDSVMNPKKGVG	-----	NKGVMEGETCEE	E	EEDDGT	VWDWRWRLHFDVDEQRLVSLK	SLGNAVNRDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL
LINUS EX1a	RWDAALQAVFNKAIKSPDSVMNPKKGVG	-----	NKGVMEGETCEE	E	EEDDGT	VWDWRWRLHFDVDEQRLVSLK	SLGNAVNRDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL
LINUS EX1b	RWDAALQAVFNKAIKSPDSVMNPKKGVG	-----	NKGVMEGETCEE	E	EEDDGT	VWDWRWRLHFDVDEQRLVSLK	SLGNAVNRDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL
CUCSA EX1	GWGSAALDLQPTAFRRPDSLVNRRNDGSKDTPDGEALQGRG	-----	VGDGDDKDDVDDDR	-----	SWDWRKXKHFVDEQRLVSLK	SLRISHAVYEDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL	
CUCME EX1	GWGSAALDLQPTAFRRPDSLVNRRNDGSKDTPDGEALQGRG	-----	VGDGDDKDDVDDDR	-----	SWDWRKXKHFVDEQRLVSLK	SLRISHAVYEDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL	
EUCGR EX1	RWDSAIQDVLKSAIKRFDVSNVNRGAKDRSCVDVAERGN	-----	AAEDK	-----	DWDWRKXKHFSEVEEERLVSILKS	QLGHAVKEDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL	
GLYMA EX1a	GWDSVLFHFP-EVAKRVDVFWKSLGN	-----	AADDRVR	-----	DWDWRKXKHFSEVEEERLVSILKS	QLGHAVKEDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL	
GLYMA EX1b	GWDSVLFHFP-EVAKRVDVFWKSLGN	-----	AADDRVR	-----	DWDWRKXKHFSEVEEERLVSILKS	QLGHAVKEDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL	
PHAVU EX1	GWDSVLFHFP-EVAKRVDVFWKSLGN	-----	AADDRVR	-----	DWDWRKXKHFSEVEEERLVSILKS	QLGHAVKEDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL	
MEDTR EX1	RWDSVLEFVTAIKRFDVSNVNRGAKDRSCVDVAERGN	-----	AAEDK	-----	DWDWRKXKHFSEVEEERLVSILKS	QLGHAVKEDYDAARLKVAIAAAT	NDVAVGRVMSLNRAIAEERYDAAAFIRNSAGAGL	
ZEAMA EX1a	GWDAALHDAFQAVRRNSEVSNWVPLPP	-----	SVKEAGTCKRVGS	SYD	EVMMGDDEEMK	VEEGEKMSWARKRHFALIES	GRVDELQQLGAAVYREDYTAHKLRLAIAAAT	SKNDVAVGRAISDLNMAIDERYKDAVYLRKAGAGL
ZEAMA EX1b	GWDAALHDAFQAVRRNSEVSNWVPLPP	-----	SVKEAGTCKRVGS	SYD	EVMMGDDEEMK	VEEGEKMSWARKRHFALIES	GRVDELQQLGAAVYREDYTAHKLRLAIAAAT	SKNDVAVGRAISDLNMAIDERYKDAVYLRKAGAGL
SETIT EX1	GWDAALHDAFQAVRRNSEVSNWVPLPP	-----	SVKEAGTCKRVGS	SYD	EVMMGDDEEMK	VEEGEKMSWARKRHFALIES	GRVDELQQLGAAVYREDYTAHKLRLAIAAAT	SKNDVAVGRAISDLNMAIDERYKDAVYLRKAGAGL
ORYSA EX1	GWDAALHDAFQAVRRNSEVSNWVPLPP	-----	SVKEAGTCKRVGS	SYD	EVMMGDDEEMK	VEEGEKMSWARKRHFALIES	GRVDELQQLGAAVYREDYTAHKLRLAIAAAT	SKNDVAVGRAISDLNMAIDERYKDAVYLRKAGAGL
ARALY EX2	DKWDWRNRRHFSEIEBEVTVVSLK	SLQDAVEKDFEAAVKLQAI	EAATVDDVAEIMRQLTA	IREERYHDA	SLRCNQTG	SSGL		
BOEST EX2	DKWDWRNRRHFSEIEBEVTVVSLK	SLQDAVEKDFEAAVKLQAI	EAATVDDVAEIMRQLTA	IREERYHDA	SLRCNQTG	SSGL		
ARATH EX2	DKWDWRNRRHFSEIEBEVTVVSLK	SLQDAVEKDFEAAVKLQAI	EAATVDDVAEIMRQLTA	IREERYHDA	SLRCNQTG	SSGL		
CAPRU EX2	DKWDWRNRRHFSEIEBEVTVVSLK	SLQDAVEKDFEAAVKLQAI	EAATVDDVAEIMRQLTA	IREERYHDA	SLRCNQTG	SSGL		
CAPGR EX2	DKWDWRNRRHFSEIEBEVTVVSLK	SLQDAVEKDFEAAVKLQAI	EAATVDDVAEIMRQLTA	IREERYHDA	SLRCNQTG	SSGL		
EUTSA EX2	DKWDWRNRRHFSEIEBEVTVVSLK	SLQDAVEKDFEAAVKLQAI	EAATVDDVAEIMRQLTA	IREERYHDA	SLRCNQTG	SSGL		
BRARA EX2	DKWDWRNRRHFSEIEBEVTVVSLK	SLQDAVEKDFEAAVKLQAI	EAATVDDVAEIMRQLTA	IREERYHDA	SLRCNQTG	SSGL		
SOLLY EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
SOLTU EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
VITVI EX2	SGDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
EUCGR EX2	CSWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
POPTR EX2a	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
POPEU EX2a	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
POPTR EX2b	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
POPEU EX2b	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
RICCO EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
LINUS EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
THECA EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
CUCSA EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
CUCME EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
FRAVE EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
PRUPE EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
GLYMA EX2a	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
GLYMA EX2b	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
PHAVU EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
MEDTR EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
SETIT EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
ZEAMA EX2a	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
ZEAMA EX2b	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
ORYSA EX2	SLDWDNRWTRYPSEIEQESYASV	LKLPLEAIEKDFEAAKLSIA	EAATSKDSVAEIMSLKNA	IDERYHDA	SLRCSTG	SSGL		
PHYPA EXa	GLSD-----	SNSLRENDHANGGVAAPSSVWD	IPSQHKHMQESE	-----	HESDWERKQVFAVETS	ESLATTMLKQEKAVQENF	QAAKCKVALDAVQKDVVAEVMNGLKRALA	BEERYDNATLFRKAGAGL
PHYPA EXc	GLSD-----	SNSLRENDHANGGVAAPSSVWD	IPSQHKHMQESE	-----	HESDWERKQVFAVETS	ESLATTMLKQEKAVQENF	QAAKCKVALDAVQKDVVAEVMNGLKRALA	BEERYDNATLFRKAGAGL
PHYPA EXb	KMGDPLRDMVSVASKLQSVLDS	VNSIKTKAEVDDELVPEQETE	-----	QBSDVWRKQVFAVETS	ESLATTMLKQEKAVQENF	QAAKCKVALDAVQKDVVAEVMNGLKRALA	BEERYDNATLFRKAGAGL	
PHYPA EXd	KMGDPLRDMVSVASKLQSVLDS	VNSIKTKAEVDDELVPEQETE	-----	QBSDVWRKQVFAVETS	ESLATTMLKQEKAVQENF	QAAKCKVALDAVQKDVVAEVMNGLKRALA	BEERYDNATLFRKAGAGL	
SELMO EXa	-----	MLSTAGKQVLLKPRSLTTEVVED	-----	EVTEWDRKQVFAVETS	ESLATTMLKQEKAVQENF	QAAKCKVALDAVQKDVVAEVMNGLKRALA	BEERYDNATLFRKAGAGL	
SELMO EXb	-----	MLSTAGKQVLLKPRSLTTEVVED	-----	EVTEWDRKQVFAVETS	ESLATTMLKQEKAVQENF	QAAKCKVALDAVQKDVVAEVMNGLKRALA	BEERYDNATLFRKAGAGL	
CHLRE EX	ETSENPPGRGAGPVKGERERVDGSELLT	-----	QGS	-----	SWEWELKHPDMDLAEDEAAHYV	ELNLTAVRBOYDAAAPFKRLOE	TSQSDTVASVORLOEALATEOYGAADLRRLGLVGL	
VOLCA EX	EPRESSHARAAPIKGERERVDGSELLT	-----	QGS	-----	SWEWELKHPDMDLAEDEAAHYV	ELNLTAVRBOYDAAAPFKRLOE	TSQSDTVASVORLOEALATEOYGAADLRRLGLVGL	

Ex1

Ex2

Ex1

Ex

.....160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300







Ex1

```

ARATH EX1 LAVVSSSEDEESNS-----DDSDLLLESSEGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
ARALY EX1 LRVVSSSEDEESNS-----DDSDLLLESSEGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
CAPRU EX1 IADVSSSEDEESNS-----DDSDLLLESSEGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
CAPGR EX1 IADVSSSEDEESNS-----DDSDLLLESSEGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
BOEST EX1 LDVSSSEDEESNS-----DDSDLLLESSEGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
EUTSA EX1 LAVVSSSEDEESNS-----DDSDLLLESSEGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
BRARA EX1 LAVVSSSEDEESNS-----DDSDLLLESSEGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
FRAVE EX1 IFLGSAADTEDGDD-----MDDLDLSEGLSGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGNVDRDLISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
PRUPE EX1 LRVVSSSEDEESNS-----DDSDLLLESSEGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
SOLLY EX1 MPDK-ISADEE-DG-----EDREDD-----PGFNALKDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
SOLTU EX1 MPDK-ISADEE-DG-----EDRDDD-----PGFNALKDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
VITVI EX1 LLAATSIEDSED-FD-----RDGSDAAEGLSGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
POPTR EX1 LPVVSTEDVDDADD-----TEDGSDLAEBGLPGFNILRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
POPEU EX1a LPVVSTEDVDDADD-----TEDGSDLAEBGLPGFNILRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
RICCO EX1 LPVVSTEDVDDADD-----TEDGSDIAEBGLPGFNILRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
THECA EX1 IPVVSTEDVDDADD-----DDADDGSDVGGELTGFQSLRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
LINUS EX1a LPVVSTEDVDDADD-----TEDGSDPAEGFPFNILRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
LINUS EX1b LPVVSTEDVDDADD-----TEDGSDPAEGFTGFNILRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
CUCSA EX1 LLIIGGFAEDGDIR-----NEDSDIAGFPVFNILRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
CUCME EX1 LPIIGGFAEDVDIR-----SEDSDIAGFPVFNILRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
EUCGR EX1 VVIAFAEDBEDGCG-----REDGSDLSEGLPGFNILRDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
GLYMA EX1a LPVVSTEDVDDADD-----RNDGSDPAEGMPGNVLDKDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
GLYMA EX1b LPVVSTEDVDDADD-----RNDGSDPAEGMPGNVLDKDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
PHAVU EX1 LPVVSTEDVDDADD-----RNDGSDPTEGMPGNVLDKDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
MEDTR EX1 LPVVSTEDVDDADD-----RNDGSDPAEGMPGNVLDKDMIPGVKVKVMKVTAPGRVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
ZEAMA EX1a EPDGSVNMDDKSD-----DSNIDAG--PGKDLSSDPAVPRILKLVKVP--MQNVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
ZEAMA EX1b EPDGSVNMDDKSD-----DSNIAAG--PGKDLSSDPAVPRILKLVKVP--MQNVDPKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
SETIT EX1 EPDGSVNMDDKSD-----DSNITAGGPAGLKDLSSDPAVPRILKLVKVP--MENVDKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE
ORYSA EX1 DNNRQVNMDDQSD-----DSNITAGGPAGLKDLSSDPAVPRILKLVKVP--MENVDKPFISKVIEQIAD-----EEDENNLDIHDIDVE

