



Estación Experimental de Aula Dei
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC)
Zaragoza



Tesis Doctoral

**MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
LOS GENES DE LAS DESATURASAS DE PLANTAS:
ADAPTABILIDAD A LA LUZ E INFLUENCIA DE LOS
PROCESOS REDOX FOTOSINTÉTICOS**

Memoria presentada por Dña. Raquel Collados Collados,
Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor en Ciencias

Zaragoza, Diciembre 2006



MINISTERIO
DE EDUCACIÓN
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL
DE AULA DEI

D. MIGUEL ALFONSO LOZANO, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), adscrito a la Estación Experimental de Aula Dei, Zaragoza

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: “*Mecanismos de regulación de la expresión de los genes de las desaturasas de plantas: Adaptabilidad a la luz e influencia de los procesos redox fotosintéticos*”, ha sido realizada por la licenciada Dña. RAQUEL COLLADOS COLLADOS en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) bajo su dirección, y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, a 6 de Octubre de 2006.

Fdo. Dr. Miguel ALFONSO LOZANO
Científico Titular CSIC

Todavía no dispongo de datos. Sería un error mayúsculo avanzar teorías antes de tenerlos, porque sin darse cuenta uno empieza a forzar los hechos para que se ajusten a las teorías, en vez de hacer que las teorías se acomoden a los hechos.

Escándalo en Bohemia. Las aventuras de Sherlock Holmes.

Sir Arthur Conan Doyle

Finalizada ya la redacción de este trabajo, deseo dedicar sus primeras líneas a expresar mi gratitud a todas las personas que, de diversas formas, han contribuido a su realización.

Al Dr. Miguel Alfonso por la profesionalidad, rigor e implicación personal con las que ha dirigido este trabajo, pero sobre todo, me gustaría agradecerle la confianza que ha depositado en mí, su apoyo constante y el haber sido un maestro y un amigo. Estoy muy contenta y muy orgullosa de que esta sea la primera Tesis que has dirigido.

Al Prof. Rafael Picorel por sus consejos y sugerencias y por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A Soledad Gracia del Laboratorio Agroambiental (DGA) por su ayuda en los análisis de cromatografía de gases, y a la Prof. M^a Carmen Risueño y la Dra. Pilar Testillano del Centro de Investigaciones Biológicas por su colaboración.

A “mis chicas del labo”: María, Marian, Sara y Vanesa por hacer que los ratos malos no lo fueran tanto y los ratos buenos fueran mejores. Vuestra amistad es lo mejor que me llevo de Aula Dei.

A Mariví Ramiro y Mariví López por el cariño que siempre me han demostrado y por sus estupendos consejos.

A toda la gente que ha pasado a lo largo de estos años por el laboratorio, en especial a Beatriz por su ayuda durante este verano y a Maya.

A los compañeros de Aula Dei por todos los momentos buenos vividos: Sofía, Sara López, Aurora, Ajmi, María Solanas, Ruth, Victoria, Rubén, Ana Flor, Ana Álvarez, Fermín, Irene, Victor, Piluca, Ade, Tere, Carmen, MC, Manu, Javier, Loreto, Jorge Loscos, María Clemente, Carmen Pérez, M^a Ángeles, Pepa, David, Jorge Álvaro, Manuel, María Muñoz, Merche, Sergio, Laura, Olfa y Meriam.

A la gente del Centro de Protección Vegetal (DGA) por el cariño con el que me han acogido y tratado durante estos últimos meses.

A mis amigos (ellos saben quienes son) por ejercer muchas veces de paño de lágrimas y ayudarme a superar los momentos bajos.

A mi familia, en especial a mis padres, Cruz y Samuel, por su gran esfuerzo y permitirme siempre elegir y a mis hermanas M^a Luz, Pilar y Viqui que siempre están cuando las necesito.

A Raúl, “mi marido”, por quererme con infinita paciencia. No tengo palabras.

ABREVIATURAS

ACP	Proteína transportadora de acilos
Act	Aciltransferasa
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
APS	Persulfato amónico
APX	Ascorbato peroxidasa
BCIP	5-bromo-4-cloro-indolilfosfato
BHT	hidroxitolueno butilado
cDNA	DNA complementario
Chl	Clorofila
CL	Cloroplasto
CoA	Coenzima A
CP43	Complejo pigmento-proteína de 43 Kda del fotosistema II
CP47	Complejo pigmento-proteína de 47 Kda del fotosistema II
Ct	Ciclo umbral
DAG	Diacilglicerol
DCMU	3-(3', 4' - diclorofenil) - 1,1 - dimetilurea
DCQB	2, 6 - diclorobenzoquinona
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGDG	Digalactosildiacilglicerol
DM	n-dodecil- β -D-maltósido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa I
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Reticulo endoplásmico
FAD	Desaturasa de ácido graso
Fd	Ferredoxina
FDA	Diacetato de fluoresceína
<i>Fed1</i>	Gen que codifica la ferredoxina
FNR	Ferredoxina-NADP ⁺ oxidoreductasa
Fm	Fluorescencia máxima de clorofila
Fo	Fluorescencia inicial de clorofila
Fv	Fluorescencia variable de clorofila

GSH	Glutation reducido
G3P	Glicerol-3-fosfato
HIK	Histidina quinasa
KAS	β -cetoacil-ACP sintasa
KLH	Hemocianina extraída de la lapa californiana
<i>Lhcb</i>	familia génica que codifica las proteínas de la LHCII
LHCII	Complejo de antena mayoritaria del fotosistema II
LPA	Ácido lisofosfatídico
MGDG	Monogalactosildiacylglicerol
mRNA	RNA mensajero
NADP ⁺	2'-Fosfodinucléotido de nicotianamida y adenina oxidado
NADPH	2'-Fosfodinucléotido de nicotianamida y adenina reducido
NBT	Nitro blue tetrazolium
OEC	Complejo de desprendimiento de oxígeno
OECC	Complejo mínimo capaz de desprender oxígeno
OEE33	Proteína extrínseca de 33 kDa
ORF	Marco abierto de lectura
PA	Ácido fosfatídico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
<i>PetE</i>	Gen que codifica la plastocianina
PG	Fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
<i>Por</i>	Protoclorofilida oxidorreductasa
PQ	Plastoquinona
PS	Fosfatidilserina
<i>PsaA</i>	Gen que codifica la proteína A del fotosistema I
<i>psaB</i>	Gen que codifica la proteína B del fotosistema I
<i>psaD</i>	Gen que codifica la proteína D del fotosistema I
<i>psaF</i>	Gen que codifica la proteína F del fotosistema I
<i>psbA</i>	Gen que codifica la proteína D1 del fotosistema II
<i>psbB</i>	Gen que codifica la proteína D2 del fotosistema II
PS I	Fotosistema I
PS II	Fotosistema II
<i>RbcL</i>	Gen que codifica la subunidad L de la Rubisco

RC	Centro de reacción del fotosistema II
Rf	Movilidad relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa H	Ribonucleasa H
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	PCR reversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SL	Sulfolípido
SQDG	Sulfoquinovosildiacilglicerol
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etil-N-diamina
Tm	Temperatura de hibridación
Tricina	N-tris(hidroximetil) metil glicina
Tris	(tris)-hidroximetil-amino metano
UTR	Región del mRNA que no se traduce

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1	ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS	9
1.1.1	Lípidos de membrana	10
1.1.1.1	Ácidos grasos	10
1.1.1.2	Glicerofosfolípidos	11
1.1.1.3	Galactolípidos	14
1.1.1.4	Sulfolípidos	14
1.2	SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN PLANTAS	15
1.2.1	Síntesis de ácidos grasos	15
1.2.2	Síntesis de glicerolípidos	16
1.3	DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS	20
1.3.1	Características de las desaturasas de ácidos grasos de plantas	20
1.3.1.1	Desaturasas solubles	20
1.3.1.2	Desaturasas de membrana	22
1.3.2	Regulación de la actividad de las desaturasas	24
1.3.2.1	El desarrollo de la planta	25
1.3.2.2	Las hormonas	26
1.3.2.3	La temperatura	27
1.3.2.4	Otros factores reguladores de la actividad de las desaturasas	34
1.4	LAS MEMBRANAS FOTOSINTÉTICAS	34
1.4.1	Componentes proteicos de las membranas fotosintéticas: los fotosistemas y el transporte electrónico fotosintético	35
1.4.2	El fotosistema II	36
1.4.2.1	La antena extrínseca LHCII	37
1.4.2.2	La unidad central del PSII: OECC	38
1.4.2.2.1	Antenas internas del PSII: CP43 y CP47	38
1.4.2.2.2	El centro de reacción del PSII	39

1.4.2.2.3 Proteínas extrínsecas	43
1.4.3 Papel de los lípidos tilacoidales en la fotosíntesis	44
1.4.4 Fotoinactivación y reparación del fotosistema II	45
1.4.4.1 Degradación y síntesis de la proteína D1	46
1.4.4.2 Papel de los lípidos tilacoidales en el ciclo de daño y reparación del fotosistema II	51
1.5 LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA COMO ELEMENTO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	52
1.5.1 Definición de control redox	53
1.5.2 Señales redox fotosintéticas y niveles de expresión génica afectados. Regulación redox de genes fotosintéticos	53
1.5.3 Transducción de la señal redox en el interior del cloroplasto	56
1.5.4 Transducción de la señal redox desde el cloroplasto al núcleo	59
1.6 PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	61
2 MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO	65
2.1.1 Cultivo de suspensiones celulares de soja (<i>Glycine max</i>)	65
2.1.1.1 Cultivo en medio líquido	65
2.1.1.2 Cultivo en medio sólido	67
2.1.2 Determinación de parámetros fisiológicos de crecimiento de las suspensiones celulares	69
2.1.2.1 Determinación del crecimiento	69
2.1.2.2 Concentración de clorofila a lo largo de un cultivo	69
2.1.2.3 Test de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA)	70
2.1.2.4 Fluorescencia de clorofila y desprendimiento de oxígeno	71
2.1.3 Cultivo de plantas de soja en cámara climática y medio hidropónico	73

2.2	FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR Y PURIFICACIÓN	74
2.2.1	Aislamiento de cloroplastos y membranas tilacoidales a partir de suspensiones fotosintéticas de soja	74
2.2.2	Aislamiento de cloroplastos intactos	76
2.2.3	Aislamiento envueltas y tilacoides a partir de cloroplastos intactos de hojas de soja	78
2.2.4	Aislamiento de fracciones enriquecidas en membranas microsomales de plantas de soja	79
2.2.5	Análisis mediante gradiente de sacarosa de fracciones de fotosistema II	79
2.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS	80
2.3.1	Análisis de lípidos	80
2.3.1.1	Extracción de lípidos de suspensiones celulares de soja	80
2.3.1.2	Separación de clases de lípidos mediante cromatografía de capa fina (TLC)	81
2.3.1.3	Determinación de los lípidos totales por gravimetría	83
2.3.1.4	Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases	84
2.3.2	Electroforesis SDS-PAGE de proteínas	84
2.4	TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS Y DE BIOLOGÍA CELULAR	88
2.4.1	Western blot y detección inmunológica de proteínas	88
2.4.2	Desarrollo de un anticuerpo contra FAD7	91
2.4.3	Traducción <i>in organello</i> : experimentos de marcaje y seguimiento (“pulse-chase”)	91
2.4.4	Inmunoprecipitación	92
2.4.5	Inmunomarcado con oro	93
2.5	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	95
2.5.1	Extracción de RNA de suspensiones celulares de soja	95
2.5.2	Técnicas de RT-PCR	96
2.5.2.1	RT-PCR semicuantitativa	96
2.5.2.2	RT-PCR cuantitativa en tiempo real	101
2.5.3	Clonaje de los productos de PCR	105

2.5.3.1	Extracción de los productos de PCR de geles de agarosa mediante lana de vidrio	106
2.5.3.2	Ligación y clonaje de los productos de PCR en el plásmido pGEM-T-Easy	106
2.5.3.3	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con la mezcla de ligación	107
2.5.3.4	Aislamiento de DNA plasmídico: método de la lisis alcalina	108
2.5.4	Aislamiento de polirribosomas	109
2.5.5	Northern blot	110

3 RESULTADOS

3.1	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE PLANTAS	117
3.1.1	Composición de ácidos grasos de suspensiones celulares de soja crecidas en luz y en oscuridad	117
3.1.1.1	Composición de ácidos grasos de los lípidos totales	120
3.1.1.2	Composición de ácidos grasos de distintas clases de lípidos	123
3.1.2	Efecto de la oscuridad en la expresión de los genes de las desaturasas	124
3.1.3	Efecto de la reiluminación en la composición de ácidos grasos y en la expresión de los genes de las desaturasas	126
3.1.4	Composición de ácidos grasos de suspensiones celulares de soja tratadas con inhibidores del transporte electrónico fotosintético	128
3.1.5	Efecto de la inhibición parcial del transporte electrónico fotosintético en la transcripción de los genes de las desaturasas	132
3.1.5.1	Análisis de los niveles de mRNA de las desaturasas mediante RT-PCR semicuantitativa	132
3.1.5.2	Análisis de los niveles de mRNA de las desaturasas mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real	133
3.1.6	Efecto de la sacarosa en la composición de ácidos grasos y en la expresión de las desaturasas	135
3.1.7	Análisis de la regulación postranscripcional del gen <i>FAD7</i>	138

3.1.7.1 Estudio de la estabilidad del mRNA de <i>FAD7</i>	138
3.1.7.1.1 Efecto de la oscuridad en la estabilidad del mRNA de <i>FAD7</i>	138
3.1.7.1.2 Efecto de la inhibición parcial del transporte electrónico fotosintético en la estabilidad del mRNA de <i>FAD7</i>	140
3.1.7.2 Asociación con los polirribosomas	141
3.1.7.3 Estudio de la acumulación de la proteína <i>FAD7</i>	144
3.1.7.3.1 Obtención de un anticuerpo específico contra <i>FAD7</i>	144
3.1.7.3.2 Efecto de la oscuridad en la acumulación de <i>FAD7</i>	147
3.1.8 Inmunolocalización de la proteína <i>FAD7</i>	149
3.2 FOTOINHIBICIÓN Y ENSAMBLAJE DEL FOTOSISTEMA II EN EL MUTANTE STR7 RESISTENTE A ATRAZINA Y DEFICIENTE EN LA INSATURACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	153
3.2.1 Fotoinhibición de la línea silvestre (WT) y de la línea mutante STR7	153
3.2.2 Fotoinhibición <i>in vitro</i> de membranas tilacoidales	156
3.2.3 Degradación inducida por la luz de la proteína D1	157
3.2.4 Recuperación de la actividad fotosintética tras la fotoinhibición	159
3.2.5 Influencia de la temperatura en la fotoinhibición y en la recuperación de la actividad fotosintética	160
3.2.6 Síntesis <i>de novo</i> e incorporación de la proteína D1 a las membranas tilacoidales	165
3.2.7 Análisis del ensamblaje del PS II mediante centrifugación en gradiente de sacarosa	168
3.2.7.1 Patrón de distribución de las proteínas D1 y D2	171
3.2.7.2 Patrón de distribución de LHCII y OEE33	172
4 DISCUSIÓN	
4.1 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE PLANTAS	177
4.1.1 La luz como factor regulador de la expresión de los genes de las desaturasas	177

4.1.2	Implicación del transporte electrónico fotosintético en la regulación de la expresión de los genes de las desaturasas	180
4.1.3	Regulación postranscripcional del gen <i>FAD7</i>	183
4.1.4	Acumulación de la proteína <i>FAD7</i> y regulación de su actividad	185
4.1.5	Interacción de la luz y la temperatura y su posible influencia en la expresión de las desaturasas	189
4.1.6	Inmunolocalización de la proteína <i>FAD7</i>	190
4.2	FOTOINHIBICIÓN Y ENSAMBLAJE DEL FOTOSISTEMA II EN EL MUTANTE STR7	192
4.2.1	Implicación del ensamblaje del PS II en la mayor sensibilidad a la fotoinhibición del mutante STR7	192
4.2.2	Influencia de la composición de ácidos grasos y de la mutación de D1 en el ensamblaje del PS II	195
5	CONCLUSIONES	201
6	BIBLIOGRAFÍA	205

ANEXO I: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Alfonso M., **Collados R.**, Yruela I., Picorel, R. 2004. Photoinhibition and recovery in a herbicide-resistant mutant from *Glycine max* (L.) Merr. Cell cultures deficient in fatty acid unsaturation. *Planta* 219, 428-439.

Collados R., Andreu V., Picorel R., Alfonso M. 2006. A light sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of ω 3 fatty-acid desaturases (*FAD3*, *FAD7* and *FAD8*) in soybean photosynthetic cell suspensions. *FEBS Letters* 580, 4934-4940.

ANEXO I: PUBLICACIONES EN PREPARACIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS LÍPIDOS

Al igual que en el resto de los seres vivos, los lípidos presentan diversas y variadas funciones en las plantas (Somerville y col., 2000). En primer lugar, los lípidos desempeñan un papel estructural fundamental siendo los principales componentes de las membranas biológicas y otros elementos de las estructuras celulares como las ceras, la cutina y la suberina. Las membranas biológicas son responsables de la separación de la célula del medio que la rodea y de la compartimentación intracelular en orgánulos y evitan la difusión libre de las moléculas hidrofílicas a través de ellas. Desde un punto de vista más fisiológico, la existencia de las membranas biológicas permite la formación del gradiente de protones clave para el mantenimiento de la bioenergética celular (Mitchell, 1979; Mitchell, 1961), y determina los fenómenos de homeostasis iónica, de gran importancia a nivel celular. Además de esta función estructural, los lípidos también representan una importante fuente de energía para la célula e intervienen en rutas de transducción de señal actuando como precursores en la síntesis de hormonas como el ácido jasmónico y de segundos mensajeros como el inositol trifosfato y el diacilglicerol, así como en otros procesos muy diversos entre los que se encuentran la fotoprotección (carotenoides) o la modificación postraduccional de proteínas, entre otros.

1.1.1 Lípidos de membrana

Las membranas celulares están formadas por una bicapa de lípidos polares, mayoritariamente glicerolípidos, en la cual se encuentran embebidas algunas proteínas denominadas proteínas de membrana. En el caso de las membranas de las células vegetales, además de un pequeño porcentaje de esfingolípidos, tres tipos de glicerolípidos forman esta bicapa: los glicerofosfolípidos o fosfolípidos, los glucoglicerolípidos o glucolípidos y los sulfolípidos.

1.1.1.1. Los ácidos grasos

Desde un punto de vista estructural, los ácidos grasos son los lípidos más sencillos que podemos encontrar en las plantas. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 átomos de carbono que pueden presentar enlaces sencillos o múltiples (normalmente dobles) y sustituciones con otros grupos funcionales como hidroxilo o epoxi, así como ramificaciones. Los ácidos grasos más abundantes poseen un número par de átomos de carbono en una cadena sin ramificar cuya longitud varía entre los 12 y 24 carbonos. Los dobles enlaces casi nunca son conjugados, sino que están separados por un grupo metileno y su configuración es *cis* en casi todos los ácidos grasos naturales. En la tabla 1-1 se muestran los principales ácidos grasos encontrados en las plantas. El ácido linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) y el ácido linolénico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) son los ácidos grasos mayoritarios. Sólo algunas especies vegetales acumulan ácidos grasos con dobles enlaces entre el grupo carboxilo y la posición $\Delta 9$ (Somerville y col., 2000).

Los ácidos grasos no suelen encontrarse en forma libre en las células sino que están formando parte de otros lípidos de estructura más compleja como los glicerolípidos y los esfingolípidos (figura 1-1).

Nombre común	Estructura	Abreviatura
Ácido láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Ácido palmítico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	16:0
Ácido esteárico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	18:0
Ácido araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	20:0
Ácido behénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	22:0
Ácido lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	24:0
Ácido oleico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1 ^{Δ9}
Ácido petroselénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:1 ^{Δ6}
Ácido linoleico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2 ^{Δ9,12}
Ácido α-linolénico ^b	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:3 ^{Δ9,12,15}
Ácido γ-linolénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:3 ^{Δ6,9,12}
Ácido rougánico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	16:3 ^{Δ7,10,13}
Ácido erúxico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	22:1 ^{Δ13}

Tabla 1-1: Principales ácidos grasos saturados (sobre fondo amarillo) e insaturados (sobre fondo naranja) presentes en las plantas. ^bÁcidos grasos encontrados frecuentemente en los lípidos de membrana. Adaptada de Somerville y col., 2000.

1.1.1.2. Glicerofosfolípidos

Los glicerofosfolípidos o fosfolípidos son lípidos anfipáticos formados por dos ácidos grasos esterificados a las dos primeras posiciones de una molécula de glicerol-3-fosfato y un grupo polar unido al esqueleto de glicerol a través del grupo fosfato. La naturaleza de este grupo polar permite distinguir los distintos fosfolípidos celulares: fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol principalmente (figura 1-1).

El fosfatidilglicerol (PG) es el único fosfolípido que se encuentra en las membranas tilacoidales además de encontrarse también en membranas extraplastidiales como las del retículo endoplásmico, las mitocondriales y la membrana plasmática. En la mayoría de las especies vegetales, el PG localizado en los plastidios contiene ácidos grasos con configuración *trans* que no se encuentran en ningún otro lípido (Dörmann, 2005).

La fosfatidilcolina (PC), la fosfatidiletanolamina (PE) y la fosfatidilserina (PS) contienen en su cabeza polar un aminoalcohol y pueden convertirse entre sí mediante varias reacciones enzimáticas (Dörmann, 2005). PC y PE son los fosfolípidos más abundantes en plantas y juntos representan más del 50 % de los glicerolípidos extraplastidiales. Sin embargo, PE no se encuentra en las membranas plastidiales, mientras que PC, no forma parte de las membranas tilacoidales pero sí de la envuelta externa del cloroplasto. PS es un lípido minoritario en plantas, representando menos del 1 % de los glicerolípidos y al igual que PE no se encuentra en las membranas cloroplásticas. Por último, el fosfatidilinositol (PI) se detecta en muy baja proporción en casi todas las membranas de las células vegetales aunque si bien su presencia en las membranas del retículo endoplásmico y en la membrana plasmática está comúnmente aceptada, la identificación de PI en las membranas tilacoidales no ha sido confirmada (Dörmann, 2005). A pesar de ser un lípido minoritario en plantas, el PI ejerce un función muy importante en la transducción de señal ya que es un precursor de la síntesis del inositol trifosfato y del diacilglicerol que actúan como segundos mensajeros en varias rutas de transducción de señal (Dörmann, 2005; Drobak, 2005).

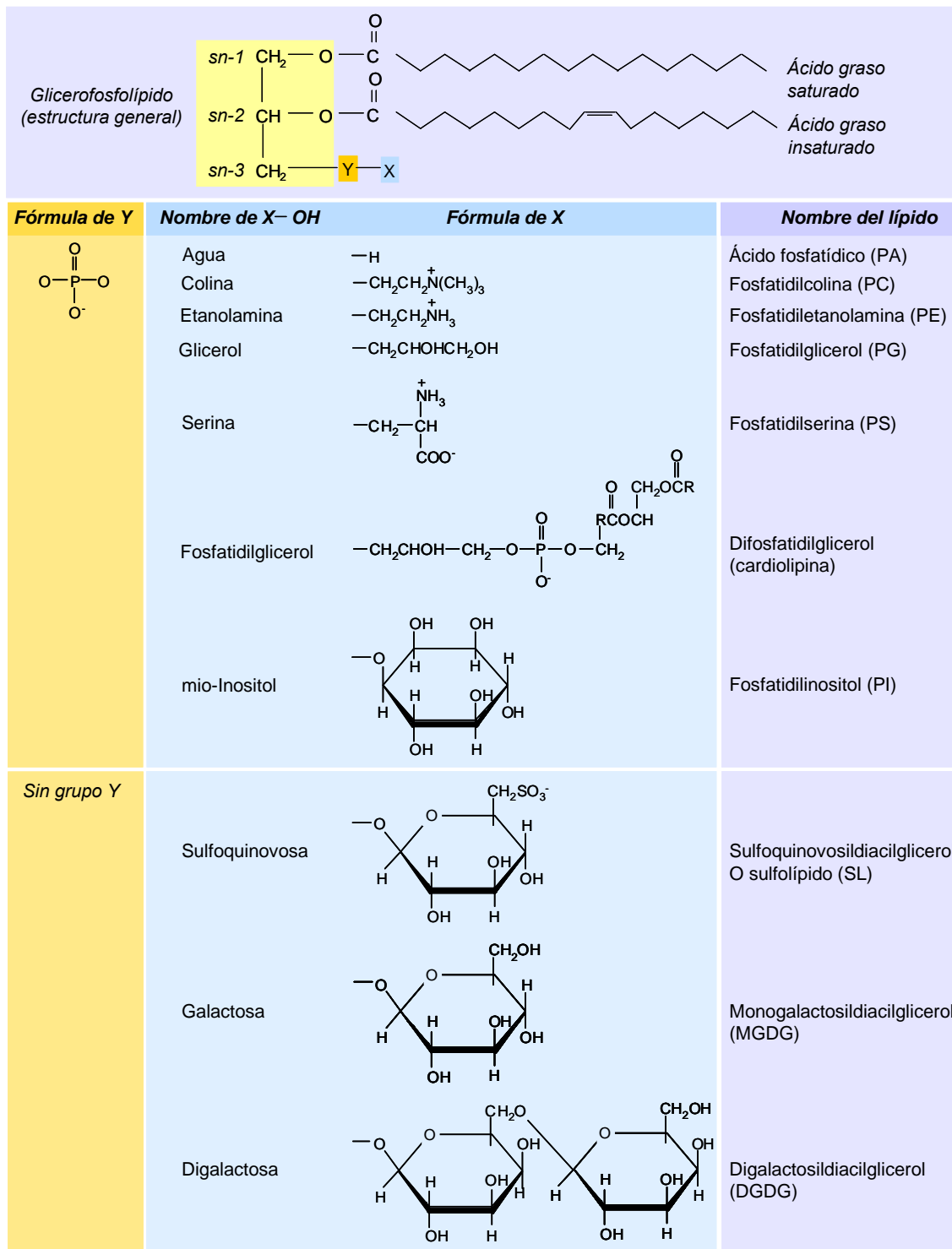


Figura 1-1: Estructura de las principales clases de glicerolípidos de membrana. Adaptada de Somerville y col., 2000.

1.1.1.3. Galactolípidos

Los galactolípidos difieren de los fosfolípidos en que en lugar del grupo polar unido al grupo fosfato presentan residuos de galactosa en la tercera posición de la molécula de glicerol (figura 1-1). El monogalactosildiacilglicerol (MGDG) y el digalactosildiacilglicerol (DGDG) son los principales galactolípidos presentes en plantas aunque también se han encontrado pequeñas cantidades de galactolípidos que contienen tres o más moléculas de galactosa (Benson y col., 1958; Fujino y Miyazawa, 1979; Kojima y col., 1990). Los galactolípidos contienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados y son los lípidos predominantes en las membranas fotosintéticas de plantas y cianobacterias (Block y col., 1983). En el caso de las plantas, el MGDG y el DGDG representan alrededor del 50 % y del 30 % respectivamente de los lípidos presentes en los tilacoides. La envuelta interna del cloroplasto presenta una composición lipídica similar a la de las membranas tilacoidales siendo el MGDG el galactolípidos mayoritario mientras que la envuelta externa del cloroplasto contiene más DGDG que MGDG (Dörmann, 2005).

1.1.1.4. Sulfolípidos

Los sulfolípidos (Sulfoquinovosildiacilglicerol, SQDG) presentes en plantas contienen una molécula de sulfoquinovopiranosil en la tercera posición de la molécula de glicerol en la que se basa su estructura (figura 1-1). Los sulfolípidos de plantas son ricos en ácidos grasos saturados, sobre todo en ácido palmítico, y solo se ha detectado su presencia en las membranas cloroplásticas donde representan entre el 5 % y el 12 % de los lípidos tilacoidales (Dörmann, 2005).

1.2. SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN PLANTAS

1.2.1. Síntesis de ácidos grasos

La síntesis de ácidos grasos en plantas tiene lugar fundamentalmente en los plastidios gracias a la enzima acetil-CoA carboxilasa y al complejo multienzimático denominado ácido graso sintasa. Además de estas enzimas, la biosíntesis de ácidos grasos requiere un donador de átomos de carbono, el acetil-CoA, y el poder reductor aportado por el NADPH. El acetil-CoA necesario parece provenir principalmente de la piruvato deshidrogenasa plastidial que lo sintetiza a partir del piruvato generado en la glicólisis (Bao y col., 2000; Schwender y Ohlrogge, 2002). Sin embargo, no se descarta que en algunas circunstancias este acetil-CoA pueda ser obtenido por rutas alternativas como a través de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial (Bao y col., 2000; Ke y col., 2000). El NADPH indispensable se obtiene mediante la fotosíntesis en los cloroplastos o mediante la ruta de las pentosas fosfato en los tejidos que no poseen cloroplastos y en oscuridad (Somerville y col., 2000).

Las reacciones implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos se muestran en la figura 1-2 (Harwood, 2005). La enzima acetil-CoA carboxilasa cataliza el primer paso del proceso de síntesis consistente en la producción de malonil-CoA mediante la carboxilación dependiente de ATP de una molécula de acetil-CoA. El complejo ácido graso sintasa es responsable de la producción de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos mediante la adición sucesiva de unidades de dos átomos de carbono proporcionadas por el malonil-CoA. Cada una de estas adiciones comprende una condensación, una reducción, una deshidratación y una nueva reducción. La primera enzima del complejo en intervenir es la malonil-CoA:ACP transacilasa que permite la unión del grupo malonil a una pequeña proteína denominada “acil-carrier protein” (ACP). A continuación, gracias a la enzima β -cetoacil-ACP sintasa III

(KAS III), una molécula de acetil-CoA es condensada al malonil-ACP que sufre una descarboxilación. Existen otras dos β -cetoacil-ACP sintetasas, KAS I y KAS II: KAS I participa en la producción de ácidos grasos de 6 a 16 átomos de carbono y KAS II cataliza la condensación final sintetizando ácido esteárico. La molécula de cetoacil-ACP formada sufre sucesivamente una reducción, una deshidratación y de nuevo otra reducción mediante la actuación de las enzimas cetoacil-ACP reductasa, hidroxiacil-ACP deshidratasa y enoil-ACP reductasa, respectivamente. El complejo FAS produce generalmente ácido palmítico y ácido esteárico. La prolongación de la cadena de ácido graso por encima de 18 átomos de carbono corre a cargo de las elongasas que se encuentran localizadas en el citosol asociadas a membrana. Por último, la síntesis de ácidos grasos se completa con la hidrólisis del ácido graso de la ACP mediante una tioesterasa, la incorporación del ácido graso a un glicerolípido mediante una aciltransferasa y posterior desaturación, o, en el caso del 18:0, con su desaturación cuando todavía se encuentra unido al ACP produciéndose ácido oleico.

1.2.2. Síntesis de glicerolípidos

Tras su síntesis, los ácidos grasos son incorporados a una de las dos rutas que existen en plantas para la producción de glicerolípidos: la ruta procariota y la ruta eucariota (figura 1-3). La *ruta procariota*, denominada así por su similitud con la ruta de síntesis de ácidos grasos en bacterias, tiene lugar íntegramente en el plastidio. Esta ruta comienza con la esterificación de 16:0, 18:1 y en menor medida 18:0 al glicerol 3-fosfato para formar ácido fosfatídico (PA). A partir del ácido fosfatídico se sintetizan fosfatidilglicerol (PG) y diacilglicerol (DAG). El diacilglicerol es la base de la síntesis de los

galactolípidos MGDG y DGDG, que son los lípidos mayoritarios de las membranas tilocoidales, así como de los sulfolípidos (SL).

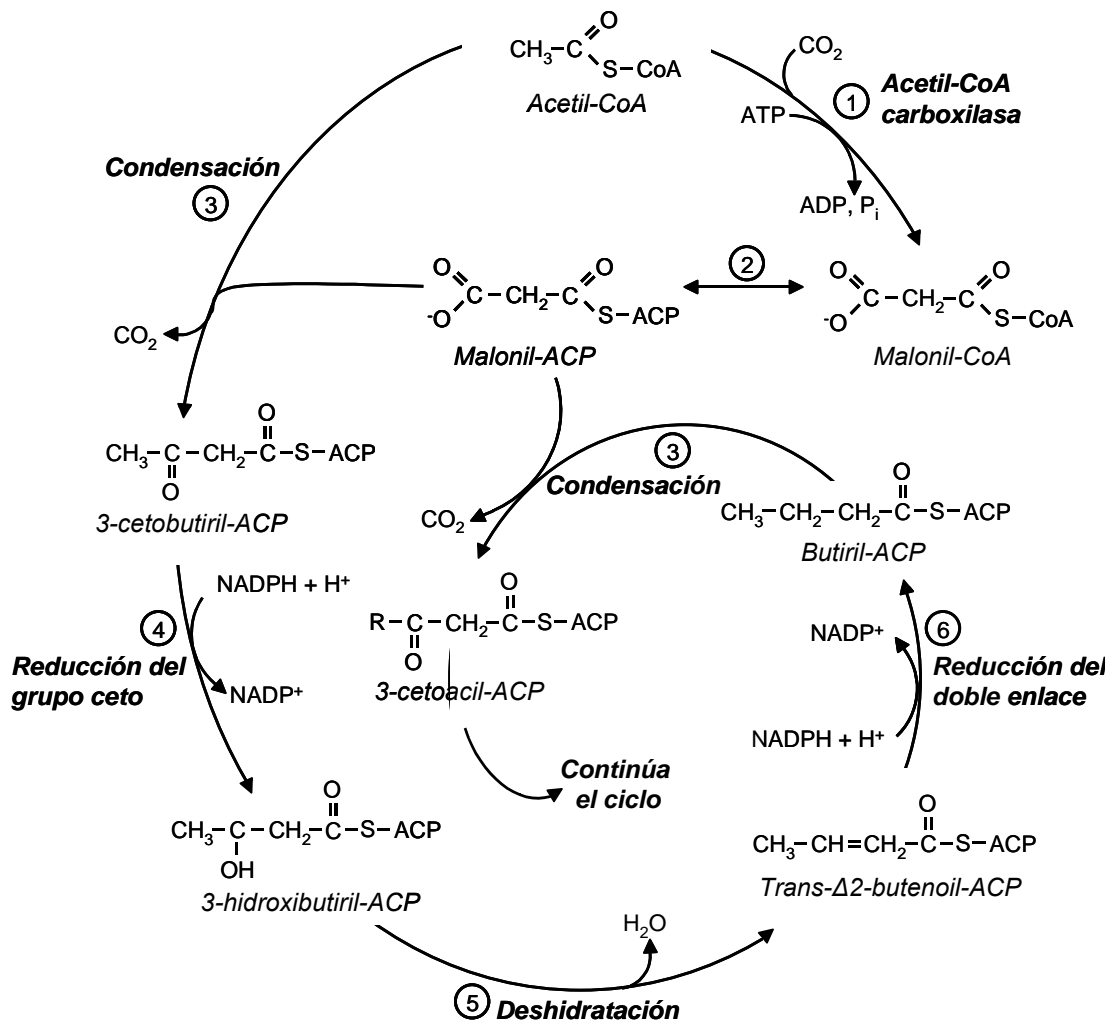


Figura 1-2: Ruta de síntesis de ácidos grasos en plantas. Adaptada de Ohlrogge y Browse, 1995.

La *ruta eucariota* transcurre entre el retículo endoplásmico y el plastidio. Una tioesterasa hidroliza el enlace de la ACP con el 16:0 y el 18:1 que ya en forma libre atraviesan la membrana del plastidio, son esterificados a coenzima A (CoA) y penetran en el retículo. Una vez en el retículo son incorporados al glicerol 3-fosfato produciendo ácido fosfatídico a partir del

Introducción

cual se sintetizan PG, PI y DAG. El DAG es utilizado para sintetizar PC y PE. De esta forma, en el retículo se producen los fosfolípidos que componen las membranas celulares. Parte de los lípidos aquí sintetizados viajan al plastidio en forma de PC, lisofosfatidilcolina o DAG y son utilizados para sintetizar MGDG, DGDG, PG y SL.

La cantidad de glicerolípidos sintetizados por una ruta u otra puede variar con los tejidos y con las distintas especies. Así, en las semillas suele predominar la ruta eucariota, mientras que en las hojas los glicerolípidos pueden ser sintetizados por igual en ambas rutas. De esta forma se distinguen plantas 18:3 y plantas 16:3. En las *plantas 18:3*, la mayoría de los glicerolípidos de las hojas son sintetizados a través de la ruta eucariota, por lo que esterificado en la posición sn-2 del glicerol se encuentra un ácido graso de 18 átomos de carbono. En estas plantas la ruta procariota quedaría limitada prácticamente a la síntesis de fosfatidilglicerol. La mayoría de los cultivos de interés agrícola, entre ellos la soja (*Glycine max*), son plantas 18:3. En las *plantas 16:3*, los glicerolípidos se sintetizan a través de ambas rutas por lo que esterificados en la posición sn-2 del glicerol pueden encontrarse tanto ácidos grasos de 16 átomos de carbono como de 18 átomos de carbono. Plantas de este tipo son, por ejemplo, la espinaca (*Spinacea oleacea*) y *Arabidopsis thaliana*.

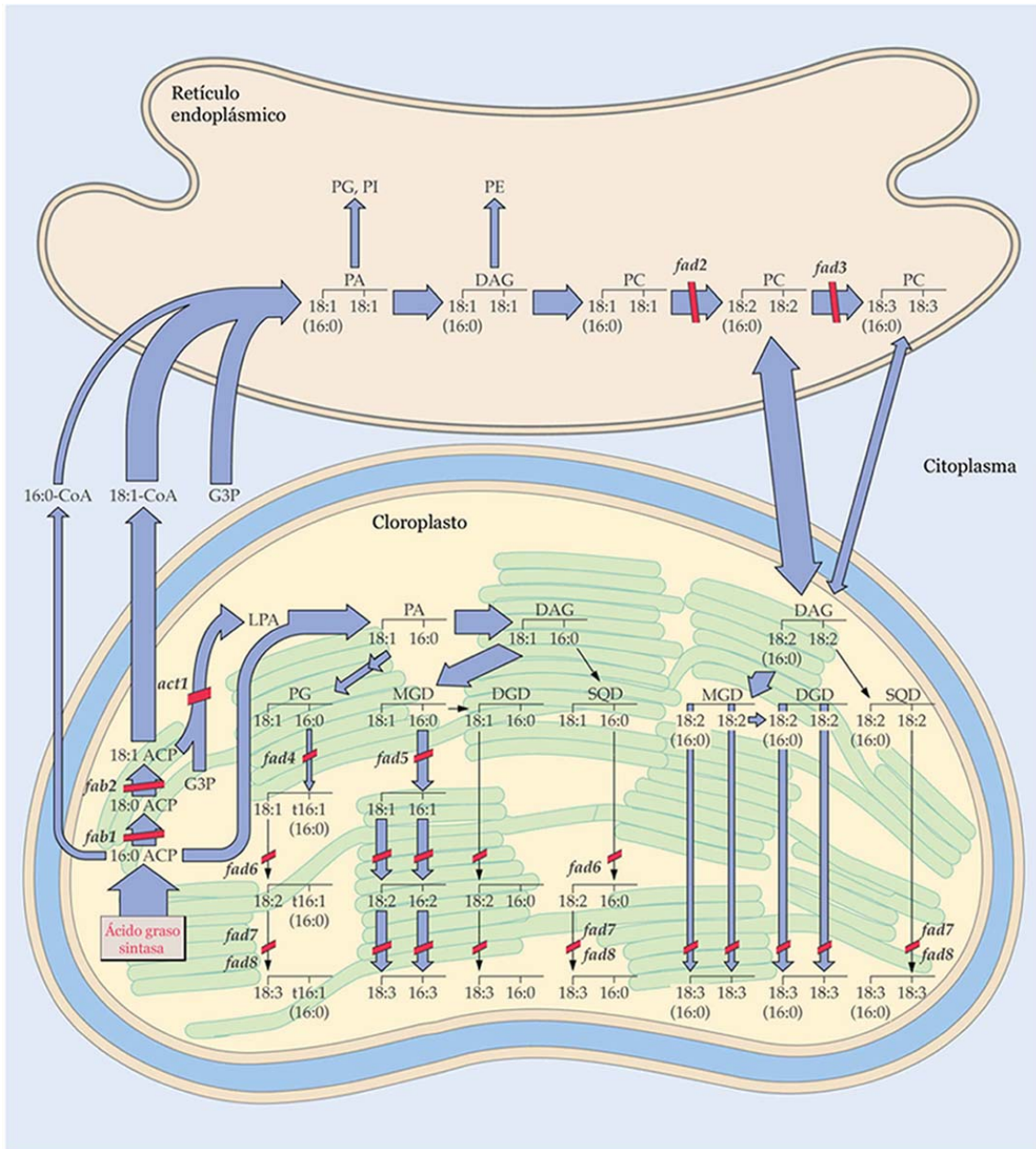


Figura 1-3: Esquema de la síntesis de lípidos en hojas de *Arabidopsis*. La anchura de las flechas representa el flujo relativo entre las varias etapas de la ruta. Las líneas rojas indican algunos de los genes para los que se han aislado mutantes en *Arabidopsis*. Adaptada de Somerville y col., 2000.