```

Ex2

```

ARALY EX2 S--ELKED-KKED-----IQLNAGEPTEEGIKNVIFLKDIPGLKLVMDVIR--IPBEIVGSDAAABELVGGIEER--NSSDDEEEEEE
BOEST EX2 S--EVKVD-KKED-----KLLNAGEPTEEGIKNVIFLKDIPGLKLVMDVIR--IPBEIVGSDAAABELVGGIEER--NSSDDEEEEEE
ARATH EX2 S--ELKVD-KKED-----IQLNAGEPTEEGIKNVIFLKDIPGLKLVMDVIR--IPBEIVGSDAAABELVGGIEER--NSSDDEEEEEE
CAPRU EX2 S--EVKVD-KKED-----KLLNAGEPTEEGIKNVIFLKDIPGLKLVMDVIR--IPBEIVGSDAAABELVGGIEER--NSSDDEEEEEE
CAPGR EX2 S--EVKVD-KKED-----KLLNAGEPTEEGIKNVIFLKDIPGLKLVMDVIR--IPBEIVGSDAAABELVGGIEER--NSSDDEEEEEE
EUTSA EX2 N--EVKVD-KKED-----KQLNAGEPTEEGIKNVIFLKDIPGLKLVIR--VLDEIVGSDAAABELVGGIEER--SSADFEEDDD
BRARA EX2 S--EVKVD-KKED-----KLLNAGEPTEEGIKNVIFLKDIPGLKLVMDVIR--LPDEIIGSDDDLVLVGGIEER--GSADFEEDDD
SOLLY EX2 DEAEAEAE-KSNE-----KSIDFGEAABGIRSVINFLKDKIPGLKLVKVMKVN--ITEETDDGSDVKOLFEEEDNITIS--SETTETTTDLNIM
SOLTU EX2 D--AEAEAE-KTNE-----KSIDFGEAABGIRSVINFLKDKIPGLKLVKVMKVN--ITEETDDGSDVKOLFEEEDNITIS--SETTETTTDLNIM
VITVI EX2 N--EGKTE-KREE-----KGISIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMKVN--VPEVIEDGSDVKOLFEEEDNITIS--SESEDEADDLKI
EUCGR EX2 N--ELKTE-TNDD-----KGLNIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VAEIVIEDGSDVKOLFEEEDNITIS--LENSEDEGDVNF
POPTR EX2a N--DVKVE-KSEE-----KSNIEEATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--ATEVMEEDSDVKOLFEEEDNITIS--SENSEDDASNLEI
POPEU EX2a N--DVKVE-RSEE-----KSNIEEATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--ATEVMEEDSDVKOLFEEEDNITIS--SENSEDDASNLEI
POPTR EX2b N--DKTE-RSEG-----KSNIEEATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--ATEVMEEDSDVKOLFEEEDNITIS--SENSEHADSLLEI
POPEU EX2b N--DKTE-KSEE-----KSNIEEATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--ATEVMEEDSDVKOLFEEEDNITIS--SENLEQASDLLEI
RICCO EX2 N--EVKAE-RSEE-----KGINIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--ATEVMEEDSDVKOLFEEEDNITIS--SESEDESNLEI
LINUS EX2 N--EVKOE-GTEE-----KGDIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VSEVVEDSDVKOLFEEEDNITIS--TESEDESEKLEI
THECA EX2 N--AKAE-RSDE-----KGINIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--ATEVMEEDSDVKOLFEEEDNITIS--TENSDDDTDLLEI
CUCSA EX2 N--VVTR-ESEE-----KGVIMEEATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VPEVIDDANSVKOLFEEEDNITIS--SGNSDEMDRLDEI
CUCME EX2 N--VVTR-ESEE-----KGVIMEEATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VPEVIDDANSVKOLFEEEDNITIS--SGNSDEMDRLDEI
FRAVE EX2 N--DNVE-SSDE-----KGLNIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VAEIVMEEDSDVKOLFEEEDNITIS--DENSEDEGNLDEI
PRUPE EX2 T--EGKAE-SSSE-----KGINIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VAEIVMEEDSDVKOLFEEEDNITIS--DENSEDEVDNDEI
GLYMA EX2a P--EKIE-RNDE-----KNSNIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VEEBAENNSDVKOLFEEEDNITIS--SENHEEVDNLEI
GLYMA EX2b P--EKIE-RNDE-----KNSNIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VEEBAENNSDVKOLFEEEDNITIS--SENHEEVDNLEI
PHAVU EX2 D--EKVE-RNDEKVRNDE--KNSNIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VEEBAENNSDVKOLFEEEDNITIS--GENHQEVDNLEI
MEDTR EX2 P--DKVEBERNDE--KNSNIEGATERGKSVINFLKDKIPGLKLVKVMNVD--VEEBAENNSDVKOLFEEEDNITIS--ED-----DNLEI
SETIT EX2 EASATDITVKGEDVBEKEDVGSSEKDSVGLKSVLFPKSRIFPKFQVINVND--VSETELAANSSBELVODVKS--SENSELEPTEEL
ZEAMA EX2a EASATDITVKGEDVBEKEDVGSSEKDSVGLKSVLFPKSRIFPKFQVINVND--VSETELAANSSBELVODVKS--SENSELEPTEEL
ZEAMA EX2b EASATDITVKGEDVBEKEDVGSSEKDSVGLKSVLFPKSRIFPKFQVINVND--VSETELAANSSBELVODVKS--SENSELEPTEEL
ORYSA EX2 DEASATDITVKGEDVBEKEDVGSSEKDSVGLKSVLFPKSRIFPKFQVINVND--VSETELAANSSBELVODVKS--SENSELEPTEEL

```

Ex1

```

PHYPA EXa DTQGLSEDISIG-----KGTDDAMSDEPLSRIVSFLKDRMPDVKLVKVFIA--PEGAEDKIPKIVEGLMCOEDSISKQOD--LPEASTNNTNSNNT
PHYPA EXc DTQGLSEDISIG-----KGTDDAMSDEPLSRIVSFLKDRMPDVKLVKVFIA--KDPKIVEGLMCOEDSISKQOD--LPEASTNNTNSNNT
PHYPA EXb NTAESSEEDASISR--KGAAGSAILDEPLSKLMSFLKDRIPDVKLVKVFIA--PEGADAEKIPKIVEGLMCOEDSISKQOD--LPEASTNNTNSNNT
PHYPA EXd NTAESSEEDASISR--KGAAGSAILDEPLSKLMSFLKDRIPDVKLVKVFIA--PEGADAEKIPKIVEGLMCOEDSISKQOD--LPEASTNNTNSNNT
SELMO EXa EGDQKVSDDL-----KSDEKDSLDEGLNRLLAPLGRMPDVKLVKVFIA--PDKVEKDLKIPKIVEGLMCOEDSISKQOD--LPEASTNNTNSNNT
SELMO EXb TKSAKTEKOEK--EKADDSDEAHVOAGSIVLPLKDRIPDLNPKVIVKVFIA--PEGSEEDIPKITEETTEREOKBHRKSD--ASAIGGIIVVOSSD

```

Ex

```

CHLRE EX GAKGCGAKGTGVA-----GAAALNPASVVRILTHVARDGSAITSVLPPKAVKESFSSWEEEMRAAALAGSLGSGPKKAGSGLGAMSSSKAKPAAAAAASAAAPAAATEDEEDVLTETLRVPAQ
VOLCA EX DARSKGSEGADAT-----KGCATOLNPASVVRILTHVARDGSAITSVLPPKAVKESFSSWEEEMRAAALAGS-----GPKPAAP-RGNVGSRPGGAAALGSAKRPNDDEDEEDVLTETLRVPAQVAMGCRDRFPKIVLEQ
.....460.....470.....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.....560.....570.....580.....590.....600

```



Ex1

```

ARATH EX1 -----DDTKAIDDK-NADILELSVDEIDNNGGREIAVKFVIGDIVDRLSNGQPLKESLRSANLESVNSFYLRLEKDLNVK-ESKGVGCTIVDVGKSGSRQRRRIE-NIMCDLAKSIEKPKKISVKM
ARALY EX1 -----DDTKAIDDK-NTHILELSVDEIDNNGGREIAVKFVIGDIVDRLSNGQPLKESLRSANLESVNSFYLRLEKDLNVK-ESKGVGCTIVDVGKSGSRQRRRIE-NIMVDLAKSIEKPKKISVKM
CAPRU EX1 -----DDTKAIDDK-NADILELSVDEIDNNGGREIAVKFVIGDIVDRLSNGQPLKESLRSANLETVNSFYLRLEKDLNVQ-ESKGVGCTIVDVGKSGSRQRRRIE-NIMVDLAKSIEKPKKISVKM
CAPGR EX1 -----DDTKAIDDK-NADILELSVDEIDNNGGREIAVKFVIGDIVDRLSNGQPLKESLRSANLETVNSFYLRLEKDLNVQ-ESKGVGCTIVDVGKSGSRQRRRIE-NIMVDLAKSIEKPKKISVKM
BOEST EX1 -----DDTKAIDDK-DADILELSVDEIDNNGGREIAVKFVIGDIVDRLSNGQPLKESLRSANLESVDNPFYLRLEKDLNVQ-ESKGVGCTIVDVGKSGSRQRRRIE-NIMVDLAKSIEKPKKISVKM
EUTSA EX1 -----DDTKAIDDK-SSDILELSVDEIDNNGGREIAVKFVIGDIVDRLSNGQPLKESLRSANLESVNSFYLRLEKDLNVQ-ESKGVGCTIVDVGKSGSRQRRRIE-NIMVDLAKSIEKPKKISVKM
BRARA EX1 -----GCTKAHSEDK-NADILELSVDEIDNNGGREIAVKFVIGDIVDRLSNGQPLKESLRSANLESVNSFYLRLEKDLNVQ-ESKGVGCTIVDVGKSGSRQRRRIE-NIMVDLAKSIEKPKKISVKM
FRAVE EX1 -----DEEKVGDGE-IDVIELD-ADPAIQAGRQIEIAVKVVGGLQKQISNIPFSSKNLLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
PRUPE EX1 -----DDEGVDDDEE-TDVIELD-ADPGIQSARREIAVKVVGGLQKQISSRPTTKNLLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIIDQDSQEKERS--SVDKKAKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
SOLLY EX1 -----DEIKVFRDGE-QNVIELD-DNGVSDGEEQSQIAVRVVVGLMNSGCAHKKLLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
SOLTU EX1 -----DEIKVFRDGE-QNVIELD-DNGVSDGEEQSQIAVRVVVGLMNSGCAHKKLLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
VITVI EX1 -----EYVNVSDGE-QDIEIME-AGHGIIDREQNEIAVKVVGGLQKLSAGVPSKLLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
POPTR EX1 -----DDKGRSDGE-RDEIEMD-AGRGIIIDNNGSEIAVKVVGGLQKLSGSPAKGSRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
POPEU EX1a -----DDKGRSDGE-RDEIEMD-AGRGIIIDNNGSEIAVKVVGGLQKLSGSPAKGSRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
RICOCC EX1 -----DESSGSDGE-RDEIEMD-AVHGIIIDNNGSEIAVKVVGGLQKLSGSPAKGSRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
THECA EX1 -----DEIKRSDGE-RDIEIIN-ADSVINDNMRGIEIAVKVVGGLQKLSGSPATSLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
LINUS EX1a -----DDIKGSEEE-RNEIID- AASEMIDNVANGIEISIKVVVEGLAKHSSASAGGEDCVRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
LINUS EX1b -----DEIKGSEEE-RNEIID- AANEMIDNVANGIEISIKVVVEGLAKHSSASAGGEDCVRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
CUCSA EX1 -----RIKDDHC-EKDAGLD-ADDGFLENGRNVAIKIIVGGLVQLSGVSKNVRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
CUCME EX1 -----RIKDDHC-EKDAGLD-ADDGFLENGRNVAIKIIVGGLVQLSGVSKNVRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
EUCGR EX1 -----DEVKSDGE-RDEMMD-LPGVIESGRNEFAVKVVGGLVQLSANVPTKLLRVPAKLEKGRSFCFSMIKDVSGKDSGRKGS--SVGRKAFRSRGSID-QVMDLAKVIGREK-IPKLV
GLYMA EX1a -----DIKSHDGE-GDDEIIVN-AGLGTFFERDNEFAVKIAIGGLVQLSSNLSRDLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
GLYMA EX1b -----DIKSHDGE-GDDEIIVN-AGLGTFFERDNEFAVKIAIGGLVQLSSNLSRDLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
PHAVU EX1 -----DIKSHDGE-GDDEIIVN-AGLGTFFERDNEFAVKIAIGGLVQLSSNLSRDLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
MEDTR EX1 -----DIKLTDE-GDGGIIVN-QDLGTFAFEEIEIAVKVVGGLVQLSSNLSRDLRVPAKLEKGRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
ZEAMA EX1a -----DAGDDNSGVAETVSAENGDESDDEIETIVSDFVSENN-VYASRPSAABAFEMPARLEKDRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
ZEAMA EX1b -----DAGDDNSGVAETVSAENGDESDDEIETIVSDFVSENN-VYASRPSAABAFEMPARLEKDRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
SETIT EX1 -----DIQDDNNVGAETVSAENGDESDDEIETIVSDFVSENN-VYASRPSAABAFEMPARLEKDRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV
ORYSA EX1 -----DIQDDNNVGAETVSAENGDESDDEIETIVSDFVSENN-VYASRPSAABAFEMPARLEKDRSFSFTVEKDIINQHSRDKES--SGDKKVKLGGQPSID-NVMFDLAKVIGREK-IPKLV