1.3. DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS

1.3.1. Características de las desaturasas de ácidos grasos de plantas

Las desaturasas son las enzimas encargadas de introducir dobles enlaces en los ácidos grasos y juegan un papel muy importante en numerosos procesos fisiológicos. Principalmente, las desaturasas regulan la fluidez de las membranas celulares y participan en la biosíntesis de moléculas implicadas en la señalización celular como el ácido jasmónico y sus derivados. Además, las propiedades físicas y el valor nutricional de los lípidos animales y vegetales dependen de la actividad de estas enzimas (Murphy y Piffanelli, 1998).

Atendiendo a su solubilidad, las desaturasas de plantas pueden clasificarse en dos grupos: desaturasas solubles y desaturasas de membrana. Las principales características de algunas de estas enzimas se resumen en la tabla 1-2. Independientemente de su solubilidad, todas las desaturasas de plantas están codificadas por genes nucleares y necesitan un donador de electrones para realizar su función. En el caso de las desaturasas plastidiales, este donador de electrones es la ferredoxina, y en el caso de las desaturasas localizadas en el retículo endoplásmico, el citocromo b_5 (Miquel y Browse, 1998).

1.3.1.1. Desaturasas solubles

Las desaturasas solubles de plantas se localizan en los plastidios y actúan sobre ácidos grasos unidos a la ACP. Dentro de este tipo de desaturasas, la familia de las Δ^9 estearoil-ACP desaturasas (FAB2) es esencial en la biosíntesis de ácidos grasos, ya que catalizan la introducción del primer doble enlace en el ácido esteárico produciendo ácido oleico.

El estudio y la comprensión del funcionamiento de estas desaturasas y de otras enzimas relacionadas avanzaron considerablemente con la resolución de la estructura cristalina de una forma recombinante de la $\Delta 9$ estearoil-ACP desaturasa de *Ricinus communis* (Lindqvist y col., 1996). Tal y como muestra esta estructura, la proteína está constituida por once hélices α y posee un centro dihierro (Fe-O-Fe) cercano al cual se encuentra el sitio de unión del sustrato (figura 1-4).

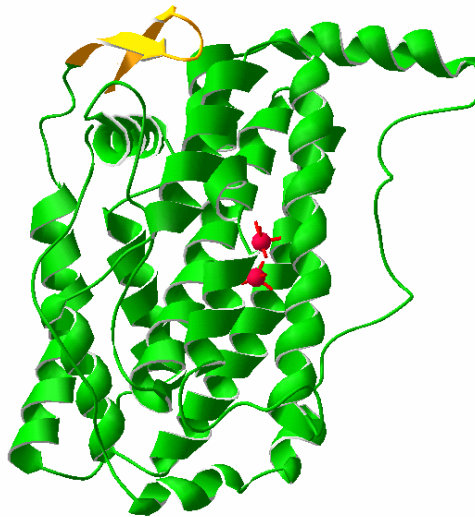


Figura 1-4: Estructura de la $\Delta 9$ estearoil-ACP desaturasa de *Ricinus communis*. Los dos átomos de hierro del centro dihierro se muestran en rojo.

Además de la $\Delta 9$ estearoil-ACP desaturasa, se han encontrado otras desaturasas solubles en semillas y otros tejidos ricos en contenido lipídico como la $\Delta 6$ palmitoil-ACP desaturasa de *Thunbergia alata* (Cahoon y col., 1994), la $\Delta 4$ palmitoil-ACP desaturasa de *Coriandrum sativum* (Cahoon y col., 1992) y la $\Delta 9$ miristoil-ACP desaturasa de *Pelargonium hortorum* (Schultz y col., 1996).

Gen	Nombre antiguo	Sustrato	Localización	Sustrato	Producto	Donador de electrones
Fab2		Acil-ACP	CP	18:0	18:1 Δ^9	Fd
Fad2		Fosfolípido	ER	18:1 Δ^9	18:2 $\Delta^9, 12$	b ₅
Fad3		Fosfolípido	ER	18:2 $\Delta^9, 12$	18:3 $\Delta^9, 12, 15$	b ₅
Fad4	FadA	PG	CP	16:0	16:1 $\Delta^{7\ddagger}$	Fd
Fad5	FadB	GL, SL	CP	16:0	16:1 Δ^7	Fd
Fad6	FadC	GL, SL, PG	CP	16:1 Δ^7	16:2 $\Delta^7, 10$	Fd
				18:1 Δ^9	18:2 $\Delta^9, 12$	
Fad7	FadD	GL, SL, PG	CP	16:2 $\Delta^7, 10$	16:3 $\Delta^7, 10, 13$	Fd
				18:2 $\Delta^9, 12$	18:3 $\Delta^9, 12, 15$	
Fad8		GL, SL, PG	CP	16:2 $\Delta^7, 10$	16:3 $\Delta^7, 10, 13$	Fd
				18:2 $\Delta^9, 12$	18:3 $\Delta^9, 12, 15$	

Tabla 1-2: Principales características de las desaturasas de ácidos grasos de plantas. Sobre fondo naranja se muestra la desaturasa soluble y sobre fondo amarillo las desaturasas de membrana. CP, cloroplasto; ER, retículo endoplásmico; Fd, ferredoxina; b₅, citocromo b₅; GL, galactolípido; PG, fosfatidilglicerol; SL, sulfolípido. Adaptada de Miquel y Browse, 1998.

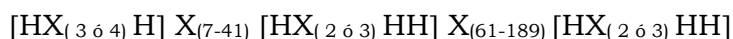
1.3.1.2. Desaturasas de membrana

La mayoría de las desaturasas de plantas son proteínas de membrana. Este hecho ha dificultado enormemente el desarrollo de métodos de purificación, y por tanto, su caracterización bioquímica. En los últimos años, la utilización de herramientas genéticas ha contribuido a aumentar nuestro conocimiento acerca de las propiedades de estas enzimas. Así, en *Arabidopsis* se han aislado mutantes para cada una de las desaturasas que participan en la síntesis de glicerolípidos en las hojas (Miquel y Browse, 1998) (figura 1-3). El análisis de estos mutantes ha permitido identificar los genes que codifican las desaturasas así como profundizar en la bioquímica y la regulación de la síntesis de glicerolípidos.

Las desaturasas de membrana son acil-lípido desaturasas, es decir, introducen insaturaciones en los ácidos grasos que se encuentran esterificados formando el lípido correspondiente y se localizan tanto en el retículo como en el plastidio (tabla 1-2). Las desaturasas reticulares están codificadas por los genes *FAD2* y *FAD3* e introducen dobles enlaces en los ácidos grasos de 18 átomos de carbono de los fosfolípidos. *FAD2* produce 18:2 a partir de 18:1 y *FAD3* produce 18:3 a partir de 18:2. En soja, se han descrito tres genes que codifican la enzima *FAD2*: *FAD2-1A* y *FAD2-1B*, que se expresan en semillas en desarrollo, y *FAD2-2*, que se expresa tanto en el desarrollo de las semillas como en tejidos vegetativos (Heppard y col., 1996; Tang y col., 2005). En el caso de la desaturasa *FAD3*, se ha propuesto la existencia de tres genes que la codifican en soja (Bilyeu y col., 2003). Según estos autores, *FAD3A* se expresa en gran cantidad en semillas, *FAD3B* se expresa en hojas pero no en semillas y *FAD3C* se expresa en ambos tejidos. Las desaturasas plastidiales están codificadas por los genes *FAD4*, *FAD5*, *FAD6*, *FAD7* y *FAD8* y su sustrato son los ácidos grasos que se encuentran formando los lípidos que componen las membranas plastidiales. El análisis de los mutantes de *Arabidopsis* sugiere que *FAD4* actuaría específicamente sobre fosfatidilglicerol sintetizando 16:1^{Δ7t} a partir de 16:0, mientras que *FAD5* parece ser específica de monogalactosildiacilglicerol sintetizando 16:1 a partir de 16:0. *FAD6* y *FAD7* podrían actuar sobre todas las clases de lípidos que componen las membranas tilacoidales (PG, sulfolípidos y galactolípidos), introduciendo dobles enlaces tanto en ácidos grasos de 16 átomos de carbono como en ácidos grasos de 18 átomos de carbono. *FAD6* produce 16:2 y 18:2 a partir de 16:1 y 18:1 respectivamente, mientras que *FAD7* produce 16:3 y 18:3 a partir de 16:2 y 18:2 respectivamente. *FAD8*, al igual que *FAD7*, produce

16:3 y 18:3 en los plastidios aunque su actividad parece ser inducida por el frío (McConn y col., 1994).

A pesar de las diferencias mostradas respecto a la especificidad de sustrato, al donador de electrones e incluso respecto a la posición en la que introducen el doble enlace, todas las desaturases de membrana contienen motivos estructurales conservados, como la presencia de tres regiones ricas en histidinas con la siguiente secuencia consenso (Murphy y Piffanelli 1998):



Las ocho histidinas contenidas en estas secuencias son esenciales para la actividad catalítica, ya que están implicadas en la unión de los átomos de Fe del centro dihierro que presentan las desaturases. En la figura 1-5 se muestra un esquema de la estructura de una desaturasa de membrana.

Algunas desaturases presentan secuencias ricas en histidinas que no se corresponden con las secuencias consenso. Este es el caso de la desaturasa $\Delta 6$ encargada de sintetizar el ácido γ -linolénico a partir del ácido linoleico. Esta desaturasa se encuentra unida por su extremo N-terminal a su donador de electrones, el citocromo b_5 , y pertenece al grupo de las denominadas desaturases “front-end” (Napier y col., 1997; Napier y col., 2003). Este tipo de desaturases introducen el doble enlace entre un doble enlace ya existente y el extremo carboxilo del ácido graso.

1.3.2. Regulación de la actividad de las desaturases

Al día de hoy todavía permanecen sin respuesta algunas preguntas fundamentales relativas al metabolismo lipídico en plantas. Básicamente, desconocemos qué factores controlan el nivel de desaturación de un determinado glicerolípido en una membrana en concreto, es decir, desconocemos los mecanismos de control de la actividad y la síntesis de las

desaturasas de plantas superiores. Varias evidencias apuntan a que diversos y numerosos factores como el desarrollo de la planta, las hormonas, la disponibilidad de sustrato, las heridas, el ataque de patógenos, el estrés hídrico y la temperatura regulan la actividad de estas enzimas. A continuación se describe de forma más detallada algunos datos conocidos sobre la regulación de las desaturasas por estos factores.

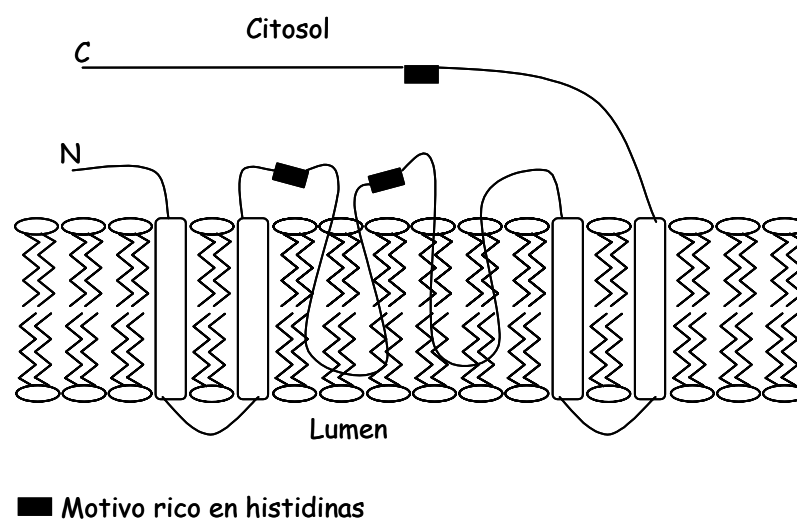


Figura 1-5: Representación de la topología de FAD2 y FAD3 en las membranas del retículo endoplásmico. Adaptada de Dyer y col., 2001 y Tang y col., 2005.

1.3.2.1. El desarrollo de la planta

La necesidad de actividad desaturasa adicional durante ciertos estadios del desarrollo vegetal puede ser suplida mediante el aumento de la expresión de los genes de las desaturasas que se expresan constitutivamente, o bien mediante la inducción de otras desaturasas específicas de algunos tejidos en desarrollo. Uno de los ejemplos mejor caracterizados de desaturasa constitutiva cuya expresión se ve afectada por el desarrollo es el caso de la

estearoil-ACP-desaturasa (FAB2). Así, esta enzima, además de encontrarse implicada en la síntesis general de las membranas, también interviene en la síntesis de lípidos de almacenamiento en semillas y polen, en la síntesis de lípidos estructurales en el *tapetum* y en la síntesis de membranas tilacoidales en las hojas en crecimiento (Slocombe y col., 1994; Piffanelli y col., 1997). En todos estos casos, tanto en tejidos fotosintéticos como en tejidos de acumulación de lípidos de almacenamiento, se ha encontrado que la regulación se produce principalmente a nivel transcripcional. Sin embargo, el análisis de los niveles de mRNA de *FAB2* y de proteína FAB2 en el mutante de *Arabidopsis chs1* sugiere que este gen también se encontraría regulado a nivel postranscripcional (Schneider y col., 1995).

Un ejemplo claro de genes de las desaturasas inducidos por el desarrollo se ha encontrado en el caso de la desaturasa FAD2. En soja, esta desaturasa se encuentra codificada por los genes *FAD2-1A*, *FAD2-1B* y *FAD2-2* y, mientras que *FAD2-2* se expresa constitutivamente, la expresión de los genes *FAD2-1* se induce durante el desarrollo de las semillas (Heppard y col., 1996; Tang y col., 2005).

1.3.2.2. Las hormonas

Diversas hormonas como las auxinas, las citoquininas o el ácido abscísico están implicadas en la regulación de las desaturasas. Así, el ácido abscísico aumenta la cantidad de mRNA de *FAB2* en semillas en desarrollo (Slocombe y col., 1994), mientras que la auxina parece estar implicada en el aumento del mRNA de *FAD2* (Yamamoto y col., 1994; Lightner y col., 1994). La regulación por hormonas parece encontrarse íntimamente relacionada con el desarrollo de la planta, en concreto con la fase de crecimiento en la que la planta se encuentre. De esta forma, en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, el

promotor de *FAD3* induce la expresión del gen de la luciferasa cuando las plantas se tratan con auxina y citoquinina anulándose este efecto cuando las plantas son tratadas previamente con ácido abscísico (Matsuda y col., 2001). Estos efectos de las hormonas se producen cuando el tratamiento se realiza en la fase reproductiva del crecimiento de la planta pero no si se realizan en la fase vegetativa.

1.3.2.3. La temperatura

La composición lipídica y el grado de insaturación de los lípidos de las membranas son uno de los factores que más directamente influyen en la respuesta de las plantas a la temperatura. Las características fisicoquímicas de las bicapas lipídicas varían según los distintos grupos de cabeza y ácidos grasos que constituyen los lípidos, y esta composición de ácidos grasos cambia dependiendo de la temperatura de crecimiento (Iba, 2002). En condiciones fisiológicas normales, las membranas biológicas se encuentran en estado *líquido cristalino*. A temperaturas bajas las membranas sufren un cambio de estado pasando a la denominada *fase de gel* en la que las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos se disponen rectas, produciéndose un aumento de la rigidez. Se cree que esta transición de las membranas biológicas a la fase de gel a temperaturas bajas contribuye al daño celular, pudiendo producir incluso la muerte celular. Diversos factores como la configuración (*cis* o *trans*) de los dobles enlaces de los ácidos grasos y su grado de insaturación pueden influir en esta transición de estado y por tanto en la fluidez o rigidez de las membranas. Como regla general, mayores cantidades de ácidos grasos saturados favorecen la rigidez de las membranas mientras que el aumento del número de dobles enlaces en configuración *cis* conduce al aumento de la fluidez de las membranas. Según este razonamiento, la

presencia de ácidos grasos saturados debería ser particularmente importante a temperaturas altas y los ácidos grasos insaturados cruciales para la supervivencia a temperaturas bajas. Sin embargo, el impacto de la insaturación en esta adaptación a la temperatura parece ser más complejo. El estudio de mutantes de *Arabidopsis* y de plantas transgénicas que presentan alteraciones en la desaturación de los ácidos grasos ha ayudado a profundizar en el papel de la insaturación de los ácidos grasos en la tolerancia a la temperatura (Wallis y Browse, 2002), analizándose sobre todo el papel del fosfatidilglicerol y de los ácidos grasos poliinsaturados.

A pesar de que únicamente representa alrededor del 8 % de los lípidos de las membranas fotosintéticas, el fosfatidilglicerol, y en concreto sus moléculas saturadas, se han relacionado con la adaptabilidad de las plantas a las temperaturas bajas. Se denomina PG saturado a aquellas moléculas de PG que contienen 16:0, 16:1 en configuración *trans* (16:1t) y 18:0. El PG cloroplástico siempre contiene 16:0 o 16:1t en la posición *sn-2* del glicerol. En plantas resistentes al frío, la posición *sn-1* del PG suele estar ocupada por el ácido graso 18:1, mientras que en las plantas sensibles al frío suele unirse 16:0 o 18:0 en dicha posición. Estas diferencias son debidas a la especificidad de sustrato de la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa. Con el fin de clarificar la relación entre la sensibilidad al frío y las especies moleculares de PG, se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresaban la glicerol-3-fosfato aciltransferasa de plantas resistentes al frío como *Arabidopsis* y de plantas sensibles al frío como calabaza (Murata y col., 1992; Moon y col., 1995). La sobreexpresión de estas enzimas, así como la de la glicerol-3-fosfato aciltransferasa de *Escherichia coli* (Wolter y col., 1992), produjo variaciones en el contenido de PG saturado de las plantas transgénicas y en su sensibilidad al frío. Aunque estos resultados sugieren

que el PG saturado es uno de los factores determinantes de la sensibilidad al frío en las plantas, estudios en el mutante *fab1* de *Arabidopsis* sugieren que el nivel de PG saturado no es lo único que determina la capacidad de las plantas a tolerar las temperaturas bajas y que debe haber otros factores implicados (Wu y Browse, 1995).

Los ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos mayoritarios en plantas y durante mucho tiempo se ha especulado con que son cruciales para la fotosíntesis y el crecimiento de la planta, en particular a bajas temperaturas. El análisis bioquímico y fisiológico de los mutantes de *Arabidopsis fad5* y *fad6* (Hugly y Somerville, 1992) muestra que los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas cloroplásticas influyen en el tamaño del cloroplasto y en la formación de sus membranas a bajas temperaturas (5 °C), mientras que, el análisis del mutante de *Arabidopsis fad2fad6* (McConn y Browse, 1998) muestra que los ácidos grasos poliinsaturados influyen en la capacidad de crecimiento fotoautótrofo de la planta incluso a la temperatura normal de crecimiento (figura 1-6). El hecho de que los niveles de 16:3 y 18:3 aumenten durante el crecimiento a bajas temperaturas, apoya la hipótesis de que los ácidos grasos trienoicos desempeñan un papel fundamental en la tolerancia al frío. Sin embargo, estudios en los mutantes de *Arabidopsis fad3fad7fad8* (figura 1-6) (McConn y Browse, 1996) y *fad7fad8* (Murakami y col., 2000), así como la sobreexpresión del gen *FAD7* de *Arabidopsis* en tabaco (Kodama y col., 1994) y la cosupresión del gen *FAD7* en plantas de tabaco (Murakami y col., 2000), sugieren que la disminución de los ácidos grasos trienoicos tiene efectos mínimos en la fotosíntesis y crecimiento a temperaturas normales y bajas, aunque sí favorece el crecimiento a temperaturas altas (40 °C).

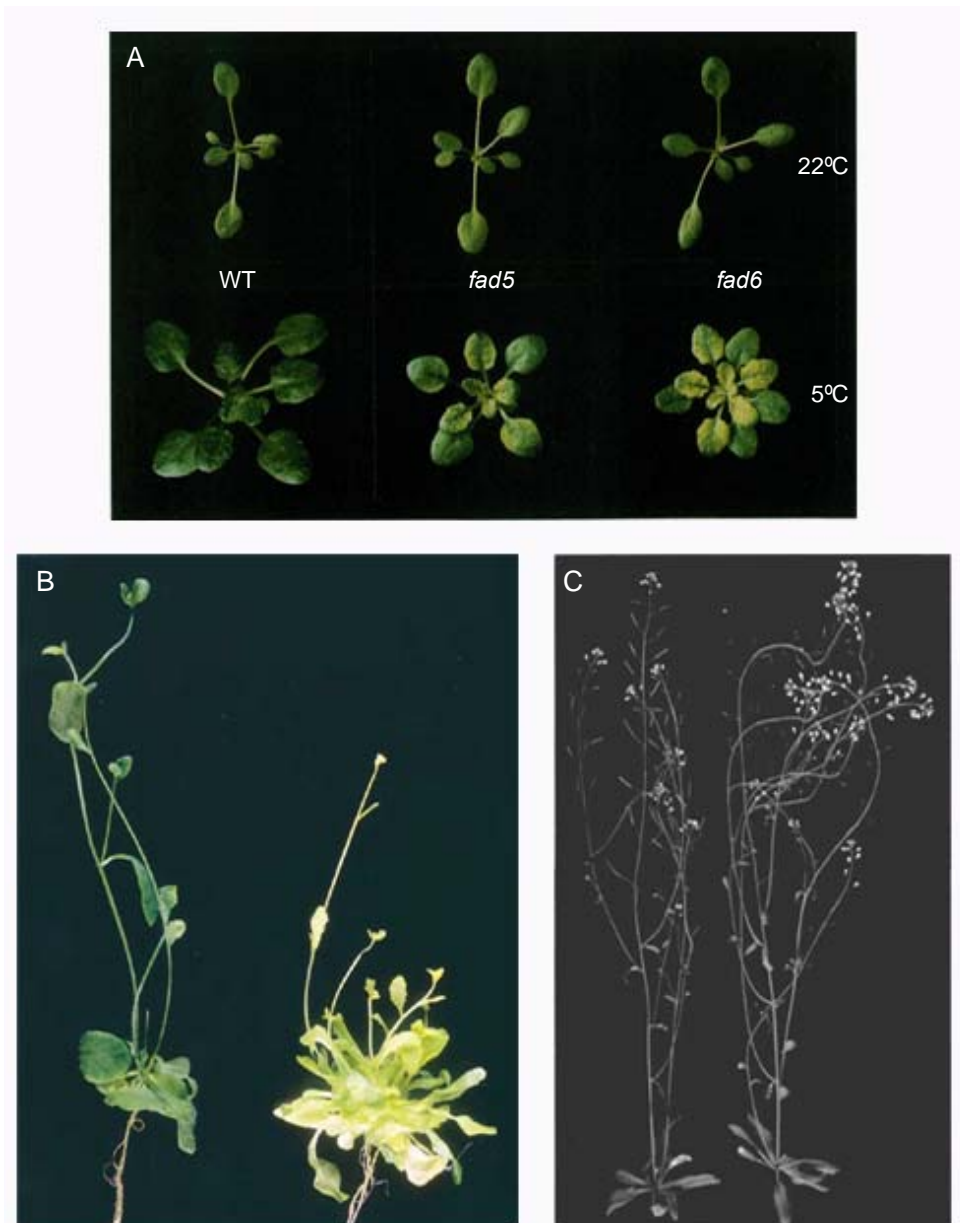


Figura 1-6: Fenotipos de algunos de los mutantes de desaturasas de *Arabidopsis thaliana*. (A) WT, mutante *fad5* y mutante *fad6* mantenidos a 22 °C o a 5 °C durante 10 días tras 7 días de germinación. Adaptada de Hugly y Somerville, 1992. (B) WT y mutante *fad2fad6* crecidos en medio sólido nutritivo que contiene un 2 % de sacarosa. En este medio el mutante desarrolla hojas y raíces pero muere al ser transferido a suelo lo que sugiere que es incapaz de sobrevivir en condiciones autótrofas. Adaptada de McConn y Browse, 1998. (C) WT y mutante *fad3fad7fad8* crecidos a 22 °C durante 4 semanas. Ambos presentan similar crecimiento vegetativo pero *fad3fad7fad8* no produce semillas. Adaptada de McConn y Browse, 1996.

Vista la implicación de la insaturación de los ácidos grasos en la aclimatación a la temperatura, no es de extrañar que la temperatura regule la actividad de las desaturasas tanto en plantas como en cianobacterias. Las cianobacterias responden a descensos en la temperatura de crecimiento introduciendo insaturaciones en los ácidos grasos constituyentes de los lípidos de membrana. En este caso, esta activación de la desaturación parece deberse a que la temperatura produce un aumento de la cantidad y de la estabilidad de los RNA mensajeros de los genes *desA*, *desB* y *desC* que codifican las desaturasas de ácidos grasos de cianobacterias (Los y col., 1993; Sakamoto and Bryant, 1997; Sakamoto and Murata 2002).

Las plantas también responden a los cambios de la temperatura externa modificando el grado de insaturación de los ácidos grasos. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual la temperatura controla la actividad de las desaturasas y, por tanto, el grado de insaturación de los ácidos grasos todavía es desconocido, aunque se han descrito efectos de la temperatura a diversos niveles de expresión génica en varias desaturasas. Así, se ha comprobado que en semillas de soja, el aumento observado en el contenido de ácido linolénico y linoleico al descender la temperatura no se ve acompañado de aumento en los niveles de mRNA de los genes *FAD2-1*, *FAD2-2* y *FAD6* lo que sugiere que la temperatura regula estos genes a nivel postranscripcional (Heppard y col., 1996). De forma similar, se ha observado que la acumulación de ácidos grasos trienoicos que se produce al descender la temperatura en raíces de trigo, no conlleva aumento del mRNA del gen *FAD3* sino aumento de la proteína FAD3 lo que también implicaría una regulación postranscripcional de este gen por la temperatura (Horiguchi y col., 2000). El caso de las ω 3 desaturasas plastidiales (*FAD7* y *FAD8*) parece diferente, modulando la temperatura la cantidad de mRNA de estas dos enzimas. La observación de que la reducción

de la cantidad de ácidos grasos trienoicos era menos pronunciada en el mutante *fad7* de *Arabidopsis* a bajas temperaturas, permitió identificar a FAD8 como una ω 3 desaturasa inducible por bajas temperaturas (McConn y col., 1994). En *Arabidopsis*, el aumento de la temperatura de 20 a 30 °C produce la desaparición del mRNA de *FAD8* mientras que el descenso de 30 a 20 °C induce de nuevo su expresión (Gibson y col., 1998), mientras que, en maíz, se ha comprobado que a 25 °C solo se detecta mRNA de *FAD7*, a 15 °C se detectan ambos y a 5 °C sólo se detecta mRNA de *FAD8* (Berberich y col., 1998). De esta forma, la temperatura podría regular la expresión de estos dos genes a nivel transcripcional. Además, estudios recientes indican que la temperatura podría modificar la actividad de la proteína FAD8, produciéndose una desestabilización de la proteína al subir la temperatura lo que supondría un control de la expresión a nivel postraducciona (Matsuda y col., 2004). En esta línea, se ha comprobado que las temperaturas altas también disminuyen la estabilidad de FAD2-1A en semillas de soja (Tang y col., 2005) así como la de FAD2 en semillas de girasol (García-Díaz y col., 2002). En este caso, además, la temperatura regula la actividad de FAD2 influyendo sobre la disponibilidad de oxígeno, que es un sustrato del enzima (García-Díaz y col., 2002; Martínez-Rivas y col., 2003).

Aunque parece pues suficientemente probado que las variaciones de la temperatura ambiental influyen en la expresión de los genes de las desaturasas, cómo perciben las células estos cambios en la temperatura y los mecanismos de transducción de esta señal son prácticamente desconocidos. La transcripción de los genes de las desaturasas de cianobacterias probablemente depende de las propiedades físicas de la membrana. Así, se ha comprobado en estos organismos que la hidrogenación catalítica de las membranas conduce a un aumento de la transcripción del gen *desA* que

codifica una $\Delta 12$ desaturasa (Vigh y col., 1993). La idea de que los cambios en la fluidez de las membranas tilacoidales de las cianobacterias pueden constituir una forma de percibir el estrés térmico se ve sustentada por el hecho de que algunas proteínas de choque térmico son inducidas cuando la fluidez de la membrana se altera químicamente (Horvath y col., 1998). La transducción de la señal originada por estos cambios en la fluidez de la membrana al interior celular podría producirse a través de la histidina quinasa de membrana HIK33. HIK33 se ha descrito implicada en la percepción y transducción de la señal producida por descensos de la temperatura en la cianobacteria *Synechocystis PCC 6803* (Sakamoto y Murata, 2002, Murata y Los, 2006). Esta quinasa parece activarse al descender la temperatura, siendo esta activación consecuencia de la dimerización de la proteína (Los y Murata, 2000). Es posible que el descenso de la fluidez de la membrana originado por el descenso de la temperatura pudiera conducir a la dimerización y autofosforilación de HIK33 (Los y Murata, 2004). Sin embargo, no se conoce con exactitud el mecanismo molecular por el cual HIK33 percibe los cambios en la fluidez de la membrana (Los y Murata, 2004). La activación de HIK33 desencadena la fosforilación de un regulador de respuesta denominado RER que posee capacidad de unión a DNA (Murata y Los, 2006). Todos estos procesos acaban produciendo un aumento de la transcripción del gen *desB* aunque no de *desA*, *desC* y *desD*. HIK33 también está implicada en la transducción de señal de estrés osmótico e influye en la expresión de otros genes además de *desB* (Mikami y col., 2002). En plantas no se han descrito proteínas homólogas a HIK33, ni se han obtenido secuencias similares del análisis de las bases de datos. Sabemos que la ruta CBF/DREB está implicada en la transducción de la señal desencadenada por el descenso de la temperatura (Xiong y col., 2002; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005),

aunque no se ha encontrado que alguna de estas proteínas afecte a la expresión de las desaturasas.

1.3.2.4. Otros factores reguladores de la actividad de las desaturasas

Además de la temperatura, otros factores ambientales tales como el *estrés hídrico* también parecen influir en la actividad de las desaturasas. Así, se ha comprobado que la adaptación a potencial hídrico bajo en células de patata produce un descenso en el grado de insaturación de los fosfolípidos de las membranas. Este descenso parece estar parcialmente asociado a una disminución de la expresión de los genes *FAD2* y *FAD3* aunque no puede descartarse regulación también a otros niveles (Leone y col., 1996).

El *ataque de patógenos y la respuesta a la herida* inducen la expresión de los genes de las desaturasas. En perejil (*Petroselinum crispum*), la transcripción del gen *FAD7* aumenta rápidamente inducida por la infección fúngica (Kirsch y col., 1997) y, en *Arabidopsis*, la expresión del gen *FAD7* se activa en diferentes tejidos en respuesta a la herida, siendo esta inducción mediada por el jasmonato (Nishiuchi y col., 1997).

1.4. LAS MEMBRANAS FOTOSINTÉTICAS

Varias etapas de la fotosíntesis tales como la absorción de luz, las reacciones fotoquímicas, el transporte de electrones y la síntesis de ATP, tienen lugar en las membranas tilacoidales de los cloroplastos de las células vegetales y de las cianobacterias. Consecuentemente, las características de estas membranas, así como su composición, influyen de manera fundamental en el desarrollo de la fotosíntesis.

Las membranas biológicas se componen principalmente de proteínas y lípidos. Entre las proteínas localizadas en las membranas tilacoidales

destacan los complejos proteicos implicados en el transporte electrónico fotosintético (fotosistema I, fotosistema II, citocromo *b₆f* y ATP sintasa) así como varias proteínas periféricas. En cuanto a la composición lipídica de las membranas fotosintéticas, como se comentó en el apartado 1.1 de esta Introducción, los galactolípidos MGDG y DGDG, el sulfolípidos SQDG y el fosfolípido PG componen las membranas tilacoidales en las plantas y en las cianobacterias.

A continuación, dado que uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral consiste en el estudio de la influencia del grado de saturación de los lípidos en el ensamblaje del fotosistema II, se expone una descripción detallada de dicho fotosistema.

1.4.1. Componentes proteicos de las membranas fotosintéticas: los fotosistemas y el transporte electrónico fotosintético

De toda la energía radiante del sol que llega a la superficie de la tierra, aproximadamente solo un 2 % es absorbida mediante la fotosíntesis gracias a los pigmentos fotosintéticos que, en el caso de las plantas, son las clorofilas (Chl *a* y Chl *b*) y los carotenoides. Los pigmentos fotosintéticos están asociados a proteínas constituyendo unidades funcionales denominadas *fotosistemas*. En cada fotosistema podemos encontrar un centro de reacción y un complejo antena. Mientras que las antenas absorben y transfieren la energía de excitación procedente de la luz (hay transferencia de energía pero no de electrones), en el RC se transfieren electrones dando lugar a la transformación de la energía luminosa en energía química (Clayton, 1965).

En las plantas superiores, así como en las algas verdes y cianobacterias, hay 2 tipos de fotosistemas: el fotosistema I (PS I), localizado casi exclusivamente en las membranas estromales cuyo RC tiene un par

Introducción

especial de Chl *a* que absorbe hacia 700 nm, y el fotosistema II (PS II), localizado mayoritariamente en las lamelas granales, cuyo RC tiene un par especial de Chl *a* que absorbe hacia 680 nm. El PS I y el PS II están conectados por una serie de transportadores de electrones. El flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico se conoce como *transporte electrónico fotosintético no cíclico* (figura 1-7) y es el responsable de la reducción del NADP⁺ y de la formación del gradiente de H⁺ a través de la membrana tilacoidal, necesario para la síntesis de ATP.

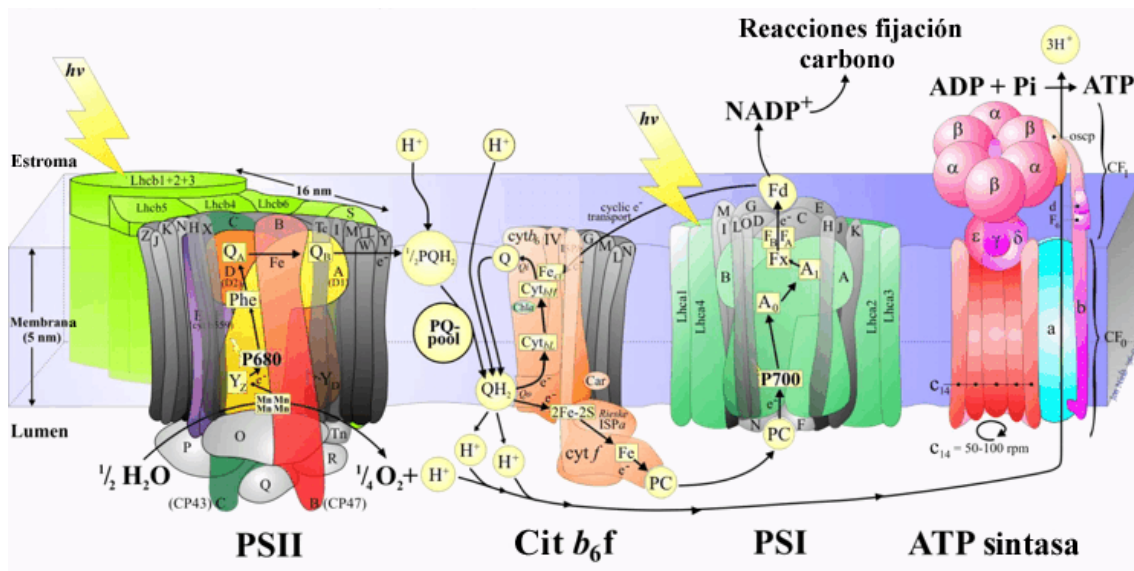


Figura 1-7: Transporte electrónico fotosintético.

1.4.2. El fotosistema II

El PS II es un complejo de proteínas de membrana presente en todos los organismos fotosintéticos oxigénicos. Dependiendo de su funcionalidad el complejo se puede dividir en distintas subunidades: la antena extrínseca LHCI, las antenas internas, el centro de reacción (RC) y las proteínas

extrínsecas asociadas al PS II que estabilizan el sistema de la fotólisis del agua. En la figura 1-8 vemos una representación esquemática del PS II.

1.4.2.1 La antena extrínseca LHCII

La LHCII une aproximadamente la mitad de la Chl presente en los cloroplastos, siendo el mayor colector de luz de la naturaleza, y tiene además un papel importante en el ensamblaje del PS II y en el apilamiento de las membranas tilacoidales, regulando también la distribución de la energía de excitación entre el PS I y el PS II (Bassi, 1990). La LHCII se encuentra asociada al PS II aunque, en ciertas condiciones de luz, puede asociarse al PS I transfiriéndole energía fotoquímica. La fosforilación de esta cromoproteína es fundamental en su mecanismo de acción. En su forma desfosforilada interacciona específicamente con el PS II (estado 2). Tras la fosforilación por una quinasa sensible a la ocupación del sitio “Qo” del citocromo *b₆f* (Verner y col., 1997), es capaz de migrar e interactuar con el PS I (estado 1) y transferirle, por tanto, la energía de excitación. Este fenómeno se conoce con el nombre de *transiciones de estado* y constituye probablemente el primer mecanismo de fotoaclimatación de las plantas. Mediante las transiciones de estado se evita el daño oxidativo inducido por exceso de absorción de energía luminosa en el PS II.

La LHCII está formada por una familia de proteínas de gran homología, con un peso molecular entre 25 y 27 kDa (Peter & Thornber, 1991) que difieren en sus potenciales de fosforilación. Su localización en el PS II es diferente: las de menor peso molecular (~25 kDa) se encuentran en la periferia del PS II, mientras que las de mayor peso molecular (~27 kDa) se encuentran fuertemente unidas a la unidad central del PS II (Larsson y col., 1987; Spangfort & Andersson, 1989; Nield y Barber, 2006).

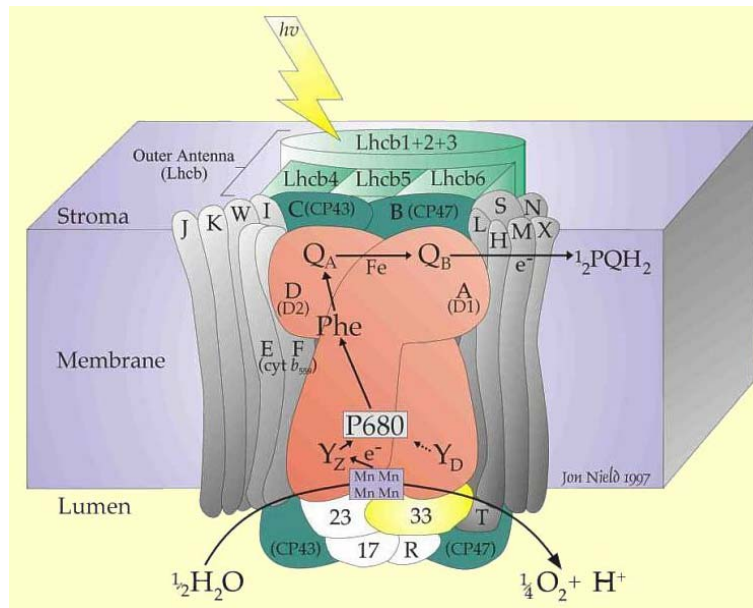


Figura 1-8: Estructura del fotosistema II

1.4.2.2 La unidad central del PSII: OECC

El complejo OECC (“Oxygen Evolving Core Complex”) corresponde a la mínima partícula aislada capaz de separar cargas, reducir quinonas y producir O_2 como subproducto de la reacción (Ghanotakis & Yocum, 1990; Green & Durnford, 1996). Esta partícula se divide en:

- antenas internas del PS II: CP43 y CP47
- centro de reacción fotosintético
- proteínas extrínsecas

1.4.2.2.1 Antenas internas del PS II: CP43 y CP47

La antena interna del PS II está formada por dos polipéptidos denominados CP43 y CP47 debido a sus masas moleculares aparentes obtenidas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Camm & Green, 1980). Ambos polipéptidos unen Chl *a* y β -caroteno de forma no covalente (Alfonso y col., 1994). La principal función de ambas proteínas es transferir la

energía de excitación procedente de la LHCII al RC, a través de una serie de reacciones ultrarrápidas (ps-fs). Así mismo, parece que ambas proteínas tienen también un importante papel estructural ya que son necesarias para la formación de un OECC estable.

1.4.2.2.2 El centro de reacción del PS II

El centro de reacción del fotosistema II está compuesto por las proteínas D1 y D2, las subunidades α y β del citocromo b_{559} y el producto del gen *psbI*. Unidos a estas proteínas también se encuentran diversos cofactores como quinonas, microelementos (Fe, Mn, Cl y Ca) y pigmentos como clorofila a, feofitina a y β -caroteno. Este complejo cataliza la transferencia de electrones desde el agua a la plastoquinona.

D1 y D2 son codificados por los genes cloroplásticos *psbA* y *psbD*, respectivamente, y tienen un peso molecular aparente de 32 y 34 kDa. Estos polipéptidos proporcionan el ambiente adecuado para que las reacciones del transporte electrónico tengan lugar. El citocromo b_{559} consta de dos subunidades, denominadas α y β , de 4,5 y 9 kDa respectivamente, codificadas por genes cloroplásticos (*psbE* y *psbF*). Este citocromo no parece participar en el transporte electrónico (Kramer y col., 1986) y al día de hoy no se conoce con exactitud su función.

D1 y D2 están compuestas por cinco hélices α localizadas en la bicapa lipídica, denominadas A, B, C, D y E, más una pequeña hélice α en el lumen del tilacoide entre las hélices α D y E (Michel & Deisenhofer, 1988). En la figura 1-9 se muestra un esquema bidimensional de la estructura de D1. Ambas proteínas poseen una gran homología funcional y estructural con las subunidades L y M del RC de bacterias púrpuras (Youvan y col., 1984; Trebst, 1987; Michel & Deisenhofer, 1988; Diner y col., 1991). D1 y D2 son los

soportes de los cofactores que intervienen en los procesos fotoquímicos del PS II, al igual que ocurre en L y M de bacterias púrpuras. La homología en los sitios de unión de las moléculas del par especial incluye residuos His, altamente conservados, que son ligandos del átomo central de Mg en las Chl. Algunos de sus residuos participan en la unión del Mn al RC necesaria para la producción de oxígeno.

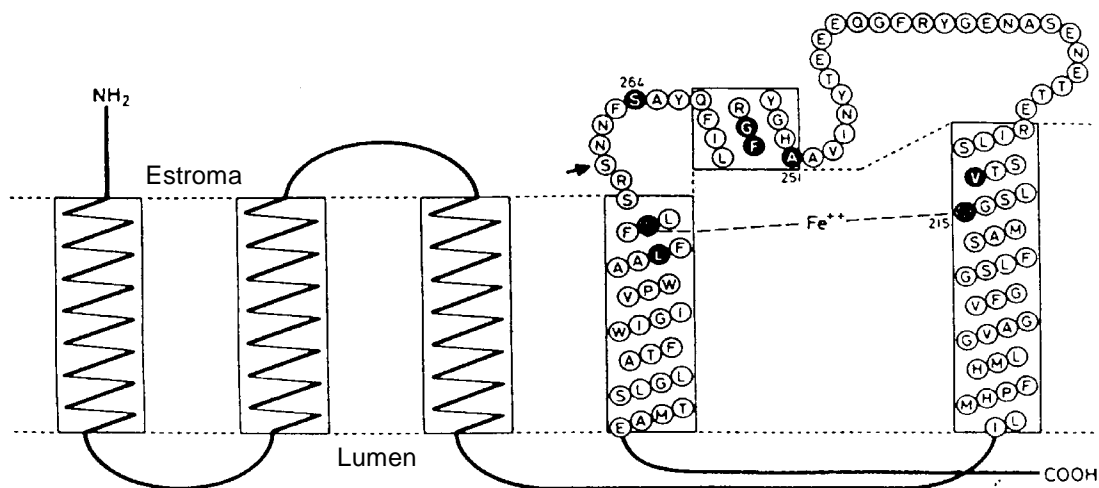


Figura 1-9: Modelo de plegamiento del polipéptido D1 en la membrana tilacoidal del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Las hélices transmembrana se representan dentro de un recuadro. Los aminoácidos comprendidos entre la 4ª y la 5ª hélice se señalan mediante el código de una sola letra. Los círculos negros indican aquellos aminoácidos que aparecen mutados en la mayoría de los mutantes resistentes a herbicidas aislados. La flecha indica la posición de la S268 mutada en el caso de STR7.

El sitio de unión de Q_B y su interacción con herbicidas

Una característica importante del RC, y más concretamente de su lado aceptor, es la accesibilidad del sitio de unión de Q_B a una gran variedad de sustancias químicas (Bowyer y col., 1991) comercializadas en su gran mayoría como herbicidas, ya que bloquean la transferencia de electrones en el RC compitiendo con Q_B por su sitio de unión, inhibiendo la fotosíntesis y

provocando la muerte de la planta (Hirschberg & McIntosh, 1983; Vermaas y col., 1989).

Q_B es un transportador móvil de electrones y protones y su movimiento de carga y descarga es esencial para el funcionamiento del RC. El diseño del sitio de unión de Q_B permite que dicha unión en su estado semireducido aumente su afinidad en comparación con su estado oxidado o doblemente reducido. En este último caso, la quinona pasa al “pool” de plastoquinona de la membrana y una nueva molécula de Q_B reemplaza a la anterior en el sitio de D1. Según la estructura de *Rhodospseudomonas viridis* los dos átomos de oxígeno del grupo carbonilo de la quinona forman enlaces de puente de hidrógeno con la proteína, uno a la HisL190 y otro con el oxígeno de la cadena lateral de la SerL223 (Deisenhofer & Michel, 1989). La HisL190 es uno de los ligandos del Fe no hemínico y está estrictamente conservada tanto en bacterias púrpuras como en el PS II. El GluL212 está en contacto próximo con la quinona y probablemente implicado en su protonación (Paddock y col., 1989). La PheL216 (análoga a la PheD₁255) forma parte importante de su sitio de unión. El sitio de unión en el PSII está localizado en la región equivalente de la proteína D1. En la figura 1-10 se muestra la interacción de la plastoquinona y de la atrazina en el sitio de unión de Q_B de la proteína D1. Se ha propuesto que la quinona puede unirse mediante un puente de hidrógeno a la Ser264 en D1 que es equivalente a la Ser223 de bacterias púrpuras (Hirschberg & McIntosh, 1983), e incluso establecer interacciones con otros residuos que pueden aportar grupos en enlaces de puente de hidrógeno, como es el caso de la Ser268 (Ruffle y col., 1992; Alfonso y col., 1996). En la figura 1-10 se muestra la posición de estos residuos en el sitio de unión de Q_B .

En 1983, Hirschberg & McIntosh establecieron una correlación directa entre la resistencia a atrazina en *Amaranthus hybridus* y la presencia de

Introducción

cambios en el gen *psbA*, concretamente un cambio S264A. Otros laboratorios trabajando con otros organismos fotosintéticos como cianobacterias (*Synechocystis*, *Synechococcus*) o algas verdes (*Chlamydomonas*), han encontrado mutaciones puntuales en el gen *psbA* en mutantes resistentes (Erickson y col., 1984; Golden y col., 1985; Sato y col., 1988; Kirilovsky y col., 1989). En todos los casos se encontraron cambios en un solo nucleótido que provocaban el cambio de un único aminoácido en la estructura primaria de D1. Estos cambios están perfectamente localizados en una región entre las hélices D y E de D1. En la figura 1-9 se muestra la orientación de D1 en la membrana. Los aminoácidos en los que con mayor frecuencia se han detectado mutaciones en el caso de mutantes resistentes se encuentran marcados en negrita. Como se puede ver, todas las mutaciones están localizadas en el sitio de unión de Q_B, constituyendo una prueba de la competición que se establece entre Q_B y los herbicidas fotosintéticos. En el caso de las plantas, la totalidad de los mutantes aislados en campo en distintas especies vegetales presentaban la mutación en el residuo S264. Sin embargo, la utilización de suspensiones celulares ha permitido el aislamiento de nuevos mutantes con mutaciones diferentes a la tradicional S264G. Es el caso de la mutación S264T en células de tabaco (Sato y col., 1988), la mutación S268P en células de soja (Alfonso y col., 1996) o la obtención de triples mutantes en células de *Chenopodium rubrum* (Schwenger-Erger y col., 1993). Esto se debe probablemente a que estos mutantes presentan un crecimiento y capacidad fotosintética menor, lo que hace que la probabilidad de seleccionarlos en condiciones naturales sea muy baja. Por último, cabe señalar que, muchos de estos mutantes asociados a la resistencia a herbicidas presentan alteraciones en el transporte electrónico fotosintético, en el crecimiento y en su comportamiento frente a determinados estreses abióticos

como luz o temperatura (Kirilovsky y col., 1991; Alfonso y col., 1996; Alfonso y col., 2001).

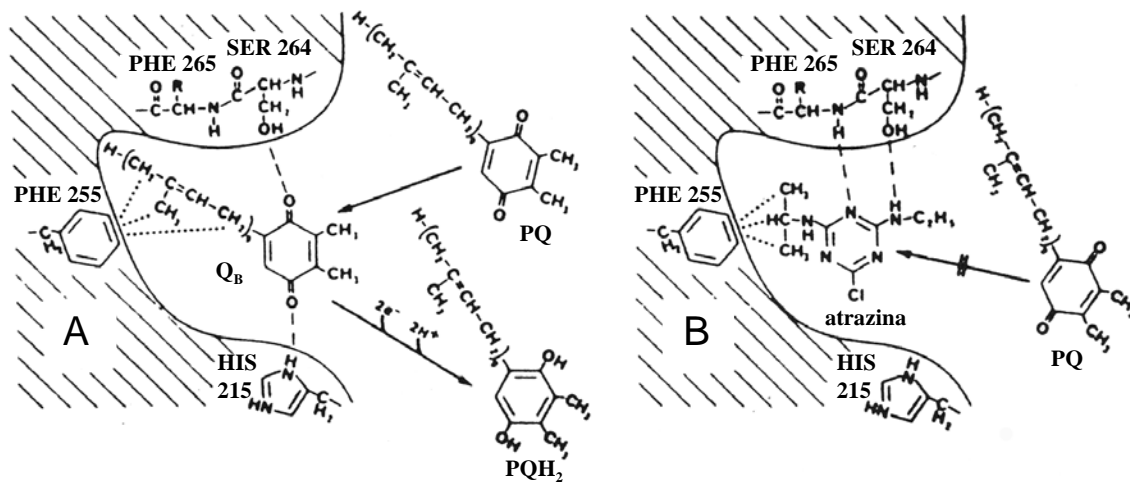


Figura 1-10: Esquema de la interacción de la plastoquinona (A) y del herbicida atrazina (B) en el sitio de unión de Q_B de la proteína D1. Los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas están representadas por líneas y puntos respectivamente. PQ, plastoquinona; Q_B , plastoquinona unida; PQH_2 , plastoquinol.

1.4.2.2.3 Proteínas extrínsecas

Existen tres proteínas extrínsecas asociadas al PS II de plantas superiores. Se encuentran en el lado interno de la membrana tilacoidal y sus pesos moleculares son de 33, 24 y 17 kDa. Estas tres proteínas se encuentran en una estequiometría 1:1:1 (Enami y col., 1991).

La proteína de 33 kDa protege al complejo de Mn y mantiene una configuración que favorece la eficiencia catalítica de la oxidación del agua (Miyao y Murata, 1984). Los otros dos polipéptidos, de 24 y 17 kDa, también están relacionados con la protección de la actividad del desprendimiento de O_2 , pero su modo de acción es más desconocido. En ausencia de estos polipéptidos, son necesarias altas concentraciones de Ca^{2+} y Cl^- para mantener

la actividad de desprendimiento de oxígeno. Concretamente, la proteína de 24 kDa parece mejorar la unión de Cl⁻ (Brudvig y col., 1989).

1.4.3. Papel de los lípidos tilacoidales en la fotosíntesis

Como ya se comentó en el apartado 1.1 de esta Introducción, los galactolípidos MGDG y DGDG, el sulfolípidos SQDG y el fosfolípido PG componen las membranas tilacoidales en las plantas y en las cianobacterias. Estos lípidos tienen una influencia directa en la fotosíntesis, proporcionando la fluidez adecuada de la membrana y manteniendo interacciones con proteínas que aseguran la adecuada conformación y orientación de éstas en el tilacoide. De esta forma se han detectado cuatro moléculas de lípidos en la estructura cristalina del PS I de cianobacterias, en concreto una de MGDG y tres de PG que forman puentes de hidrógeno con las proteínas PsaA y PsaB en la cara citosólica de las membranas tilacoidales (Jordan y col., 2001). Las estructuras cristalinas del PS II de cianobacterias y de plantas (Zouni y col., 2001; Rhee y col., 1997) no presentan en cambio moléculas lipídicas aunque sí que se han detectado en preparaciones de LHCII de cloroplastos de guisante pero no en su estructura cristalina (Kühlbrandt y col., 1994). Sin embargo, estas moléculas son cruciales para la estabilidad de los complejos LHCII *in vitro* (Nuberger y col., 1993; Reinsberg y col., 2001).

El aislamiento y estudio de mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la composición lipídica ha permitido profundizar en el papel de los lípidos en la fotosíntesis. De esta forma, la inhibición de la MGDG sintasa en el mutante *mgd1* produce una disminución del contenido de MGDG del 50 % y como consecuencia la ultraestructura del cloroplasto y el contenido en clorofila se ve alterado en las hojas del mutante (Jarvis y col., 2000). La estructura del cloroplasto así como el contenido en clorofila también se ven

afectados en el mutante *dgd1dgd2* que carece de actividad DGDG sintasa (Kelly y col., 2003) y en el mutante *pgp1* que carece de actividad PG-3-fosfato sintasa (Hagio y col., 2002). Al contrario de lo que ocurre con PG, MGDG y DGDG, el otro lípido constituyente de las membranas tilacoidales, el SQDG no parece esencial para la fotosíntesis aunque sí parece indispensable para el crecimiento en condiciones de deficiencia de fosfato (Yu y col., 2002).

1.4.4. Fotoinactivación y reparación del fotosistema II

A pesar de ser la fuerza motriz de la fotosíntesis y por consiguiente un requisito imprescindible para el crecimiento autótrofo de los organismos fotosintéticos, la luz puede producir daños en el aparato fotosintético. En los organismos que realizan la fotosíntesis oxigénica, la luz daña principalmente al fotosistema II produciendo inactivación del transporte electrónico y daños en las subunidades del centro de reacción, en particular sobre la proteína D1. Las plantas remedian estos daños a través de un costoso y complicado proceso de reparación que implica la degradación y la síntesis *de novo* de la proteína D1. *In vivo*, estos daños inducidos por la luz solo representan un problema para la planta cuando la velocidad con la que se produce el daño excede a la capacidad de reparación. Esta situación se conoce con el nombre de *fotoinhibición* y se traduce en una disminución de la actividad fotosintética y del crecimiento de la planta. La fotoinhibición se ve favorecida por la exposición prolongada a intensidades altas de luz y, además, aumenta cuando se combinan condiciones de intensidad de luz alta con otros estreses como temperaturas altas o bajas, deficiencia de agua o de CO₂. Es más, cuando la planta se encuentra sometida a alguno de estos estreses, la fotoinhibición puede suceder incluso a intensidades de luz moderadas (Andersson y Aro, 2001).

Con el fin de evitar o minimizar la fotoinhibición, las plantas han desarrollado varias estrategias. Estas estrategias se basan en cambios en la distribución de la antena del PS II entre los dos fotosistemas (transiciones de estado), en la disipación del exceso de energía captado en forma de calor y, principalmente, en la reparación del PS II reemplazando sus proteínas dañadas (mayoritariamente D1) (Aro y col., 1993).

1.4.4.1. Degradación y síntesis de la proteína D1

El recambio de la proteína D1 es un fenómeno complejo en el cual tienen lugar simultáneamente dos procesos: el proceso de fotoinactivación causado por el daño producido por la luz en D1 y el proceso de degradación y síntesis de D1.

El proceso de fotoinactivación es inducido por un funcionamiento inapropiado del transporte electrónico fotosintético en el lado aceptor o donador del PS II (Andersson y Aro, 2001). La fotoinactivación inducida en el lado aceptor se produce básicamente por una acumulación de Q_A reducida que conduce a la formación de clorofila triplete y a la producción de oxígeno singlete dando como resultado daño oxidativo en D1. La fotoinactivación inducida en el lado donador tiene lugar cuando la velocidad con la que el PS II dona electrones es mayor que la velocidad con la que los acepta. En estas condiciones aumenta el tiempo de vida de $P680^+$, lo que acaba dañando a D1.

El proceso de degradación y síntesis de D1 comprende varias etapas que se esquematizan en la figura 1-11 (Andersson y Aro, 2001):

a) Migración del PS II dañado de los grana a los tilacoides expuestos al estroma

Los PS II funcionales se localizan principalmente en los grana donde tiene lugar el proceso de fotoinactivación. Sin embargo, la inserción de la proteína

D1 sintetizada *de novo* tiene lugar en los tilacoides expuestos al estroma. El mecanismo por el cual el PS II dañado migra desde el grana no se comprende en su totalidad.

b) Eliminación de la D1 dañada del PS II mediante proteólisis

La degradación proteolítica de una proteína transmembrana como D1 que se encuentra formando parte de un gran complejo multiproteico es un proceso complicado. Las proteasas implicadas en el proceso deben distinguir las proteínas D1 dañadas de las funcionales. Parece ser que un cambio conformacional de D1 se encuentra implicado en el mecanismo que dispara la degradación (Janssen y col., 1993; Virgin y col., 1992; Nakajima y col., 1995; Zer y Ohad, 1995). Los fragmentos de D1 detectados varían según la fotoinhibición se haya inducido en el lado aceptor o en el lado donador del PS II. Cuando la fotoinhibición se produce en el lado aceptor se detectan fragmentos de 23 kDa y 10 kDa debidos a una degradación proteolítica del bucle DE (figura 1-9) (Greenberg y col., 1987; Canovas y Barber, 1993). Sin embargo, también se han detectados fragmentos de 16 kDa que sugieren degradación proteolítica en el bucle CD expuesto al lumen (Andersson y Barber, 1996). Cuando la fotoinhibición se produce en el lado donador, se detectan un fragmento N-terminal de 9 kDa y otro C-terminal de 24 kDa lo que sugiere que en este caso, la degradación se produce en el bucle AB expuesto al lumen (Barbato y col., 1991; De las Rivas y col., 1992; Andersson y Barber, 1996). Todavía queda por determinar si estas diferencias en el patrón de fragmentación se deben a diferencias a nivel de sustrato o a la acción enzimática de distintas proteasas.

En los últimos años se han conseguido identificar algunas de las proteasas implicadas en el proceso. Distintas evidencias indican que la proteasa degP2 dependiente de GTP y localizada en la cara externa de los tilacoides expuestos

al estroma, realiza la primera degradación proteolítica generando el fragmento N-terminal de 23 kDa (Haussühl y col., 2001). La degradación de este fragmento de 23 kDa parece correr a cargo de la proteasa FstH dependiente de ATP. FstH es una proteína integral de membrana cuyo extremo C-terminal expuesto al estroma contiene los dominios catalíticos y de unión al ATP (Lindahl y col., 2000). Así pues, la proteína D1 es degradada mediante un proceso que comprende varias etapas lo cual no es extraño considerando su complejo plegamiento. Probablemente, además de DegP2 y FstH, haya más proteasas implicadas en la degradación de D1 teniendo en cuenta la necesidad de rupturas en los bucles expuestos a la cara interna del tilacoide.

De manera prácticamente simultánea a la activación de las proteasas, diversas evidencias indican que se produce una monomerización del PS II y un desensamblaje parcial que incluye la liberación del OEC (“Oxygen Evolving Complex”), de CP43 y de CP47, aunque la disociación de esta proteína no está muy clara (Zhang y col., 2000). Este desensamblaje podría ser necesario para facilitar la inserción de la proteína D1 sintetizada *de novo*.

c) Síntesis del precursor de D1 e inserción en el PS II

La proteína D1 se encuentra codificada por el gen *psbA* que presenta una única copia en el genoma cloroplástico en las plantas. En estos organismos, la regulación de la expresión de este gen parece producirse fundamentalmente a nivel de la iniciación de la traducción. La iniciación de la traducción se activa gracias a la unión a la región 5'UTR del mensajero de un complejo proteico codificado en el genoma nuclear que facilita la asociación de los ribosomas al mRNA (Somanchi y Mayfield, 2001). Estos ribosomas unidos al mRNA de *psbA* son eficientemente dirigidos a la membrana tilacoidal en luz posiblemente mediante la unión a cpSRP54, un homólogo cloroplástico de la SRP (signal recognition particle) que dirige a los complejos formados por la cadena

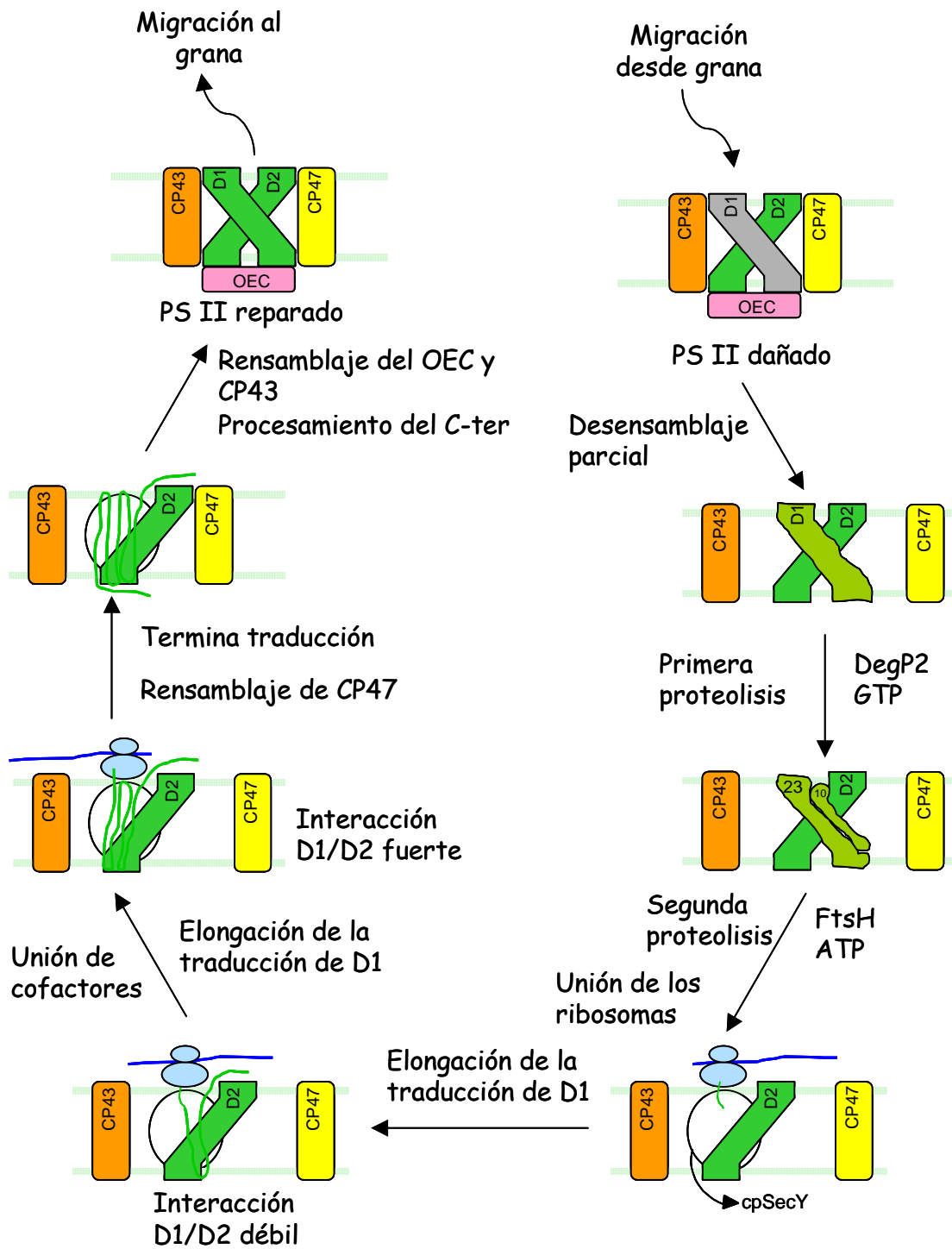


Figura 1-10: Ciclo de reparación del PSII a través de la síntesis y ensamblaje de la proteína D1 dañada. Adaptada de Andersson y Aro, 2001.

peptídica, el mensajero y el ribosoma al retículo endoplásmico (Nilsson y col., 1999). La proteína D1 es incorporada y ensamblada en el PS II de forma cotraduccional (Zhang y col., 1999; Zhang y col., 2000) produciéndose unas pausas en la traducción que se creen necesarias para la inserción de las hélices transmembrana en los tilacoides y para la unión de los cofactores. Durante su síntesis e inserción, la cadena polipeptídica D1 interacciona con cpSecY, un canal de translocación cloroplástico que guía la inserción de D1 en la membrana. Además, durante la elongación D1 interacciona con otras subunidades del PS II. Así, un intermediario de D1 de 17 kDa compuesto por dos hélices α transmembrana, interacciona débilmente con D2. Cuando ya han sido traducidas cuatro hélices transmembrana la interacción con D2 es más fuerte probablemente debido a la formación de un puente disulfuro transitorio entre las dos proteínas (Zhang y col., 2000). La terminación de la elongación genera un precursor de D1 que posee las cinco hélices transmembrana de la proteína y un extremo C-terminal en el lumen del tilacoide que debe ser procesado.

d) Maduración del precursor de D1 mediante procesamiento del extremo C-terminal y ensamblaje del PS II

Una proteasa localizada en el lumen es la responsable del procesamiento del extremo C-terminal del precursor de D1 tan pronto como termina la elongación (Anbudurai y col., 1994). El procesamiento del extremo C-terminal se encuentra coordinado con la asociación de CP43 al PS II reparado siendo ambos sucesos necesarios para que vuelva a ensamblarse el OEC al nuevo PS II (Zhang y col., 2000; Diner y col., 1988; Bowyer y col., 1992). Una vez correctamente ensamblados en los tilacoides expuestos al estroma, los

monómeros de PS II migran a los grana donde se encuentran en su forma dimérica.

1.4.4.2. Papel de los lípidos tilacoidales en el ciclo de daño y reparación del fotosistema II

La composición de ácidos grasos de las membranas tilacoidales influye en el proceso de fotoinhibición. En concreto, en cianobacterias se ha relacionado el grado de insaturación de los ácidos grasos tilacoidales con la capacidad de recambio de D1 y con la capacidad de recuperación de la fotoinhibición a bajas temperaturas (Gombos y col., 1992; Gombos y col., 1994; Kanervo y col., 1995). En estos estudios, dobles mutantes de *Synechocystis* que carecen de ácidos grasos poliinsaturados, se muestran más susceptibles a la fotoinhibición que la cepa silvestre. Apoyando estos resultados, la expresión del gen *desA*, que codifica la desaturasa $\Delta 12$ en cianobacterias, en una especie que normalmente no sintetiza ácidos grasos poliinsaturados (*Synechococcus* sp. PCC7942), aumenta la tolerancia a las bajas temperaturas del PS II de este organismo. Los datos derivados de estos mutantes de cianobacterias sugieren que la ineficiente recuperación de la fotoinhibición podría deberse a un fallo en el procesamiento del extremo C-terminal del precursor de D1 a bajas temperaturas (Kanervo y col., 1997).

En plantas también se ha relacionado la extensión de la fotoinhibición a bajas temperaturas con el grado de insaturación de los ácidos grasos. El aumento del porcentaje de PG conteniendo únicamente los ácidos grasos 16:0, 18:0 y 16:1t (PG saturado), posiblemente hasta un determinado valor umbral, no afecta al proceso de inactivación que conduce a la fotoinhibición pero parece retardar la recuperación de la fotoinhibición a bajas temperaturas (Moon y col., 1995; Somerville, 1995; Vijayan y Browse, 2002). El estudio de la

fotoinhibición en el triple mutante *fad3-2 fad7-2 fad8* de *Arabidopsis*, que carece de ácidos grasos trienoicos, muestra que dichos ácidos grasos no influyen en el proceso de fotoinactivación del PS II pero sí en la reparación del PS II a bajas temperaturas aunque se desconoce qué etapa o etapas del proceso se ven más afectadas (Vijayan y Browse, 2002). El mutante de D1 resistente a herbicidas STR7 aislado a partir de suspensiones celulares fotosintéticas de soja en nuestro laboratorio (Alfonso y col., 1996) presenta mayor sensibilidad a la fotoinhibición y menor grado de insaturación de los ácidos grasos que la línea silvestre (Alfonso y col., 2001). La reparación y ensamblaje del PS II en este mutante ha sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, y revela una capacidad reducida tanto de D1 como de D2, OEE33 y LHCII de ensamblarse y producir dímeros de PS II funcionales (Alfonso y col., 2004). Estas dificultades en el ensamblaje no estarían relacionadas con alteraciones en el proceso de maduración de D1, como parece ser el caso de las cianobacterias.

1.5. LA ACTIVIDAD FOTOSINTÉTICA COMO ELEMENTO REGULADOR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La luz, además de ser la fuerza motriz de la fotosíntesis y un posible factor de estrés, es también un importante elemento regulador de la expresión génica en plantas. Básicamente, podemos decir que la luz actúa sobre la expresión génica a través de varios mecanismos diferentes. Por un lado, existen mecanismos de regulación dependientes de la existencia de una molécula que percibe cambios en la calidad y la cantidad de la luz incidente. Esta molécula se denomina *fotorreceptor*. El ejemplo más conocido y estudiado es el fitocromo, fotorreceptor que se activa por luz roja y se inhibe mediante luz roja lejana (Quail, 2002a; Quail, 2002b), aunque también existen

fotorreceptores que se activan por luz azul (criptocromos) e incluso por luz ultravioleta (Gyula y col., 2003; Lin, 2002). Además de los fotorreceptores, existe otro mecanismo de regulación dependiente de la absorción de la energía luminosa por el aparato fotosintético. En este caso, el propio transporte electrónico fotosintético está implicado directamente en esta regulación, proporcionando la señal o señales reguladoras, a través de los denominados mecanismos de *control redox*.

1.5.1 Definición de control redox

El control redox de un proceso biológico puede definirse como la dependencia de una respuesta molecular del estado redox de una o varias de las moléculas implicadas (Pfannschmidt y col., 2001). Muchos procesos metabólicos celulares implican reacciones redox, por lo que un gran número de respuestas biológicas se encuentran bajo este tipo de control. Un ejemplo muy conocido es la regulación de las enzimas del ciclo de Calvin por la tiorredoxina (Scheibe, 1991). En los últimos años, diversas evidencias indican que el control redox se extiende también a niveles de expresión génica. Los modos de acción de las moléculas implicadas en el control redox son diversos e incluyen oxidación-reducción de grupos tiol, centros hierro-azufre, grupos hemo y flavinas (Bauer y col., 1999).

1.5.2 Señales redox fotosintéticas y niveles de la expresión génica afectados. Regulación redox de genes fotosintéticos

Hasta la fecha se han descrito tres tipos de señales redox reguladoras de la expresión génica derivadas del transporte electrónico fotosintético (Fey y col., 2005): la generada por algún componente de la cadena transportadora de electrones como el “pool” de PQ o el citocromo *b₆f*, la producida por

componentes acoplados a la fotosíntesis con propiedades redox como la tiorredoxina o el glutatión y la desencadenada por las especies reactivas de oxígeno derivadas del propio proceso fotosintético (figura 1-12). Diversas etapas del proceso de expresión génica se han visto reguladas por estas señales redox fotosintéticas (Pfannschmidt, 2003). El proceso de expresión de un gen comprende varias etapas. En primer lugar se produce la transcripción de un precursor de mRNA que es transformado en mRNA maduro mediante un procesamiento que incluye el “splicing” y el “editing”. La estabilidad de este mRNA maduro también puede ser regulada por señales redox fotosintéticas. Por último, para obtener un polipéptido funcional, los ribosomas deben unirse al mRNA y la traducción debe iniciarse, elongarse y terminarse adecuadamente.

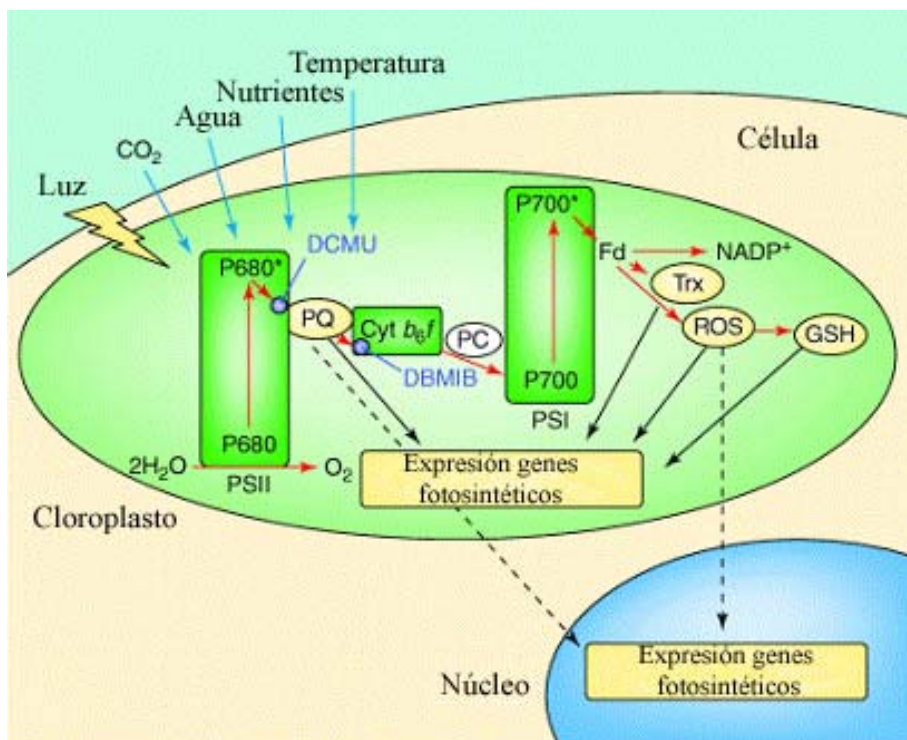


Figura 1-12: Regulación redox fotosintética de genes cloroplásticos y nucleares. Adaptada de Pfannschmidt, 2003.

En la figura 1-13 se muestran algunos casos de genes regulados por señales redox fotosintéticas, los niveles de expresión de estos genes que se han encontrado regulados, así como la molécula origen de la señal redox en los casos en los que ha podido ser identificada. Como puede observarse en la figura 1-13, la mayoría de los genes cuya regulación redox ha sido caracterizada son genes que codifican proteínas implicadas o directamente relacionadas con la fotosíntesis y que se localizan en el cloroplasto. Los cambios en diversos factores ambientales como la temperatura o la disponibilidad de CO₂ alteran el estado redox de los componentes de la cadena de transporte electrónico fotosintético (figura. 1-12). Sobre todo cambios en la cantidad y la calidad de la luz producen desequilibrios en la energía de excitación de los dos fotosistemas disminuyendo así la eficiencia de la fotosíntesis. Para corregir estos desequilibrios las plantas redistribuyen la energía luminosa mediante dos estrategias: las transiciones de estado, ya citadas anteriormente, y el ajuste de la estequiometría de los fotosistemas. Las transiciones de estado se producen en tiempos cortos, del orden de minutos, y consisten en la migración de parte de la LHClI desde el PSII al PSI. El ajuste de la estequiometría de los fotosistemas ocurre en tiempos más largos, del orden de horas o días, y conlleva la síntesis de nuevos componentes afectando así a la expresión génica. Ambos procesos se encuentran regulados por señales redox fotosintéticas originadas por el estado redox del “pool” de plastoquinona o del citocromo *b₆f* (Vener y col., 1997; Alfonso y col., 2000; Pfannschmidt, 2003). Este ajuste de la estequiometría conlleva expresión tanto de genes cloroplásticos como de genes nucleares ya que muchas de las proteínas fotosintéticas están codificadas en el genoma nuclear (figura 1-12). Sin embargo, se conoce muy poco de la ruta de transducción de señal en el interior del cloroplasto y desde el cloroplasto hasta el núcleo.

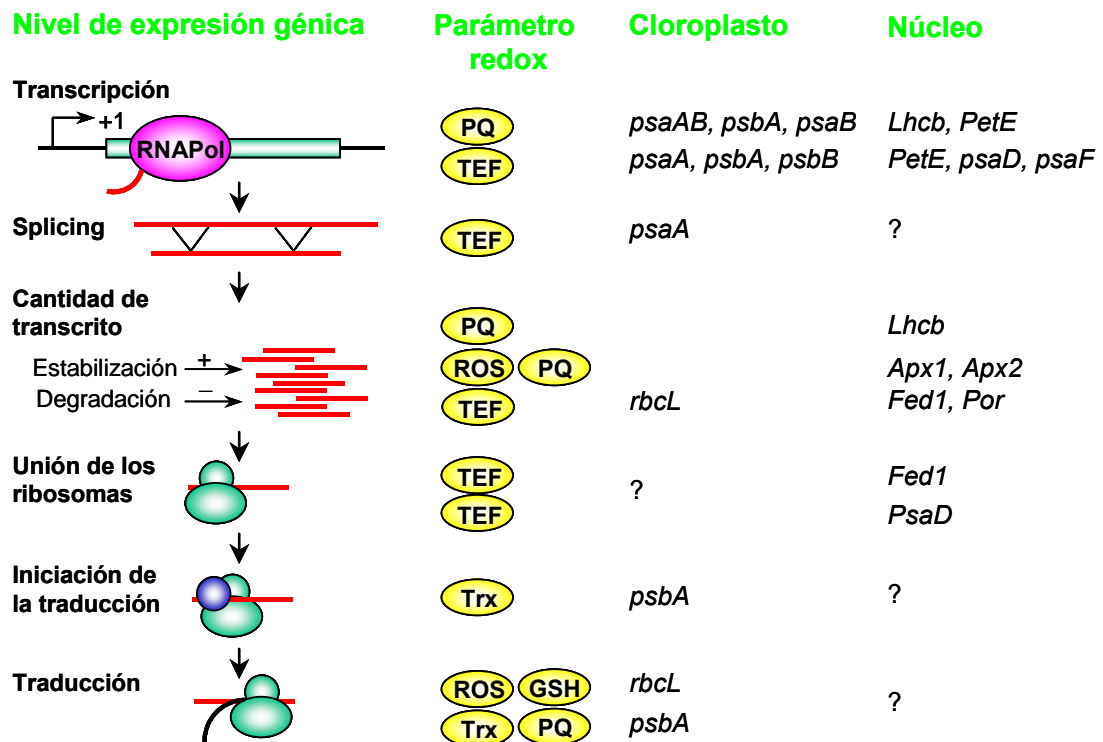


Figura 1-13: Regulación redox de distintas etapas de expresión génica en plantas y algas. Adaptada de Pfannschmidt, 2003.