```

Ex2

```

ARALY EX2 -----NBSIEBISMSDADYKGNHNLKVIIGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
BOEST EX2 -----NBSIEBISMSDADYKGNHNLKVIIGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
ARATH EX2 -----NBSIEBISMSDADYKGNHNLKVIIGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
CAPRU EX2 -----KNBSIEBISMSDADYKGNHNLKVIIGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
CAPGR EX2 -----KNBSIEBISMSDADYKGNHNLKVIIGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
EUTSA EX2 -----SIEETIASMDADNKNHNLKVIIGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
BRARA EX2 -----SSEETIASMDADNKNHNLKVIIGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
SOLLY EX2 -----NSDRVTVGSDSGTSEBKTVDKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
SOLTU EX2 -----NSDRVTVGSDSGTSEBKTVDKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
VITVI EX2 -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
EUCGR EX2 -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
POPTR EX2a -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
POPEU EX2a -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
POPTR EX2b -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
POPEU EX2b -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
RICOCC EX2 -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
LINUS EX2 -----CPDGVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
THECA EX2 -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
CUCSA EX2 -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
CUCME EX2 -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
FRAVE EX2 -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
PRUPE EX2 -----CPDEVALGSDSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
GLYMA EX2a -----PDAVTLERDGDATBEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
GLYMA EX2b -----PDAVTLERDGDATBEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
PHAVU EX2 -----PDGVTLDRDGDATBEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
MEDTR EX2 -----PDEVTLESDGSDSDEKDLDMKLPVGGVLIHNEISSIDDEIVRVSADIMTERDSFILHVPGRSKI--DIDTRKN-RVSKQVTLAAAGISDLMPPEVAKAFWGSKASLKV
SETIT EX2 -----PQBEVVSDEEMD--DESKSEVVKLPTSGVVHNKEAGAKS--YRVRVPAEINNMERDSFELYIPGKGSDR--DLAET-KAAKQKQVADMAAKLASELMPSDVAKALWGTTKSSSKI
ZEAMA EX2a -----PQBEVVSDEEMD--DESKSEVVKLPTSGVVHNKEAGAKS--YRVRVPAEINNMERDSFELYIPGKGSDR--DLAET-KAAKQKQVADMAAKLASELMPSDVAKALWGTTKSSSKI
ZEAMA EX2b -----PQBEVVSDEEMD--DESKSEVVKLPTSGVVHNKEAGAKS--YRVRVPAEINNMERDSFELYIPGKGSDR--DLAET-KAAKQKQVADMAAKLASELMPSDVAKALWGTTKSSSKI
ORYSA EX2 -----PQBEVVSDEEMD--DESKSEVVKLPTSGVVHNKEAGAKS--YRVRVPAEINNMERDSFELYIPGKGSDR--DLAET-KAAKQKQVADMAAKLASELMPSDVAKALWGTTKSSSKI

```

Ex1

```

PHYPA EXa -----SEKKGSSKFLDGLKIPVGGIGVEKEPIRLVVGGLIQNNVSEPPKLPVVRVPAEIRERQGNRSFPHEDSGGTPAGAAPTKE--NPSWKVANIATQASADLMPDDVAKVWVNEKVPVKV
PHYPA EXc -----SEKKGSSKFLDGLKIPVGGIGVEKEPIRLVVGGLIQNNVSEPPKLPVVRVPAEIRERQGNRSFPHEDSGGTPAGAAPTKE--NPSWKVANIATQASADLMPDDVAKVWVNEKVPVKV
PHYPA EXb -----TEKKGLGSKFLDGLKIPVGGIGVEKEPIRLVVGGLIQNNVSEPPKLPVVRVPAEIRERQGNRSFPHEDSGGTPAGAAPTKE--NPSWKVANIATQASADLMPDDVAKVWVNEKVPVKV
PHYPA EXd -----TEKKGLGSKFLDGLKIPVGGIGVEKEPIRLVVGGLIQNNVSEPPKLPVVRVPAEIRERQGNRSFPHEDSGGTPAGAAPTKE--NPSWKVANIATQASADLMPDDVAKVWVNEKVPVKV
SELMO EXa -----LQEK-----GQNAVPT--AEELVEMSVRLIIGRLMNVPEIDRVVPLVPAKIVNKRDESFVPHEDLLEEKISTTDAMS--SWRLAVTAQ--PSELTSBHAQVLS--QALPVVKV
SELMO EXb -----TEGK-----AGDDVPTG--DKAVTVRVVIGGASPEGGDGTGPAVRVPAATIKOBSTIDSEVLIHEDLSTP-DDTHODDSKA--WKVARIATKASADOMPDVAKVWVNEKVPVKV

```

Ex

```

CHLRE EX -----VDLPRWAAVPIDDSDDEEAEASORRISASASASSASASMTSEVVPVEVEVEVELAPKGGEDDEAEARRRSMLEAAASLGMNDSDEDEBEEDGDESSSELKVSFDMLSAGVGRVDAVAIVSV
VOLCA EX -----EMGDAAARAVAVAAAGVDNLEIASGSSVDLSRWAAVVIDDSSGDDIETSAESORRISASASAVT--VDAFVVEVELLDPIKAG--VGTGGOSLLDADEAAAAAADADDDDED--DRLSVSDMLSTGQKLDVAIVSV

```

```

.....610.....620.....630.....640.....650.....660.....670.....680.....690.....700.....710.....720.....730.....740.....750

```



	ARATH EX1	LKDVCELLSITLSQAQN-----	ROQ
	ARALY EX1	LKDVCELLSITLSQAQN-----	ROQ
	CAPRU EX1	LKDVCELLSITLSQAQN-----	ROQ
	CAPGR EX1	LKDVCELLSITLSQAQN-----	ROQ
	BOEST EX1	LKDVCELLSITLSQAQN-----	ROQ
	EUTSA EX1	LKDVCELLSITLSQAQN-----	ROQ
	BRARA EX1	LKDVCELLSITLSQAQN-----	ROQ
	FRAVE EX1	LKDVGELINLALSQVHN-----	HQP
	PRUPE EX1	LKDVGELINLALSQVNN-----	HQP
	SOLLY EX1	LKDMGELISITLTQARN-----	RQP
	SOLTU EX1	LKDMGELISITLTQARN-----	RQP
	VITVI EX1	LKDVGELINLTLQAHN-----	RQP
	POPTR EX1	LKDVGELISITLSQAQN-----	RQP
	POPEU EX1a	LKDVGELINLTLQAQN-----	RQP
	RICCO EX1	LKDVRLINFTLSQAQN-----	RQP
	THECA EX1	LKDVGELINLTLQAQS-----	HQP
	LINUS EX1a	LKDLSELLSVLSQAQN-----	RQP
	LINUS EX1b	LKDLSELLSVLSQAQN-----	RQP
	CUCSA EX1	LKDLSELLKLSISQAQN-----	YQP
	CUCME EX1	LKDLSELLKLSISQAQN-----	YQP
	EUCGR EX1	LKDVGELISITLSQTS-----	HRS
	GLYMA EX1a	LKEVGELINLTLQAQS-----	HHQ
	GLYMA EX1b	LKEVGELINLTLQAQS-----	HHQ
	PHAVU EX1	LKEVGELISITLSQAQN-----	HHQ
	MEDTR EX1	LKEVGELISITLSQAQN-----	HQP
	ZEAMA EX1a	LQ----LGIKR-NNKV-----	QKK
	ZEAMA EX1b	LQ----LGIKQ-NNKV-----	QOK
	SETIT EX1	LQ----LGIKQHDNKA-----	QOK
	ORYSA EX1	LQ----LGIKQHNKV-----	QOK
Ex2	ARALY EX2	SRNVREIVKLAINGAOK-----	GNR
	BOEST EX2	SRNVREIVKLAINGAOK-----	GNR
	ARATH EX2	SRNVHEIVKLAINGAOK-----	GNH
	CAPRU EX2	SRNLHEMVKRSTTEPQE-----	RNH
	CAPGR EX2	SRNLHEMVKRSTTEPQE-----	RNH
	EUTSA EX2	SRNVREIVKLAINGAOK-----	GNR
	BRARA EX2	SRNVREIVKLAISQAOK-----	GNR
	SOLLY EX2	SRDVKEMMLKLAVTQAOK-----	RYK
	SOLTU EX2	SRDVKEMMLKLAVSQAOK-----	RYK
	VITVI EX2	SRDREIVKLAVSQAOK-----	RNR
	EUCGR EX2	SRDREIVKLAVTQAOK-----	RNK
	POPTR EX2a	SRNVREIVKLAVSQAOK-----	QSS
	POPEU EX2a	SRNVREIVKLAVSQAOK-----	QSS
	POPTR EX2b	SRNVREIVKLAVSQAOK-----	QSS
	POPEU EX2b	SRNVREIVKLAVSQAOK-----	QSS
	RICCO EX2	SRDREIVKLAVSQAOK-----	QSR
	LINUS EX2	SRNVREIVKLAVSQAOK-----	ESR
	THECA EX2	SRDREIVKLAVSQARR-----	RSR
	CUCSA EX2	SRNVREIVKRAVSQAOK-----	RSK
	CUCME EX2	SRNVREIVKRAVSQAOK-----	RSK
FRAVE EX2	TRNMREIVKLAASQAYK-----	RST	
PRUPE EX2	TRNMREIVKLAVSQAOK-----	RSR	
GLYMA EX2a	SRSMRDIVRVAMSQAOK-----	RTK	
GLYMA EX2b	SRSMRDIVRVAMSQAOK-----	RTR	
PHAVU EX2	SRSMRDIVRVAMSQAOK-----	RTR	
MEDTR EX2	SRSMREIVKLAISQAOK-----	KSR	
SETIT EX2	NKEVQELLRITLSKAC-----	-VK	
ZEAMA EX2a	NKEVQELLRITLSKAR-----	-VK	
ZEAMA EX2b	NKEVQELLRITLSKAR-----	-VK	
ORYSA EX2	NKEVQELLRITLSKAR-----	-VK	
Ex1	PHYPA EXa	SKEMGEIIVKLAVSQAOR-----	RRG
	PHYPA EXc	SKEMGEIIVKLAVSQAOR-----	RRG
	PHYPA EXb	SKEMSEIIRVAVSQAOR-----	RRG
	PHYPA EXd	SKEMSEIIRVAVSQAOR-----	RRG
Ex	SELMO EXa	SKELKEIVKLAVNQAOR-----	RRG
	SELMO EXb	SKELKEIVKLAVNQAOR-----	MOS
CHLRE EX	SDAEEGRIVIEPLG-----		
VOLCA EX	SDAEEGRILIEPVGRILIRCOOREABEHRRLSGACACTSAAGCSSEOSKDRASKTDFDLAARVAQLQAARAGRRVPEHLATALRTLAORLVNGELAADGSSSATAVPSPAAATAAKAAAAAARLQAASSPAVRSSSSSSSPTSSQL		

.....760.....770.....780.....790.....800.....810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880.....890.....900



DUF3506

Sequence alignment table for DUF3506. The table lists protein sequences from various species, including ARATH, ARALY, CAPRU, BOEST, BUTSA, BRARA, FRAVE, PRUPE, SOLLY, SOLTU, VITVI, POPTR, POPEU, RICCO, THECA, LINUS, CUCSA, CUCME, EUCGR, GLYMA, PHAVU, MEDTR, ZEAMA, SETIT, ORYSA, ARALY, BOEST, ARATH, CAPRU, BUTSA, BRARA, SOLLY, SOLTU, VITVI, EUCGR, POPEU, POPTR, POPEU, RICCO, LINUS, THECA, CUCSA, FRAVE, PRUPE, GLYMA, PHAVU, MEDTR, SETIT, ORYSA, PHYPA, PHYPA, PHYPA, SELMO, SELMO, CHLRE, VOLCA. The sequences are aligned in columns, with gaps represented by dashes. Conservation markers are shown above the sequences, and domain labels (Ex1, Ex2) are on the left. A scale bar at the bottom indicates positions from 910 to 1050.