1.5.3. Transducción de la señal redox en el interior del cloroplasto

El conocimiento de las moléculas implicadas en la transducción de la señal redox es limitado, si bien algunos estudios han conseguido identificar algunas de ellas dando una primera idea del modo de acción de dicho mecanismo. La iniciación de la traducción del gen *psbA* en *Chlamydomonas* ha sido analizada *in vitro* mostrando que un complejo multienzimático se une a la región 5' UTR del mRNA y activa su traducción. Estudios *in vitro* e *in organello* muestran que la unión del complejo aumenta en condiciones reductoras como las que se producen en presencia de luz (Trebitch y col., 2000). El complejo está formado por cuatro subunidades (Pfannschmidt, 2003): la proteína PABP que media la unión y presenta homología con las proteínas de unión a poliA, la proteína PDI que presenta homología con las

disulfuro isomerasas y regula la unión de PABP y dos proteínas desconocidas. En la luz, los electrones de la cadena de transporte electrónico fotosintético son transferidos vía ferredoxina y tiorredoxina a un grupo ditiol vecino a PDI. Esto requiere una oxidación previa del grupo ditiol por un factor desconocido. Este factor es activado en luz por una señal que parte de la plastoquinona reducida. Cuando el grupo ditiol se encuentra reducido aumenta la capacidad de unión de PABP lo que conduce a un aumento de la traducción de *psbA*. En oscuridad PDI es inactivada mediante una fosforilación realizada por una quinasa dependiente de ADP que se activa cuando aumenta la relación ADP/ATP en oscuridad y se inactiva cuando baja la relación ADP/ATP en luz (Danon y Mayfield, 1994). Estudios en *Arabidopsis* indican que un complejo parecido se une al mRNA de *psbA* dependiendo de las condiciones redox sugiriendo que este tipo de regulación también existe en plantas (Shen y col., 2001).

Algunas de las proteínas implicadas en la regulación redox de la maduración del mRNA y de la transcripción también han sido identificadas. De esta forma se ha encontrado que la proteína p54 se activa mediante fosforilación y por la forma oxidada del glutatión y se inactiva mediante desfosforilación y por la forma reducida del glutatión (Liere y Link, 1997). p54 es una endorribonucleasa específica de secuencia implicada en la formación de los precursores de los mRNA de los genes de plantas *trnK* y *rps16 in vitro* (Nickelsen y Link, 1993). En cuanto a la regulación redox de la transcripción, estudios en mostaza muestran que una quinasa denominada “plastid transcription kinase” se encuentra asociada con la RNA polimerasa cloroplástica (Baginsky y col., 1997). Esta quinasa es capaz de fosforilar factores σ *in vitro* y su actividad se ha visto regulada también *in vitro* mediante fosforilación y estado redox del glutatión (Baginsky y col., 1999). Se piensa que

estos factores σ intervienen en la regulación de la transcripción en el cloroplasto (Allison, 2000). Intensidades altas de luz inducen variaciones en el estado redox del glutatión del cloroplasto produciendo cambios en la transcripción cloroplástica y sugiriendo que este control redox mediado por glutatión también interviene *in vivo* (Baena-González y col., 2002).

Por último, estudios en cianobacterias apuntan a que la transducción de la señal redox originada por la plastoquinona podría realizarse a través de un sistema de dos componentes formado por una quinasa de membrana que sentiría el estado redox de la plastoquinona y transmitiría la señal a un regulador de respuesta que afecta a la expresión génica (Allen, 1993). En esta línea, varias evidencias sugieren la implicación de un sistema de dos componentes en la regulación de la estequiometría entre los dos fotosistemas en la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (Li y Sherman, 2000). Sin embargo, también hay evidencias que apuntan a que la transducción de la señal redox en cianobacterias podría implicar a activadores transcripcionales tipo CRP, como la proteína NtcA, cuya afinidad por su diana depende de grupos tiol (Alfonso y col., 2000; Alfonso y col., 2001). En plantas en cambio no se ha encontrado implicación de este tipo de activadores transcripcionales. Sí se han identificado en plantas, sin embargo, histidina quinasas citoplasmáticas implicadas en la señalización por etileno y citoquinas, así como un gran número de genes nucleares con homología a los de los reguladores de respuesta (Chang y Steward, 1998; Sakakibara y col., 2000; Urao y col., 2000), aunque en ninguno se ha predicho péptido señal cloroplástico (Pfannschmidt y col., 2001).

1.5.5. Transducción de la señal redox desde el cloroplasto al núcleo

El genoma plastidial codifica menos de cien marcos abiertos de lectura, mientras que el resto de los más de 3000 polipéptidos localizados en el cloroplasto se encuentran codificados en el genoma nuclear y se importan al orgánulo tras su traducción. De esta forma muchos de los complejos proteicos que participan en la fotosíntesis y en otros procesos metabólicos en los cloroplastos se componen de subunidades codificadas en ambos genomas. Para el correcto ensamblaje y funcionamiento de estos complejos se necesita una estrecha comunicación entre el cloroplasto y el núcleo. Esta comunicación incluye rutas de señalización del núcleo al cloroplasto, las llamadas señales anterógradas, y del cloroplasto al núcleo, las denominadas señales retrógradas (Nott y col., 2006).

Los estudios realizados en los últimos años apuntan a la existencia de varias rutas de señalización retrógradas, una de las cuales sería la derivada de señales redox fotosintéticas. Estudios recientes con microarrays de DNA confirman la importancia del estado redox, no solo de la plastoquinona sino también de otros componentes de la cadena de transporte electrónico fotosintético, en la regulación de la expresión génica nuclear (Fey y col., 2005). El mecanismo de transducción de esta señal redox se desconoce, aunque se ha propuesto la participación de una proteína fosforilable en *Dunaliella* (Escoubas y col., 1995) y de un translocador fosfoenolpiruvato/fosfato plastidial en *Arabidopsis* (Streatfield y col., 1999). Las especies reactivas de oxígeno, sobre todo H_2O_2 y 1O_2 también se han visto implicadas en la regulación de la expresión génica nuclear. En particular el H_2O_2 afecta a la expresión de APX2, una forma citosólica de la ascorbato peroxidasa, en condiciones de intensidad de luz alta (Fryer y col., 2003, Yabuta y col., 2004). La transducción de la señal redox mediada por especies reactivas de oxígeno

al núcleo parece involucrar cascadas de quinasas MAPK aunque el mecanismo de transducción en detalle queda todavía por determinar (Kovtun y col., 2000).

Otra ruta de señalización retrógrada muy importante es la dependiente de precursores de la síntesis de clorofila. El aislamiento de los denominados mutantes *gun* (genome uncoupled) de *Arabidopsis thaliana* confirmó la implicación de los precursores de la biosíntesis de carotenoides en las rutas de señalización retrógrada (Nott y col., 2006). A diferencia de la línea silvestre, estos mutantes presentan altos niveles de expresión de *Lhcb* aún en presencia de norflurazón, un inhibidor de la síntesis de tetrapirroles (Susek y col., 1993). La caracterización molecular de estos mutantes indica que todos presentan deficiencias en enzimas que participan en la ruta de síntesis de tetrapirroles y que impiden la acumulación del intermediario de síntesis Mg-protoporfirina IX (Strand, 2004). El acúmulo de este compuesto parece desempeñar un papel fundamental en la represión de la expresión de los genes fotosintéticos nucleares en plantas aunque no se conoce prácticamente nada sobre el modo de acción del mecanismo de transducción de la señal.

La inhibición de la traducción de proteínas en el cloroplasto mediante el tratamiento con cloramfenicol o lincomicina produce represión de la expresión de genes fotosintéticos nucleares. Teniendo en cuenta esta observación se ha propuesto la existencia de una ruta de señalización retrógrada que requiere expresión de genes cloroplásticos. Esta respuesta a la expresión génica plastidial tiene lugar en estadios tempranos del desarrollo de las plántulas y es independiente de la luz (Sullivan y Gray, 1999). La señal implicada en esta ruta de señalización es totalmente desconocida y diversas evidencias indican que, esta ruta dependiente de la expresión génica plastidial, converge con la ruta derivada de Mg-protoporfirina IX (Nott y col., 2006).

1.6. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

En esta Tesis Doctoral se han abordado principalmente dos objetivos científicos: por un lado, el estudio de los mecanismos de regulación de las desaturasas de ácidos grasos en suspensiones celulares de soja, centrándonos en el efecto de la luz y en la influencia de los procesos redox fotosintéticos y, por otro, el estudio del efecto del grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas tilacoidales en la reparación y el ensamblaje del fotosistema II y su implicación en la respuesta frente al estrés luminoso.

Al comienzo de esta Tesis Doctoral, el conocimiento acerca de los mecanismos de regulación de las desaturasas de plantas estaba prácticamente limitado al estudio de la respuesta frente a la temperatura. La decisión de estudiar el posible papel de la luz en la regulación de las desaturasas estuvo motivada por la existencia de una serie de evidencias descritas en la literatura. Así, en la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 la expresión de los genes *desA*, *desB* y *desD*, que codifican las desaturasas $\Delta 12$, $\omega 3$ y $\Delta 6$ respectivamente, se encuentra regulada por la luz a través de un mecanismo sensible al transporte electrónico fotosintético. Sin embargo, la expresión de *desC*, que codifica la desaturasa $\Delta 9$, permanece inalterada (Kis y col., 1998). En plantas, el mRNA de *FAD7* aumenta durante el proceso de “greening” en hojas de trigo etioladas (Horiguchi y col., 1996). Otra evidencia que sugiere que la luz podría actuar como elemento regulador deriva del análisis del promotor del gen *FAD7* de *Arabidopsis*, donde se detectó la presencia de secuencias cis homólogas a las encontradas en algunos genes regulados por luz (Nishiuchi y col., 1995).

Dos parecen ser los únicos factores descritos hasta la fecha capaces de inducir cambios en la sensibilidad frente al estrés luminoso: alteraciones en el grado de insaturación de los ácidos grasos de la membrana y mutaciones en la

Introducción

subunidad D1 del centro de reacción del PS II. En el segundo objetivo de esta Tesis Doctoral pretendimos estudiar el papel de ambos factores en el ensamblaje del PS II y su influencia en algunos procesos biológicos que tienen lugar a nivel del PS II como son la fotoinhibición y la recuperación del estrés luminoso. Para ello utilizamos como herramienta el mutante STR7. La caracterización fisiológica de dicho mutante, aislado anteriormente en nuestro laboratorio a partir de suspensiones celulares fotosintéticas de soja, reveló la existencia de una sustitución S268P en la proteína D1 del centro de reacción del PS II (Alfonso y col., 1996). Esta mutación además de causar resistencia al herbicida atrazina, induce alteraciones en el transporte electrónico fotosintético. Además, STR7 muestra mayor sensibilidad al estrés luminoso y un aumento de los ácidos grasos saturados en los lípidos de las membranas tilacoidales (Alfonso y col., 2001), convirtiéndolo en un buen material biológico para el desarrollo del segundo objetivo de esta Tesis Doctoral.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1 Cultivo de suspensiones celulares de soja (*Glycine max*)

La línea celular fotoautótrofa silvestre de *Glycine max* (L.) Merr. var Corsoy fue establecida por Horn y col. en 1983 y posteriormente estudiada desde el punto de vista fisiológico por Rogers y col. en 1984. Esta línea celular silvestre fue gentilmente donada por el profesor Jack M. Widholm, del Departamento de Agronomía de la Universidad de Illinois (Urbana, USA). Posteriormente, a partir de la línea celular original (WT), se aislaron en nuestro laboratorio 36 líneas resistentes a la acción del herbicida fotosintético atrazina de las que 8 se caracterizaron a nivel fisiológico y bioquímico (Alfonso y col., 1996). Una de ellas, STR7, fue caracterizada también a nivel molecular (Alfonso y col., 1996). Para este estudio se ha trabajado con la línea celular silvestre WT y con la línea celular mutante STR7.

Se han utilizado dos sistemas diferentes para el cultivo de estas suspensiones celulares: cultivo en medio líquido y cultivo en medio sólido (figura 2-1).

2.1.1.1. Cultivo en medio líquido

El cultivo en medio líquido es un sistema rápido y eficaz para el crecimiento de células vegetales. El medio líquido utilizado para el

crecimiento de estas suspensiones celulares es el descrito por Rogers y col. en 1987. Este medio es una modificación del medio Murashige y Skoog (1962) en el que se han variado algunos microelementos y determinadas hormonas para permitir el crecimiento celular indiferenciado. La composición de este medio es la siguiente:

- 10 % Solución de macronutrientes
- 1 % Solución de micronutrientes
- 1 % Solución de hierro
- 0.1 % Tiamina 0.1 g/l
- 0.1 % Kinetina 0.20 g/l en HCl 0,5N
- 0. 1% Ácido Naftalen-acético 1 g/l en etanol

Se puede añadir opcionalmente un 1 % de sacarosa (medio KN¹) para facilitar el crecimiento celular. Este sistema de cultivo fotomixotrofo se utilizó para el mantenimiento de las líneas celulares, mientras que para la mayoría los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se utilizó el medio de cultivo sin sacarosa (KN⁰) lo que proporcionó condiciones de cultivo fotoautótrofas. El pH del medio se ajustó a 5,8 con KOH diluido y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Los cultivos se crecieron en un incubador con agitación orbital (New Brunswick Scientific Co., Modelo G-25), en matraces de 125 ml con 50 ml de medio fresco bajo las siguientes condiciones de cultivo:

- Intensidad de luz: 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
- Temperatura: 22 °C \pm 2 °C
- Agitación: 130 r.p.m.

En estas condiciones, las suspensiones celulares mantienen un color verde intenso, característico del buen estado de los cultivos (figura 2-1A).

Tras 21 días de cultivo, las células fueron diluidas a 1/3 del volumen total con medio fresco.

La línea celular STR7 fue crecida utilizando el mismo medio de cultivo pero en presencia de s-triazina. Este procedimiento garantiza que los cultivos mantengan la resistencia a herbicidas fotosintéticos impidiendo la proliferación de revertientes. La s-triazina se añade al medio de cultivo ya estéril, disuelta en 1 ml de metanol hasta una concentración final de 200 μ M. Este compuesto no resiste las altas temperaturas, por ello, no puede ser autoclavado junto con el medio y se añade al mismo a través de un filtro estéril Millex®-GS (Millipore) de 0,22 μ m.

Solución de macronutrientes: $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 16,5 g/l, KNO_3 19,0 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,4 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g/l, KH_2PO_4 1,7 g/l

Solución de micronutrientes: $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,230 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,860 g/l, H_3BO_3 0,620 g/l, KI 0,083 g/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g/l, $^*\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 ml/l, $^*\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 ml/l

Solución nutritiva de hierro: $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,72 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,78 g/l

Soluciones de Cu y Co: $^\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,500 g/l, $^*\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3,000 g/l

2.1.1.2. Cultivo en medio sólido

Debido a la ausencia de un método eficaz de congelación que permita el mantenimiento de las colecciones celulares, se utilizó el sistema de cultivo en placa de Petri como método de mantenimiento de nuestra colección (figura 2-1B).

El medio de cultivo es el mismo descrito en el apartado anterior (medio KN¹) excepto por la presencia de un 1,5 % de agar, que actúa como agente gelificante. Las placas con medio sólido se sembraron con las suspensiones celulares obtenidas en los medios líquidos mediante disposición gota a gota por la superficie de la placa. Las placas se cerraron con parafilm y se

crecieron en las mismas condiciones de luz, temperatura y gaseo a las que se sometieron los cultivos líquidos.

Cada 30 días, las colonias de células se transfirieron a placas con medio fresco. Para ello, una porción del material crecido se resuspendió en 5 ml de medio KN¹ en un tubo estéril. Este material fue utilizado como inóculo depositándolo gota a gota en una nueva placa con medio fresco.

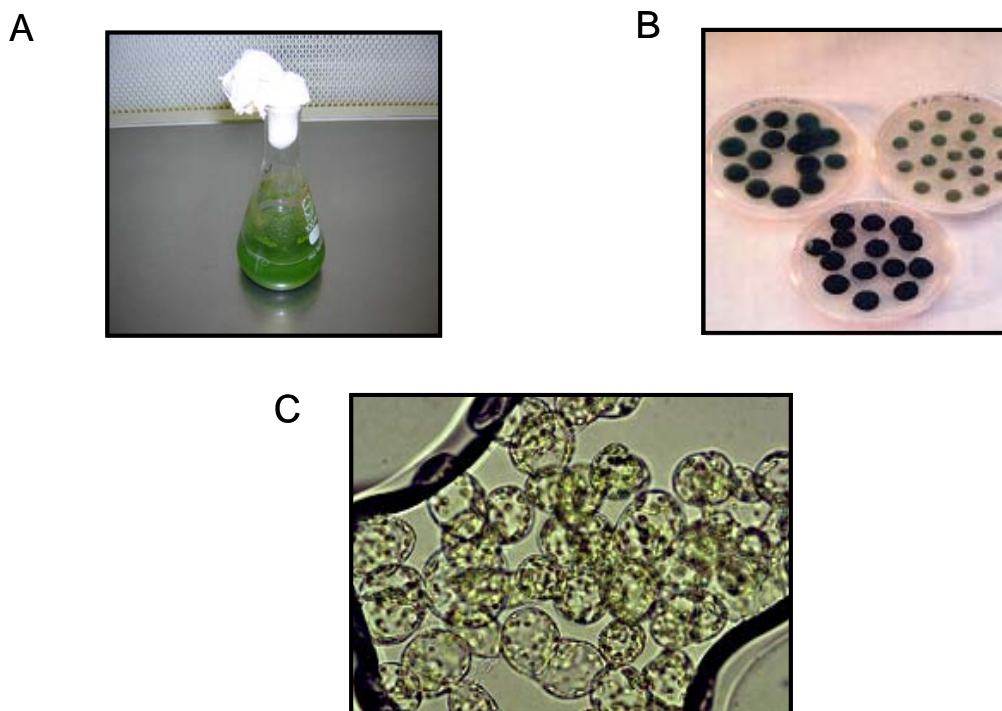


Figura 2-1: *Métodos de crecimiento de las suspensiones celulares de soja. (A) Cultivo en medio líquido. (B) Cultivo en medio sólido. (C) Observación al microscopio óptico de las suspensiones celulares de soja crecidas en medio líquido.*

El cultivo de este tipo de suspensiones celulares es complicado ya que requiere medios nutritivos relativamente complejos en comparación con los medios bacterianos, mucho más restringidos. Por esta razón, la manipulación debe ser muy cuidadosa, poniendo especial cuidado en utilizar

todo el material convenientemente esterilizado en autoclave y realizar todos los procesos de manipulación del cultivo en el interior de una campana de flujo laminar (Telstar AH-100).

2.1.2. Determinación de los parámetros fisiológicos de crecimiento de las suspensiones celulares

2.1.2.1. Determinación del crecimiento

Para estudiar el crecimiento de las suspensiones celulares se pueden realizar curvas de crecimiento del cultivo utilizando como parámetro el *volumen celular empaquetado*. Este sistema es rápido, representativo y se utiliza comúnmente en las suspensiones celulares vegetales como alternativa a la turbidez o D.O., mucho más difícil de determinar debido a que éstas células forman agregados de tamaño variable (5-20 células). Para medir el volumen empaquetado, se tomó una alícuota de 1 ml del cultivo, teniendo cuidado de agitar previamente el matraz y tomar la alícuota con una pipeta de orificio ancho para permitir el paso de agregados celulares, característicos de los cultivos celulares de soja. La alícuota se depositó en un tubo eppendorf donde se dejó sedimentar por gravedad durante dos horas. Esta medida se repitió periódicamente a lo largo de todo el ciclo de cultivo. Una vez sedimentada la muestra se midió el volumen que ocupaban las células, que será mayor cuanto más avanzado se encuentre el estado de crecimiento del cultivo. Se realizó una determinación para cada tiempo de crecimiento y se promediaron los valores de tres cultivos independientes.

2.1.2.2. Concentración de clorofila a lo largo de un cultivo

El cálculo de la concentración de clorofila también se utilizó como método indirecto para determinar el crecimiento y el estado de las

suspensiones celulares a lo largo de un ciclo de cultivo. Las alícuotas de 1 ml del cultivo, tomadas a distintos tiempos de crecimiento, se centrifugaron en una microfuga de tubos eppendorf a 13.000 r.p.m. durante 5 min para eliminar el medio de cultivo. El sedimento obtenido se resuspendió con 1 ml de acetona al 80 % en agua, con el fin de extraer los pigmentos. La muestra se sonicó durante 5 min en un baño de ultrasonidos (Ultrasound-P Selecta) a 4 °C, y se centrifugó de nuevo en la microfuga durante 5 min, extrayéndose el sobrenadante y manteniéndolo a 4 °C. La extracción se repitió hasta que el sedimento obtenido presentó un color marrón claro.

La concentración de la clorofila total (Chl_T) de la muestra se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 663 y 645 nm y aplicando la fórmula de Arnon (1949):

$$(\text{Chl}_T)_{\text{mg/l}} = 8,02 \times \text{Abs}_{663 \text{ nm}} + 20,2 \times \text{Abs}_{645 \text{ nm}} \quad (1)$$

2.1.2.3. Test de viabilidad con diacetato de fluoresceína (FDA)

Este test permite determinar la capacidad de actividad metabólica celular utilizando una disolución de diacetato de fluoresceína (FDA) al 0,1 % disuelta en acetona. Una gota de la suspensión celular se mezcló con una gota de la disolución de FDA según lo descrito por Widholm (1972). Inmediatamente después, las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia. Las células metabólicamente activas fueron capaces de metabolizar la molécula de FDA, liberando la fluoresceína. Este compuesto excitado con luz ultravioleta emite fluorescencia en la zona amarilla del espectro. La determinación de los resultados de este test se ve a menudo dificultada por la autofluorescencia propia de la Chl en la parte roja del espectro cuando se ilumina con luz ultravioleta, lo que obliga a utilizar un microscopio con filtros ópticos adecuados (Nikon Eclipse TE300).

2.1.2.4. Fluorescencia de clorofila y desprendimiento de oxígeno

Fluorescencia de clorofila

La fluorescencia de la clorofila de las suspensiones celulares de soja se analizó utilizando un fluorímetro PAM (Walz, Eifelrich, Alemania). Una alícuota de 1 ml de las suspensiones celulares, fue mantenida en oscuridad durante 20 min para que todos los centros del PS II se encontraran en forma mayoritariamente oxidada. La alícuota se introdujo en una cubeta especial (KS 101) con agitación. Esta cubeta se conectó a un baño termostático que mantuvo la muestra a 24 °C. A continuación, tras aplicar a la muestra un pulso de luz modulada, se midió la fluorescencia debida a procesos que no implican separación de cargas (F_0). Seguidamente, la muestra se sometió a un pulso de luz actínica saturante producido por una lámpara de Xénon XST de 8 μ s de semianchura. Este pulso de luz actínica saturante fue lo suficientemente fuerte para producir separación de cargas en cada centro de reacción pero lo suficientemente corto (1 s) para evitar la reoxidación de los aceptores primarios durante el tiempo del flash. El pulso de luz saturante permite registrar la fluorescencia máxima (F_m) a la cual todos los centros se encuentran reducidos. Tras alcanzar la F_m , se registró nuevamente F_0 y, con estos valores de F_m y F_0 , se calculó la fluorescencia variable de clorofila (F_v) según la ecuación:

$$F_v = F_m - F_0 \quad (2)$$

La relación F_v/F_m permitió determinar el rendimiento cuántico efectivo del PS II, tanto en suspensiones celulares tratadas con el inhibidor del transporte electrónico fotosintético atrazina como en suspensiones celulares sometidas a fotoinhibición.

Determinación de la actividad de desprendimiento de oxígeno

El O₂ desprendido durante la fotosíntesis puede ser detectado polarográficamente utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark. En nuestro caso, utilizamos el modelo comercializado por Hansatech (figura 2-2), acoplado a una cubeta termostatzada con un baño circulante a 24 °C (Exacal 200, Neslab Instruments, Inc. Portsmouth, Estados Unidos). El electrodo consta de un cátodo de platino y un ánodo de plata inmersos en un electrolito. Ambos electrodos están colocados en un disco de plástico: el cátodo se sitúa en el centro de una protuberancia en la zona central del disco y el ánodo ocupa una hendidura circular. El sistema se encuentra aislado del medio ambiente por una delgada membrana de teflón permeable al oxígeno pero no al agua ni a los iones. Separando el disco y la membrana se coloca un papel espaciador, normalmente papel de arroz, para conseguir una capa uniforme del electrolito entre el cátodo y el ánodo. Este electrolito utilizado es una solución de KCl que da continuidad al espacio entre los dos electrodos. Es importante conseguir una buena homogeneidad en la cubeta y una buena sensibilidad en la medida evitando la difusión del oxígeno en forma de gradiente. Para ello, se utiliza un pequeño agitador magnético.

Cuando se aplica un pequeño voltaje entre los electrodos, el platino se carga negativamente respecto a la plata; el flujo de corriente inicial es despreciable y el platino se polariza adoptando el potencial aplicado externamente. Si el potencial se incrementa hasta 600-700 mV, el O₂ es reducido en la superficie del platino inicialmente a H₂O₂, de manera que al donar electrones al oxígeno la polaridad tiende a descargarse. La corriente que circula es proporcional al oxígeno consumido en el cátodo, la cual se mide en un registrador (Control Box CBD1 Hansatech) conectado a una carta

de registro (L6512B, Linseis, GmbH, Alemania) que traduce los cambios de potencial a lo largo del tiempo en curvas de pendientes variables.

Como fuente de iluminación se utilizaron dos focos situados a ambos lados de la cubeta del electrodo. La luz actínica fue filtrada a través de 9,5 cm de agua y su intensidad en ambas caras de la cubeta fue de $2.200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El blanco se realizó con tampón E y las medidas con 1 ml de células en 2 ml de tampón E. Para determinar el grado de inhibición de la actividad fotosintética en presencia de atrazina se añadieron distintas concentraciones del inhibidor a la mezcla de células y tampón E.

Tampón E: NaCl 10 mM, Sacarosa 300 mM, MES-NaOH (pH 6,5) 25 mM

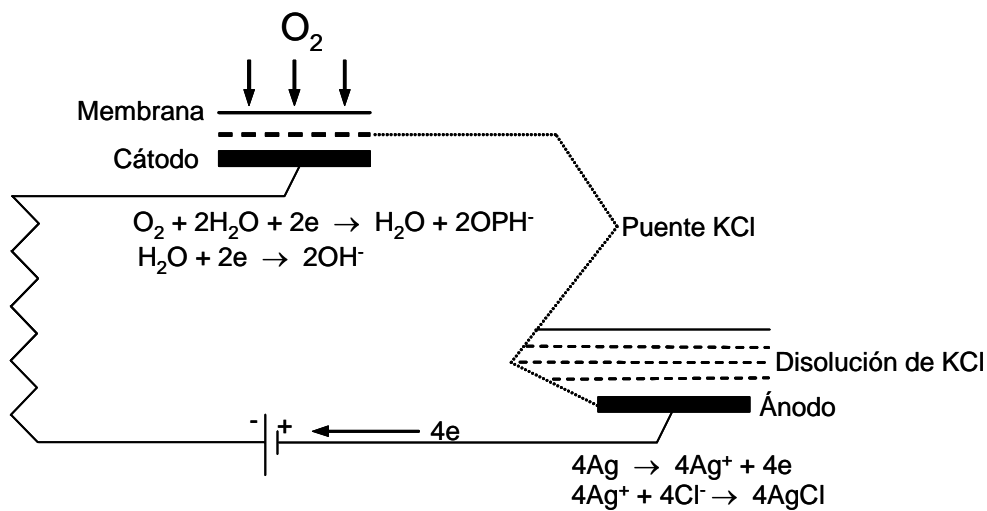


Figura 2-2: Esquema de un electrodo de oxígeno tipo Clark y de las diferentes reacciones que tienen lugar en el electrodo.

2.1.3. Cultivo de plantas de soja en cámara climática y medio hidropónico

El cultivo de plantas de soja (*Glycine max*) se realizó en cámara controlada en las siguientes condiciones (figura 2-3):

Intensidad de luz: $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Temperatura: 25 °C

Humedad: 80 %

Rango espectral de la luz de crecimiento: visible (luz diurna)

La disolución nutritiva de Hoagland, cuya composición se detalla a continuación, se utilizó como medio de cultivo:

0.5 % Disolución 1

0.25 % Disolución 2

0.05 % Disolución de micronutrientes

0.3 % Disolución de hierro

Disolución 1: KNO_3 50,55 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 49,30 g/l, KH_2PO_4 27,50 g/l, NaCl 5,85 g/l

Disolución 2: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 218 g/l

Disolución de micronutrientes: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 g/l, H_3BO_3 2,86 g/l, Na_2MoO_4 0,025 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,23 g/l, CuSO_4 0,06 g/l

Disolución de hierro: Secuestrene 14 g/l

2.2. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR Y PURIFICACIÓN

2.2.1. Aislamiento de cloroplastos y membranas tilacoidales a partir de suspensiones fotosintéticas de soja

Los cultivos de suspensiones celulares fotosintéticas presentan una tendencia natural a agregarse lo que dificulta su manipulación, a lo que hay que añadir los problemas que presenta la ruptura de la pared celular de estas células.

Las distintas fracciones celulares se obtuvieron a partir de 50 ml de cultivo después de tres semanas de crecimiento, tiempo éste en el que el aparato fotosintético se encuentra totalmente desarrollado. Las células se

filtraron a través de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem) para eliminar el medio de cultivo y se resuspendieron en tampón B1. Este tampón se añade a razón de 1,5 ml/g de células filtradas. La rotura de las células se llevó a cabo con un homogeneizador manual de teflón durante 10 min. Para evitar el calentamiento de la preparación, se interrumpió 1 min el proceso de rotura cada 2 min, manteniendo la muestra constantemente en hielo.



Figura 2-3: Crecimiento de plantas de soja (*Glycine max*) en cámara climática y medio hidropónico.

El extracto celular se agitó durante 10 min a 4 °C para favorecer la liberación de los cloroplastos retenidos entre los restos celulares. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 1250 r.p.m. durante 1 min (centrífuga Sorvall, Dupont Wilmington DL Estados Unidos; rotor SS-34), reservando el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en tampón B1 y se

centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Los dos sobrenadantes obtenidos anteriormente se mezclaron y se centrifugaron a 10000 r.p.m. durante 10 min (centrífuga Sorvall; rotor SS-34). El sedimento obtenido contiene fundamentalmente cloroplastos. Este sedimento se resuspendió en tampón B2 con ayuda de un pincel, provocando la ruptura del cloroplasto por choque osmótico. Los cloroplastos rotos fueron centrifugados a 10000 r.p.m. durante 10 min (centrífuga Sorvall; rotor SS-34) obteniendo como sedimento las membranas tilacoidales. Las membranas fueron resuspendidas en tampón B3 sacarosa. Todos los pasos fueron realizados en cámara fría y bajo luz tenue. Tras su aislamiento, los tilacoides pueden ser congelados y almacenados a -80 °C y una vez descongelados deben ser mantenidos a 4 °C durante su utilización.

Tampón B1: NaCl 400 mM, MgCl₂ 2 mM, Tricina (pH 8) 20 mM, BSA 0,2 %

Tampón B2: NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, Tricina (pH 8) 20 mM

Tampón B3 sacarosa: NaCl 15 mM, MgCl₂ 5 mM, MES (pH 6) 50 mM, Sacarosa 400 mM

2.2.2. Aislamiento de cloroplastos intactos

La obtención de cloroplastos intactos se realizó según el método descrito por van Wijk y col. (1995) adaptado tanto a suspensiones celulares como a plantas de soja. Las hojas de soja (50 g) troceadas y lavadas con agua destilada se homogenizaron en un homogenizador tipo politrón en presencia de medio A y, tras filtrar el homogenizado por dos capas de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem), se centrifugó a 1300 r.p.m. durante 2 min (centrífuga Sorvall; rotor JLA 10.500). En el caso de las suspensiones celulares (10 g de células) la homogenización se realizó con un homogenizador de teflón en presencia de medio A, tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 2.1). Posteriormente, el lisado se centrifugó a 1300 r.p.m. durante 2 min

(centrífuga Sorvall; rotor SS-34). El sobrenadante obtenido en ambas muestras se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 10 min obteniéndose en el pellet fundamentalmente cloroplastos. Este pellet se resuspendió con 3 ml de medio B y se cargó cuidadosamente sobre un colchón de percoll al 35 % preparado en medio B. La muestra se centrifugó a 6875 r.p.m. durante 10 min (centrífuga Sorvall; rotor SS-34). Tras la centrifugación se observó una banda verde intensa de cloroplastos intactos, situada aproximadamente a 1 cm de la superficie del líquido (figura 2-4), que recogimos cuidadosamente con una pipeta de boca ancha. Finalmente, los cloroplastos intactos se lavaron con medio C centrifugando a 10000 r.p.m. durante 10 min para eliminar posibles restos de percoll, y se resuspendieron suavemente con ayuda de un pincel en medio C. Los cloroplastos se conservaron en presencia de los inhibidores de proteasas Pefabloc (100 µg/ml), antipaína (1 µg/ml) y leupeptina (1 µg/ml).

Medio A (pH=6,1): Sorbitol 330 mM, Ascorbato 5 mM, EDTA 2 mM, NaCl 20 mM, MgCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, MES (KOH) 5 mM

Medio B (pH=7,6): Sorbitol 330 mM, Ascorbato 5 mM, EDTA 2 mM, NaCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, MES (KOH) 5mM

Medio C (pH=8): Sorbitol 330mM, HEPES (KOH) 50mM

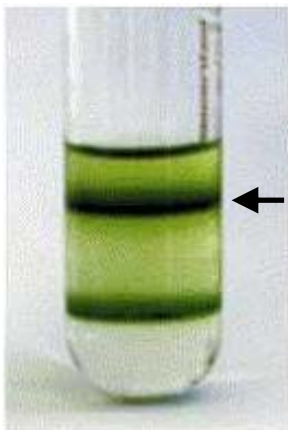


Figura 2-4: Aislamiento de cloroplastos intactos mediante centrifugación en gradiente de percoll. La flecha indica la banda que forman los cloroplastos intactos.

2.2.3. Aislamiento de envueltas y tilacoides a partir de cloroplastos intactos de plantas de soja

Los cloroplastos intactos aislados a partir de hojas de soja (50 g) tal y como se ha descrito en el apartado anterior, fueron utilizados para aislar envueltas y tilacoides según el protocolo descrito por Li y col. (1991) con algunas modificaciones. Los cloroplastos intactos fueron recogidos mediante centrifugación y resuspendidos en 2 ml de tampón B3. A continuación, los cloroplastos se lisaron manteniéndolos en hielo y en presencia de un volumen igual de TE durante 10 min. Seguidamente, se cargaron 2 ml de los cloroplastos lisados en un gradiente discontinuo de sacarosa preparado con disoluciones de sacarosa de 1,2 M, 1 M y 0,46 M en TE y se centrifugó a 39000 r.p.m. durante 70 min (centrífuga Beckman; rotor SW41Ti). Tras la centrifugación, las envueltas formaron una banda verde en la interfase entre la disolución de sacarosa 0,46 M y la disolución de sacarosa 1 M, mientras que las membranas tilacoidales formaron un pellet en el fondo del tubo. La envueltas se recogieron cuidadosamente con una pipeta, fueron diluidas con TE, se sedimentaron mediante centrifugación a 20000 r.p.m. durante 45 min (centrífuga Beckman; rotor 70.1 Ti) y se resuspendieron en 50 µl de TE. El pellet de membranas tilacoidales se resuspendió en TE y se centrifugó a 7500 r.p.m. durante 10 min (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H). Finalmente las membranas tilacoidales se resuspendieron en TE. Tanto las envueltas como los tilacoides aislados se conservaron en presencia de los inhibidores de proteasas Pefabloc (100 µg/ml), antipaína (1 µg/ml) y leupeptina (1 µg/ml).

TE: Tris HCl (pH 7,5) 10 mM, 2 mM EDTA

Tampón B3 sacarosa: NaCl 15 mM, MgCl₂ 5 mM, MES (pH 6) 50 mM, Sacarosa 400 mM

2.2.4. Aislamiento de fracciones enriquecidas en membranas microsomales de hojas de soja

La obtención de fracciones enriquecidas en membranas microsomales de hojas de soja se realizó según lo descrito por Madey y col. (2001) con algunas modificaciones. Las hojas de soja (50 g) troceadas y lavadas con agua destilada se homogenizaron en un homogenizador de tipo politrón en presencia de tampón de homogenización a razón de 4 ml/g de hojas. El homogenizado de hojas se filtró a través de dos capas de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem) y se centrifugó a 1300 r.p.m. durante 2 min (centrífuga Sorvall; rotor JLA 10.500). El sobrenadante se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 20 min (centrífuga Sorvall; rotor JLA 10.500). El pellet se desechó, y el sobrenadante obtenido se sometió a centrifugación a 42000 r.p.m. durante 75 min (ultracentrífuga Beckman L8-70M; rotor 45.Ti) obteniéndose en el pellet la fracción enriquecida en membranas microsomales. Por último, las membranas microsomales se resuspendieron en un volumen total de 9 ml de tampón de resuspensión.

Tampón de homogenización: Sacarosa 0,5 M, HEPES (KOH) (pH= 7,5) 50 mM, Ascorbato 5 mM, Cisteína 3,6 mM, PMSF 0,5 mM, PVP insoluble 0,6%

Tampón de resuspensión: Sacarosa 0,33 M, K₃PO₄ (pH=7,8) 5 mM, KCl 3 mM

2.2.5. Análisis mediante gradiente de sacarosa de fracciones de fotosistema II

Los cloroplastos intactos aislados a partir de suspensiones celulares de soja, se resuspendieron en tampón Tricina (pH=7,8) 10 mM hasta una concentración final de clorofila de 1 mg/ml. A continuación los cloroplastos se solubilizaron en un volumen igual de tampón Tricina (pH=7,8) 10 mM conteniendo 2 % (p/v) de n-dodecil β -D-maltósido (DM), durante 55 min a 4 °C en oscuridad con agitación ocasional. Tras la solubilización, la

preparación se cargó en 12 ml de un gradiente continuo de sacarosa (0,1-1 M), conteniendo 0,05 % (p/v) de DM y que se preparó con la ayuda de un formador de gradiente. Los cloroplastos se centrifugaron en este gradiente de sacarosa a 180000 g durante 22 h en un rotor basculante (ultracentrífuga Beckman L8-70M; rotor SW41Ti). Tras la centrifugación, el gradiente se recogió en diez fracciones de igual volumen (1 ml) desde la boca hasta el fondo del tubo que se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE y con anticuerpos específicos de diferentes componentes del fotosistema II de plantas.

2.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.3.1. Análisis de lípidos

2.3.1.1. Extracción de lípidos de suspensiones celulares de soja

Para extraer los lípidos de las suspensiones celulares se aplicó el protocolo desarrollado por Bligh y Dyer (1959). Las células de soja (1 g), filtradas a través de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem), se homogenizaron en un homogenizador de teflón en presencia de 2 ml de B1 tal y como se especifica en el apartado 2.1. Al lisado de células se le añadieron 6 ml de la mezcla de extracción metanol:cloroformo (2:1 en volumen), 2 ml de cloroformo y 2 ml de agua milliQ. Tras la adición de cada uno de estos tres reactivos se agitó la muestra con un vortex durante 30 s. A continuación, la muestra se centrifugó a 2000 r.p.m. y 4 °C durante 20 min (centrífuga Sorvall; rotor SS-34). Recogimos la fase orgánica en la que se encuentran los lípidos y los pigmentos fotosintéticos con una pipeta Pasteur. A la fase acuosa obtenida en la centrifugación anterior se le añadieron 3 ml de

cloroformo. La mezcla se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores, y se recogió la fase orgánica que fue mezclada con la obtenida en la centrifugación anterior. El disolvente de la fase orgánica obtenida se evaporó con N₂, quedando como residuo seco los lípidos y los pigmentos fotosintéticos. Este residuo se guardó a -20 °C y en oscuridad hasta su posterior utilización.

2.3.1.2. Separación de clases de lípidos mediante cromatografía en capa fina (TLC)

La separación de las distintas clases de lípidos se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (TLC) en placa de sílica-gel G60 (Merck Kieselgel). El eluyente utilizado para desarrollar la placa fue una mezcla de cloroformo:acetona:metanol:acético:agua (50:20:10:10:5 en volumen).