Ex1

Ex2

Ex1

Ex

.....910.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050

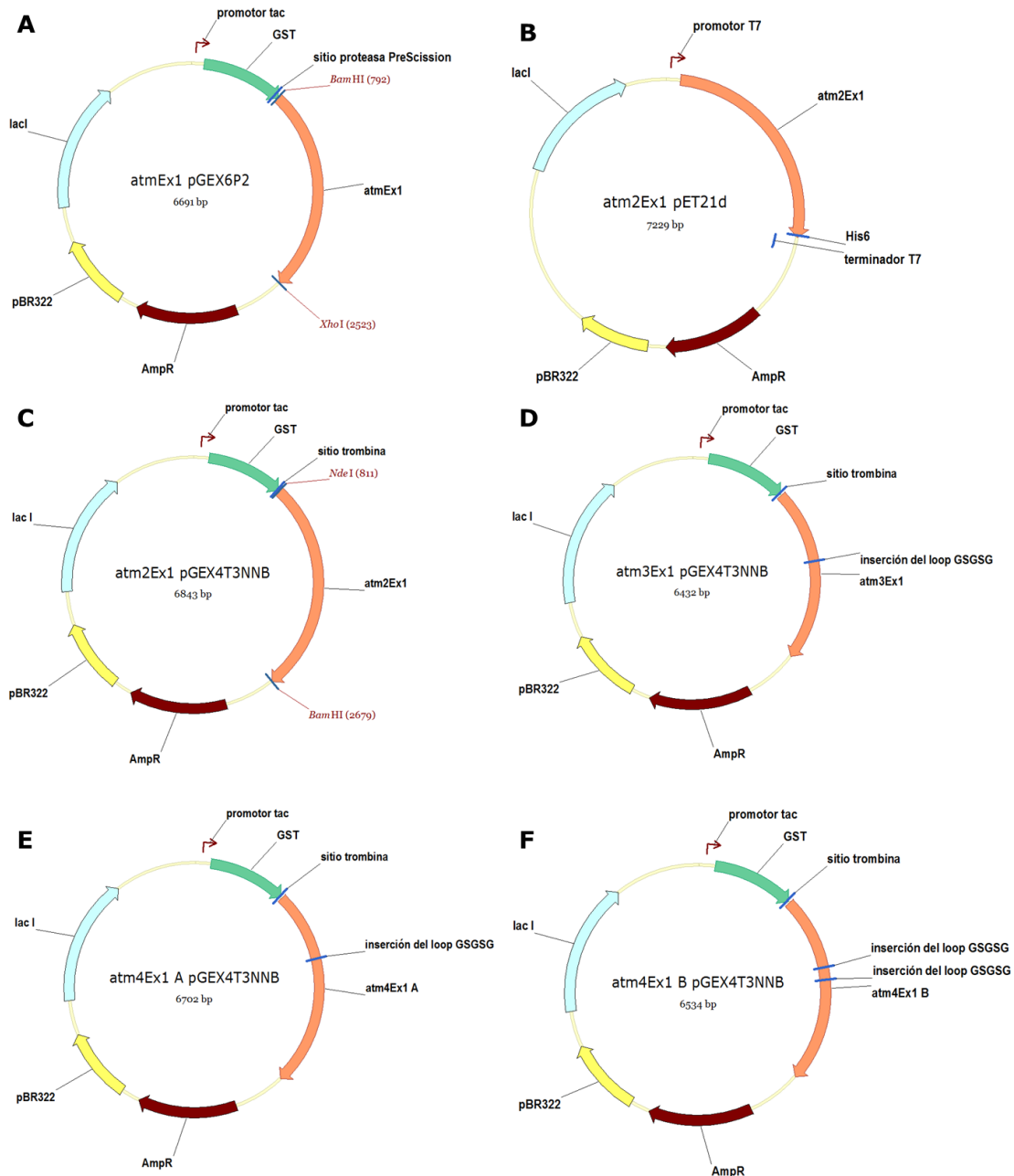




	ARATH EX1	-----
	ARALY EX1	-----
	CAPRU EX1	-----
	CAPGR EX1	-----
	BOEST EX1	-----
	EUTSA EX1	-----
	BRARA EX1	-----
	FRAVE EX1	-----
	PRUPE EX1	-----
	SOLLY EX1	-----
	SOLTU EX1	-----
	VITVI EX1	-----
	POPTR EX1	-----
Ex1	POPEU EX1a	-----
	RICCO EX1	-----
	THECA EX1	-----
	LINUS EX1a	-----
	LINUS EX1b	-----
	CUCSA EX1	-----
	CUCME EX1	-----
	EUCGR EX1	-----
	GLYMA EX1a	-----
	GLYMA EX1b	-----
	PHAVU EX1	-----
	MEDTR EX1	-----
	ZEAMA EX1a	-----
	ZEAMA EX1b	-----
	SETIT EX1	-----
	ORVSA EX1	-----
	ARALY EX2	-----
	BOEST EX2	-----
	ARATH EX2	-----
	CAPRU EX2	-----
	CAPGR EX2	-----
	EUTSA EX2	-----
	BRARA EX2	-----
	SOLLY EX2	-----
	SOLTU EX2	-----
	VITVI EX2	-----
	EUCGR EX2	-----
	POPTR EX2a	-----
	POPEU EX2a	-----
	POPTR EX2b	-----
Ex2	POPEU EX2b	-----
	RICCO EX2	-----
	LINUS EX2	-----
	THECA EX2	-----
	CUCSA EX2	-----
	CUCME EX2	-----
	FRAVE EX2	-----
	PRUPE EX2	-----
	GLYMA EX2a	-----
	GLYMA EX2b	-----
	PHAVU EX2	-----
	MEDTR EX2	-----
	SETIT EX2	-----
	ZEAMA EX2a	-----
	ZEAMA EX2b	-----
	ORVSA EX2	-----
	PHYPA EXa	-----
	PHYPA EXc	-----
Ex1	PHYPA EXb	-----
	PHYPA EXd	-----
	SELMO EXa	-----
	SELMO EXb	-----
Ex	CHLRE EX	-----
	VOLCA EX	SAGVDWGVTFCTCTNYTMBGYRFRGVCAIFGGBYTPEGLCCLTNADCANPPSLENGCLLDS CDDVFSCTVLLDTELOGKVIOTCTRVEVCTPBAACALCAKTOYCNTWSWCCDPRGCPGLERFRQCVLKSADPENPVPGRGGFCNSTGMM
		.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330.....1340.....1350

	ARATH EX1	-----
	ARALY EX1	-----
	CAPRU EX1	-----
	CAPGR EX1	-----
	BOEST EX1	-----
	EUTSA EX1	-----
	BRARA EX1	-----
	FRAVE EX1	-----
	PRUPE EX1	-----
	SOLLY EX1	-----
	SOLTU EX1	-----
	VITVI EX1	-----
	POPTR EX1	-----
Ex1	POPEU EX1a	-----
	RICCO EX1	-----
	THECA EX1	-----
	LINUS EX1a	-----
	LINUS EX1b	-----
	CUCSA EX1	-----
	CUCME EX1	-----
	EUCGR EX1	-----
	GLYMA EX1a	-----
	GLYMA EX1b	-----
	PHAVU EX1	-----
	MEDTR EX1	-----
	ZEAMA EX1a	-----
	ZEAMA EX1b	-----
	SETIT EX1	-----
	ORYSA EX1	-----
	ARALY EX2	-----
	BOEST EX2	-----
	ARATH EX2	-----
	CAPRU EX2	-----
	CAPGR EX2	-----
	EUTSA EX2	-----
	BRARA EX2	-----
	SOLLY EX2	-----
	SOLTU EX2	-----
	VITVI EX2	-----
	EUCGR EX2	-----
	POPTR EX2a	-----
	POPEU EX2a	-----
	POPTR EX2b	-----
Ex2	POPEU EX2b	-----
	RICCO EX2	-----
	LINUS EX2	-----
	THECA EX2	-----
	CUCSA EX2	-----
	CUCME EX2	-----
	FRAVE EX2	-----
	PRUPE EX2	-----
	GLYMA EX2a	-----
	GLYMA EX2b	-----
	PHAVU EX2	-----
	MEDTR EX2	-----
	SETIT EX2	-----
	ZEAMA EX2a	-----
	ZEAMA EX2b	-----
	ORYSA EX2	-----
	PHYPA EXa	-----
	PHYPA EXc	-----
Ex1	PHYPA EXb	-----
	PHYPA EXd	-----
	SELMO EXa	-----
	SELMO EXb	-----
Ex	CHLRE EX	-----
	VOLCA EX	-----
	.....1360	