El residuo seco obtenido en el apartado anterior se disolvió con 1 ml de cloroformo y se reservaron 100 µl y 50 µl para la determinación gravimétrica y la extracción de clorofila, respectivamente. Depositamos en la placa de sílica-gel el resto de la muestra en dos alícuotas de 250 µl y una de 300 µl con una microjeringa Hamilton. Además, cargamos en la placa una alícuota de 200 µl de una muestra patrón para revelar con yodo. La adición se realizó con sumo cuidado para impedir la difusión de la muestra en la placa. A continuación, se dejó migrar la muestra hasta que el frente de pigmentos llegó al final de la placa. Finalizada la migración, tapamos con una placa de vidrio la parte de la placa que contiene las alícuotas de la muestra de interés, revelando con vapores de I₂ el resto de la placa que contiene la muestra patrón. Las distintas bandas de lípidos se marcaron con la ayuda de un lápiz. La tinción de los lípidos con vapores de I₂ se produce por la unión del I₂ a los dobles enlaces de los ácidos grasos que componen los lípidos. De esta

manera, aquellas bandas de lípidos que tengan una mayor coloración presentan ácidos grasos con un contenido elevado en insaturaciones, mientras que los lípidos menos coloreados presentan ácidos grasos más saturados. La identificación de las clases de lípidos de interés (MGDG, DGDG, PG y PC) se realizó previamente mediante comparación de R_f con patrones comerciales (Sigma) (figura 2-4).

El siguiente paso consistió en la extracción de los lípidos de la sílica-gel. Para ello, se rascaron con mucho cuidado las zonas de la sílica-gel que contenían las bandas de los lípidos, recogiéndose cada banda en un tubo de vidrio. Los lípidos se extrajeron de la sílica con cloroformo:metanol (2:1 en volumen) y 1 ml de disolución acuosa de NaCl (9 g/L). La mezcla se agitó con un vortex y posteriormente durante 5 min en un balancín. Tras centrifugar a 4000 r.p.m. durante 5 min (centrífuga Sorvall; rotor SS-34) se recogió la fase orgánica (la de abajo) y se secó con N₂.

Para evitar la oxidación de los dobles y triples enlaces de los ácidos grasos durante el proceso de separación y fraccionamiento, se añadió el antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) a una concentración final de 3 µg/ml, siguiendo el método descrito por Eder y col. (1992). El antioxidante se añadió a la muestra de lípidos antes de ser depositada en la placa de TLC y antes de la extracción de los lípidos con cloroformo:metanol (2:1 en volumen) después de haber sido rascados de la placa y separadas las bandas de los diferentes lípidos.

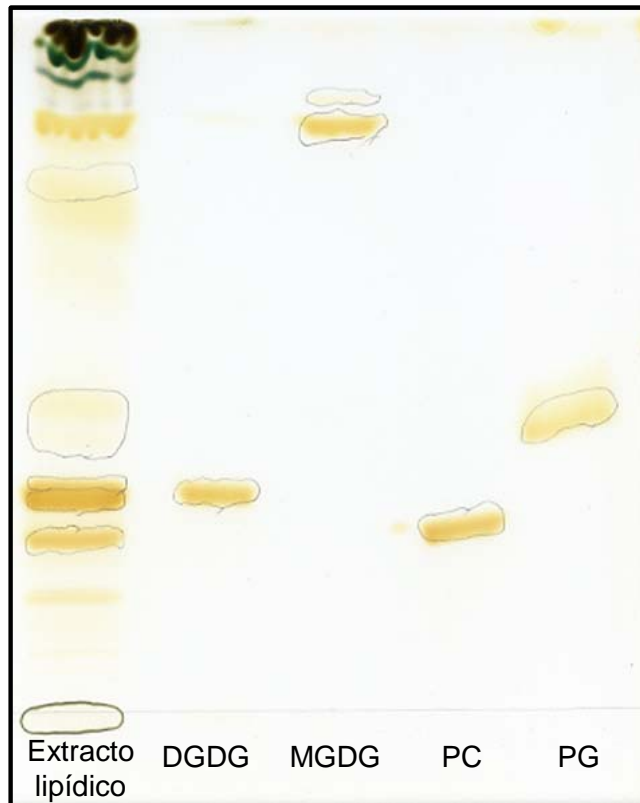


Figura 2-4: Cromatografía en capa fina de los lípidos extraídos de suspensiones celulares de soja e identificación de las distintas clases de lípidos mediante comparación de los R_f de patrones comerciales. Los lípidos fueron teñidos con I_2 para su visualización.

2.3.1.3. Determinación de los lípidos por gravimetría

Existen distintos métodos de determinación de la cantidad de lípidos, aunque muchos son específicos de un tipo determinado de lípido y un tanto complicados en su ejecución. Sin embargo, la cantidad de lípidos totales se puede determinar de forma simple por métodos gravimétricos (Herbes y Allen, 1983). Para ello, se prepararon unas cápsulas de papel de aluminio, las cuales se introdujeron en un desecador durante una hora y, posteriormente, se pesaron en una balanza analítica (AT21 Comparator, Mettler Toledo) de 6 cifras decimales. Después, estas cápsulas se colocaron en una placa calefactora a 25-30 °C con el objeto de favorecer la rápida evaporación del

cloroformo en el que se encuentran disueltos las distintas clases de lípidos. Se colocaron en cada cápsula 100 µl de lípidos totales disueltos en cloroformo. Con el calor de la placa calefactora se evaporó rápidamente el cloroformo quedando como residuo en las capsulillas de aluminio los lípidos totales. Hay que procurar no sobrepasar los 30 °C para evitar la incineración de los lípidos. A continuación, las cápsulas se volvieron a dejar en el desecador durante 1 h y se pesaron en la misma balanza analítica utilizada para pesar las cápsulas vacías. Por diferencia de pesada se obtuvo la cantidad total de lípidos. Toda la manipulación se realizó con la ayuda de unas pinzas de laboratorio.

2.3.1.4. Análisis de la composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases

El análisis de los ácidos grasos presentes tanto en los lípidos totales como en las distintas clases de lípidos se realizó en el Departamento de Grasas y Aceites del Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón. Los residuos secos de los lípidos totales y de las distintas clases de lípidos fueron transesterificados con KOH en metanol. Los ésteres metílicos así obtenidos fueron analizados y cuantificados en un cromatógrafo de gases (modelo 5890 series 2 plus, Hewlett Packard) equipado con un detector de ionización a la llama (FID) y con una columna SE2330 (30 × 0,25 mm de diámetro interno, 0,2 df).

2.3.2. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se llevó a cabo según el protocolo de Laemmli (1970), en presencia del detergente dodecil sulfato de

sodio (SDS) y urea como agente desnaturizante. El equipo de electroforesis utilizado fue el Miniprotean III (Biorad).

Se utilizaron dos tipos de geles: geles del 12 % de acrilamida y geles de gradiente del 12 al 22 % de acrilamida. La conveniencia de estos dos tipos de geles dependió del tipo de experimento y, sobre todo, del peso molecular de las proteínas a analizar.

Preparación de geles del 12 % de acrilamida

El gel separador del 12 % de acrilamida se preparó con la siguiente composición:

<u>Gel separador</u> (5 ml)	<u>12 %</u>
Urea	1,2 g
1,5 M Tris-HCl pH=8,8	1,25 ml
SDS 10 % (p/v)	50 μ l
Acrilamida/Bisacrilamida 40 %	1,5 ml
H ₂ O miliQ	1,75 ml
APS 10 %	25 μ l
TEMED	2,5 μ l

Debido al carácter higroscópico de la urea, hay que tener la precaución de disolver la misma sin añadir el H₂O y una vez disuelta ajustar el volumen a 5 ml con H₂O. Una vez ajustado el volumen, añadimos el TEMED y el APS preparado en el momento. El molde se rellenó con gel separador hasta un nivel de aproximadamente 1 cm por debajo del peine. A continuación, se añadió alcohol isopropílico hasta el borde del molde lo que evita la deshidratación del gel y favorece la formación de un frente uniforme. El gel se dejó polimerizar durante 45 min.

Una vez polimerizado el gel separador, se retiró el alcohol lavando con H₂O milliQ y se añadió el gel concentrador que se preparó con la siguiente composición:

<u>Gel concentrador</u>	<u>4 %</u>
0,5 M Tris-HCl pH=6,8	625 µl
SDS 10 % (p/v)	25 µl
Acrilamida/Bisacrilamida 40 %	244 µl
H ₂ O milliQ	1,606 ml
APS 10 %	12,5 µl
TEMED	2,5 µl

Tras añadir el gel concentrador sobre el gel separador se colocó el peine y se dejó polimerizar.

Preparación de geles de gradiente del 12 al 22 % de acrilamida

El gel separador de gradiente se preparó a partir de dos disoluciones de acrilamida, una del 12 % y otra del 22 %, cuyas composiciones se detallan a continuación:

<u>Gel separador (5 ml)</u>	<u>12 %</u>	<u>22 %</u>
Urea	1,2 g	1,2 g
1,5 M Tris-HCl pH=8,8	1,25 ml	1,25 ml
SDS 10 % (p/v)	50 µl	50 µl
Acrilamida/Bisacrilamida 40 %	1,5 ml	2,75 ml
H ₂ O milliQ	1,75 ml	922 µl
APS 10 %	25 µl	25 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl

Tras mezclar todos los componentes, se añadió el APS y el TEMED y se colocaron ambas disoluciones en el formador de gradiente. El formador de gradiente mezcló las disoluciones con la ayuda de una bomba peristáltica, a un flujo constante de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. El molde se rellenó hasta 1 cm por debajo del peine. Al igual que en el caso anterior se cubrió con alcohol isopropílico y se dejó polimerizar. Posteriormente, se añadió el gel concentrador de composición idéntica al comentado anteriormente y se colocó el peine. Tras la polimerización del gel concentrador, el gel completo quedó listo para la electroforesis.

Desarrollo de la electroforesis

Una vez que los geles estuvieron completamente polimerizados, se retiraron los peines, se lavaron los pocillos con H_2O milliQ para eliminar posibles restos de acrilamida y se colocaron en la cubeta de electroforesis vertical en presencia del tampón de electroforesis. Antes de ser cargadas en los pocillos con una micropipeta, las muestras fueron desnaturalizadas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 45 min con el tampón de desnaturalización. Este método de desnaturalización supone una alternativa válida a la desnaturalización térmica en el caso de proteínas del cloroplasto, ya que la desnaturalización térmica suele resultar en agregados de alto peso molecular, dificultando la separación y, por tanto, la identificación de las proteínas de interés. Además de las muestras, se cargó en el mismo gel un patrón de peso molecular con proteínas entre 12 y 110 kDa (Low range prestained SDS-PAGE standars, Biorad). La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 100 V, hasta que salió del gel el frente de colorante (alrededor de 3 h).

Finalizada la electroforesis, el gel se retiró del molde y se tiñó durante 3 horas con la disolución de teñido, tras lo cual se decoloró con la disolución

de desteñido hasta que el fondo quedó claro y las bandas proteicas fueron apreciables.

Tampón de electroforesis: Tris-HCl (pH=8,3) 15 g/l, Glicina 72 g/l, SDS 5 g/l

Tampón de desnaturalización × 4: Tris-HCl (pH=6,8) 62 mM, SDS 2,3 % (p/v), Glicerol 10 %, β-mercaptoetanol 5 %, Azul de bromofenol 0,02 %

Disolución de teñido: Azul de Coomassie 0,25 g, Metanol 450 ml, Ácido acético 60 ml, Agua desionizada 490 ml

Disolución de desteñido: Metanol 250 ml, Ácido acético 750 ml, Agua desionizada 1.500 ml

2.4. TÉCNICAS INMUNOQUÍMICAS Y DE BIOLOGÍA CELULAR

2.4.1. Western blot y detección inmunológica de proteínas

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE (apartado 4.2.), éstas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Transblot transfer medium, BioRad) (Towbin y col., 1979) y se detectaron mediante anticuerpos específicos. Para ello, tras desarrollar la electroforesis, el gel sin teñir se dispuso junto a la membrana en el equipo de transferencia (Mini Trans-blot, BioRad). Tanto el gel como la membrana, previamente hidratada, se colocaron entre dos papeles Whatman y dos esponjas, todo ello empapado en tampón TBS. Los papeles Whatman y la membrana se recortaron con las dimensiones exactas del gel para que la transferencia transcurriera eficientemente. La transferencia se llevó a cabo a un voltaje constante de 100 V durante 90 min en presencia del tampón de transferencia.

Una vez realizada la transferencia, la membrana se incubó con el anticuerpo específico para la proteína que se deseaba detectar. Este anticuerpo, denominado *anticuerpo primario* es reconocido a su vez por un *anticuerpo secundario*. El anticuerpo secundario se encuentra conjugado con

una molécula que permite la detección del complejo formado por la proteína de interés, el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario mediante una reacción colorimétrica. En nuestro caso se han utilizado dos tipos de anticuerpos secundarios; conjugados con peroxidasa y conjugados con fosfatasa alcalina biotinada.

Tampón de tranferencia: Glicina 14,4 g/l, Tris-HCl 3,03 g/l, Metanol 200 ml

Método de revelado con la peroxidasa

Tras la transferencia se lavó la membrana con tampón TBS y se dejó incubando con agitación toda la noche a 4 °C en tampón TBS conteniendo 5 % de leche en polvo. Esta incubación permite que las proteínas de la leche bloqueen el resto de la membrana impidiendo que los anticuerpos se unan inespecíficamente a ella. Tras esta incubación realizamos dos lavados de 10 min con TBS 0,1 % leche en polvo. Tras los lavados, se añadió el anticuerpo primario en TBS con 0,1 % de leche en la dilución apropiada. Los anticuerpos contra D1, D2, LHCII y OEE33 se utilizaron a una dilución 1:1000, mientras que en el caso del anticuerpo contra FAD7 se utilizó una dilución 1:200. Incubamos con el anticuerpo primario durante 1 h a temperatura ambiente y retiramos el exceso lavando de nuevo dos veces con TBS 0,1 % leche. Añadimos el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Blotting grade anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate, BioRad) diluido en TBS con 0,1 % de leche en polvo a una dilución 1:1000. La membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Retiramos el exceso de anticuerpo secundario lavando dos veces durante 10 min con TBS con 0,1 % de leche en polvo y preparamos la mezcla de reacción de la peroxidasa (disolución A y disolución B). Las dos disoluciones se mezclaron rápidamente y se añadieron a la membrana. Las proteínas que reaccionaron con los anticuerpos se

hicieron visibles al cabo de 5-10 min. Para detener la reacción se lavó la membrana con H₂O milliQ. Tras secar la membrana, ésta fue escaneada utilizando un escáner modelo EPSON perfection 2400 PHOTO. El análisis densitométrico se llevó a cabo utilizando el software Quantity One (BioRad). Una vez analizada, la membrana se guardó envuelta en papel de aluminio entre dos capas de papel de filtro.

TBS: Tris-HCl (pH=7,5) 25 mM, NaCl 0,9 %

Disolución A: TBS 25 ml, H₂O₂ 50 µl

Disolución B: Naftol 15 mg, Metanol 5 ml

Método de revelado con la fosfatasa alcalina

Para el revelado con la alcalínfosfatasa se utilizó el kit “Amplified Alkaline Phosphatase Goat Anti-rabbit Inmuno-blot Assay” de BioRad, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La gran especificidad de la unión entre la biotina y la estreptavidina permite que se produzca una reducción del ruido de fondo y un aumento de la sensibilidad de la detección pudiendo detectarse con este método de revelado hasta 10 pg de proteína en la membrana. Al igual que en el método anterior de revelado, la membrana una vez transferida se lavó con TBS y se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con TBS 5 % leche. A continuación se lavó la membrana con TTBS (180 ml TBS y 90 µl Tween 20) dos veces durante 10 min. Tras incubar con el anticuerpo primario durante 90 min y realizar dos lavados de 10 min con TTBS, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante 90 min a temperatura ambiente. Durante esta incubación se preparó el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó dos veces con TTBS y se incubó durante 90 min con el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina que formamos previamente a temperatura ambiente. Tras realizar cuatro lavados con TTBS

revelamos la membrana con las disoluciones de NBT (nitro blue tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-cloro-indolilfosfato) en dimetilformamida proporcionadas en el kit.

2.4.2. Desarrollo de un anticuerpo contra FAD7

El anticuerpo de FAD7 fue realizado por Sigma-Genosys (Reino Unido) contra un péptido de 16 aminoácidos correspondiente a los residuos 69-84 de la secuencia de la proteína FAD7 madura. Para la elección de este péptido se realizó un alineamiento de la secuencia de FAD7 con la de FAD3 y se analizó la secuencia de FAD7 con el programa CloroP de predicción de péptidos señal. El péptido elegido fue conjugado a la proteína KLH e inyectado en dos conejos tras haberles extraído una muestra de suero (suero preinmune). Cada conejo se inmunizó seis veces con el conjugado y se sangró en tres ocasiones, utilizándose como anticuerpo el suero obtenido en el tercer sangrado. Una vez obtenido el anticuerpo, se comprobó su especificidad realizando un análisis de “Western blot” con distintas fracciones subcelulares tanto de cultivos celulares como de plantas de soja.

2.4.3. Traducción *in organello*: experimentos de marcaje y seguimiento (“pulse-chase”)

La síntesis *de novo* de la proteína D1 se estudió mediante experimentos de traducción *in organello*. Estos experimentos se llevaron a cabo con cloroplastos intactos frescos aislados a partir de suspensiones celulares de soja según el protocolo descrito en el apartado 2.2 de este capítulo. El procedimiento es básicamente el mismo que el publicado por van Wijk y col. (1995) con algunas modificaciones descritas por Zhang y col. (1999). Los cloroplastos, resuspendidos en medio C a una concentración de

clorofila de 0,5 mg ml⁻¹, en presencia de 10 mM DTT, fueron incubados durante 10 min a 23 °C bajo una intensidad de luz de 70 μE m⁻² s⁻¹ en presencia de la denominada “mezcla de traducción”. La mezcla de traducción contiene 10 mM de ATP y 40 μM de cada aminoácido excepto metionina. Todas las disoluciones contienen los siguientes inhibidores de proteasas: antipaína 2 μg ml⁻¹, leupeptina 2 μg ml⁻¹ y pefablock 100 μg ml⁻¹. La adición de estos inhibidores es crucial ya que añadiendo únicamente pefablock, se observó degradación parcial de D1.

Tras esta preincubación, se añadió metionina marcada a una concentración final de 18,5 kBq μl⁻¹. Los cloroplastos se marcaron con la metionina radiactiva durante 2,5 min tras lo cual se incubaron durante 5, 10 o 15 min en presencia de 10 mM de metionina no radiactiva en intensidad de luz baja (70 μE m⁻² s⁻¹) o intensidad de luz alta (750 μE m⁻² s⁻¹). La traducción se detuvo añadiendo diez volúmenes de medio B frío y el resultado se analizó mediante electroforesis en SDS-PAGE utilizando un gel de gradiente de 12 al 22 % de acrilamida. Tras secar y exponer el gel, las proteínas marcadas con la metionina radiactiva se detectaron en el equipo FX molecular imager (BioRad), utilizando el software Quantity One (BioRad) para el análisis densitométrico.

Medio B: Sorbitol 330 mM, Ascorbato 5 mM, EDTA 2 mM, NaCl 20 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, NaNO₃ 2 mM, HEPES-KOH (pH=7,6) 50 mM

Medio C: Sorbitol 330 mM, HEPES-KOH (pH=8) 50 mM, DTT 10 mM

2.4.4. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación de proteínas del fotosistema II se realizó según el protocolo descrito por Zhang y col. (1999) con algunas modificaciones. Los cloroplastos intactos aislados a partir de suspensiones celulares de soja, en una concentración de clorofila de 1 mg ml⁻¹, fueron sometidos a un marcaje

con metionina radiactiva. Tras el marcaje, los cloroplastos fueron solubilizados en oscuridad a 4 °C y con agitación ocasional en presencia del tampón de solubilización. A continuación, las muestras fueron diluidas con cuatro volúmenes del tampón de lavado y se añadió anticuerpo contra D1 a concentración saturante incubándose a 22 °C toda la noche. Esta concentración saturante fue determinada previamente en ensayos piloto de inmunoprecipitación. Tras la incubación de la muestra con el anticuerpo, la mezcla se añadió a la resina Sepharosa-Proteína A CL-4B (Amersham-Pharmacia) y se incubó durante 10-12 h. La resina se sometió a cinco lavados con el tampón de lavado y a un lavado final con Tris-HCl (pH=7,5) 50 mM. El anticuerpo unido a la resina se liberó con Tris-HCl (pH=7,5) 50 mM conteniendo SDS al 1 %. Finalmente, las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante electroforesis en SDS-PAGE y se detectaron, una vez secos los geles, mediante el equipo FX molecular imager (BioRad).

Tampón de solubilización: Tricina (pH= 7,8) 10 mM, DTT 10 mM, DM 2 %

Tampón de lavado: Tris-HCl (pH=7,5) 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1 %

2.4.5. Inmunomarcado con oro

El estudio de la localización subcelular de la proteína FAD7 se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. M^a Carmen Risueño del Departamento de Biología de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). La localización subcelular se analizó mediante inmunomarcado con partículas de oro siguiendo el protocolo descrito por Bernal y col. (2006b). Para ello, las células de soja fueron fijadas en una disolución de paraformaldehído al 4 % (p/v) en tampón PBS mediante 1 min de extracción al vacío. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en presencia del fijador durante 12 h a 4 °C. Tras esta incubación, se lavaron tres veces con tampón

PBS y se almacenaron en una disolución de paraformaldehído al 0,1 % en PBS a 4 °C para evitar la reversión de la fijación. Bajo estas condiciones de fijación la estructura del material se preservó correctamente.

Las células así fijadas se crioprotegieron mediante inmersión en una disolución de sacarosa en PBS en las siguientes condiciones de concentración y tiempo: 0,1 M durante 1 h, 1 M durante 1 h y 2,3 M durante toda la noche a 4 °C. A continuación las células se dispusieron en el portamuestras y fueron criofijadas sumergiéndolas rápidamente en nitrógeno líquido a -190 °C y deshidratadas. La deshidratación se realizó en una AFS (Automatic Freeze Substitution System Leica, Viena, Austria) tal y como se describe en Seguí-Simarro y col. (2005). Las muestras criofijadas se sumergieron en metanol puro con 0,5 % (p/v) de acetato de uranilo a -80 °C durante 3 días, tras lo cual la temperatura se elevó lentamente hasta alcanzar -18 °C tras 18 h. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 30 min con metanol puro a -30 °C, tras lo cual, las muestras fueron infiltradas e incluidas en Lowicryl K4M a -30 °C bajo luz ultravioleta. El Lowicryl K4M es una resina hidrofílica y de naturaleza acrílica por lo que deja una superficie rugosa en el corte ultrafino dejando mayor número de epítomos accesibles para la reacción con los anticuerpos. A continuación se obtuvieron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo (Ultracut Reichert, Viena, Austria) que se recogieron sobre rejillas de níquel de 200 mesh recubiertas con una película de Formvar que facilita la adhesión y la estabilidad en la manipulación de los cortes.

Los cortes ultrafinos dispuestos en las gradillas de níquel se incubaron sucesivamente en PBS, BSA al 5 % (p/v) en PBS y en el suero antiFAD7 o el suero preinmune sin diluir durante 1 h. Tras varios lavados con una disolución de BSA al 0,1 % (p/v) en PBS, las rejillas se incubaron con el

anticuerpo secundario, inmunoglobulinas G de ratón conjugadas con partículas de oro de 10 nm (Biocell, Cardiff, Reino Unido), a una dilución 1:25 en una disolución de BSA al 1 % (p/v) en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, los cortes dispuestos en las rejillas se lavaron con PBS y agua y se dejaron secar al aire. Finalmente, los cortes se tiñeron con acetato de uracilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico JEOL 1200 a 80 kV.

2.5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.5.1. Extracción de RNA de suspensiones celulares de soja

Tras ser recogidas mediante filtración a través de papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem) y lavadas con medio de cultivo KN⁰ fresco, las células de soja (0,4-0,6 g) se congelaron con nitrógeno líquido y se rompieron con la ayuda de un mortero hasta la obtención de un polvo fino. A continuación, se añadió sobre el lisado celular una mezcla de tampón de extracción y fenol (1:1 en volumen) a razón de 1,5 ml de mezcla por cada 0,1 g de peso fresco inicial de células. Tras centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 min (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) se recogió la fase acuosa a la que se añadió un volumen igual de mezcla (1:1 en volumen) de fenol y cloroformo-isoamilalcohol (24:1 en volumen). Se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores y se separó la fase acuosa a la que se le añadió un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (24:1 en volumen). Tras centrifugar de nuevo en las mismas condiciones anteriores, se recogió la fase acuosa, precipitando el RNA con un volumen de LiCl 4 M en presencia de 2 µl de inhibidor de RNAsas (RNase OUT, Invitrogen) durante toda la noche a 4 °C. A continuación, centrifugamos a 10000 r.p.m. durante 25 min (centrífuga

Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H). El sobrenadante se descartó y el precipitado que contiene el RNA fue lavado con etanol 80 % y resuspendido finalmente en 35 µl de agua con 0,1 % (v/v) de DEPC.

La concentración y la pureza del RNA se determinaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm de 3 µl de muestra. Para el cálculo de la concentración, cada unidad de absorbancia a 260 nm se consideró como 40 µg/ml de RNA. La pureza se determinó calculando la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm. Las muestras de RNA con esta relación superior a 1,8 se consideraron suficientemente libres de proteínas. Finalmente, el RNA se diluyó con agua con 0,1 % (v/v) de DEPC hasta una concentración de trabajo estándar de 2 µg/µl.

Tampón de extracción: LiCl 0,1 M, Tris-HCl (pH=8) 0,1 M, EDTA 10 mM, SDS 1 % (p/v)

2.5.2. Técnicas de RT-PCR

2.5.2.1. RT-PCR semicuantitativa

La técnica de RT-PCR se utilizó para estudiar de modo semicuantitativo los niveles de RNA mensajeros de los genes de las desaturasas. Esta técnica supone una alternativa al análisis por Northern por cuanto las desaturasas de plantas presentan una elevada homología entre sí y, por tanto, resulta complicado poder diseñar sondas específicas de una desaturasa en concreto. La realización de una RT-PCR conlleva dos etapas: la síntesis del DNA complementario (cDNA) a partir del mRNA y la amplificación mediante cebadores específicos del cDNA derivado del mRNA del gen de interés.

Síntesis de cDNA

El RNA extraído tal y como se explica en el apartado 2.5.1 (4 µg) se dispuso en un volumen total de 5 µl de agua con 0,1 % (v/v) de DEPC. A continuación se procedió a eliminar del RNA la posible contaminación con DNA genómico mediante tratamiento con 5 unidades de DNAsa I libre de RNAsa a 37 °C durante 10 min. Tras inactivar la DNAsa mediante la adición de EDTA a una concentración final de 2,5 µM y la incubación a 65 °C durante 15 min, se sintetizó la hebra de cDNA utilizando como cebador un oligonucleótido compuesto por desoxirribonucleótidos de timina denominado oligo dT. Para ello se añadió el oligo dT a una concentración final de 0,3 µM e incubamos a 70 °C durante 10 min. Tras enfriar rápidamente en hielo durante al menos 5 min, se añadió el tampón de la retrotranscriptasa y la mezcla de desoxirribonucleótidos, incubándose todo a 42 °C durante 1 min. Pasado este minuto se añadió la retrotranscriptasa (M-MLV retrotranscriptase, Promega) incubándose durante 1 h a 42 °C. La retrotranscriptasa se inactivó a 70 °C durante 10 min y la muestra se trató con RNAsa H libre de DNAsa que digiere el RNA de las dobles cadenas formadas por RNA y DNA. Finalmente, el cDNA sintetizado se diluyó hasta un volumen final de 120 µl con H₂O miliQ estéril, y se hicieron alícuotas que se conservaron a -80 °C.

Condiciones de PCR

La detección de los cDNA de cada desaturasa se realizó mediante PCR utilizando parejas de cebadores específicos para cada uno de los genes de las desaturasas. La elección de estos cebadores supuso la búsqueda en las bases de datos de las secuencias disponibles de los genes de las desaturasas de soja y la utilización del programa *primer3* para su diseño. La alta homología

que presentan entre sí los genes de las desaturasas determinó que al menos uno de los cebadores de cada pareja se escogiera en alguna de las regiones UTR, ya que estas regiones son específicas para cada gen (tabla 2-1). Tras encontrar las condiciones de PCR adecuadas para cada pareja de cebadores, los productos de amplificación fueron clonados y secuenciados para comprobar su identidad.

Secuencia Genbank	ORF	Cebadores	Posición
FAB2 L34346	99-1334	5'-GCAAGAGTCAAGGAGTCGTCAA-3' 5'-CTGCTTCACCTT ACAGTGACT-3'	1209 1420
FAD2 L43921	85-1236	5'-CTCTCACCTCCTCTTCACAC-3' 5'-GAACTCCATAAACACACACCACA-3'	9 856
FAD3 L22964	855-1997	5'-GACAACTGGCTTCTCTGGCT-3' 5'-CTCAGTCTCGTTGCGAGTGGA-3'	1080 1998
FAD6 L29215	90-1364	5'-CCCT TGTGTGAGCTTAATTC-3' 5'-GAGTTCCAACAATGTCTT CTACC-3'	51 642
FAD7 L22965	169-1530	5'-GAACCTGACCAAATAAATAAACC-3' 5'-CTGCCACTACCTTGTTTGTGTCC-3'	103 298
FAD8 TC204934	444-1424	5'-CAAGCAAGAGGGTAAACATGCTGTATT-3' 5'-ATACTTCCTACCAACCCATTATTA-3'	209 350
ACTINA U60503	140-533 853-1446	5'-ATTGTAGGTTCGTCCTCGTC-3' 5'-TTGCATAAAGTGA AAGAACAG-3'	186 518

Tabla 2-1: *Números de acceso de las secuencias de cDNA de las desaturasas analizadas en este estudio. También se muestra la posición del marco abierto de lectura (ORF) y la posición y secuencia de los cebadores escogidos para cada gen.*

Las PCRs se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) en tubos de 0,2 ml en los que se dispuso la siguiente mezcla de reacción:

cDNA	8 µl
dNTP mix (10 mM)	3,5 µl
Tampón Taq × 10	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	4 µl

Oligo 5' (10 μ M)	2 μ l
Oligo 3' (10 μ M)	2 μ l
H ₂ O miliQ	24,5 μ l
Taq Platinum (5 u/ μ l)	1 μ l

Como se muestra en la figura 2-6, todas las PCR realizadas constaron de una etapa de desnaturalización y activación de la DNA polimerasa (Taq Platinum, Invitrogen) a 93 °C 3 min, seguida de varios ciclos compuestos por una etapa de desnaturalización a 93 °C 1 min, otra de hibridación de los cebadores y otra de extensión. El número de ciclos varía para cada cDNA y la temperatura de hibridación (T_m) varía para cada pareja de cebadores (Tabla 4). Todos los programas de PCR se finalizaron con una etapa de extensión a 72 °C durante 10 min.

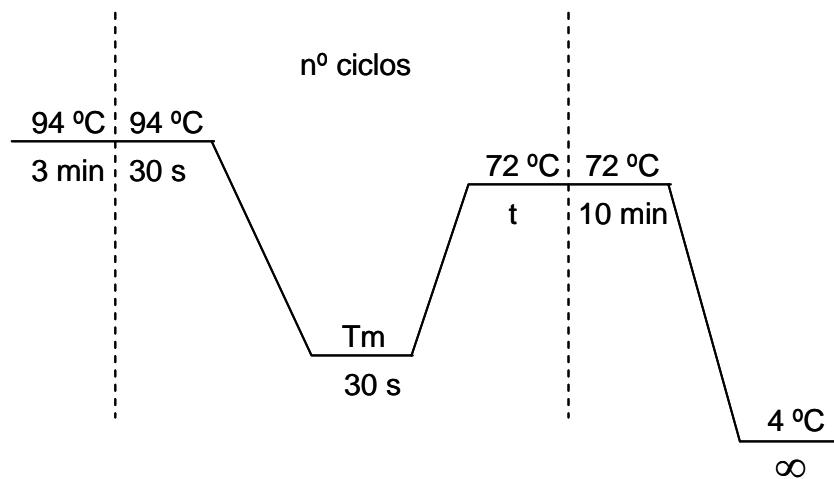


Figura 2-6: Programa tipo de PCR utilizado. La temperatura de hibridación (T_m), el número de ciclos y el tiempo de extensión (t) se ajustaron de forma apropiada para cada gen.

cDNA	Tm (°C)	Nº ciclos	Tiempo extensión (s)	Tamaño del producto (pb)
FAB2	52	37	45	221
FAD2	64	32	90	847
FAD3	53	33	90	917
FAD6	55	35	45	580
FAD7	55	40	45	206
FAD8	50	38	45	141
ACTINA	46	31	45	334

Tabla 2-2: Número de ciclos y temperatura de hibridación a la que se ha realizado cada amplificación, así como el tamaño del producto amplificado.

Análisis de los productos de PCR

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. La concentración de agarosa de los geles depende del tamaño del fragmento que se desea analizar. En nuestro caso, debido a la diversidad de tamaño, se utilizaron geles desde el 0,7 % de agarosa para los fragmentos más grandes, hasta el 2 % para los más pequeños. Para preparar el gel, la agarosa se fundió mediante calentamiento y con agitación en tampón TBE. Una vez preparada la disolución de agarosa, se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 5 µg/µl, se vertió en el molde del gel y se colocó el peine para formar los pocillos. El bromuro de etidio se une al DNA y fluoresce bajo luz ultravioleta. Una vez solidificado el gel, se retiró el peine y se colocó con el molde en la cubeta de electroforesis. La cubeta se rellenó con TBE hasta cubrir el gel y se dispusieron en los pocillos 15 µl de la mezcla de PCR a los que se les añadieron 3 µl de tampón de carga. Los productos de PCR se observaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta en un equipo de análisis de imágenes (Gel Doc, BioRad).

Tampón de carga: EDTA (pH=8) 50 mM, Glicerol 50 % (v/v), TBE × 1, Azul de bromofenol 0,05 % (p/v)

TBE: Tris-borato (pH=8) 90 mM, EDTA 2 mM

2.5.2.2. RT-PCR cuantitativa a tiempo real

La síntesis de cDNA se realizó como se describe en el apartado 6.2.1. Las PCRs cuantitativas a tiempo real se realizaron en un termociclador iCycler (Biorad) utilizando el reactivo SyBr Green[®] mix (Biorad). La mezcla de reacción contenía:

cDNA	2 µl
SyBr Green [®] mix	12,5 µl
Cebador 5' (5 µM)	1,5 µl
Cebador 3' (5 µM)	1,5 µl
H ₂ O miliQ	5,5 µl

Los cebadores se diseñaron con el programa *Primer Express* (Applied Biosystems) de forma que su temperatura de hibridación fuera 59 ó 60 °C y que el fragmento que amplificaran tuviera un tamaño de 70 pb (tabla 2-3). De esta manera, además de permitir analizar de forma simultánea varios genes, se minimizan los problemas de hibridación y señales inespecíficas. El programa de PCR consistió en una etapa de desnaturalización y activación de la Taq polimerasa de 5 min a 95 °C seguida de 40 ciclos consistentes en una etapa de desnaturalización de 15 s a 95 °C y una etapa de hibridación y extensión de 1 min a 60 °C. La fluorescencia emitida por el SyBr Green[®] se midió al final de la etapa de extensión de cada ciclo (figura 2-7A).

Secuencia	Cebador	Secuencia del Cebador
FAB2	FAB2FQ	5'-AACCGAGAACAGCCCCTACC-3'
	FAB2RQ	5'-CGTGGGATATGAAGGTTGCC-3'
FAD2	FAD2FQ	5'-ACTGATGTTCCCTCCTGCCAAC-3'
	FAD2RQ	5'-TGAGGTTTTTCAAATGGCACC-3'
FAD3	FAD3FQ	5'-GACCACTTCGTAAGTGACACTGGA-3'
	FAD3RQ	5'-ACTCAGTCTCGTTGCGAGTGGA-3'
FAD6	FAD6FQ2	5'-ATGCACTGGGTCTCTTCATGAT-3'
	FAD6RQ2	5'-TTGCAGTCCCTGTCCATAACC-3'
FAD7	5'FAD7RT	5'-CAGGAACCTGACCAAATAAATAAACC-3'
	3'FAD7RT	5'-TGCCATTGGACTAAAAAATGAAACT-3'
ACTINA	ACTFQ4	5'-ACCTCAGCCGAGCGTGAAAT-3'
	ACTRQ4	5'-TGCTCGTAGTCAAGGGCAATG-3'

Tabla 2-3: Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa

Cálculo de la eficiencia

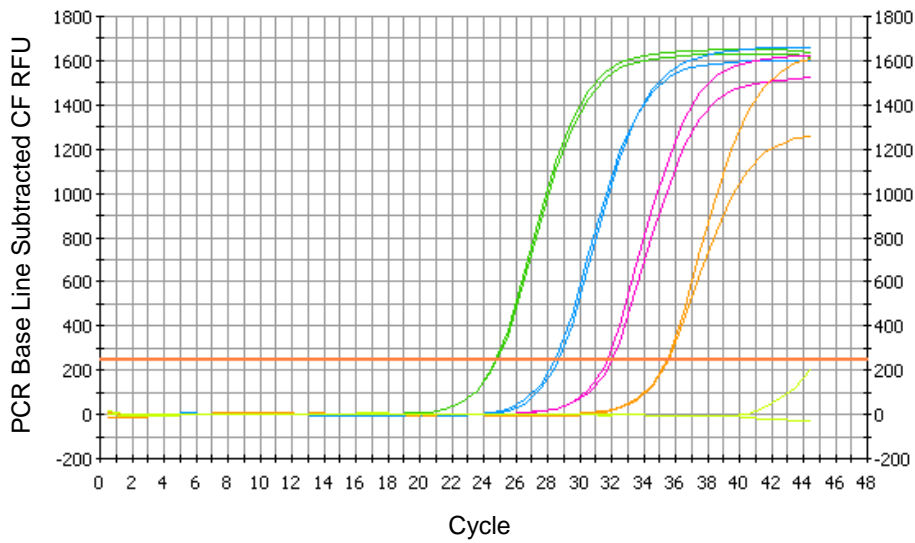
La eficiencia de una PCR se define como la velocidad a la que el amplicón se está generando y se expresa generalmente como un porcentaje. La eficiencia es el 100 % cuando la cantidad del amplicón se dobla en cada ciclo de la fase exponencial de la reacción de PCR. La estimación de este parámetro puede realizarse a partir de la regresión del ciclo umbral frente al logaritmo de la cantidad inicial de DNA. Como en nuestro caso no se conoce la concentración de las muestras, se realizó la regresión frente a una serie de diluciones seriadas (1, 1:10, 1:100 y 1:1000) de una muestra de cDNA (figura 2-7B). La pendiente de esta recta proporciona el valor de la eficiencia según la ecuación:

$$e = 10^{-1/a} - 1 \quad (3)$$

donde e , es la eficiencia y a , es la pendiente de la regresión.

Cada dilución de la muestra se determinó por duplicado y sólo se consideraron válidas aquellas parejas de cebadores cuya eficiencia estuviera comprendida entre el 90 y el 100 %. Como ejemplo se muestran en la figura 2-6 los datos de eficiencia obtenidos para *FAB2*.

A



B

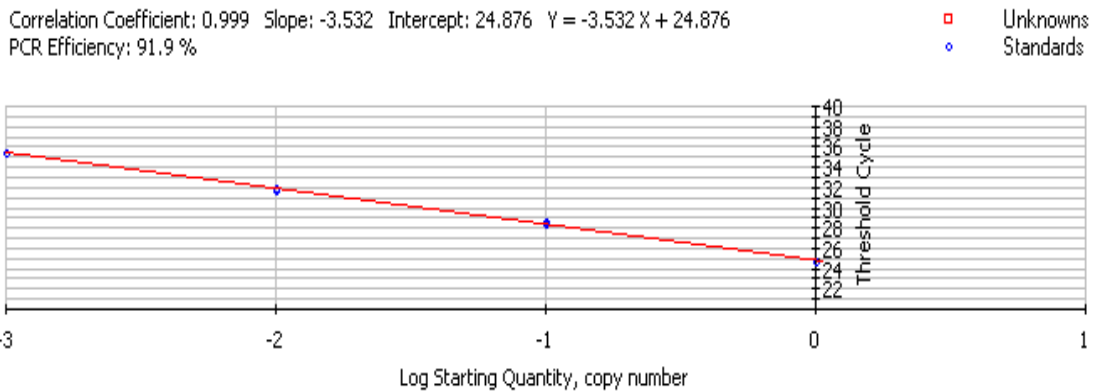


Figura 2-6: Cálculo de la eficiencia de la PCR de FAB2. (A) PCR cuantitativa de una muestra de cDNA (verde) y sus diluciones seriadas 1:10 (azul), 1:100 (rosa), 1:1000 (naranja) y el correspondiente control negativo (amarillo). (B) Regresión del ciclo umbral frente al logaritmo de la cantidad de DNA. La eficiencia se dedujo a partir de la pendiente de la recta.

Curva de desnaturalización (curva de “melting”)

La especificidad de cada PCR se comprobó mediante la realización de una curva de desnaturalización del amplicón una vez finalizada la PCR. Esta curva de desnaturalización consistió en un calentamiento desde 55 °C hasta

95 °C aumentando la temperatura medio grado cada 10 s. Este aumento de la temperatura desnatura el DNA amplificado produciéndose cambios en la fluorescencia debidos a la disociación del SyBr Green® de la doble hélice. La representación de estos cambios de la fluorescencia con la temperatura ($-d(RFU)/dT$) frente a la temperatura proporciona la curva de desnaturalización del producto amplificado (figura 2-7). Cada producto amplificado posee una temperatura característica de desnaturalización según su longitud y secuencia, por lo que las curvas de desnaturalización permiten comprobar si el par de cebadores utilizados amplifican un único fragmento o fragmentos heterogéneos, así como si se producen dímeros de los cebadores.

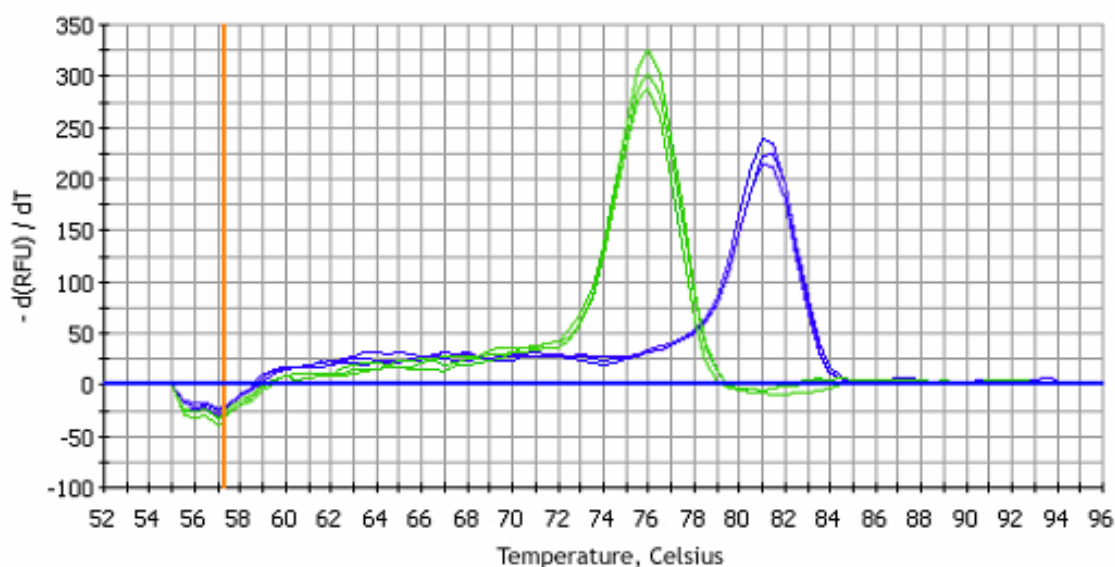


Figura 2-7: Curvas de desnaturalización de los fragmentos amplificados de las ω 3 desaturasas de plantas: FAD3 (azul) y FAD7 (verde).

Cuantificación

Las cuantificaciones se realizaron con muestras procedentes de al menos dos experimentos independientes y cada muestra se analizó por

triplicado. Todas las cuantificaciones se realizaron de forma relativa tomando como gen control o “housekeeping” el gen de la actina o el RNA 18S y tomando una de las muestras del experimento como referencia o calibrador. Los niveles relativos de RNA mensajero se calcularon utilizando el método del $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) que se resume en la siguiente expresión algebraica:

$$\text{Inducción} = 2^{[\Delta Ct(\text{muestra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})]} \quad (4)$$

$$\Delta Ct(\text{muestra}) = Ct(H)_m - Ct(P)_m \quad (5)$$

$$\Delta Ct(\text{calibrador}) = Ct(H)_c - Ct(P)_c \quad (6)$$

El *ciclo umbral* (Ct) es el ciclo al que comienza a detectarse el amplicón. $Ct(H)_m$ y $Ct(H)_c$ representan el valor de Ct para el gen control o “housekeeping” en la muestra a analizar y en la muestra que se ha tomado como calibrador respectivamente. De modo análogo, $Ct(P)_m$ y $Ct(P)_c$ representan el valor de Ct para el gen cuya expresión se desea estudiar (gen problema) en la muestra a analizar y en la muestra que se toma como calibrador respectivamente.

2.5.3. Clonaje de los productos de PCR

Los productos de amplificación obtenidos en la RT-PCR semicuantitativa fueron clonados y secuenciados para identificarlos con total seguridad. Para realizar este clonaje, los productos de PCR se extrajeron del gel de agarosa, se introdujeron en el plásmido pGEM-T-easy y se transformaron en células de *Escherichia coli* de la cepa DH5 $_{\alpha}$.

2.5.3.1. Extracción de los productos de PCR de geles de agarosa mediante lana de vidrio

Una vez separados los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, éstos se visualizaron bajo luz ultravioleta y la zona del gel donde se localizó la banda se recortó con un bisturí estéril. El fragmento de agarosa que contiene el DNA se troceó y se colocó junto con 20 µl de H₂O miliQ estéril en un eppendorf de 0,5 ml al que se le había practicado un orificio en el fondo y en el que se había dispuesto lana de vidrio hasta aproximadamente la mitad de su volumen. El tubo con la lana de vidrio y la agarosa se acopló a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 10 min (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H). El eluato obtenido tras la centrifugación contiene el DNA. El tubo con la lana de vidrio se acopló a un nuevo eppendorf de 1,5 ml, se añadieron otros 20 µl de H₂O milliQ estéril y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones anteriores. El eluato se mezcló con el eluato anterior y se eliminaron posibles contaminaciones de proteínas extrayendo con un volumen de fenol:cloroformo-isoamilalcohol (1:1 en volumen) y posteriormente con un volumen de cloroformo:isoamilalcohol (24:1 en volumen). Finalmente, el DNA se precipitó con dos volúmenes de etanol y 1/5 del volumen de acetato de sodio 3 M a -20 °C durante como mínimo 1 h y se resuspendió con H₂O milliQ estéril.

2.5.3.2. Ligación y clonaje de los productos de PCR en el plásmido pGEM-T-easy

Una de las características de la Taq polimerasa que se utilizó en las reacciones de PCR (Taq Platinum, Invitrogen), es que introduce una base adenina (A) en los extremos 3' del amplicón. El plásmido pGEM-T-easy (Promega) contiene una timina (T) en los extremos 5' lo que permite la unión

del fragmento amplificado mediante la acción de la enzima T4 ligasa (Promega). La mezcla de ligación debe contener, de forma aproximada, cantidades equimolares de plásmido y fragmento que se desea clonar para que la ligación sea óptima. La ligación se realizó mediante una primera incubación durante 1 h a temperatura ambiente seguido de una incubación posterior durante toda la noche a 8 °C.

2.5.3.3. Transformación de *Escherichia coli* con la mezcla de ligación

Las células competentes de la cepa DH5_α de *E. coli* (Promega) se transformaron mediante choque térmico con las mezclas de ligación. Para ello, las bacterias competentes que se conservan a -80 °C, fueron descongeladas en hielo durante 15-20 min. Una vez descongeladas, se añadieron 100 µl de bacterias a 10 µl de ligación y se incubó en hielo durante otros 20 min. A continuación, el tubo conteniendo la mezcla de ligación se transfirió rápidamente a 37 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 5 min. Seguidamente, se añadieron a la mezcla 500 µl de medio LB y se incubó durante otros 30 min a 37 °C. La mezcla se sembró en placas de LB con ampicilina (50 µg/ml) a razón de 200 µl de mezcla por placa. La ampicilina fue utilizada como marcador selectivo, ya que el vector pGEM-T-easy confiere resistencia a este antibiótico. Tras incubar las placas sembradas a 37 °C durante toda la noche, aparecieron abundantes colonias correspondientes la mayoría de las veces a clones positivos conteniendo la construcción deseada. Las colonias así obtenidas se numeraron, y se inocularon algunas de ellas en tubos con 3 ml de LB y 100 µg µl⁻¹ de ampicilina para el posterior análisis de su DNA plasmídico de forma individual.

2.5.3.4. Aislamiento de DNA plasmídico: método de la lisis alcalina

Tras incubar toda la noche a 37 °C los cultivos en medio LB líquido con ampicilina, se procedió a aislar su DNA plasmídico para determinar si contenían el fragmento deseado clonado en el plásmido pGEM-T-Easy. Para ello, 1,5 ml del cultivo líquido fueron centrifugados a 13000 r.p.m. durante 3 min. Tras retirar cuidadosamente con una pipeta Pasteur el sobrenadante, se resuspendió el pellet de bacterias con 100 µl de disolución I mediante agitación con vortex. Para digerir la pared bacteriana se añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/ml. A continuación, se añadieron 200 µl de disolución II preparada en el momento, se voltearon los tubos varias veces y se dejaron en hielo. Seguidamente, se añadieron 150 µl de disolución III y se agitó nuevamente utilizando un vortex. Tras incubar los tubos en hielo durante 15 min, se centrifugaron a 13000 r.p.m. 5 min (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) y se recogió el sobrenadante que contiene el DNA plasmídico. El DNA genómico de la bacteria se desnaturalizó en las condiciones alcalinas del medio de extracción y precipitó en esta centrifugación. Las posibles contaminaciones de proteínas se eliminaron del sobrenadante extrayendo con un volumen de una mezcla (1:1 en volumen) de fenol y de cloroformo:isoamilalcohol (24:1 en volumen). El DNA, que permanece en la fase acuosa de dicha extracción, se precipitó con dos volúmenes de etanol y 1/5 del volumen de acetato de sodio 3 M a -20 °C durante al menos 1 h. El pellet de DNA plasmídico recogido por centrifugación a 12000 r.p.m. durante 30 min (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H), se lavó con etanol al 70 %, se secó al aire y se resuspendió en 20 µl de H₂O milliQ estéril.

Una alícuota del DNA plasmídico obtenido se digirió con enzimas de restricción adecuadas que cortaran el plásmido pGEM-T-Easy liberando el

producto de PCR clonado. Los fragmentos originados en las digestiones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se observaron bajo luz ultravioleta. Los plásmidos que habían incorporado el inserto del tamaño deseado se enviaron a secuenciar para comprobar la identidad del producto clonado y las colonias que los contenían se conservaron en glicerol a -80 °C. La secuenciación del DNA plasmídico fue realizada en el Servicio de Secuenciación del CNIO (Madrid).

Disolución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl (pH=8) 25 mM, EDTA 10 mM

Disolución II: NaOH 0,2 N, SDS 1 % (p/v)

Disolución III: Acetato potásico 60 ml, Ácido acético 11,5 ml, H₂O 28,5 ml

2.5.4. Aislamiento de polirribosomas

El aislamiento de polirribosomas a partir de suspensiones celulares de soja, se realizó según lo descrito por Horiguchi y col. (2000) con algunas modificaciones. Una vez recogidas mediante filtración con papel Miracloth (Hoechst, Calbiochem) y lavadas con medio fresco, las células de soja (0,6 g) se rompieron en un mortero con nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino. El polvo se mezcló con 1,5 ml del tampón de aislamiento agitando con un vortex. Tras centrifugar a 4 °C y 13000 r.p.m. durante 15 min (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) el sobrenadante se depositó con una pipeta sobre un gradiente de sacarosa del 15 al 60 %. Las disoluciones de sacarosa se prepararon en tampón de aislamiento y el gradiente (10 ml) se preparó con un formador de gradientes y la ayuda de una bomba peristáltica. La muestra se centrifugó a 32000 r.p.m. durante 3 h en un rotor basculante (ultracentrífuga Beckman L8-70M; rotor SW41Ti) y recogimos todo el contenido del tubo, desde la superficie hasta el fondo, en alícuotas de 500 µl. Medimos la absorbancia a 254 nm de todas las fracciones mezclando aquellas con valores de absorbancia similares.

El RNA presente en cada alicuota se extrajo con un volumen igual de una mezcla (1:1 en volumen) de fenol y de cloroformo-isoamilalcohol (24:1 en volumen). Tras centrifugar a 4000 r.p.m. durante 10 min (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H) separamos la fase acuosa y precipitamos el RNA con dos volúmenes de etanol y 1/5 del volumen de acetato de sodio 3 M durante toda la noche a -80 °C. El pellet de RNA, recogido mediante centrifugación a 4 °C y 10000 r.p.m. durante 25 min (centrífuga Beckman Allegra™ 21R; rotor F2402H), se secó con nitrógeno y se resuspendió en 5 µl de H₂O con 0,1 % (v/v) de DEPC.

Tampón de aislamiento: Tris-HCl (pH=8,5) 50 mM, KCl 250 mM, MgCl₂ 50 mM, DTT 20 mM, Cicloheximida 10 µg/ml, Heparina 100 µg/ml

2.5.5. Northern blot

El RNA aislado de las distintas fracciones polisomales se analizó mediante la técnica de Northern blot. Esta técnica consiste en la separación de las muestras de RNA mediante electroforesis desnaturizante en gel de agarosa y en su transferencia a una membrana para la posterior hibridación con una sonda específica para cada gen de interés.

Los geles de agarosa utilizados fueron del 1,2 % y se prepararon añadiendo los siguientes componentes:

Agarosa	3 g
HEPES EDTA × 10	25 ml
H ₂ O con 0,1 % DEPC	190 ml
Formaldehído	40 ml

La agarosa se disolvió calentando y con agitación. El formaldehído, que actuó como agente desnaturizante, se añadió una vez que la disolución de agarosa se hubo enfriado ligeramente. Para la formación del gel, la disolución

de agarosa se depositó en un molde de 15 cm × 15 cm y se colocó el peine para formar los pocillos. Una vez solidificado, se retiró el peine y se introdujo el gel con el molde en la cubeta de electroforesis que se rellenó con tampón de electroforesis hasta cubrir el gel.

Antes de ser depositadas en los pocillos, las muestras de RNA se desnaturalizaron a 65 °C durante 3 min en presencia de tres volúmenes de tampón de carga × 4. Tras disponer las muestras en los pocillos, la electroforesis se llevó a cabo a una intensidad constante de 20 mA hasta que el frente de colorante migró unos 11 cm (aproximadamente 14 h). El tampón de electroforesis se mantuvo en agitación durante toda la electroforesis con un agitador magnético, y el bromuro de etidio que migró en dirección contraria a la del RNA, se transportó del polo positivo al polo negativo con la ayuda de una bomba peristáltica conectada a los reservorios de la cubeta de electroforésis.

Finalizada la electroforesis, el gel fue expuesto a luz ultravioleta durante 5 min, realizándose dos lavados de 10 min con H₂O miliQ estéril, dos lavados de 20 min con tampón SSC × 20. Tras estos lavados, el gel fue expuesto a luz ultravioleta durante 10 min para favorecer la posterior transferencia de las moléculas de RNA a la membrana.

A continuación, los distintos RNA separados en el gel fueron transferidos a una membrana. A diferencia de la transferencia de proteínas que realizamos mediante carga eléctrica, la transferencia de RNA se realizó por capilaridad. El gel se dispuso sobre una tira de papel Whatman que cubría una placa de vidrio en una bandeja en la que se vertió tampón SSC × 20 hasta una altura de unos 2 cm (figura 2-8). Sobre el gel se colocó la membrana (Hybond N⁺, Amersham) hidratada con H₂O miliQ y posteriormente saturada con tampón SSC × 20 y sobre ésta dos trozos de

papel Whatman empapados en tampón SSC $\times 20$. Sobre todo esto se colocó papel de filtro hasta unos 15 cm de altura y un peso aproximado de 1 kg. El tampón SSC $\times 20$ asciende por capilaridad arrastrando las moléculas de RNA desde el gel hasta la membrana donde quedan fijadas gracias a la carga positiva de la misma. Tras realizar la transferencia durante toda la noche, la membrana se expuso a luz ultravioleta durante 5 min y se mantuvo 2 h a 80 °C, quedando lista para la hibridación.

Tampón de electroforesis (1L): HEPES EDTA $\times 10$ 100 ml, Formaldehído 160 ml, H₂O miliQ estéril 740 ml

Tampón de carga $\times 4$: Formamida 50 %, Formaldehído 16 %, Hepes-EDTA, Glicerol 10 %, Xylene-cianol 0,025 M, Azul de bromofenol 0,025M, BET 10 ng/ml

Tampón SSC $\times 20$: NaCl 175,3 g/l, Citrato sódico 88,2 g/l

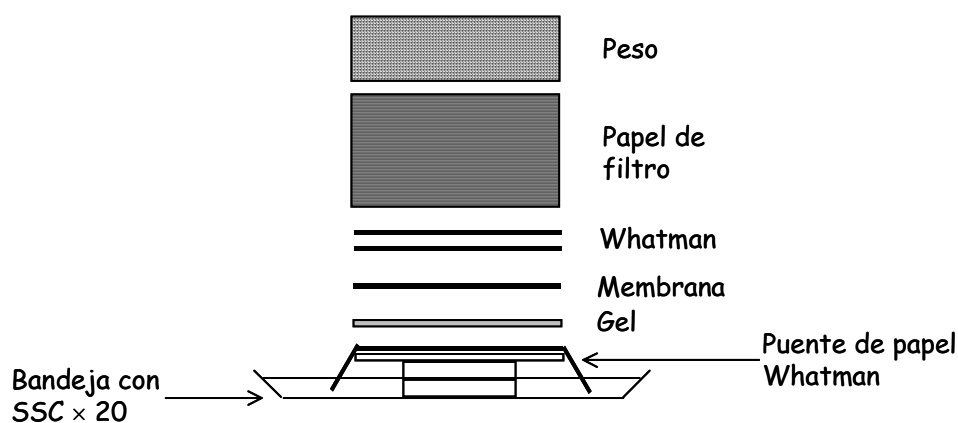


Figura 2-8: Esquema del montaje realizado para la transferencia de RNA a una membrana de nitrocelulosa

Hibridación de la membrana

Las membranas se hibridaron con sondas de los genes *FAD7* y *ACTINA*. La *ACTINA* fue utilizada como gen control o “housekeeping”. Los productos de PCR obtenidos con los cebadores específicos para los cDNA de dichos genes (tabla 2-1) se utilizaron como sonda. Las sondas se marcaron

con fósforo radiactivo ($\alpha^{(32}\text{P})\text{dCTP}$, Amersham) utilizando el kit Megaprime™ DNA labelling (Amersham-Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de realizar la hibridación se incubó la membrana en el horno de hibridación con el tampón de prehibridación (Rapid-Hyb buffer, Amersham-Pharmacia) a 42 °C durante al menos 4 h. Esta prehibridación bloquea la membrana impidiendo que la sonda se una de forma inespecífica. Tras desnaturalizar la sonda marcada a 95 °C durante 5 min, se añadió al tampón de prehibridación incubándose la membrana en el horno de hibridación a 42 °C durante toda la noche. Posteriormente, se realizó un lavado a la membrana con tampón SSC \times 2 seguido de dos lavados con SSC \times 2, 0,1 % SDS de 5 min a temperatura ambiente y dos lavados con SSC \times 0,1, 0,1 % SDS de 5 min a temperatura ambiente. Finalmente la membrana se secó al aire y se detectó la señal radioactiva (FX molecular imager, BioRad).

3. RESULTADOS

3.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE PLANTAS

3.1.1. Composición de ácidos grasos de suspensiones celulares de soja crecidas en luz y en oscuridad

Como se ha comentado en Materiales y Métodos, las suspensiones celulares de soja se mantienen normalmente en el medio heterótrofo KN¹ que contiene un 1 % de sacarosa. En estas condiciones nutricionales, no sólo la fotosíntesis, sino también la metabolización de la sacarosa actúa como fuente de energía y de carbono. En este medio de cultivo las suspensiones celulares crecen en tres fases bien diferenciadas (figura 3-1). En la primera fase, la *fase de latencia*, se produce la adaptación de las células al medio de cultivo. En la segunda fase, la *fase exponencial*, las células se dividen aumentando la masa celular. En la tercera fase, la *fase estacionaria*, no varía la masa celular y se produce por agotamiento de algún nutriente o por la producción de algún metabolito secundario dañino para el cultivo.

Para evitar que la sacarosa interfiriera en el estudio del efecto de la luz y del estado redox celular en la actividad de las desaturasas, las células mantenidas en KN¹ se cultivaron en medio KN⁰ que no contiene sacarosa. En estas condiciones la fotosíntesis es la única fuente de energía del cultivo. En este medio de cultivo, y a diferencia de lo descrito anteriormente para los cultivos KN¹, las células mantenidas en luz crecieron más lentamente aunque

Resultados

mostraron un incremento constante del volumen celular (figura 3-2A), sin que puedan distinguirse las tres fases del crecimiento comentadas anteriormente. Las células crecidas en KN^0 muestran, además, un aumento progresivo de la cantidad de clorofila (figura 3-2B). Sin embargo, las células mantenidas en oscuridad en este medio de cultivo, prácticamente no presentaron variación del volumen celular a lo largo del ciclo de cultivo (figura 3-2A) y su contenido de clorofila apenas varió (figura 3-2B). La tinción con I_2K de estas suspensiones celulares muestra la gran cantidad de almidón que almacenan estas células de soja en condiciones normales de cultivo (Bernal y col., 2006a). En oscuridad, las células podrían obtener el carbono y la energía necesaria a partir de dichos acúmulos de almidón.

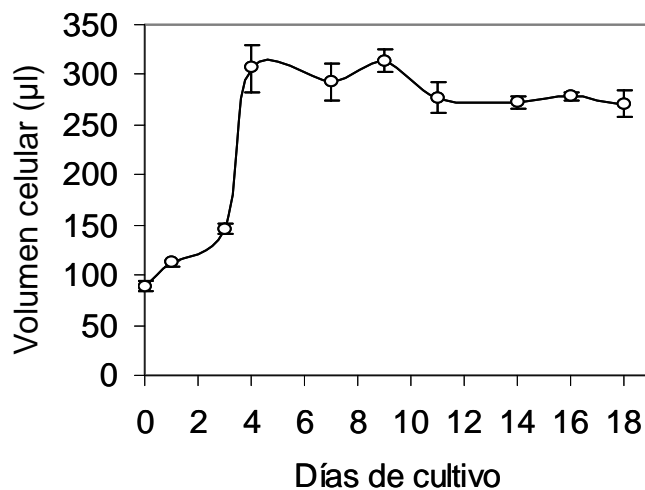
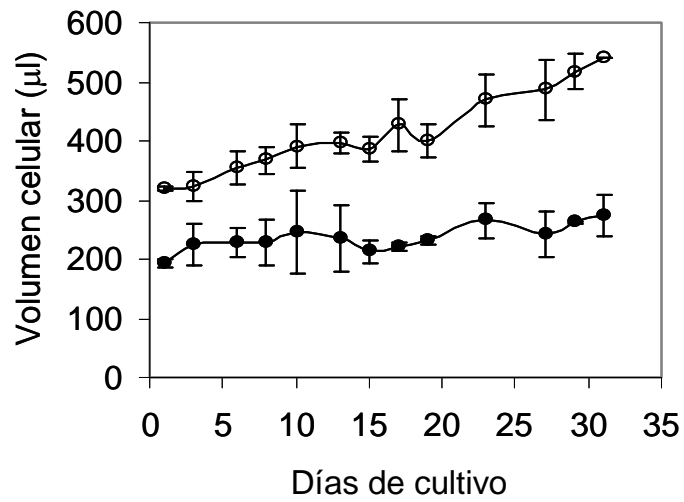


Figura 3-1: Curva de crecimiento a lo largo de un ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de soja crecidas en luz y medio KN^1 . Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

A



B

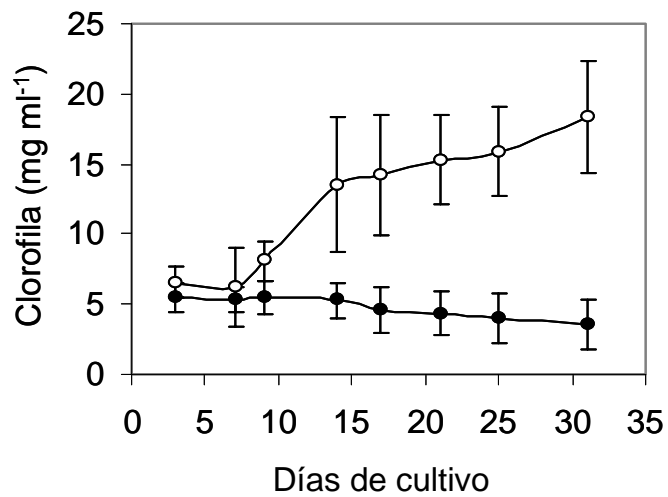


Figura 3-2: Curva de crecimiento (A) y concentración de clorofila (B) a lo largo de un ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de soja mantenidas en luz (\circ) o en oscuridad (\bullet) en KN^0 . Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

3.1.1.1. Composición de ácidos grasos de los lípidos totales

Con el fin de estudiar el efecto de la luz en la desaturación de los ácidos grasos constituyentes de los lípidos, analizamos la composición de ácidos grasos de suspensiones celulares de soja crecidas en medio fotoautótrofo (KN⁰) bajo condiciones normales de iluminación y en oscuridad. En primer lugar, la cantidad de lípidos de cada muestra se determinó gravimétricamente (tabla 3-1). Estos datos indicaron que la cantidad de lípidos, referida tanto a gramo de peso fresco como a cantidad de clorofila, de las células mantenidas en oscuridad era muy similar a la de las células mantenidas en luz. Esta escasa variación de la cantidad de lípidos sugiere que en oscuridad no se produce degradación de las membranas. El contenido de clorofila de las suspensiones celulares mantenidas en oscuridad corrobora esta idea ya que la degradación de las membranas conduciría a un dramático descenso del contenido en clorofila que, de hecho, no se observa (figura 3-2B).

	mg lip/g fw	mg lip/mg Chl
L14	6.98 ± 1.22	6.88 ± 0.58
D14	6.29 ± 1.06	6.20 ± 2.77
L21	5.42 ± 0.25	5.40 ± 0.47
D21	6.01 ± 1.31	6.40 ± 0.56

Tabla 3-1: Determinación gravimétrica de la cantidad de lípidos de las suspensiones celulares de soja crecidas en medio KN⁰ en luz o en oscuridad durante 14 ó 21 días.

La composición de ácidos grasos de los lípidos totales extraídos de estas suspensiones celulares en distintos días del ciclo de cultivo se analizó mediante cromatografía de gases (figura 3-3). La composición de ácidos grasos de nuestras suspensiones celulares ha sido descrita en trabajos

anteriores (Alfonso y col., 2001) y es similar a la obtenida en el pasado para la misma línea celular (Martín y col., 1984), representando los ácidos grasos poliinsaturados más del 65 % de los ácidos grasos totales y siendo el ácido linolénico la especie mayoritaria (alrededor del 50 %) (figura 3-3). Las células mantenidas en luz prácticamente no mostraron cambios en la composición de ácidos grasos a lo largo del ciclo de cultivo. Únicamente se detectó un ligero aumento (5 %) del 18:3 tras 31 días de crecimiento. Sin embargo, las células mantenidas en oscuridad mostraron un descenso progresivo de los ácidos grasos poliinsaturados. Así, los niveles de 18:3 descendieron dramáticamente desde alrededor del 50 % hasta alrededor del 15 % después de 21 días de oscuridad. Tras 31 días de oscuridad, el porcentaje de 18:3 disminuyó hasta representar menos del 10 % de los ácidos grasos totales. De forma similar, los niveles de 18:2 también descendieron aunque en menor cuantía, desde alrededor del 12 % hasta alrededor del 9 %, tras 21 días de oscuridad y hasta alrededor del 5 % tras 31 días de oscuridad. Cabe destacar que este descenso del 18:3 parece preceder al descenso de la cantidad de 18:2. Por el contrario, los niveles de 16:0, 18:0, 20:0 y 18:1 aumentaron en oscuridad. De hecho, el nivel de 16:0 mostró el ascenso más acusado, aumentando su porcentaje molar desde el 19 % hasta casi el 38 %. Cabe señalar también que el descenso obtenido en oscuridad de los niveles de 18:2 y 18:3 no se ve compensado por el aumento de los ácidos grasos 18:0 y 18:1. Este dato sugiere que, además de la desaturación, probablemente la elongación de 16:0 a 18:0 realizada por la enzima KAS II o la elongación de 18:0 a 20:0 también se encontrarían afectadas en ausencia de iluminación.

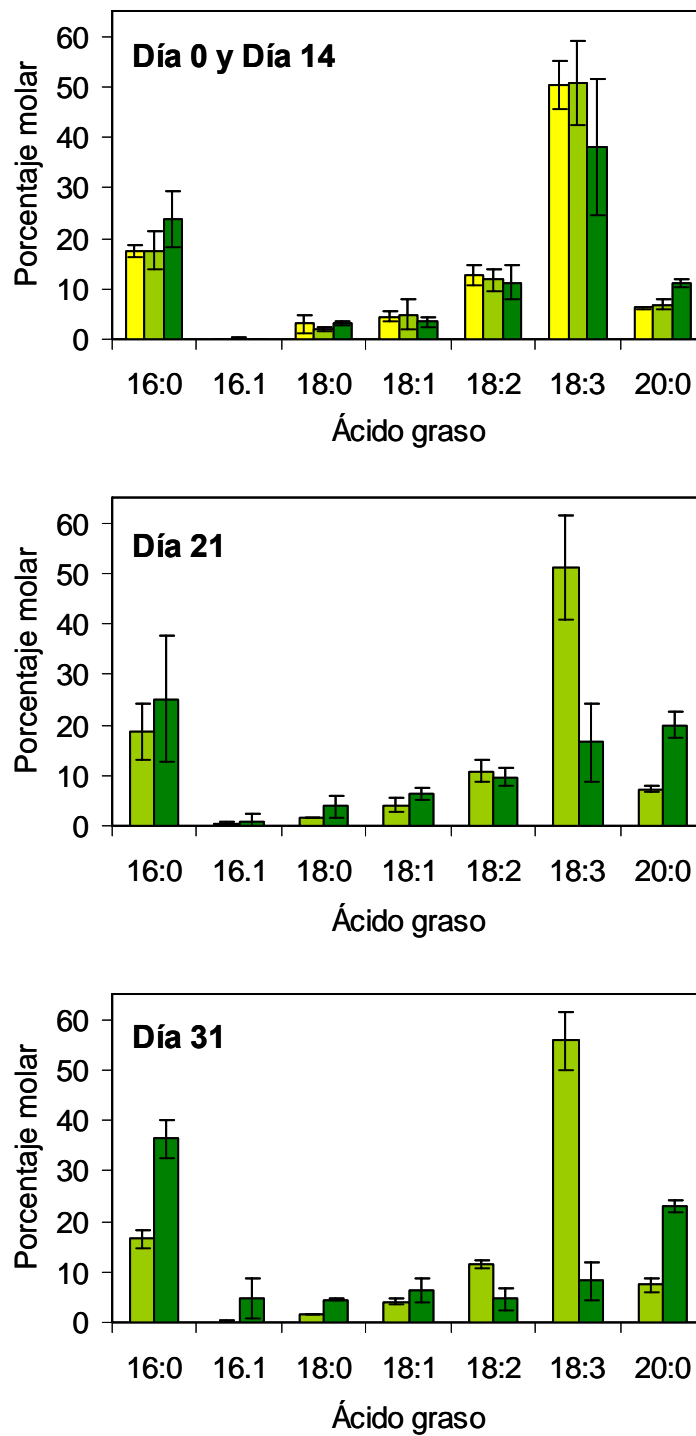


Figura 3-3: Composición de ácidos grasos de las suspensiones celulares de soja inmediatamente después de la dilución (●), de células crecidas en luz (●) y de células crecidas en oscuridad (●). Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

3.1.1.2. Composición de ácidos grasos de distintas clases de lípidos

Con el fin de averiguar si los cambios en la composición de ácidos grasos detectados en las suspensiones celulares de soja mantenidas en oscuridad afectaban más a unas clases de lípidos que a otras, analizamos la composición de ácidos grasos de varias clases de lípidos. Para ello, a partir de los lípidos totales, separamos mediante cromatografía en capa fina las distintas clases de lípidos y analizamos su composición de ácidos grasos mediante cromatografía de gases. En nuestro caso decidimos analizar la composición de ácidos grasos del MGDG, del DGDG y del PG por ser los lípidos que componen las membranas tilacoidales que son las membranas más abundantes en nuestras células de soja. Además también analizamos la composición de ácidos grasos del PC por ser el lípido que se sugiere implicado en el intercambio de ácidos grasos entre el retículo endoplásmico y el cloroplasto. Los resultados de estos análisis se muestran en la tabla 3-2. De forma general, las cuatro clases de lípidos analizadas mostraron descenso de la cantidad de 18:3 en oscuridad. Sin embargo, es en el caso de MGDG donde este descenso es más importante y donde se produce, además, un aumento de la cantidad de 16:0 y 18:1 tal y como se detectaba en el caso del análisis de los lípidos totales. En el resto de los lípidos analizados, estas variaciones son de menor cuantía, no apreciándose diferencias notables entre el PC que se encuentra sobre todo en el retículo y los otros lípidos cloroplásticos como PG y DGDG. Esto no es extraño teniendo en cuenta que la soja es una planta 18:3 y, por tanto, sus lípidos son desaturados en ambos orgánulos. De esta forma los cambios producidos en oscuridad en la composición de ácidos grasos del MGDG, el lípido más abundante de las membranas tilacoidales, son consistentes con los cambios observados en la composición de ácidos grasos de los lípidos totales en estas condiciones.

Lípido	Días cultivo	Composición de ácidos grasos de cada lípido (% molar)				
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3
MGDG	L14	3,1	-	4,6	11,5	80,8
	D14	14,7	4,2	34,3	11,2	30,3
	L21	3,7	-	4,4	12,6	76,5
	D21	25,6	-	12,2	8,5	42,1
DGDG	L14	21	-	57,9	8,6	12,5
	D14	17,3	8,9	59,9	6,4	-
	L21	13,7	-	40	5,4	14
	D21	21,6	4,9	60,2	8,6	-
PG	L14	21,7	3,8	10,6	35,5	28,3
	D14	33	-	12,5	20,3	26,1
	L21	22,6	3,7	26,2	24	21,2
	D21	17,4	4,3	56,4	10,3	3,7
PC	L14	16,7	3,9	9,8	21,3	48,3
	D14	23,7	4	12,5	18	39,1
	L21	19,2	3,9	14,7	20,6	38,5
	D21	22,1	-	28,3	14,7	24,9

Tabla 3-2: Composición de ácidos grasos de las clases de lípidos en las suspensiones celulares de soja crecidas en medio KN⁰ en luz o en oscuridad durante 14 y 21 días.

3.1.2. Efecto de la oscuridad en la expresión de los genes de las desaturasas

A la vista de los resultados de los análisis de la composición de ácidos grasos expuestos anteriormente, estudiamos si los cambios en el grado de insaturación observados en oscuridad, se correlacionaban con cambios en la expresión de los genes de las desaturasas. Para ello, extrajimos el RNA total de los mismos cultivos a partir de los cuales realizamos el análisis de ácidos grasos, y analizamos los niveles de RNA mensajero de los genes de las desaturasas mediante RT-PCR. Este análisis se realizó inmediatamente tras el subcultivo (día 0) y en los días 14 y 21 de crecimiento de las suspensiones celulares (figura 3-4), lo que cubre todo el ciclo de cultivo. El RNA mensajero

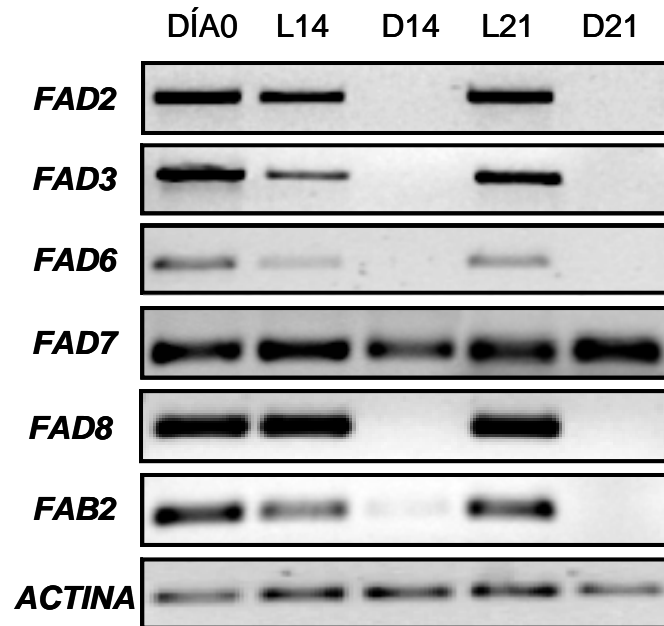


Figura 3-4: Análisis mediante RT-PCR de los genes de las desaturasas. El RNA se aisló de las células tras el subcultivo (día 0) y tras 14 o 21 días de crecimiento en medio KN⁰ en luz (L14; L21) o en oscuridad (D14; D21) y se sintetizó el cDNA. Para cada reacción de PCR se utilizaron los cebadores específicos detallados en la tabla 2-1.

de todos los genes estudiados estaba presente en las células crecidas en luz a lo largo de todo el ciclo de cultivo. Sin embargo, tras 14 días de incubación en oscuridad no se detectaron los mRNA de los genes *FAD2*, *FAD3*, *FAD6*, *FAD8* y *FAB2* (figura 3-4). Cabe destacar que este descenso en los niveles de mRNA, precedió al descenso detectado en los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (figura 3-3). Por el contrario, el mRNA del gen *FAD7* se detectó tras 14 días de incubación en oscuridad en niveles similares a los obtenidos en luz. Es más, tras periodos más largos de incubación en oscuridad, seguimos detectando dicho mRNA (figura 3-4). Sin embargo, como se muestra en la figura 3-3, los niveles de 18:3 descienden acusadamente en

tales condiciones, lo que sugiere que la luz podría regular la expresión del gen *FAD7* mediante un mecanismo diferente a los demás genes.

3.1.3. Efecto de la reiluminación en la composición de ácidos grasos y en la expresión de los genes de las desaturasas

A la vista de los resultados anteriores, decidimos comprobar la reversibilidad del efecto que la luz ejerce tanto sobre la composición de ácidos grasos como sobre la expresión de los genes de las desaturasas. Para ello, las suspensiones celulares mantenidas en medio KN⁰ y en oscuridad durante 14 días se reiluminaron y analizamos su composición de ácidos grasos y la expresión de los genes de las desaturasas tras 4 y 8 días de reiluminación. Estos resultados se muestran en las figuras 3-5 y 3-6. Tras 14 días de crecimiento en oscuridad, las células mostraron un descenso del 18:3 de alrededor del 20 % y un aumento del 16:0 y del 20:0 de alrededor del 7 % y el 11 %, respectivamente (figura 3-5). Sin embargo, la reiluminación de estas células logró evitar el acusado descenso de los ácidos grasos insaturados que se produce en tratamientos más prolongados de oscuridad (figura 3-3), mostrando las células reiluminadas durante 4 y 8 días una recuperación de los niveles de ácidos grasos saturados e insaturados hasta valores similares a los de las células crecidas en luz (figura 3-5).