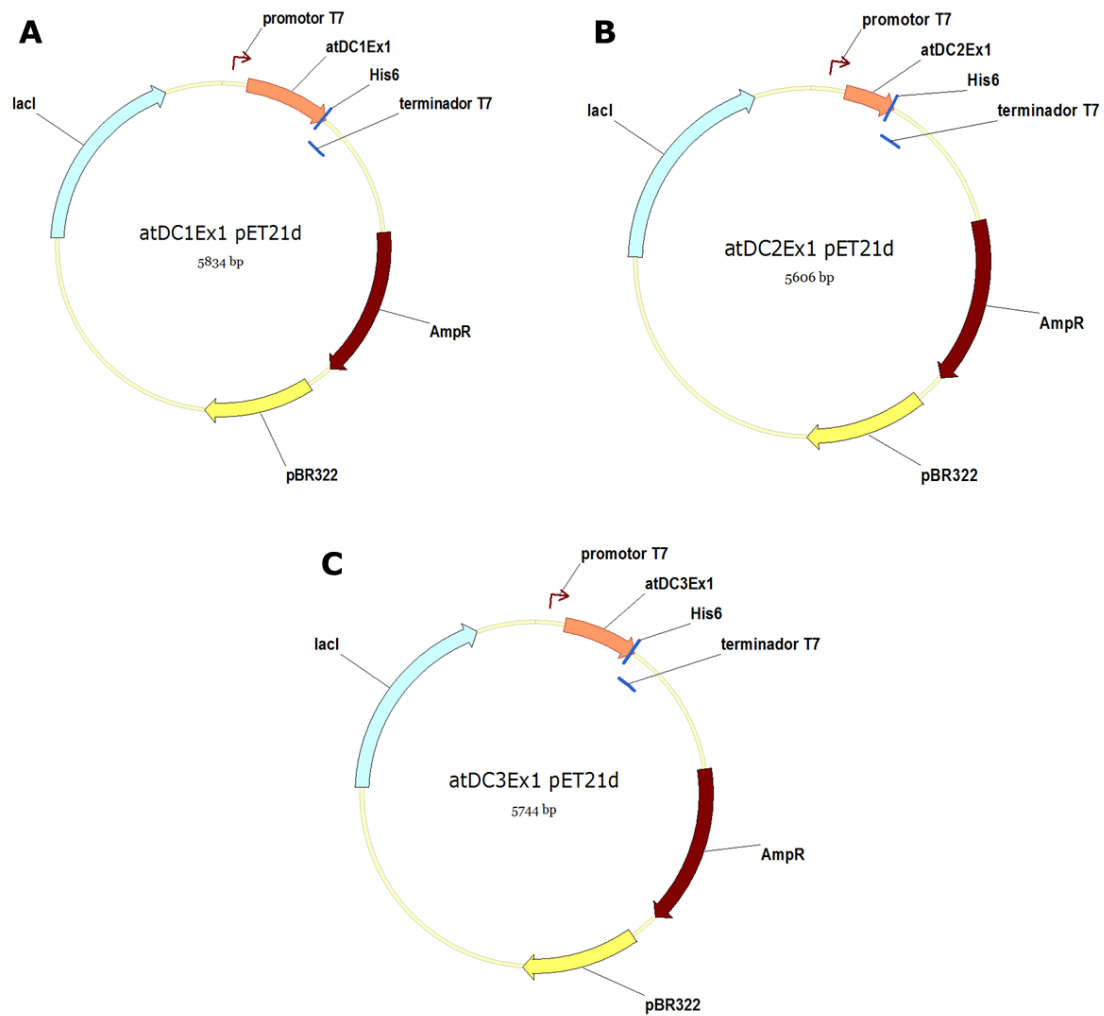
## Material suplementario



**Figura A2.** Mapas de los vectores atmEx1\_pGEX6P2 (A), atm2Ex1\_pET21d (B), atm2Ex1\_pGEX4T3NNB (C), atm3Ex1\_pGEX4T3NNB (D), atm4Ex1\_A\_pGEX4T3NNB (E), y atm4Ex1\_B\_pGEX4T3NNB (F). Los genes de interés codifican para la proteína madura de Executer2 de *A. thaliana*: atmEx1, 111-684 aminoácidos; atm2Ex1, 65-684 aminoácidos; atm3Ex1, 65-684 aminoácidos con una deleción desde 266 a 407 e inserción del loop GSGSG; atm4Ex1\_A, 65-684 aminoácidos con una deleción de 266 a 317 e inserción del loop GSGSG; y atm4Ex1\_B, 65-684 aminoácidos con dos deleciones: del residuo 266 al 317, y del 347 a 407 e inserción de un loop GSGSG en cada una de las deleciones. Los vectores pGEX6P2 y pGEX4T3NNB fusionan la proteína Glutación S-transferasa (GST) al extremo N-terminal de la proteína de interés. El vector pET21d fusiona la etiqueta de 6 histidinas (His<sub>6</sub>) al extremo C-terminal de la proteína de interés. El vector pGEX6P2 contiene el sitio de digestión de la proteasa PreScission, mientras que el vector pGEX4T3NNB contiene el sitio de digestión trombina. En el mapa A se muestran los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I, y en el mapa C se muestran los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI. Los vectores pGEX6P2 y pGEX4T3NNB contienen el promotor tac, mientras que el vector pET21d contiene el promotor y el terminador T7. Todos los vectores contienen

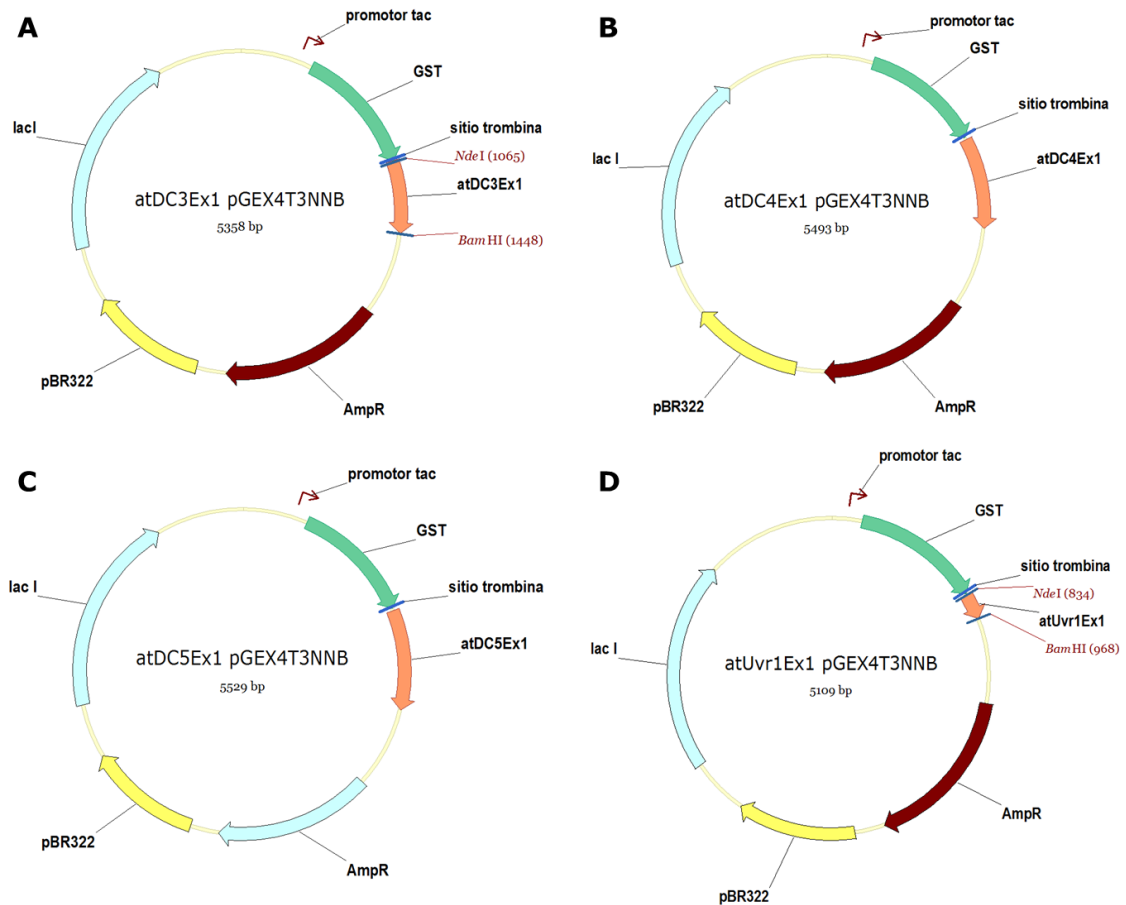


el gen de resistencia a ampicilina (AmpR), el origen de replicación del plásmido (pBR322), y el gen lacI que codifica para la proteína represora lac.

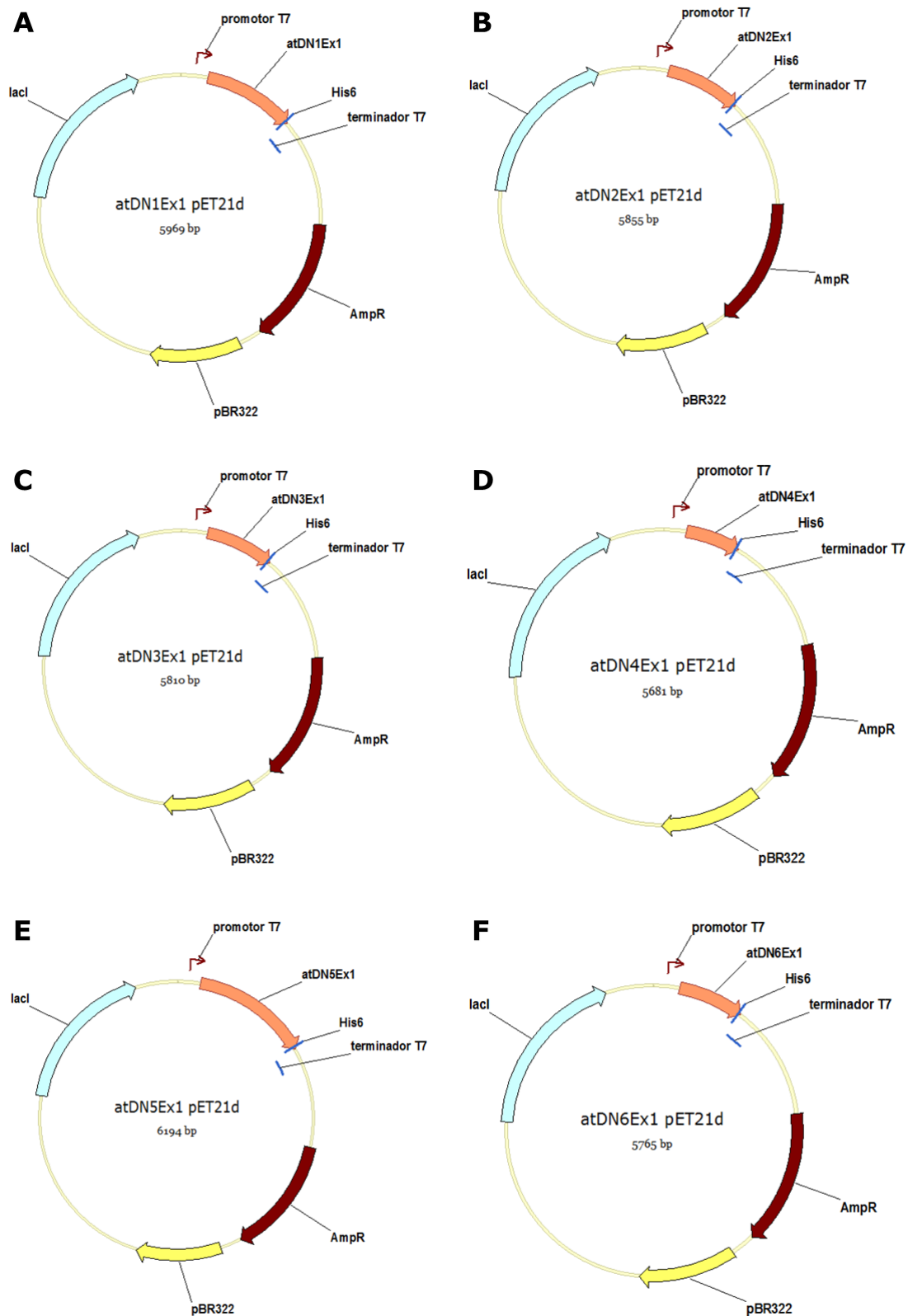


**Figura A3.** Mapas de los vectores at $\Delta$ C1Ex1\_pET21d (A), at $\Delta$ C2Ex1\_pET21d (B), y at $\Delta$ C3Ex1\_pET21d (C). Los genes de interés codifican para el dominio N-terminal de Executer1 de *A. thaliana*: at $\Delta$ C1Ex1, 111-264 aminoácidos; at $\Delta$ C2Ex1, 111-189 aminoácidos; y at $\Delta$ C3Ex1, 65-189 aminoácidos.

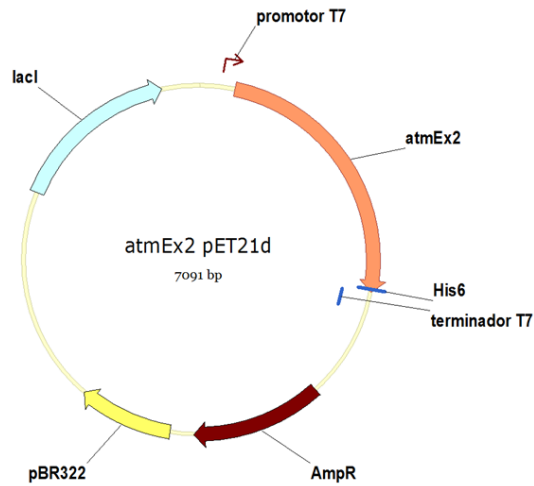
Material suplementario



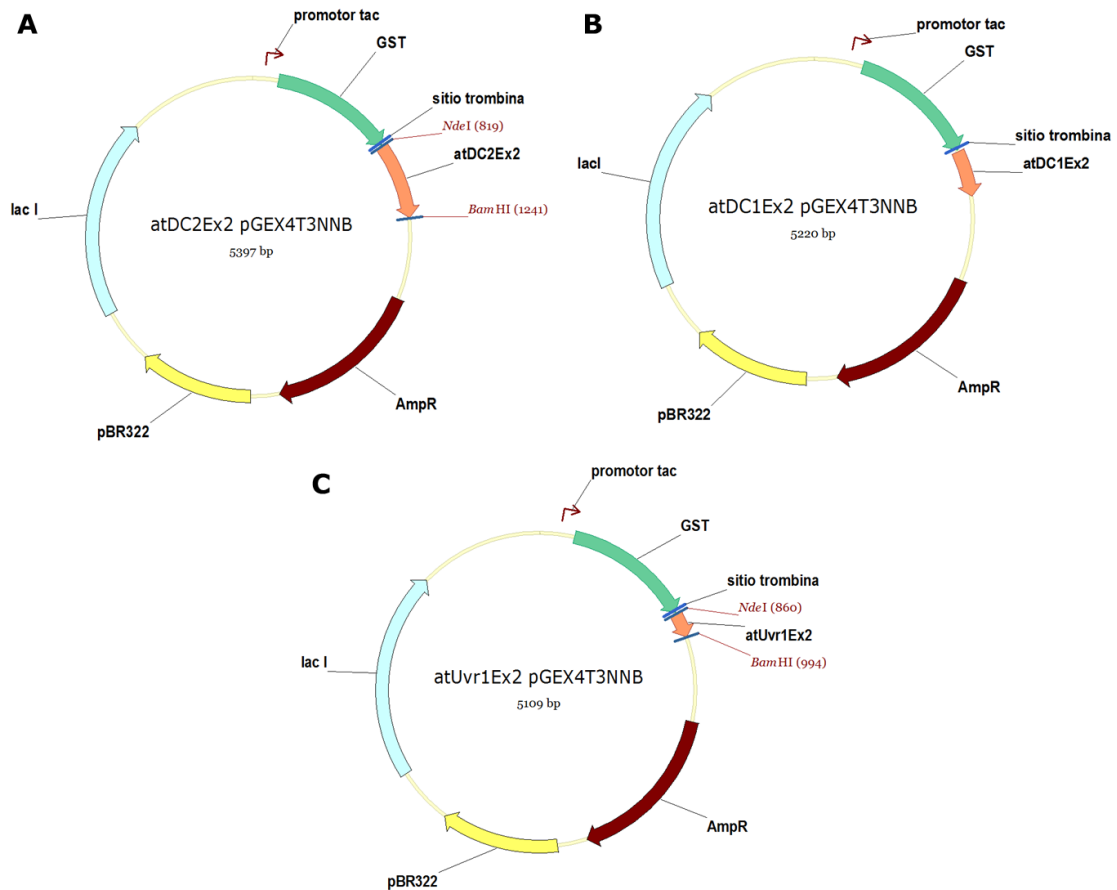
**Figura A4.** Mapas de los vectores at $\Delta$ C3Ex1\_pGEX4T3NNB (A), at $\Delta$ C4Ex1\_pGEX4T3NNB (B), at $\Delta$ C5Ex1\_pGEX4T3NNB (C), y atUvr1Ex1\_pGEX4T3NNB (D). Los genes de interés codifican para el dominio N-terminal de Executer1 de *A. thaliana*: at $\Delta$ C3Ex1, 65-189 aminoácidos; at $\Delta$ C4Ex1, 65-234 aminoácidos; at $\Delta$ C5Ex1, 65-246 aminoácidos; y atUvr1Ex1, 121-163 aminoácidos. En los mapas A y D se muestran los sitios de restricción *Nde*I y *Bam*HI.



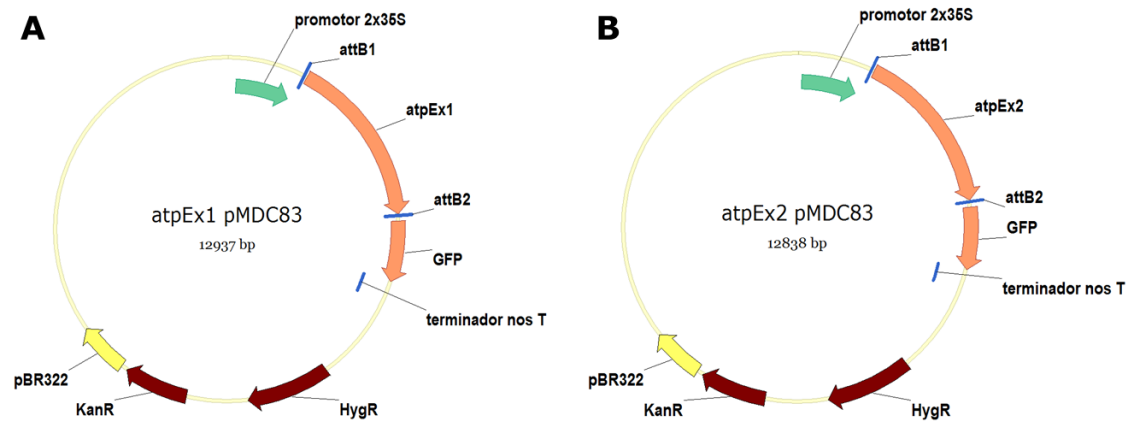
**Figura A5.** Mapas de los vectores at $\Delta$ N1Ex1\_pET21d (**A**), at $\Delta$ N2Ex1\_pET21d (**B**), at $\Delta$ N3Ex1\_pET21d (**C**), at $\Delta$ N4Ex1\_pET21d (**D**); at $\Delta$ N5Ex1\_pET21d (**E**); y at $\Delta$ N6Ex1\_pET21d (**F**). Los genes de interés codifican para el dominio C-terminal de Executer1 de *A. thaliana*: at $\Delta$ N1Ex1, 485-684 aminoácidos; at $\Delta$ N2Ex1, 523-684 aminoácidos de *A. thaliana*; at $\Delta$ N3Ex1, 538-684 aminoácidos; at $\Delta$ N4Ex1, 581-684 aminoácidos; at $\Delta$ N5Ex1, 410-684 aminoácidos; y at $\Delta$ N6Ex1, 523-654 aminoácidos.



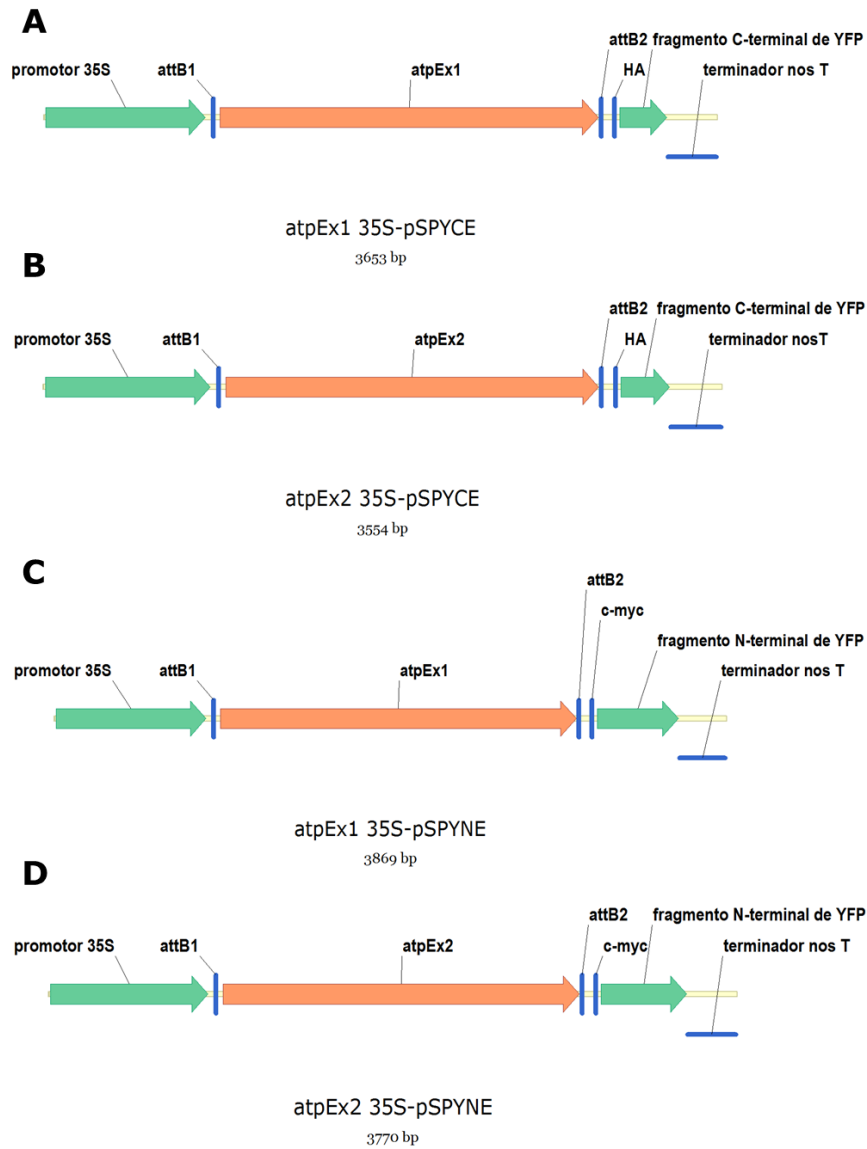
**Figura A6.** Mapa del vector atmEx2\_pET21d. El gen de interés atmEx2 codifica para la proteína madura Executer2 (85-651 aminoácidos) de *A. thaliana*.



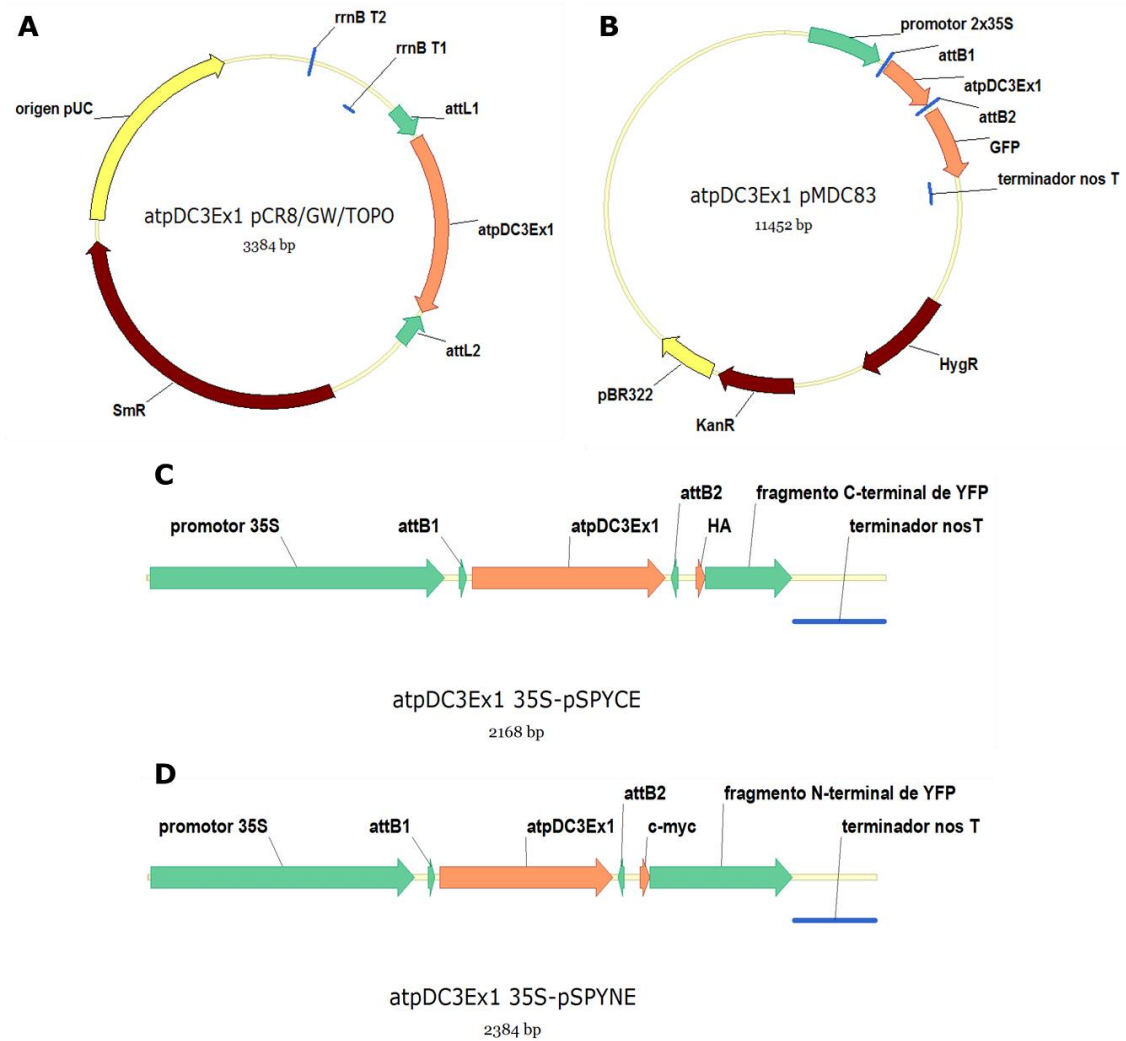
**Figura A7.** Mapas de los vectores atDC2Ex2\_pGEX4T3NNB (A), atDC1Ex2\_pGEX4T3NNB (B), y atUvr1Ex2\_pGEX4T3NNB (C). Los genes de interés codifican para el dominio N-terminal de Executer1 de *A. thaliana*: atDC2Ex2, 85-222 aminoácidos; atDC1Ex2, 85-163 aminoácidos; y atUvr1Ex2, 97-138 aminoácidos. En los mapas A y C se muestran los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*.