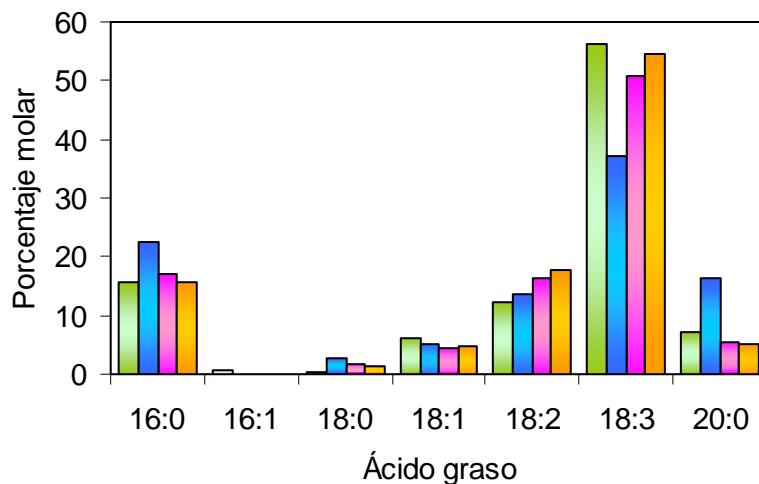


Figura 3-5: Composición de ácidos grasos de las suspensiones celulares de soja mantenidas durante 14 días en luz (●) o en oscuridad (●) y de células crecidas en oscuridad durante 14 días y reiluminadas durante 4 (●) y 8 días (●).

A continuación procedimos a determinar si la recuperación de los niveles de ácidos grasos en las células reiluminadas se correspondía con cambios en el perfil de expresión de los genes de las desaturasas. Para comprobar esto, analizamos mediante PCR la expresión de los genes de las desaturasas en las suspensiones celulares reiluminadas. Efectivamente, tras reiluminar durante 4 y 8 días, los mRNA de los genes *FAD2*, *FAD3*, *FAD6*, *FAD8* y *FAB2*, indetectables en las células crecidas durante 14 días en oscuridad, recuperaron los niveles a los que se encontraban en las células crecidas en luz. Estos resultados sugieren que la luz regula la expresión de los genes *FAD2*, *FAD3*, *FAD6*, *FAD8* y *FAB2* al menos a nivel transcripcional. El mRNA del gen *FAD7*, que se detectaba tanto en células iluminadas en condiciones control como en las células crecidas en oscuridad (figura 3-4), continuó detectándose tras la reiluminación (figura 3-5). Estos datos, conjuntamente con el gran descenso de los niveles de 18:3 observados en

oscuridad, sugieren que la luz podría regular la expresión del gen *FAD7* a través de un mecanismo postranscripcional.

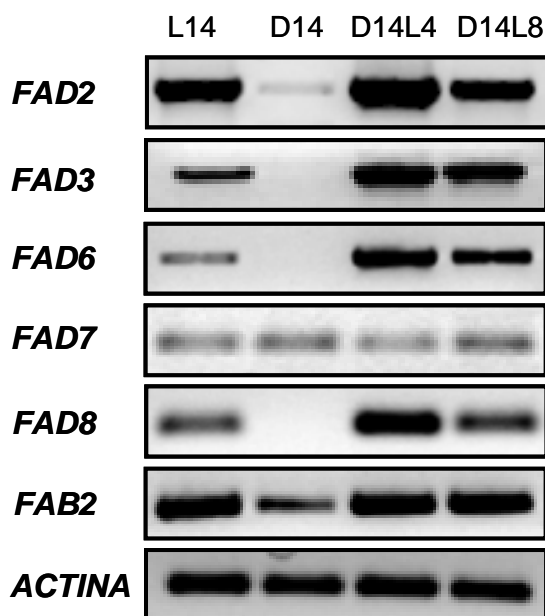


Figura 3-6: Análisis mediante RT-PCR de los genes de las desaturasas. Las suspensiones celulares mantenidas en oscuridad en medio KN^0 durante 14 días (D14) se incubaron durante 4 días (D14L4) y 8 días (D14L8) en luz y se analizó la expresión de los genes de las desaturasas. El gen de la actina se utilizó como gen control en todos los experimentos.

3.1.4. Composición de ácidos grasos de suspensiones celulares de soja tratadas con inhibidores del transporte electrónico fotosintético

A continuación, decidimos estudiar la implicación de los procesos redox fotosintéticos en el mecanismo de regulación por la luz descrito anteriormente. Para ello, las suspensiones celulares fueron tratadas con el inhibidor del transporte electrónico fotosintético atrazina. La atrazina es un inhibidor específico que actúa a nivel de los aceptores secundarios de electrones del PS II. La atrazina desplaza a Q_B de su sitio de unión en D1 bloqueando así el transporte electrónico entre Q_A y Q_B y manteniendo el

“pool” de plastoquinona en estado oxidado. La concentración de atrazina utilizada se determinó analizando la inhibición de la actividad de desprendimiento de oxígeno en las suspensiones celulares (figura 3-7). Finalmente, se optó por una concentración subletal de atrazina de 0,1 μM que producía una inhibición de alrededor del 20-30 % de la actividad de desprendimiento de oxígeno. La utilización de esta concentración subletal nos aseguró que cualquier efecto observado sería debido a la inhibición real del transporte electrónico fotosintético y no a cualquier otro fenómeno causado por el daño celular inducido por el herbicida.

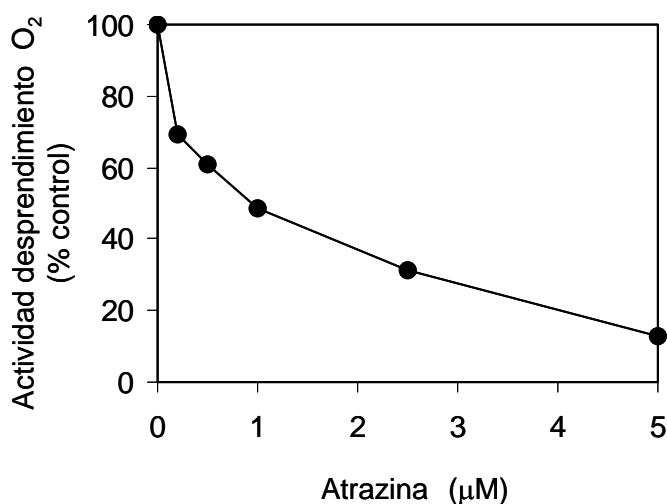


Figura 3-7: Actividad de desprendimiento de oxígeno de las suspensiones celulares de soja tratadas con distintas concentraciones de atrazina.

Para determinar el efecto del transporte electrónico fotosintético, la atrazina fue añadida a las suspensiones celulares tras 19 días de crecimiento en luz y medio KN^0 . De esta forma, evitamos interferencias de alguna posible regulación por desarrollo y nos aseguramos de que el aparato fotosintético de las células es completamente maduro antes de añadir el inhibidor. La

Resultados

composición de ácidos grasos de estas células tras mantenerlas 3 y 6 días en presencia del inhibidor fue analizada, y los resultados se muestran en la figura 3-8. Las suspensiones celulares tratadas durante 3 días con atrazina mostraron una composición de ácidos grasos similar a las de las suspensiones sin tratar. Sin embargo, tras seis días de tratamiento con atrazina, sí que se observaron cambios en la composición de ácidos grasos que sugerían que la inhibición del transporte electrónico fotosintético producía un patrón de ácidos grasos comparable al encontrado en las células incubadas en oscuridad. Concretamente, en presencia de atrazina se observó un descenso del 18:3 y un aumento del 16:0, aunque estos cambios no son tan acusados como los encontrados en oscuridad (figura 3-3). Los niveles de 18:3 descendieron desde alrededor del 50 % hasta el 25 % y el nivel de 16:0 aumentó desde cerca del 19 % hasta alrededor del 30 % (figura 3-8). Por otro lado, y a diferencia de lo observado en oscuridad, no se detectó un descenso del nivel de 18:2 de las células tratadas con atrazina ni un aumento del nivel de 20:0. Sin embargo, nuestros datos indican que, de forma similar a lo ocurrido en oscuridad, el descenso de 18:3 no se ve compensado con el aumento de 18:0 y 18:1 sugiriendo que probablemente la elongación del 16:0 también se ve afectada por el transporte electrónico fotosintético.

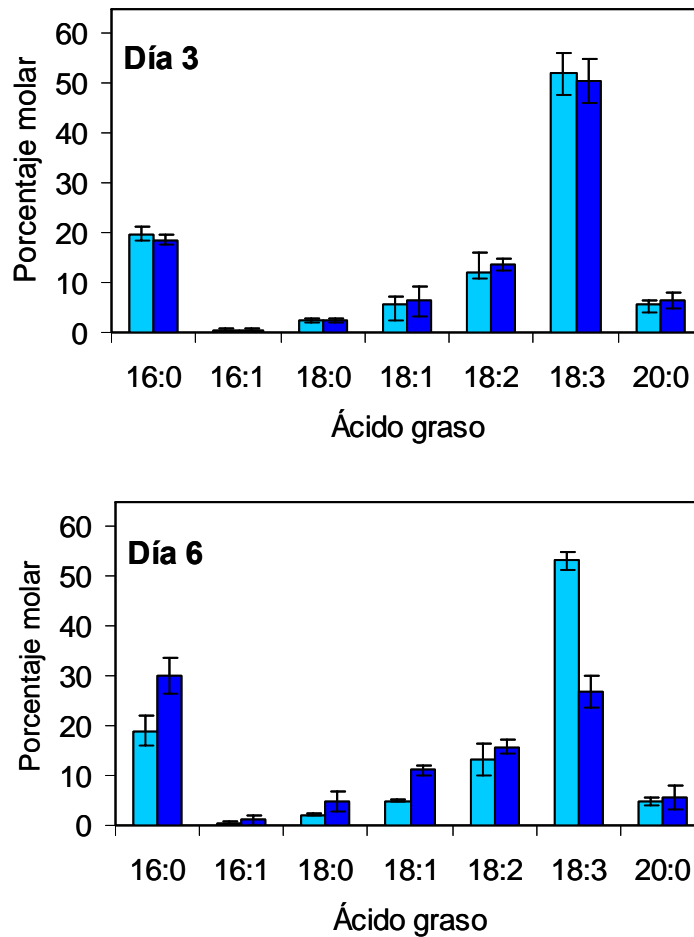


Figura 3-8: Efecto del inhibidor del transporte electrónico fotosintético atrazina sobre la composición de ácidos grasos. Las células fueron crecidas en luz y medio KN^0 durante 19 días. En ese momento se añadió el inhibidor. Control sin atrazina (●); en presencia de $0,1 \mu M$ de atrazina (●) durante 3 días o 6 días. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

3.1.5. Efecto de la inhibición parcial del transporte electrónico fotosintético en la transcripción de los genes de las desaturasas

3.1.5.1. Análisis de los niveles de mRNA de las desaturasas mediante RT-PCR semicuantitativa

Algunos genes regulados por luz se encuentran controlados a través de un mecanismo dependiente del transporte electrónico fotosintético (Pfannschmidt, 2003). Con el fin de comprobar si la luz regula la expresión de los genes de las desaturasas a través de un mecanismo de este tipo, y estudiar la correlación entre los cambios en la composición de ácidos grasos descritos anteriormente y la expresión de los genes de las desaturasas, analizamos el nivel de mRNA de las desaturasas de las suspensiones celulares tratadas con atrazina que utilizamos para el análisis de ácidos grasos. Para ello, extrajimos el RNA de las suspensiones celulares crecidas durante 19 días en luz y medio KN⁰ y tratadas durante 3 días con atrazina y estudiamos mediante RT-PCR la abundancia del mRNA de los distintos genes de las desaturasas (figura 3-9). Los mRNA de *FAD3* y *FAD6* fueron indetectables tras 3 días de tratamiento con el inhibidor, precediendo el descenso de los mRNA de estos genes al descenso de los ácidos grasos (figura 3-8.) Sin embargo, los niveles de mRNA de *FAD2*, *FAD7* y *FAD8* no se vieron afectados por el tratamiento con atrazina, encontrándose tras 3 días de tratamiento niveles similares a los encontrados en las células sin tratar (figura 3-9). En el caso del gen *FAB2*, los niveles de mRNA no descendieron tan dramáticamente como en el caso de los genes *FAD3* y *FAD6*.

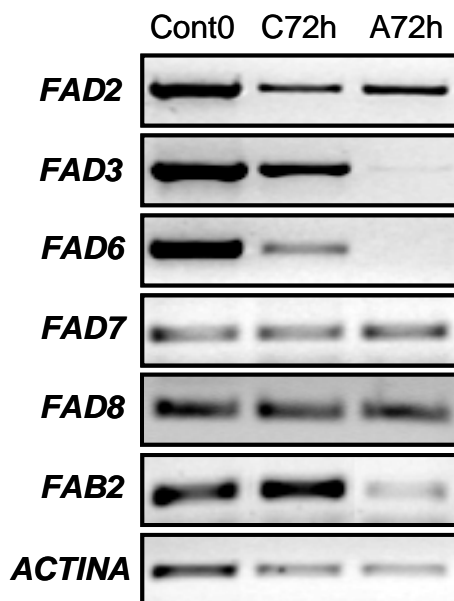


Figura 3-9: Análisis de la expresión de los genes de las desaturasas en suspensiones celulares de soja tratadas con atrazina. RT-PCR de las desaturasas en células de 19 días (Cont 0), células de 19 días crecidas durante 72 horas más en ausencia de atrazina (C72h), o en presencia de atrazina (A72h).

3.1.5.2. Análisis de los niveles de mRNA de las desaturasas mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real

Para analizar con mayor precisión los cambios en los niveles de expresión de los genes de las desaturasas como consecuencia de la inhibición del transporte electrónico fotosintético, analizamos los niveles de cada mRNA de interés mediante RT-PCR en tiempo real (figura 3-10). Los resultados obtenidos con dicha técnica corroboraron los obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa, siendo los niveles de mRNA de los genes *FAD3* y *FAD6* indetectables tras 3 días de tratamiento y los de *FAD2* y *FAB2* similares a los de las células control (figura 3-10). El mRNA de *FAD7* mostró incluso un ligero aumento tras 3 días de inhibición del transporte electrónico fotosintético. Estos resultados sugieren que, para el rango de inhibición del

Resultados

transporte electrónico fotosintético estudiado, sólo los genes *FAD3* y *FAD6* serían sensibles a la inhibición del transporte electrónico fotosintético, mientras que *FAD2* y *FAB2*, no serían sensibles a cambios en el estado redox del cloroplasto. De nuevo, el descenso de 18:3 en presencia del mRNA de *FAD7* sugeriría que el transporte electrónico fotosintético podría regular la expresión de este gen a nivel postranscripcional.

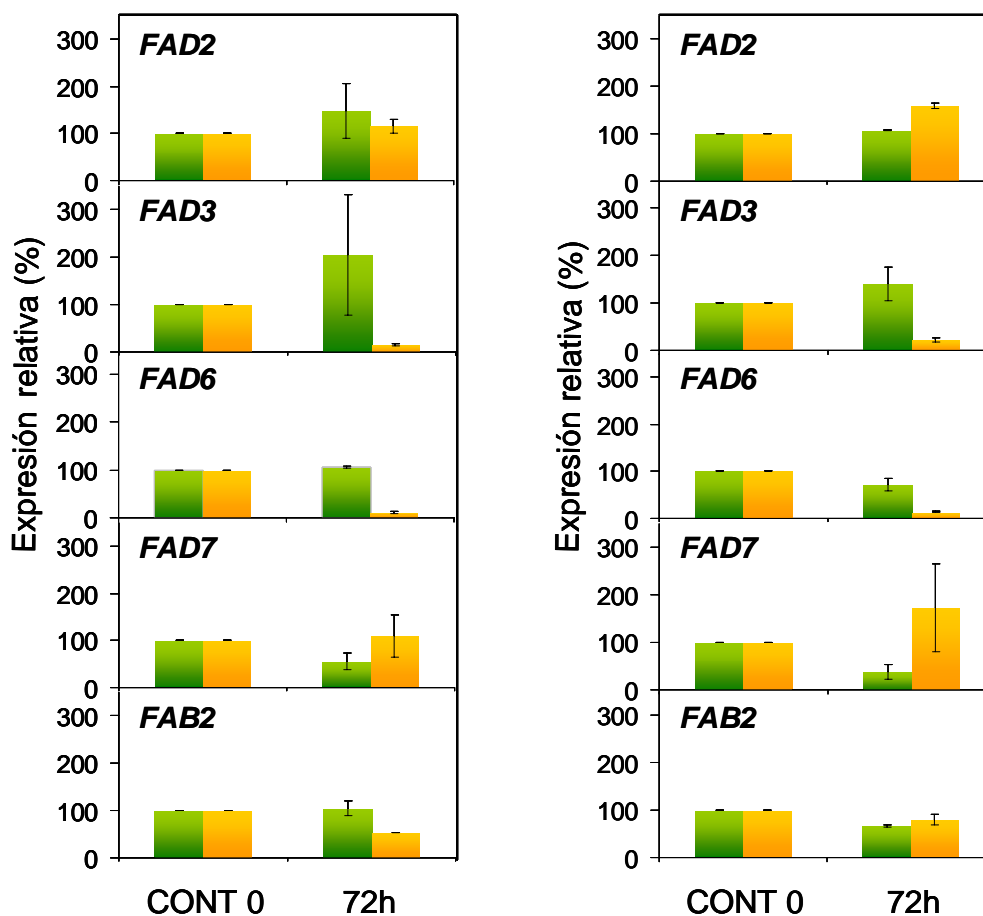


Figura 3-10: Análisis de la expresión de los genes de las desaturasas en células tratadas con atrazina mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el RNA 18S (panel izquierdo) y el gen de la ACTINA (panel derecho) como control. Células de 19 días tratadas durante 72 horas con atrazina (●) y sin atrazina (●).

3.1.6. Efecto de la sacarosa en la composición de ácidos grasos y en la expresión de las desaturasas

Con el fin de comprobar el efecto del poder reductor sobre la desaturación de los ácidos grasos constituyentes de los lípidos, analizamos la composición de ácidos grasos de suspensiones celulares de soja crecidas en medio KN¹, que contiene un 1 % de sacarosa, bajo condiciones normales de iluminación y en oscuridad. El análisis mediante cromatografía de gases de la composición de ácidos grasos de estas suspensiones celulares en distintos días del ciclo de cultivo se muestra en la figura 3-11. Al igual que ocurría en medio KN⁰ (figura 3-3), las células mantenidas en luz prácticamente no mostraron cambios en la composición de ácidos grasos a lo largo del ciclo de cultivo (figura 3-11). En cambio, las células mantenidas en oscuridad sí que mostraron variaciones en el grado de insaturación, produciéndose un descenso del ácido graso insaturado 18:3 y un aumento de los ácidos grasos saturados 16:0 y 20:0 (figura 3-11). Estas variaciones fueron, sin embargo, algo menos pronunciadas que las sufridas por las células mantenidas en oscuridad en medio KN⁰. La principal diferencia entre ambos medios de cultivo radica en el descenso de 18:3. Así, tras 21 días de oscuridad, el porcentaje de 18:3 descendió desde alrededor del 54 % hasta alrededor del 31 % (figura 3-11) mientras que en medio KN⁰ descendía hasta alrededor del 15 % (figura 3-3). Estos resultados sugieren que la presencia de una fuente externa de poder reductor como la sacarosa, retarda el efecto que la oscuridad produce sobre la composición de ácidos grasos.

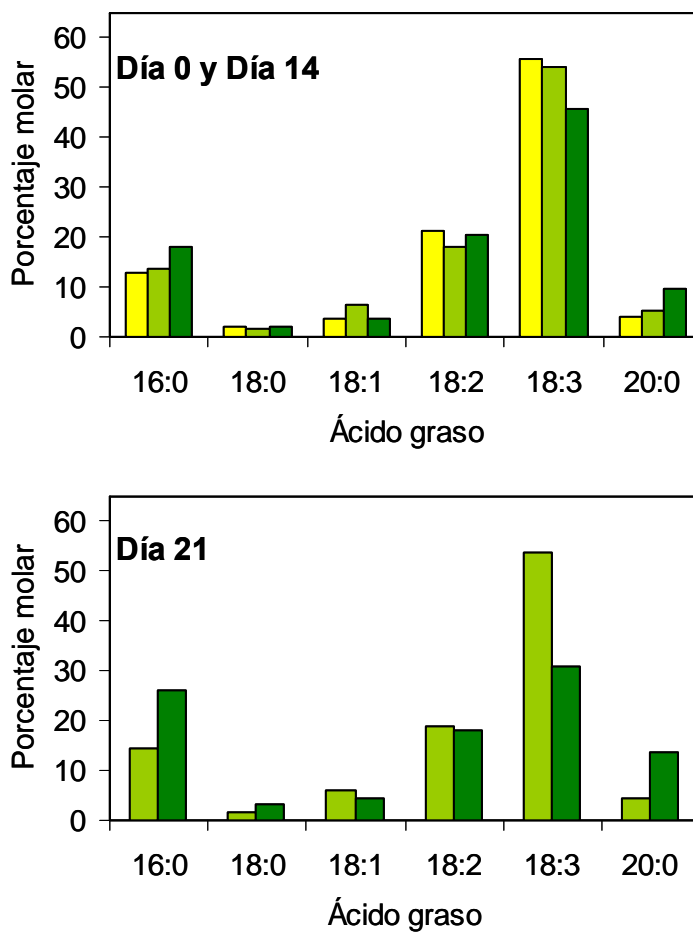


Figura 3-11: Composición de ácidos grasos de las suspensiones celulares de soja crecidas en medio de cultivo con 1 % de sacarosa (KN^1), inmediatamente tras la dilución (●) y mantenidas en luz (●) o en oscuridad (●) durante 14 y 21 días.

A continuación procedimos a comprobar si el retraso que se observó sobre los cambios en la composición de ácidos grasos en oscuridad en presencia de sacarosa también se observaba sobre los perfiles de la expresión de los genes de las desaturasas. Para ello analizamos los niveles de mRNA de los genes de las desaturasas de las suspensiones celulares crecidas en KN^1 y en condiciones de iluminación o de oscuridad (figura 3-12). El RNA mensajero de todos los genes estudiados estaba presente en las células crecidas en luz a lo largo de todo el ciclo de cultivo. En oscuridad, el mRNA

de FAD7 se detectó también a lo largo del ciclo de cultivo (figura 3-12), de forma similar a como ocurría en medio KN⁰ (figura 3-4). Por el contrario, mientras en KN⁰ el descenso de los niveles de mRNA de los genes de las desaturasas sucede antes del día 14 de incubación (figura 3-4), en KN¹ el descenso se produce entre el día 14 y el día 21 de incubación (figura 3-12). Estos resultados indican que la presencia de una fuente externa de poder reductor como la sacarosa retrasa el efecto de la oscuridad sobre la expresión de los genes de las desaturasas.

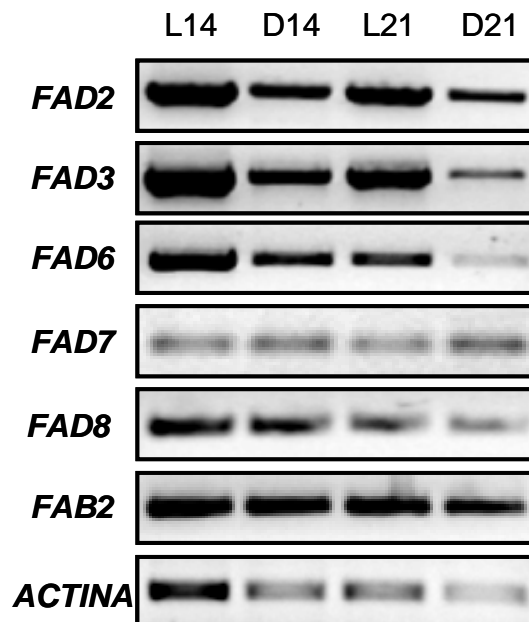


Figura 3-12: Análisis mediante RT-PCR de los genes de las desaturasas en suspensiones celulares de soja crecidas en medio KN¹. El RNA se aisló de las células tras el subcultivo (día 0) y tras 14 o 21 días de crecimiento en luz (L14; L21) o en oscuridad (D14; D21) y se sintetizó el cDNA. Para cada reacción de PCR se utilizaron los cebadores específicos detallados en la tabla 2-1.

3.1.7. Análisis de la regulación postranscripcional del gen *FAD7*

3.1.7.1. Estudio de la estabilidad del mRNA de *FAD7*

3.1.7.1.1. Efecto de la oscuridad en la estabilidad del mRNA de *FAD7*

La presencia de niveles considerables de mRNA del gen *FAD7* en oscuridad, en condiciones en las que la cantidad de 18:3 mostraba un descenso dramático, sugiere que *FAD7* podría encontrarse regulado por la luz a nivel postranscripcional. Esta regulación postranscripcional podría afectar a la estabilidad de su mRNA. Algunos genes regulados por luz, incluyendo algunos genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas como es el caso de *FAD7*, presentan variaciones en la estabilidad de su mRNA en respuesta a cambios en la iluminación (Tang y col., 2003). Para analizar si el mRNA de *FAD7* detectado en oscuridad era resultado de la transcripción activa de dicho gen o resultado de un aumento de la estabilidad del mRNA, inhibimos la transcripción utilizando actinomicina D, conocido inhibidor de la RNA polimerasa. El tratamiento de suspensiones celulares de arroz durante 12 h con concentraciones de actinomicina D de 10 a 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ produce una inhibición de la transcripción superior al 95 % (Sheu y col., 1996). Así, añadimos 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de actinomicina D a las suspensiones celulares crecidas durante 14 días en luz o en oscuridad y en medio KN^0 y analizamos los niveles de mRNA de *FAD7* tras 8 h en presencia del inhibidor (figura 3-13). La expresión del gen de la ACTINA fue utilizado como control positivo de la inhibición de la transcripción celular. El nivel del mRNA del gen de la ACTINA fue similar en las células crecidas en luz y en oscuridad en ausencia de actinomicina D. Tras 8 h de tratamiento con el inhibidor, los niveles de mRNA del gen de la ACTINA fueron muy bajos, prácticamente

indetectables, tanto en las células crecidas en luz como en las crecidas en oscuridad. Estos datos demostraron que la transcripción fue casi totalmente inhibida por el tratamiento con actinomicina D. El RNA 18S se utilizó como control interno de carga. En las células crecidas en luz tratadas con actinomicina D no se detectó mRNA de *FAD7*, indicando que en luz el gen *FAD7* se transcribe activamente (figura 3-13 panel derecho). Por el contrario, las células crecidas en oscuridad y tratadas con actinomicina D mostraron niveles de mRNA de *FAD7* similares a los de las células crecidas en oscuridad que no fueron tratadas con el inhibidor. Estos resultados sugieren que la estabilidad del mRNA del gen *FAD7* aumenta considerablemente en oscuridad, indicando la presencia de un mecanismo de regulación postranscripcional a nivel de la estabilidad del mRNA.

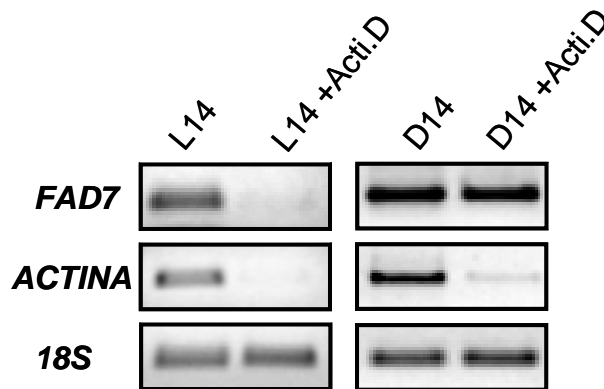


Figura 3-13: Efecto de la luz en la estabilidad del gen *fad7*. RT-PCR de 18S, ACTINA y *FAD7* en células crecidas durante 14 días en luz (L14), células crecidas durante 14 días en luz y tratadas durante 8 horas con el inhibidor de la transcripción actinomicina D (L14 + acti.D), células crecidas durante 14 días en oscuridad (D14) y células crecidas durante 14 días en oscuridad y tratadas durante 8 horas con actinomicina D (D14 + Acti.D).

3.1.7.1.2. Efecto de la inhibición parcial del transporte electrónico fotosintético en la estabilidad del mRNA de *FAD7*

Algunos genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas y cuya regulación es de tipo postranscripcional, presentan cambios en la estabilidad del RNA mensajero a través de un mecanismo sensible al transporte electrónico fotosintético (Tang y col., 2003). Para comprobar si un mecanismo similar opera en el caso del gen *FAD7*, analizamos la estabilidad de dicho mRNA en células tratadas con atrazina. Para ello, las suspensiones celulares crecidas durante 19 días en luz y medio KN⁰ y tratadas durante 3 días con atrazina, se incubaron durante 8 h con actinomicina D y se analizaron los niveles de mRNA de *FAD7* (figura 3-14). De nuevo, la expresión del gen de la *ACTINA* fue utilizada como control positivo de la inhibición de la transcripción celular y el RNA 18S como control interno de carga. Los niveles de mRNA del gen de la *ACTINA* disminuyeron considerablemente en las células tratadas con actinomicina D demostrando que el tratamiento con actinomicina D había funcionado. En cambio, los niveles de mRNA de *FAD7* de las células tratadas con atrazina y actinomicina D fueron similares a los de las células tratadas únicamente con atrazina (figura 3-14). Así, al igual que ocurría en oscuridad, la estabilidad del mRNA de *FAD7* aumenta tras la inhibición parcial del transporte electrónico fotosintético. Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos en oscuridad, sugieren que la estabilidad del mRNA de *FAD7* está regulada por la luz a través de un mecanismo dependiente del transporte electrónico fotosintético.

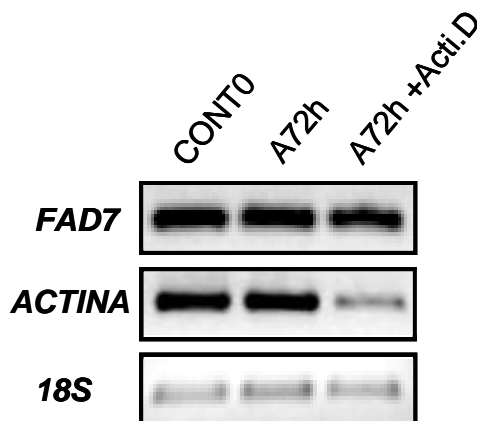


Figura 3-14: Efecto del transporte electrónico fotosintético en la estabilidad del gen *fad7*. RT-PCR de 18S, ACTINA y FAD7 en células crecidas durante 19 días en luz y medio KN^o (CONT0) y tratadas durante 72 h con atrazina (A72h) o durante 72 h con atrazina y 8 h con actinomicina D (A72h + Acti. D)

3.1.7.2. Asociación con los polirribosomas

La luz parece regular la expresión de algunos genes nucleares a nivel postranscripcional afectando tanto la estabilidad de sus mensajeros como la traducción de los mismos (Tang y col., 2003). De esta forma, la oscuridad o el tratamiento con DCMU inducen la desestabilización del mRNA del gen *FED-1*, que codifica la ferredoxina, y su disociación de los polirribosomas disminuyendo su tasa de traducción (Petracek y col., 1997; Hanse y col., 2001). Con el fin de comprobar si esto sucede con el gen *FAD7*, estudiamos si la luz y el transporte electrónico fotosintético, además de regular la estabilidad del gen *FAD7*, controlan también la asociación de su mRNA con los polirribosomas. Para ello aislamos y separamos en un gradiente de sacarosa los polirribosomas procedentes de las suspensiones celulares mantenidas durante 14 días en luz o en oscuridad y de las suspensiones celulares tratadas durante 3 días con atrazina. El RNA extraído de cada fracción del gradiente se hibridó con una sonda específica de *FAD7* y de

Resultados

ACTINA (figura 3-15). En el caso de las células mantenidas en luz en condiciones control, el mRNA de *FAD7* se detectó fundamentalmente asociado con los polirribosomas (fracciones 7-22 del gradiente). Por el contrario, en las células mantenidas en oscuridad y en las tratadas con atrazina disminuyó la cantidad de mRNA de *FAD7* que se detectó en los polirribosomas, produciéndose un desplazamiento hacia las fracciones que contienen los monosomas y los complejos mRNP que no se traducen (fracciones 1-6 del gradiente) (figura 3-15). Estos resultados indicarían que la oscuridad y la inhibición del transporte electrónico fotosintético producirían la disociación del mRNA de *FAD7* de los polirribosomas, afectándose por tanto su traducción. Sin embargo, la distribución del mRNA del gen de la *ACTINA* mostró un patrón similar al del mRNA de *FAD7* (figura 3-15). Estos datos sugieren que los resultados obtenidos no son concluyentes, posiblemente porque los tratamientos sean demasiado largos y estemos observando un efecto general de la oscuridad en la traducción, y no un efecto específico sobre *FAD7*. La utilización de tiempos más cortos podría resolver este problema.

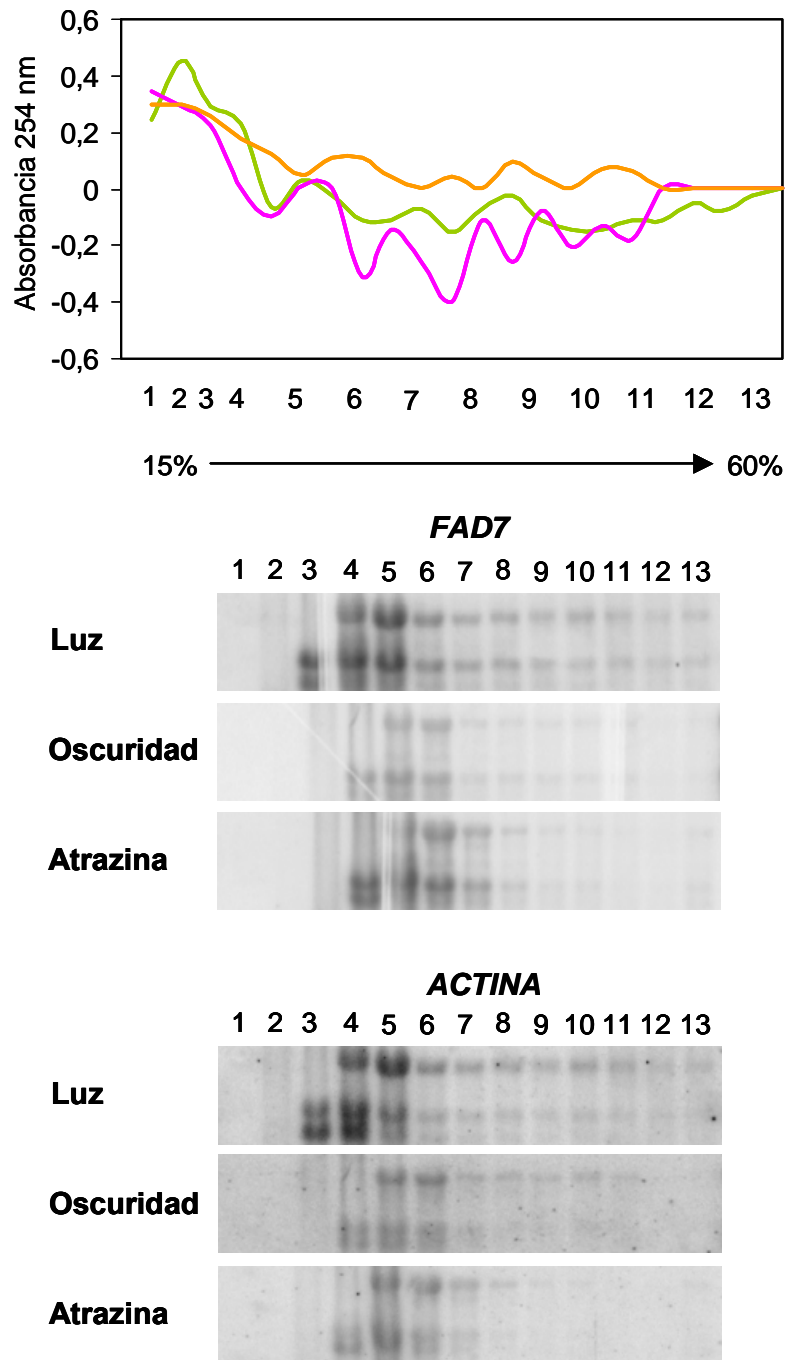


Figura 3-15: Asociación con los polirribosomas del mRNA de FAD7. En la parte superior se muestran los perfiles de absorbancia a 254 nm de los gradientes de sacarosa en los que se separaron los polirribosomas de las suspensiones celulares de soja mantenidas durante 14 días en luz (●), en oscuridad (●) o tratadas durante 3 días con atrazina (●). La numeración del eje x indica la posición aproximada de cada fracción sometida a Northern blot seguida del porcentaje de sacarosa en cada extremo del gradiente. En la parte inferior se muestran los autorradiogramas de los Northern blot realizados hibridados con sondas específicas para el mRNA de FAD7 y para el de la ACTINA.

3.1.7.3. Estudio de la acumulación de la proteína FAD7

3.1.7.3.1. Obtención de un anticuerpo específico contra FAD7

Hasta el momento, los mecanismos de regulación postranscripcional de las desaturasas de plantas no han podido ser estudiados en detalle, debido a la ausencia de anticuerpos específicos y a la dificultad que presenta la realización de ensayos enzimáticos con las desaturasas de membrana. Dada la necesidad de estudiar el mecanismo de regulación postranscripcional del gen *FAD7* en respuesta a la luz, decidimos intentar de obtener un anticuerpo específico para esta desaturasa. Este anticuerpo de FAD7 se desarrolló contra un oligopéptido sintético situado en una región específica de la proteína. La elección de este péptido fue complicada, ya que las desaturasas de plantas presentan una alta homología (Wallis and Browse, 2002). Como se muestra en la figura 3-16A, esta homología es particularmente alta (85 %) en el caso de las tres ω 3 desaturasas, FAD3, FAD7 y FAD8. Tras un cuidadoso análisis, se eligió el péptido de secuencia VASIEEEQKSVDLTNG situado entre los residuos 69 y 84 de la secuencia de aminoácidos de la proteína FAD7 (figura 3-16A). Esta región es específica de FAD7 y presenta una homología muy baja con FAD3. Los análisis de la secuencia de FAD7 con el programa ChloroP de predicción de péptidos señal, indicaron que el péptido señal de dicha proteína terminaba en el residuo 42. Así, el péptido elegido para sintetizar el anticuerpo se encuentra situado en el extremo N-terminal de la proteína FAD7 madura.

La reactividad del antisuero se analizó utilizando varias fracciones subcelulares aisladas tanto de suspensiones celulares como de plantas de soja (figura 3-16B). El anticuerpo sintetizado reaccionó con un polipéptido de aproximadamente 39 kDa, que corresponde con el peso molecular deducido

para la proteína FAD7 de soja (figura 3-16B panel derecho). Esta banda de 39 kDa no se detectó con el suero preinmune (figura 3-16B panel izquierdo), lo que indica que la reacción inmunológica es específica. La proteína FAD7 se detectó en los extractos crudos de las suspensiones celulares de soja aunque la señal aumentó considerablemente en la fracción cloroplástica tanto de suspensiones celulares como de plantas (figura 3-16B). Este resultado es consistente con la localización cloroplástica predicha para FAD7 (Yadav y col., 1993). Para comprobar la especificidad del anticuerpo de FAD7, estudiamos su posible reactividad contra la proteína FAD3, la ω 3 desaturasa reticular, analizando si el anticuerpo producía señal en fracciones enriquecidas con membranas microsomales (figura 3-16B). La ausencia de reacción indicó que el anticuerpo contra FAD7 no reacciona con FAD3, indicando que la respuesta del anticuerpo es específica de la proteína FAD7. Cabe señalar que este anticuerpo es el primer anticuerpo específico contra una ω 3 desaturasa del cloroplasto.