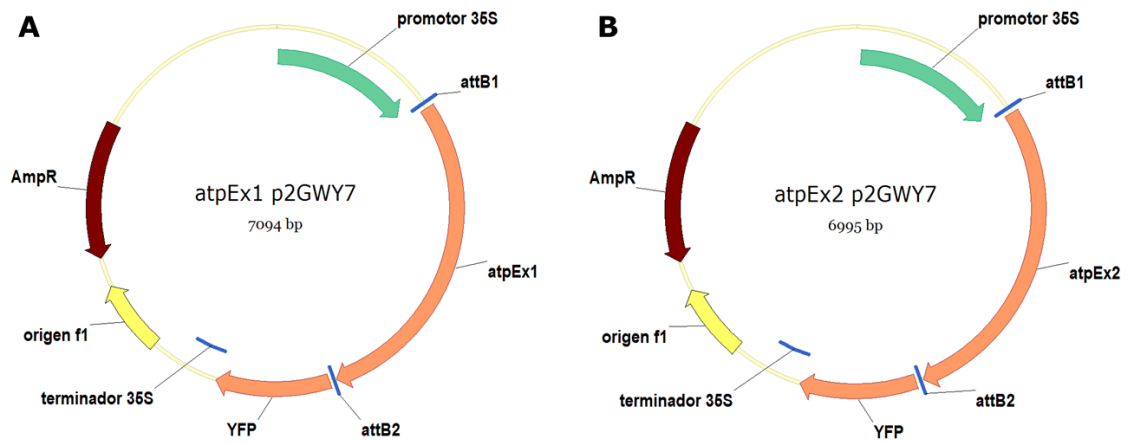
**Figura A8.** Mapas de los vectores atpEx1\_pMDC83 (A), y atpEx2\_pMDC83 (B). Los genes de interés que codifican para las pre-proteínas Ex1 y Ex2 (atpEx1 y atpEx2) están fusionados al gen que codifica para la proteína GFP. El vector pMDC83 contiene el promotor eucariota 35S dos veces, el terminador nos T, el gen de resistencia a kanamicina (KanR), el gen de resistencia a higromicina (HygR), el origen de replicación del plásmido (pBR322), y los sitios de Gateway® attB1 y attB2.



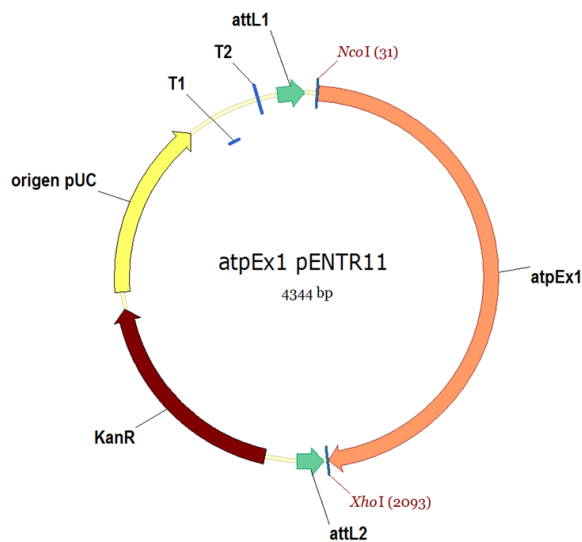
**Figura A9.** Mapas de los vectores atpEx1\_35S-pSPYCE (A), atpEx2\_35S-pSPYCE (B), atpEx1\_35S-pSPYNE (C), y atpEx2\_35S-pSPYNE (D). Los genes de interés que codifican para las pre-proteínas Ex1 y Ex2 (atpEx1 y atpEx2) están fusionados al gen que codifica para el fragmento C-terminal de YFP (35S-pSPYCE) y para el fragmento N-terminal de YFP (35S-pSPYNE). Todos los vectores contienen el promotor eucariota 35S, el terminador nos T, la etiqueta HA (A y B) y c-myc (C y D), y los sitios Gateway® attB1 y attB2.



**Figura A10.** Mapas de los vectores atp $\Delta$ C3Ex1\_pCR8/GW/TOPO (A), atpEx2\_35S-pSPYCE (B), atpEx1\_35S-pSPYNE (C), y atpEx2\_35S-pSPYNE (D). El gen de interés atp $\Delta$ C3Ex1 codifica para el dominio N-terminal de la proteína Ex1 de *A. thaliana* con su péptido de tránsito. En el vector pCR8/GW/TOPO el gen de interés está flanqueado por los sitios de recombinación Gateway® attL1 y attL2. Además contiene el origen de replicación pUC, y las secuencias de terminación de la transcripción *rrnB* T1 y T2.

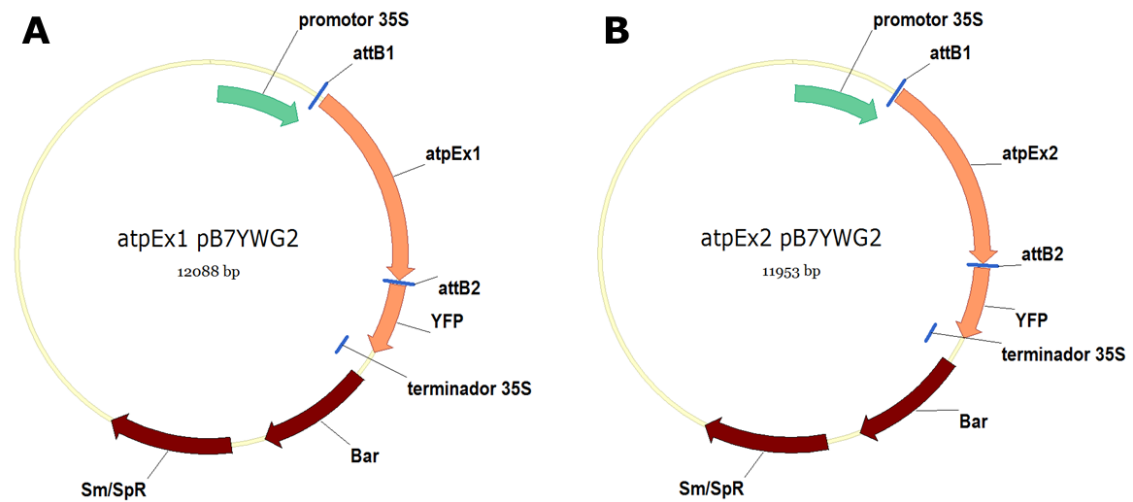


**Figura A11.** Mapas de los vectores atpEx1\_p2GWY7 (A) y atpEx2\_p2GWY7 (B). Los genes de interés que codifican para las pre-proteínas Ex1 y Ex2 (atpEx1 y atpEx2) están fusionados al gen que codifica para la proteína YFP. El vector p2GWY7 contiene el promotor eucariota 35S, el terminador 35S, el gen de resistencia a kanamicina (AmpR), el origen de replicación del plásmido (f1), y los sitios de Gateway® attB1 y attB2.

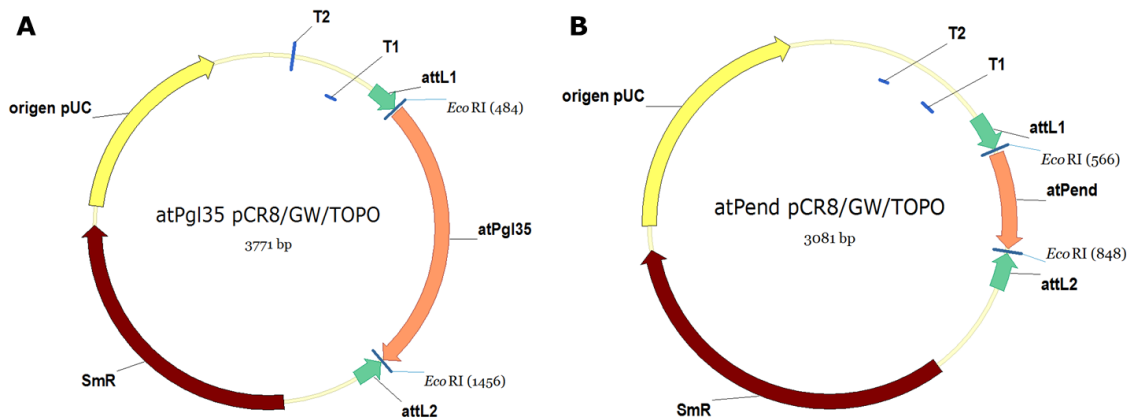


**Figura A12.** Mapa del vector de entrada Gateway® atpEx1\_pENTR11 que contiene el gen que codifica para la preproteína Executer1 de *A. thaliana* (atpEx1) flanqueado por los sitios de recombinación Gateway® attL1 y attL2. Este vector contiene el gen de resistencia a kanamicina (KanR), el origen de replicación del plásmido (pUC), los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*, las secuencias de terminación de la transcripción *rrmB* T1 y T2.

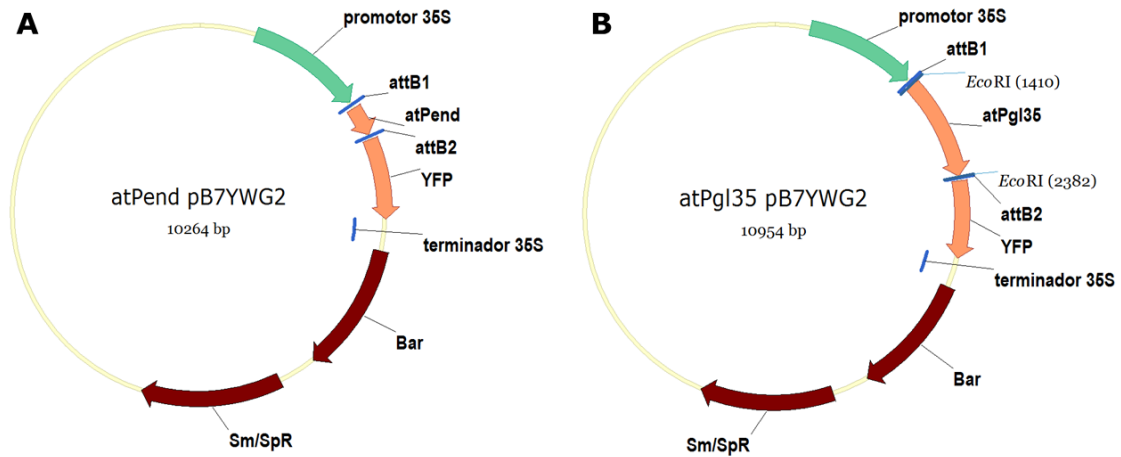




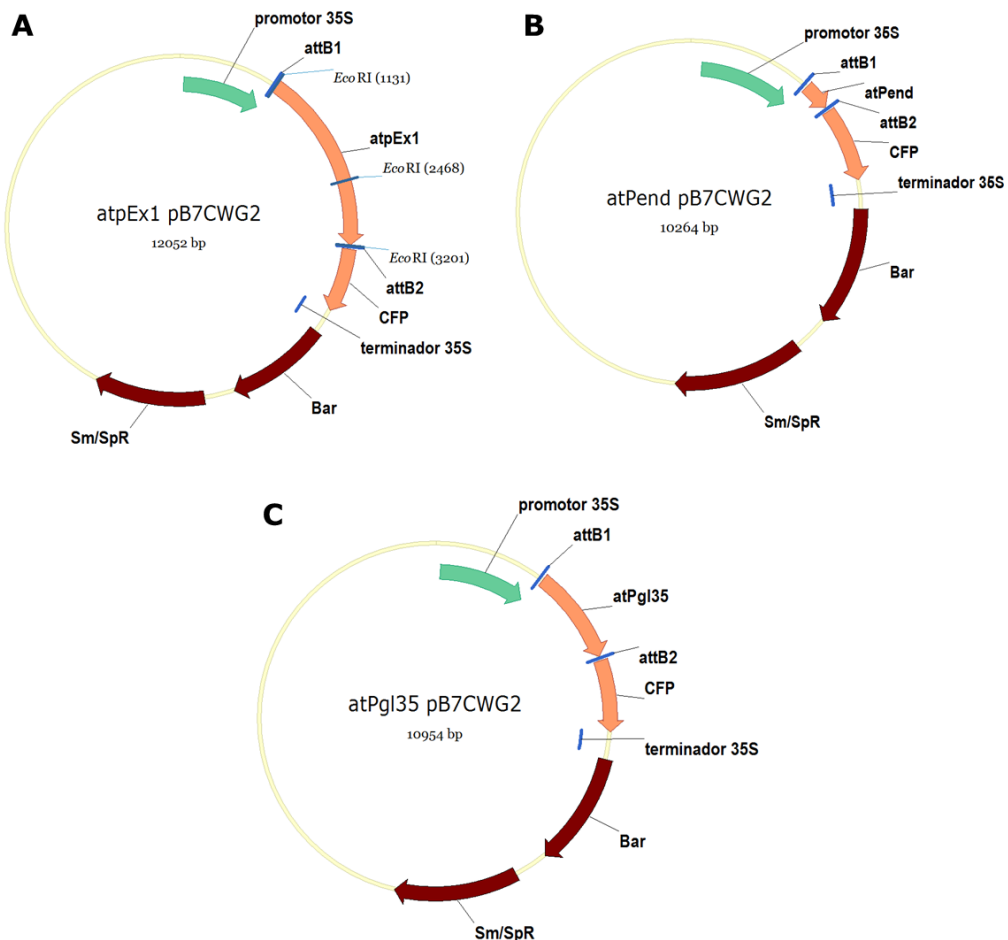
**Figura A13.** Mapas de los vectores atpEx1\_pB7YWG2 (A) y atpEx2\_pB7YWG2 (B). Los genes de interés que codifican para las pre-proteínas Ex1 y Ex2 (atpEx1 y atpEx2) están fusionados al gen que codifica para la proteína YFP. El vector pB7YWG2 contiene el promotor eucariota 35S, el terminador 35S, espectinomicina (SmR) y a estreptomomicina (SpR), el gen de resistencia al herbicida *bialaphos* (Bar), y los sitios Gateway® attB1 y attB2.



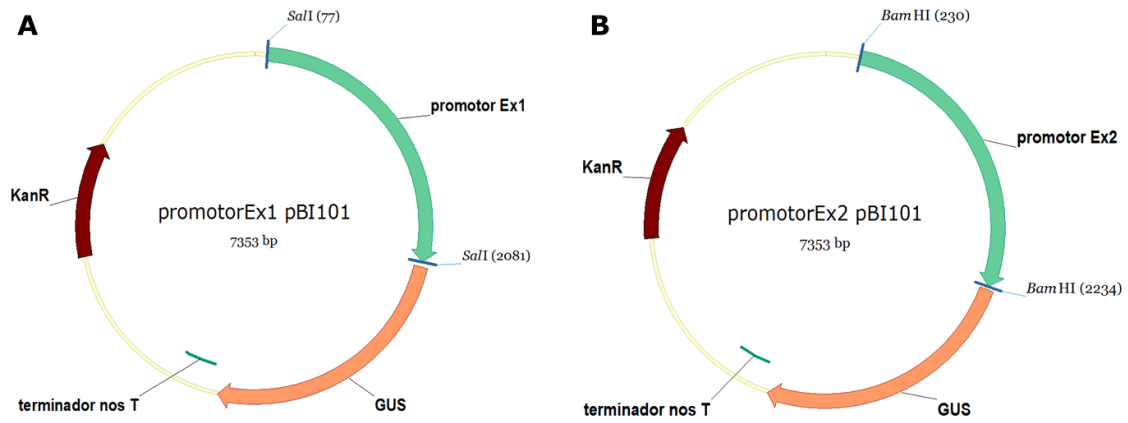
**Figura A14.** Mapas de los vectores atPend\_pCR8/GW/TOPO (A), y atPgl35\_pCR8/GW/TOPO (B). Los genes de interés de *A. thaliana*: atPend, que codifica para la pre-proteína asociada a nucleoides Pend; y atPgl35, codifica para la pre-proteína asociada a plastoglobulos Pgl35. Los mapas muestran los sitios de restricción de *EcoRI*.



**Figura A15.** Mapas de los vectores atPend\_pB7YWG2 (A) y atPgl35\_pB7YWG2 (B). Los genes de interés que codifican para las pre-proteínas Pend y Pgl35 (atPend y atPgl35) están fusionados al gen que codifica para la proteína YFP.



**Figura A16.** Mapas de los vectores atpEx1\_pB7CWG2 (A), atPend\_pB7CWG2 (B), y atPgl35\_pB7CWG2. Los genes de interés que codifican para las pre-proteínas Ex1, Pend, Pgl35 (atpEx1, atPend, y atPgl35) están fusionados al gen que codifica para la proteína CFP. El vector pB7CWG2 contiene el promotor eucariota 35S, el terminador 35S, espectinomicina (SmR), y a estreptomicina (SpR), el gen de resistencia al herbicida *bialaphos* (Bar), y los sitios Gateway® attB1 y attB2.



**Figura A17.** Mapas de los vectores promotorEx1\_pBI101 (A) y promotorEx2\_pBI101 (B), que contienen el promotor del gen *Executer1* y *Executer2* de *A. thaliana* (promotor Ex1 y promotor Ex2) fusionado al gen  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). El vector pBI101 contiene el terminador nosT, y el gen de resistencia a kanamicina (KanR). En el mapa A se muestran los sitios de restricción *SalI*, y en el mapa B los sitios de restricción *BamHI*.

**Tabla A1.** Expresión de los genes *Ex1* (At4g33630) y *Ex2* (At1g27510) en plantas de *Arabidopsis* en plantas sometidas a diferentes tratamientos de estrés abiótico y biótico, con hormonas, y con químicos. Los valores proceden de la base de datos atGenExpress (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter *et al.* 2007). Los cambios de expresión más importantes están marcados en rojo. Abreviaturas: ACC (1-aminociclopropano-1-carboxílico, precursor del etileno), MeJa (metil jasmonato), ABA (ácido abscísico), GA3 (giberelina), GA (ácido giberélico), Pacl (paclobutrazol), Prohx (prohexadiona), Propi (propiconazol), Unicz (uniconazol), AVG (aminoetoxivinilo), CHX (cicloheximida), SA (ácido salicílico), y B9 (daminozida).

		MEDIA-FRÍO					
		Parte aérea			Raíz		
		CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1		173	164	-0,1	55	55	0,0
Ex2		119	116	0,0	59	50	-0,2

		MEDIA-OSMÓTICO					
		Parte aérea			Raíz		
		CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1		173	171	0,0	55	73	0,4
Ex2		119	113	-0,1	59	69	0,2

		MEDIA-CALOR					
		Parte aérea			Raíz		
		CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1		155	155	0,0	54	59	0,1
Ex2		109	119	0,1	57	60	0,1

		MEDIA-SEQUÍA					
		Parte aérea			Raíz		
		CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1		169	162	-0,1	55	60	0,1
Ex2		116	126	0,1	57	62	0,1

		MEDIA-OXIDATIVO					
		Parte aérea			Raíz		
		CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1		173	170	0,0	55	69	0,3
Ex2		119	127	0,1	59	62	0,1

		MEDIA-UvB					
		Parte aérea			Raíz		
		CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1		169	128	-0,4	55	69	0,3
Ex2		116	103	-0,2	57	58	0,0

MEDIA-SAL						
Parte aérea			Raíz			
	CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1	173	163	-0,1	55	63	0,2
Ex2	119	116	0,0	59	57	-0,1

MEDIA-GENOTÓXICO						
Parte aérea			Raíz			
	CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1	173	181	0,1	55	70	0,3
Ex2	119	132	0,2	59	52	-0,2

MEDIA-HERIDAS						
Parte aérea			Raíz			
	CONTROL	ESTRÉS	log2	CONTROL	ESTRÉS	log2
Ex1	169	143	-0,2	55	61	0,2
Ex2	116	101	-0,2	57	60	0,1

### HORMONAS y QUÍMICOS

ACC (10 µM)			Zeatin (1µM)			MeJa (10 µM)			IAA (1 µM)			
	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2
Ex1	89	75	-0,2	89	76	-0,2	89	105	0,2	89	90	0,0
Ex2	85	80	-0,1	85	80	-0,1	85	78	-0,1	85	84	0,0

ABA (10 µM)			GA3 (1 µM)			GA3 (10 µM)			ABA en semillas (30 µM)			
	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2
Ex1	89	95	0,1	89	89	0,0	89	70	-0,3	72	86	0,3
Ex2	85	80	-0,1	85	84	0,0	85	68	-0,3	107	105	0,0

ABA en semillas (3 µM)			Inhibidor GA Pacl (3 h)			Inhibidor GA Pacl (12 h)			Inhibidor GA Prohx (3 h)			
	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2
Ex1	72	63	-0,2	132	143	0,1	123	103	-0,3	132	147	0,1
Ex2	107	123	0,2	93	81	-0,2	67	80	0,3	93	93	0,0

GA Inhibitor Prohx (12 h)			Inhibidor GA Propi (3 h)			Inhibidor GA Propi (12 h)			Inhibidor GA Unicz (3 h)			
CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	
Ex1	123	107	-0,2	132	154	0,2	123	108	-0,2	132	132	0,0
Ex2	67	81	0,3	93	98	0,1	67	90	0,4	93	72	-0,4

Inhibidor GA Unicz (12 h)			Inhibidor etileno AVG (10 µM, 3 h)			Inhibidor etileno AgNO3 (10 µM, 3h)			CHX (10 µM, 3 h)			
CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	
Ex1	123	142	0,2	132	132	0,0	132	64	-1,1	132	80	-0,7
Ex2	67	94	0,5	93	72	-0,4	93	71	-0,4	93	72	-0,4

Inhibidor del proteasoma MG132 (10 µM, 3 h)			Inhibidor de la fotosíntesis PNO8 (1 µM, 3 h)			Inhibidor de la fotosíntesis PNO8 (1 µM, 12 h)			Inhibidor de la fotosíntesis PNO8 (10 µM, 3 h)			
CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	
Ex1	132	108	-0,3	132	113	-0,2	123	136	0,1	132	71	-0,9
Ex2	93	81	-0,2	93	81	-0,2	67	74	0,1	93	78	-0,2

B9 (10 µM, 3 h)			Ibuprofeno (10 µM, 3h)			SA (10 µM, 3h)			
CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	CONTROL	MUESTRA	log2	
Ex1	132	122	-0,1	132	107	-0,3	132	140	0,1
Ex2	93	80	-0,2	93	71	-0,4	93	72	-0,4