A

<i>GmFAD7</i>	1	MATWYHQKCG	LKPLAPVIPR	PRTGAALSS	SRVEFLDTNK	VVAGPKFQP-	--LRCNLRER	57
<i>GmFAD3</i>	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
<i>GmFAD8</i>	1	MATWVLSECG	LRPLPPVFP	STRPISCQKP	SKSRFLSTNK	GVPDLNLQAR	GLTCCIFRDR	60
<i>GmFAD7</i>	58	NWGLKVSAPL	RVASTIEEEK	SVDLTNGING	VEHEKLPEDF	PGAPPPFNLA	DIRAAIPKHC	117
<i>GmFAD3</i>	1	--MVKDTKPL	AYAANNGYQQ	----KGS-	-----FDFD	PSAPPPFKIA	EIRASIPKHC	46
<i>GmFAD8</i>	61	KWELGVSAPL	KFATNEGEEE	--ERTNGANN	GVGEEVSEFD	PSAPPPFKLA	DIRAAIPKHC	118
<i>GmFAD7</i>	118	WVKDPWRSMS	YVVRDVIAVF	GLAAAAAYLN	NWLWVPLYWA	AQGTMFWALF	VLGHDCGHGS	177
<i>GmFAD3</i>	47	WVKNPWRSL	YVLRDVLVIA	ALVAAAIFHD	NWLLWLIYCP	IQGTMFWALF	VLGHDCGHGS	106
<i>GmFAD8</i>	119	WVKDPWRSMS	YVVRDVIVVF	GLAAAAAYLN	NWVWVPLYWA	AQGTMFWALF	VLGHDCGHGS	178
<i>GmFAD7</i>	178	FSNNSKLSNV	VGHLLHSSIL	VPYHGWRISH	RTHHQHHGHA	ENDESWHPLP	EKLFRSLDTV	237
<i>GmFAD3</i>	107	FSDSPLNSL	VGHLLHSSIL	VPYHGWRISH	RTHHQNHGHI	EKDESWVPLT	EKIYKNLDSM	166
<i>GmFAD8</i>	179	FSNPKLNSV	ACHLLHSSIL	VPYHGWRISH	RTHHQNHGHV	ENDESWHPLP	EKIFKSLDNV	238
<i>GmFAD7</i>	238	TRMLRFTAPF	PLLAFPVYLF	SRSPGKIGSH	FDPSSDLFVP	NERKDVITST	ACWAAMLGLL	297
<i>GmFAD3</i>	167	TRLIRFTVPE	PLFVPIIYLF	SRSPGKIGSH	FNPYSNLPEP	SERKGIATST	LCWATMFSLL	226
<i>GmFAD8</i>	239	TRLIRFTLPE	PLLAFTIYLF	SRSPGKIGSH	FNPDSDLFVP	SERKDVITST	ICWTAMAALL	298
<i>GmFAD7</i>	298	VGLGFVMGPI	QLLKLYGVPY	VLFVMWLDLV	TYLHHHGHE	KLPWYRGKEW	SYLRGGLTTL	357
<i>GmFAD3</i>	227	IYLSFTLSPL	LVLKLYGIPY	WLFVMWLDLV	TYLHHHGHHQ	KLPWYRGKEW	SYLRGGLTIV	286
<i>GmFAD8</i>	299	VGLGFVMGPI	QLLKLYGIPY	VLFVMWLDLV	TYLHHHGHE	KLPWYRGEW	SYLRGGLTTL	358
<i>GmFAD7</i>	358	DRDYGWINNI	HHDIGTHVIH	HLFPQIPHYH	LVEATEAAKP	VFQKYREPK	KSAAPLPFHL	417
<i>GmFAD3</i>	287	DRDYGWINNI	HHDIGTHVIH	HLFPQIPHYH	LVEATQAAKP	VLGDYREPE	R-SAPLPFHL	345
<i>GmFAD8</i>	359	DRDYGWINNI	HHDIGTHVIH	HLFPQIPHYH	LIEATEAAKP	VLGQYREPK	K-SSPLPIYL	417
<i>GmFAD7</i>	418	IGELIRSFKT	DHFVSDTGDV	VYYQTDSEIN	GSSKLE	453		
<i>GmFAD3</i>	346	IKYLIQSMRQ	DHFVSDTGDV	VYYQTDSEIN	HSQRD-	380		
<i>GmFAD8</i>	418	IGELIRSMKK	DHFVSDSGDI	VYYQTDSEIN	SSSTSQ	453		

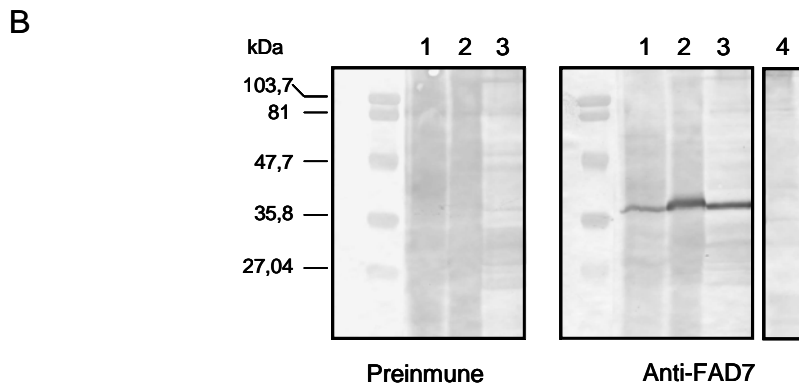


Figura 3-16: (A) Alineamiento de las secuencias de las proteínas *GmFAD3* y *GmFAD7*. Los residuos idénticos se representan sobre fondo negro y los cambios conservativos sobre fondo gris. El recuadro indica el péptido utilizado para desarrollar el anticuerpo de *FAD7*. (B) Detección inmunológica de la proteína *FAD7* utilizando el anticuerpo desarrollado contra ella. La detección se realizó en varias fracciones subcelulares: cloroplastos aislados a partir de suspensiones celulares de soja (1), cloroplastos aislados a partir de hojas de soja (2), cloroplastos intactos aislados a partir de hojas de soja (3), fracciones enriquecidas con membranas microsomales obtenidas a partir de hojas de soja (4). En las calles 1, 2 y 4 se cargaron 47 μ g de proteína total y en la calle 3, 20 μ g. El panel de la izquierda muestra los resultados obtenidos con el suero preinmune y el de la derecha los obtenidos con el anticuerpo contra *FAD7*. Los patrones de peso molecular se indican a la izquierda.

3.1.7.3.2. Efecto de la oscuridad en la acumulación de FAD7

Para estudiar la respuesta de la acumulación de FAD7 a cambios en la iluminación, aislamos cloroplastos de suspensiones celulares de soja crecidas durante 14 y 21 días en luz o en oscuridad y analizamos los niveles de la proteína FAD7 (figura 3-17A). El análisis con el anticuerpo de FAD7 mostró como los niveles de proteína FAD7 descendieron tras la incubación en oscuridad. Sin embargo, tras 21 días de oscuridad aún se detectó una cantidad considerable de FAD7 (más del 50 %). Así pues, aunque los niveles de 18:3 se ven reducidos severamente en estas condiciones experimentales (figura 3-3), los datos de proteína indican que la disponibilidad de proteína FAD7 no sería limitante para la producción de 18:3 en oscuridad. Estos resultados sugieren que, muy probablemente, la proteína FAD7 es inactiva en estas condiciones.

A la luz de estos resultados, nos propusimos estudiar si esta proteína FAD7 detectada en oscuridad representaba los restos del “pool” inicial de la proteína que es degradado lentamente o, por el contrario, era producto de la traducción *de novo* a partir del mRNA de *FAD7* muy estable en estas condiciones. Para ello, se analizó la cantidad de proteína FAD7 presente en suspensiones celulares crecidas en luz o en oscuridad durante 14 y 21 días y tratadas con 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cicloheximida durante 12 h. La cicloheximida inhibe la traducción en el citoplasma y se ha comprobado que la concentración elegida para el tratamiento inhibe más del 90 % de la incorporación de metionina radioactiva en suspensiones celulares de soja (Tenhaken y Rübél, 1998). En la figura 3-17B se muestra el análisis mediante Western blot de extractos crudos y cloroplastos aislados a partir de las suspensiones celulares crecidas en luz o en oscuridad y tratadas con cicloheximida. La FeSOD citosólica se utilizó como control interno para

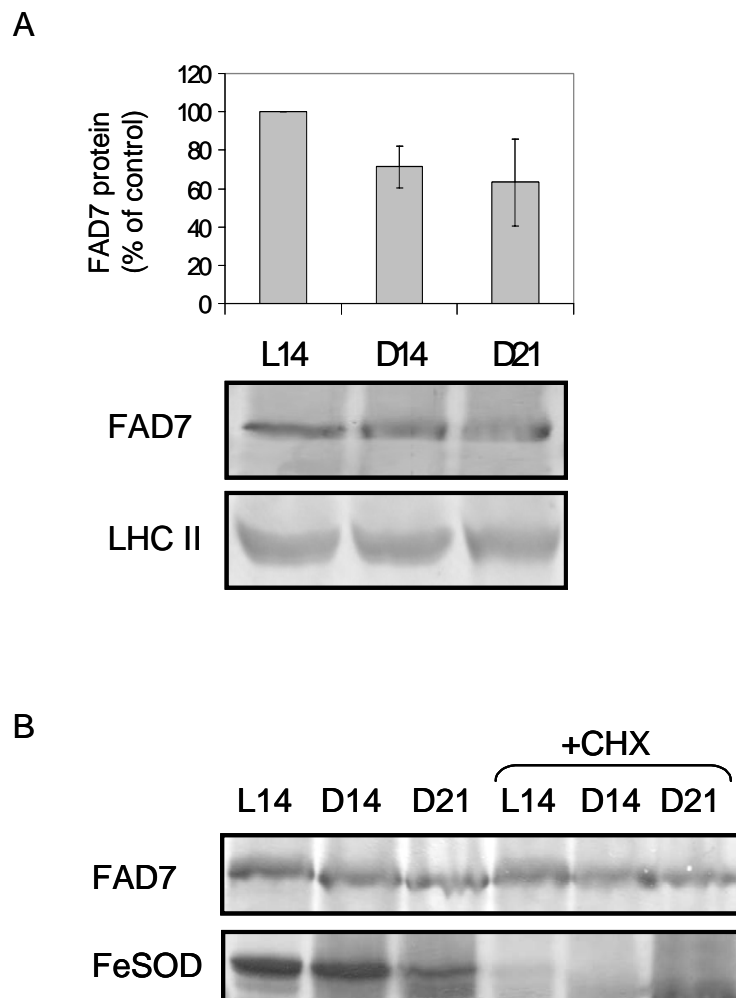


Figura 3-17: (A) Efecto de la oscuridad en la acumulación de la proteína FAD7. FAD7 se detectó mediante Western blot con el anticuerpo contra FAD7 en cloroplastos aislados de suspensiones celulares incubadas durante 14 días en luz (L14) y durante 14 y 21 días en oscuridad (D14, D21). LHCII se utilizó como control de carga y de correcta transferencia. También se muestran la cuantificación por densitometría de los niveles de proteína FAD7. (B) Experimento similar al expuesto en (A) añadiendo 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas, a las suspensiones celulares. Tras incubación de las suspensiones celulares durante 14 días en luz y durante 14 y 21 días en oscuridad se trataron con cicloheximida durante 12 h y se aislaron los cloroplastos en los que se analizó la presencia de FAD7 mediante Western blot. La FeSOD citosólica se analizó en los extractos celulares para verificar la inhibición de la traducción. En el caso de los extractos se cargaron 15,5 μg de proteína total y en el caso de los cloroplastos 37,5 μg de proteína total.

comprobar el funcionamiento de la cicloheximida. En ausencia de cicloheximida, la FeSOD fue detectada tanto en luz (L14) como en oscuridad (D14 y D21), observándose incluso un ligero descenso de los niveles de la FeSOD tras 21 días en oscuridad. Sin embargo, la FeSOD fue indetectable en presencia de cicloheximida en todas las condiciones experimentales indicando que la cicloheximida inhibió la síntesis de proteína casi completamente (figura 3-17B). Por el contrario, los niveles de FAD7 apenas variaron durante el tratamiento con el inhibidor, tanto en las células crecidas en luz como en las células crecidas en oscuridad, lo que sugiere, en primer lugar, que la proteína FAD7 es muy estable y, en segundo lugar, que su estabilidad no depende de la luz.

3.1.8. Inmunolocalización de la proteína FAD7

Una vez obtenido el anticuerpo contra FAD7 y comprobada su especificidad, decidimos utilizar el anticuerpo para estudiar la localización subcelular de la proteína FAD7 mediante inmunomarcado con partículas de oro. Hasta la fecha no se han realizado trabajos de localización subcelular de esta proteína, aunque se ha asumido a partir de una serie de evidencias (Schmidt y Heinz, 1990) que esta desaturasa se encuentra localizada en la envuelta del cloroplasto. De hecho, trabajos de proteómica de la envuelta del cloroplasto publicados recientemente (Froechlich y col., 2003; Ferro y col., 2003), han detectado FAD7 en fracciones enriquecidas en la envuelta. Sin embargo, trabajos previos en la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (Mustardy y col., 1996), localizaron las desaturasas de este organismo tanto en las membranas tilacoidales como en las membranas citoplasmáticas mediante inmunomarcado con partículas de oro. Los resultados de la localización de FAD7 en las suspensiones celulares de soja mediante el

Resultados

inmunomarcado con partículas de oro se muestran en la figura 3-18. El método utilizado en el laboratorio de la Dra. Risueño para la criofijación y sustitución en frío, seguido de una inclusión a bajas temperaturas en una resina de tipo acrílico como es el Lowicryl, se encuentra entre las metodologías más convenientes para una mejor preservación de la ultraestructura celular y la integridad de las membranas, al mismo tiempo que mantiene la reactividad antigénica de la célula. Los resultados muestran que el protocolo utilizado fue adecuado para nuestras células de soja, que mostraron un óptimo mantenimiento de la ultraestructura celular y de los diferentes compartimentos subcelulares (figura 3-18A), incluyendo los cloroplastos y las membranas tilacoidales (figura 3-18B). Los resultados de la localización de FAD7 en las células de soja se muestran en las figuras 3-18C y 3-18D. Como en ellas puede observarse, la proteína FAD7 se detectó preferencialmente en las membranas tilacoidales, aunque también parecen detectarse partículas de oro en la envuelta del cloroplasto.

Con el objeto de validar los resultados obtenidos mediante el inmunomarcado con oro, llevamos a cabo un fraccionamiento bioquímico del cloroplasto. Para ello, aislamos a partir de hojas de soja cloroplastos intactos y, a partir de éstos, envueltas y membranas tilacoidales y analizamos la presencia de FAD7 en cada una de estas fracciones mediante Western blot (figura 3-19). Mediante esta técnica, la proteína FAD7 se detectó en cloroplastos y en las membranas tilacoidales, siendo prácticamente indetectable en las fracciones purificadas de envuelta. La colocalización utilizando anticuerpos específicos de proteínas de la envuelta y de los tilacoides confirmaron los resultados anteriores. Así, la utilización de un anticuerpo contra la proteína Tic110, una proteína localizada en la envuelta (Jackson y col., 1998) y utilizada frecuentemente como marcador de la

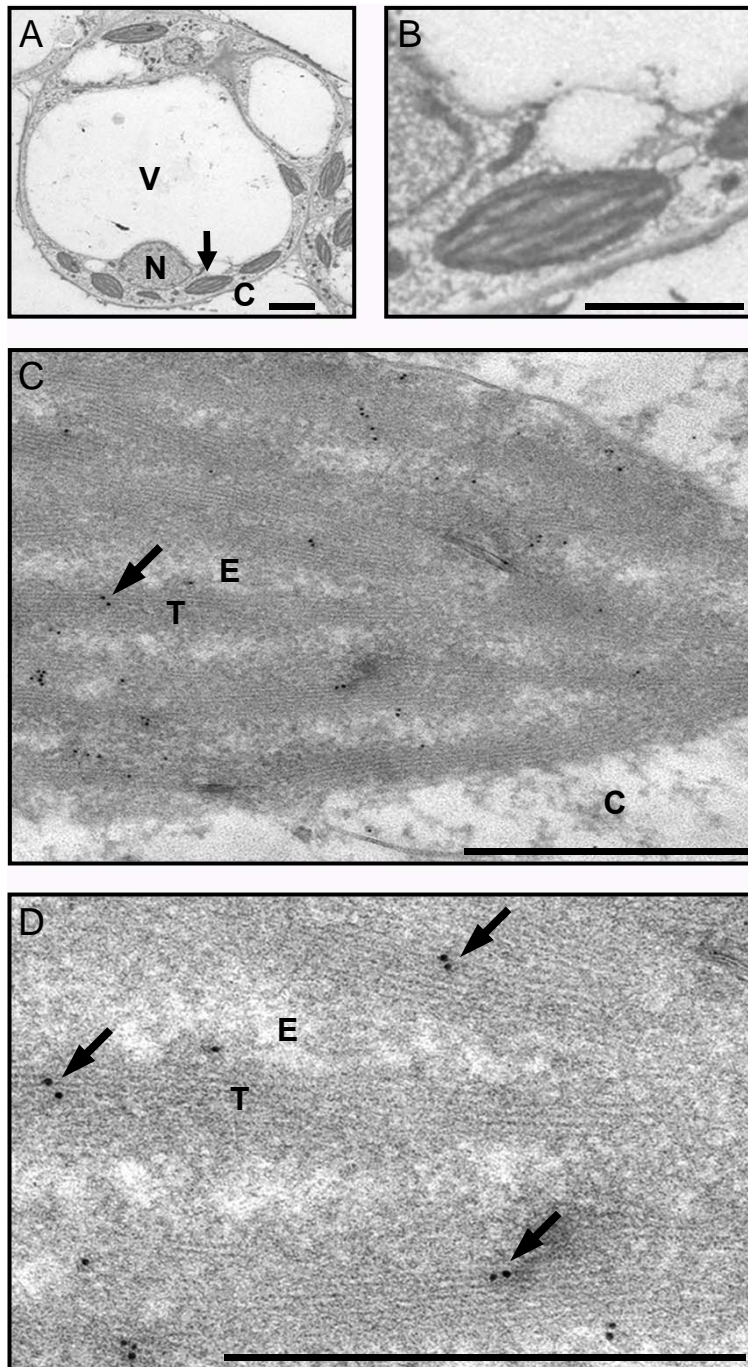


Figura 3-18: *Inmunolocalización de la proteína FAD7 mediante inmunomarcado con partículas de oro en las suspensiones celulares de soja. (A) Visión general de una célula de soja. (B) Visión general de un cloroplasto. (C) y (D) Partículas de oro localizadas en las membranas tilacoidales (flechas). V, vacuola; N, núcleo; E, estroma; T, membranas tilacoidales; C, citoplasma. Las barras representan en A y B 0,5 μm y en C y D 200 nm.*

Resultados

misma, permitió comprobar que el fraccionamiento se había realizado correctamente, no detectándose esta proteína en las fracciones tilacoidales (figura 3-19). Del mismo modo, la utilización de un anticuerpo contra la subunidad α del citocromo b_{559} , proteína que se encuentra únicamente en los tilacoides, permitió comprobar que las membranas tilacoidales aisladas eran también muy puras. En conclusión, el fraccionamiento bioquímico confirmó la localización preferencialmente tilacoidal de la ω 3 desaturasa FAD7.

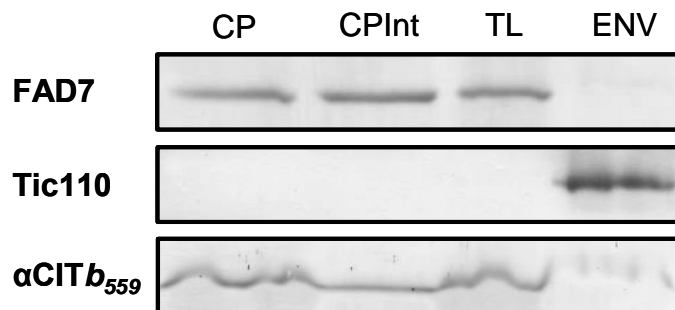


Figura 3-19: Detección inmunológica de las proteínas FAD7, Tic110 y subunidad α del citocromo b_{559} en las distintas fracciones cloroplásticas aisladas a partir de hojas de soja. En cada calle se cargaron 18,9 μ g de proteína total. CP, cloroplastos; CPInt, cloroplastos intactos; TL, tilacoides; ENV, envuelta.

3.2. FOTOINHIBICIÓN Y ENSAMBLAJE DEL FOTOSISTEMA II EN EL MUTANTE STR7 RESISTENTE A ATRAZINA Y DEFICIENTE EN LA INSATURACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

3.2.1. Fotoinhibición de la línea silvestre (WT) y de la línea mutante STR7

Como se ha comentado en la Introducción, la situación en la cual los daños producidos por la luz sobre el aparato fotosintético, y más concretamente sobre el PS II, exceden a la capacidad de reparación de los mismos se conoce con el nombre de fotoinhibición y se traduce en una disminución de la actividad fotosintética. Con el fin de estudiar en profundidad el mecanismo de acción de la fotoinhibición tanto en la línea celular WT como en la línea celular mutante STR7, y particularmente, la mayor sensibilidad de STR7 a la misma, analizamos la inactivación de la fotosíntesis tras la exposición a intensidad de luz alta ($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para ello determinamos la pérdida de actividad fotoquímica del PS II utilizando la técnica de fluorescencia variable de clorofila. Los resultados se muestran en la figura 3-20. Ambas líneas celulares mostraron un descenso de la relación F_v/F_m con el tiempo de exposición a intensidad de luz alta. Sin embargo, el mutante STR7 resultó ser más sensible a la fotoinhibición que el WT (Figura 3-20). Así, mientras la línea STR7 mostraba una pérdida del 50 % de la fluorescencia variable de clorofila tras 90 min de exposición a intensidad de luz alta, la línea WT necesitaba 250 min para alcanzar un nivel de inactivación de su capacidad fotoquímica similar. Estos resultados son consistentes con los publicados anteriormente por nuestro grupo (Alfonso y col., 1996).

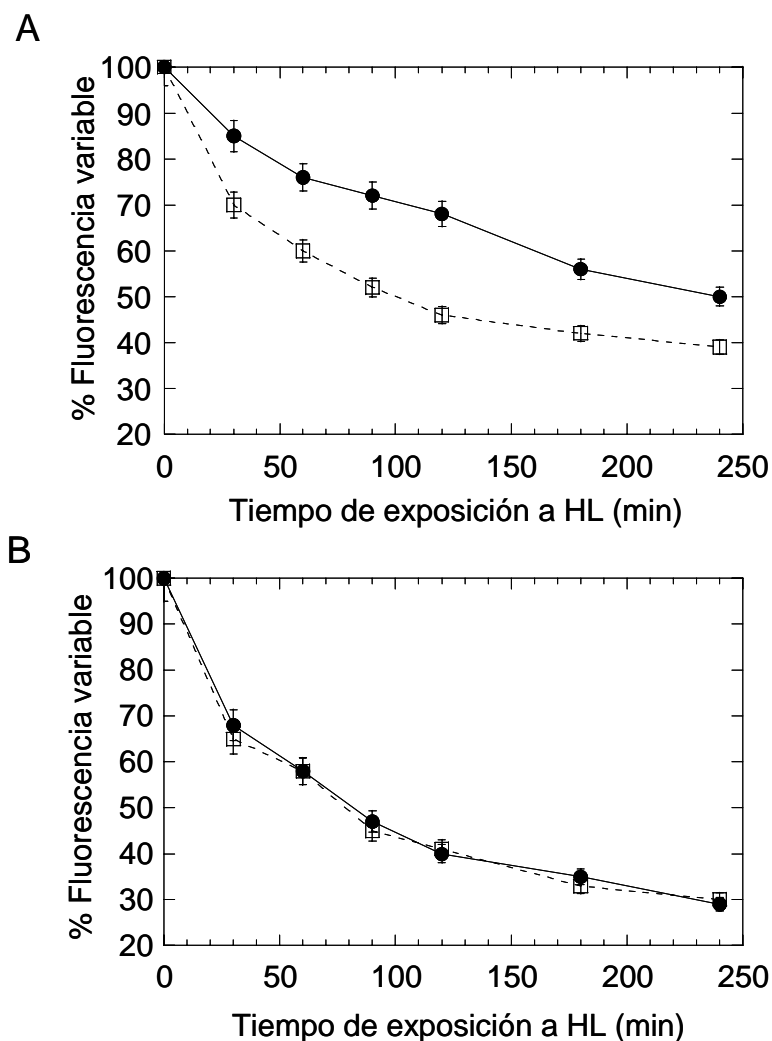


Figura 3-20: Efecto de la intensidad de luz alta y la síntesis de proteínas en la fotoinhibición de la fotosíntesis en las líneas celulares WT (●) y STR7 (□). Las células se crecieron con intensidad de luz de $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LL) siendo incubadas a continuación a intensidad de luz alta de $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL) y a la temperatura normal de crecimiento ($24 \text{ }^\circ\text{C}$). La fluorescencia variable de clorofila fue determinada tras distintos tiempos de incubación en estas condiciones. (A) Fotoinhibición en ausencia de cloramfenicol. (B) Fotoinhibición en presencia de cloramfenicol ($300 \mu\text{g ml}^{-1}$). Los valores iniciales de F_v/F_m de las células WT y las STR7 fueron 0,78 y 0,73 respectivamente. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

El proceso de fotoinhibición comprende varias etapas que van desde la fotoinactivación, pasando por la degradación y la síntesis de nueva proteína D1 y su ensamblaje con el resto de componentes del PS II para producir nuevas unidades de PS II completamente funcionales. Con el fin de estudiar cual o cuales de estas etapas se encuentran afectadas en la línea celular mutante STR7, comenzamos estudiando el proceso de fotoinactivación.

La mayor sensibilidad del mutante STR7 a la fotoinhibición podría deberse a que el proceso de fotoinactivación se produjera en mayor medida en la línea mutante que en la WT. Para comprobarlo, se comparó la inactivación de la fotosíntesis en ambas líneas celulares tras la exposición a intensidad de luz alta en presencia de cloramfenicol. El cloramfenicol es un inhibidor de la síntesis de proteínas en el cloroplasto y su presencia nos permite, por tanto, estudiar el proceso de fotoinactivación de la fotoinhibición anulando el proceso de síntesis de D1 y, por consiguiente, el proceso de reparación del PS II dañado. Los resultados se muestran en la figura 3-20. A diferencia de lo observado en ausencia de cloramfenicol (figura 3-20), en presencia del cloramfenicol, no se encontraron diferencias en la fotoinhibición entre las dos líneas celulares, mostrando ambas una pérdida del 50 % de la relación F_v/F_m tras 80 min de exposición a intensidad de luz alta. Además, debido a la ausencia del sistema de reparación, la fotoinhibición se produjo con mayor rapidez en presencia de cloramfenicol en ambas líneas celulares. Estos resultados sugieren que la mayor sensibilidad a la fotoinhibición detectada en el mutante STR7 no está relacionada con un aumento del proceso de fotoinactivación, sino con una modificación del proceso de reparación bien a nivel de la síntesis de la nueva proteína D1 o de su reensamblaje para constituir nuevas unidades de PS II funcionales.

3.2.2. Fotoinhibición *in vitro* de membranas tilacoidales

Una manera de comprobar los resultados obtenidos *in vivo* descritos anteriormente, es realizar estudios de fotoinhibición en tilacoides aislados a partir de ambas líneas celulares. La utilización de estas membranas tilacoidales aisladas garantiza la ausencia de la maquinaria de reparación del PS II, por lo que los resultados son comparables a los obtenidos *in vivo* en presencia de cloramfenicol. Los tilacoides aislados fueron fotoinhibidos a 24 °C bajo una intensidad de luz de $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y la actividad fotosintética se midió analizando la actividad de desprendimiento de oxígeno en presencia de un donador de electrones artificial (DCBQ). La fotoinhibición tuvo lugar más rápidamente en las membranas tilacoidales aisladas que en células intactas tanto en la línea WT como en la STR7 (figura 3-21), lo que no es sorprendente teniendo en cuenta la ausencia del sistema de reparación. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría al estudiar la fotoinhibición en células intactas, no se encontraron diferencias significativas en la extensión de la fotoinhibición entre los tilacoides aislados de ambas líneas celulares. Estos resultados obtenidos con las membranas tilacoidales son similares a los obtenidos al estudiar la fotoinhibición en presencia de cloramfenicol en las células intactas, lo que de nuevo sugiere que, en ausencia del sistema de reparación, el proceso de fotoinactivación de D1 es similar en ambas líneas celulares.

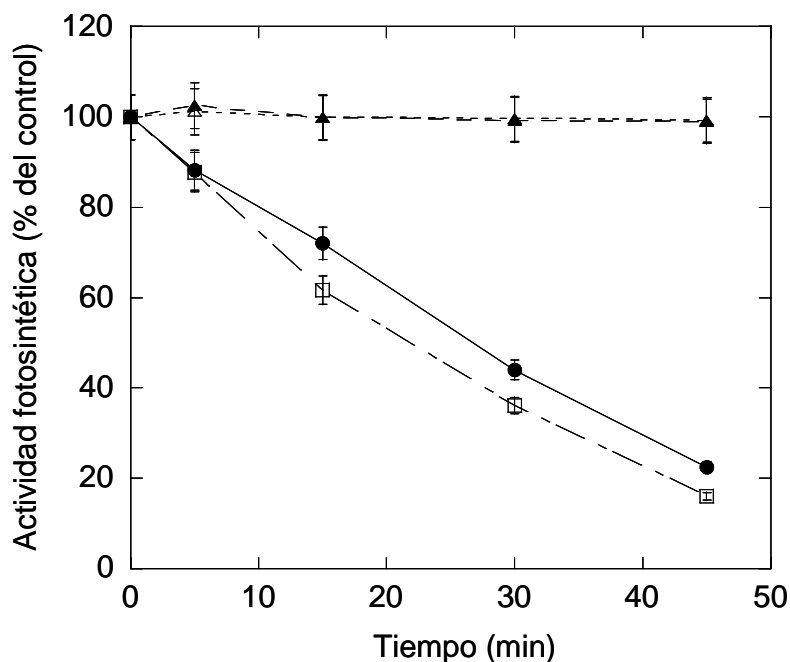


Figura 3-21: Fotoinhibición de membranas tilacoidales aisladas a partir de células WT (●) y de las STR7 (□). Los tilacoides fueron incubados a 24 °C bajo intensidad de luz alta ($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y se utilizó DCBQ como aceptor artificial de electrones. Los valores control de actividad fueron 223 y $165 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl-1 h}^{-1}$ para las células WT y STR7 respectivamente. También se muestran los valores de actividad obtenidos en las células WT (△) y STR7 (▲) mantenidas en oscuridad. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

3.2.3. Degradación inducida por la luz de la proteína D1

El mutante STR7 podría ser más sensible a la fotoinhibición porque como consecuencia de la mutación en D1 ésta se degrade más rápidamente que en la línea celular WT. Para comprobar esto, se estudió la degradación inducida por la luz de la proteína D1 bajo dos condiciones diferentes de luz: $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LL) y $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL). Estos experimentos se realizaron en presencia de cloramfenicol para inhibir la síntesis de D1 y asegurarnos, por tanto, de que no hay proceso de reparación activo (figura 3-22). Tras la exposición a LL, la cantidad de proteína D1 descendió en ambas líneas celulares, no apreciándose diferencias en la velocidad de degradación de D1 entre ambas

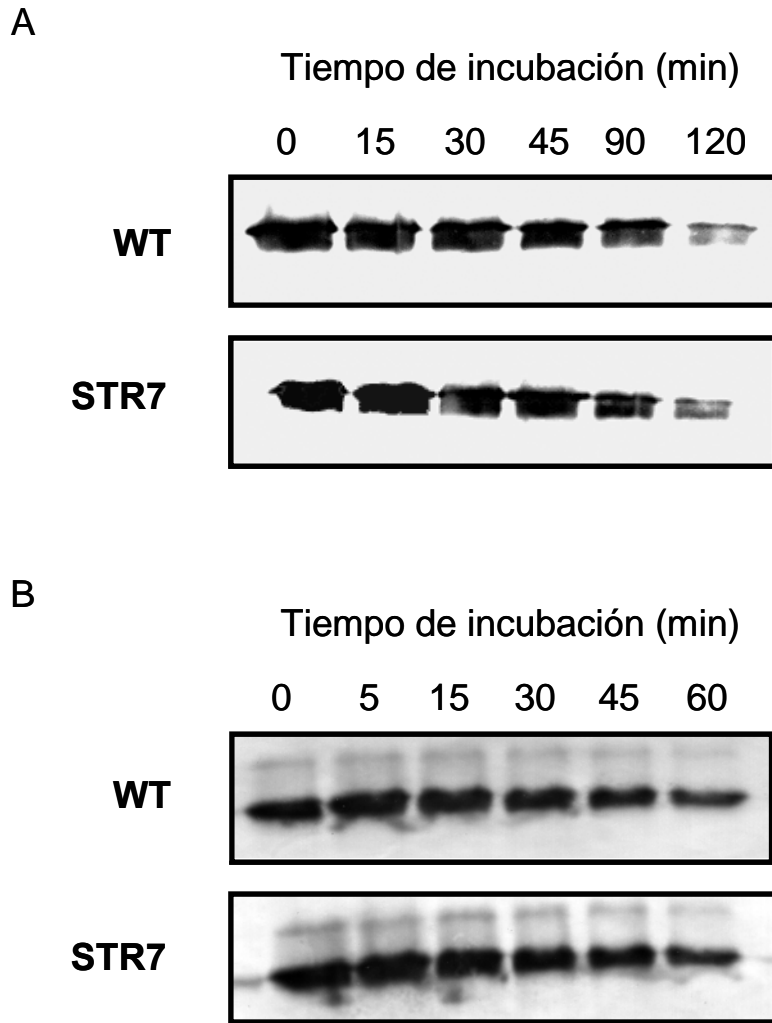


Figura 3-22: Degradación de la proteína D1 en las líneas celulares WT y STR7. La presencia de la proteína D1 se detectó inmunológicamente en ambas líneas celulares bajo diferentes condiciones de luz: (A) Intensidad de luz baja (LL, $70 \mu E m^{-2} s^{-1}$) o (B) intensidad de luz alta (HL, $1000 \mu E m^{-2} s^{-1}$). Se añadió cloramfenicol para inhibir la síntesis de proteínas en los plastidios. En cada pocillo se dispusieron $15 \mu g$ de clorofila.

líneas celulares (Figura 3-22). Tras 90 min de iluminación, la cantidad de proteína D1 descendió alrededor del 50 % en ambos casos. Cuando las células fueron iluminadas con HL, la degradación de D1 se aceleró en ambas líneas celulares (figura 3-22) siendo el tiempo de vida medio de D1 de aproximadamente 30-45 min frente a los 90 min encontrados en LL. Así

pues, de nuevo, la velocidad de degradación de D1 fue similar en ambas líneas celulares (figura 3-22). Estos resultados indican que la fotodegradación de D1 es similar en ambas líneas celulares y no es la responsable de la mayor sensibilidad a la fotoinhibición del mutante STR7.

3.2.4. Recuperación de la actividad fotosintética tras la fotoinhibición

La recuperación de la actividad fotosintética tras la fotoinhibición se encuentra directamente influenciada por la síntesis y el ensamblaje de la proteína D1. Por tanto, nos propusimos estudiar la recuperación de la actividad fotosintética tras la exposición a HL ($1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en la línea WT y en el mutante STR7. Ambas líneas celulares se fotoinhibieron incubándose en estas condiciones de iluminación y a $24 \text{ }^\circ\text{C}$, hasta que se perdió entre el 40 % y el 50 % de la Fv. A continuación, las células se incubaron en las condiciones normales de cultivo (LL; $70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o en oscuridad y se analizó la recuperación de la actividad fotosintética determinando la relación Fv/Fm. Los resultados se muestran en la figura 3-23. Las células WT recuperaron prácticamente el 100 % de la actividad fotosintética tras 120 min de incubación en LL, mientras que las células STR7 únicamente lograron recuperar el 76 % de la actividad en el mismo tiempo de incubación. En condiciones de oscuridad o de iluminación en presencia de cloramfenicol, no se encontró recuperación de la actividad fotosintética en ninguna de las dos líneas celulares, lo que es lógico teniendo en cuenta que, en ambas situaciones, el mecanismo de reparación es inactivo. Estos datos confirman la hipótesis de que la recuperación de la fotoinhibición se encuentra modificada en el mutante STR7.

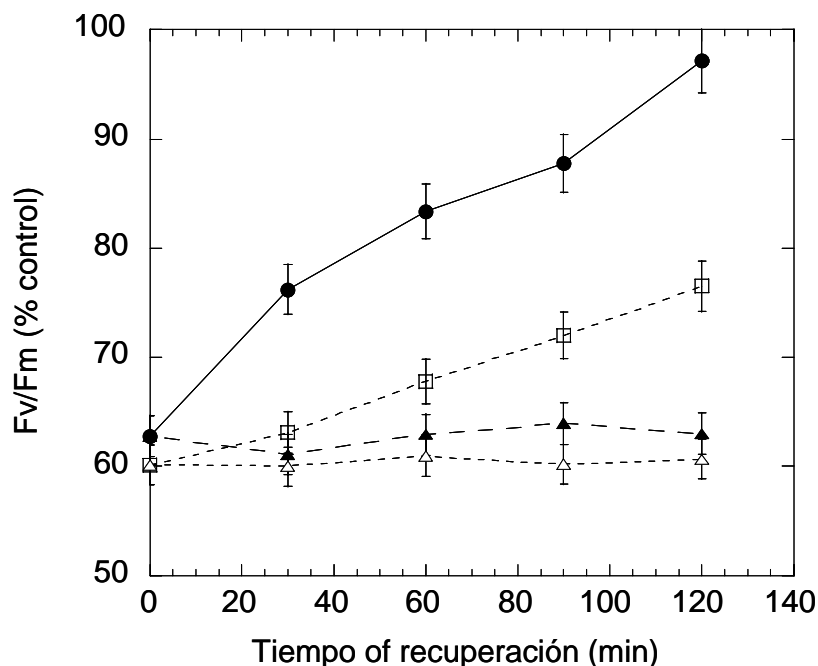


Figura 3-23: Recuperación de la actividad del PS II tras la fotoinhibición en las líneas celulares WT y STR7. Las células fueron fotoinhibidas con una intensidad de luz de $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $24 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que perdieron alrededor del 40 % de los valores de fluorescencia iniciales (fase reversible). A continuación, la mitad del cultivo se incubó en las condiciones normales de crecimiento ($70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $24 \text{ }^\circ\text{C}$) y la otra mitad se mantuvo en oscuridad a $24 \text{ }^\circ\text{C}$. La figura muestra los valores de F_v/F_m obtenidos para las células WT en LL (●) y en oscuridad (▲) y para las células STR7 en LL (□) y en oscuridad (△). Los valores iniciales de F_v/F_m fueron 0,78 y 0,73 para las células WT y STR7 respectivamente. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

3.2.5. Influencia de la temperatura en la fotoinhibición y en la recuperación de la actividad fotosintética

Aunque la temperatura no parece influir en el daño producido por la luz en la proteína D1 y en la consecuente fotoinactivación del PS II (Tyysstjärvi y Aro, 1996), la recuperación de la actividad fotosintética, sin embargo, depende de la temperatura (Gombos y col., 1994). Nosotros estudiamos la dependencia de la fotoinhibición y de la recuperación de la actividad fotosintética de la temperatura en la línea celular WT y en el

mutante STR7 (figura 3-24). Para ello, en primer lugar comparamos la cinética del descenso de la relación F_v/F_m bajo condiciones de intensidad de luz de $750 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL) y varias temperaturas (17°C , 21°C y 27°C) cercanas a la temperatura normal de crecimiento de las suspensiones celulares de soja (24°C). A 24°C , el mutante STR7 mostró mayor sensibilidad a la luz que el WT, confirmando los resultados comentados en el apartado 2.1 (figura 3-24 panel superior derecha). A 27°C , las diferencias entre ambas líneas celulares eran mucho menores mostrando las dos una pérdida de aproximadamente el 50 % de la F_v/F_m tras 4 h de fotoinhibición (figura 3-24 panel superior izquierdo). Un aspecto interesante es que, a esta temperatura, la velocidad de descenso de la relación F_v/F_m que mostraba el mutante STR7 era similar a la que mostraba a 24°C , mientras que el descenso de la F_v/F_m del WT resultó más rápido a 27°C que a 24°C . A 21°C , la relación F_v/F_m descendió con mayor rapidez que a 24°C en el mutante STR7, mientras que, en la línea WT, la relación F_v/F_m descendió con velocidad similar en ambas temperaturas (figura 3-24 panel inferior izquierdo). De hecho, las mayores diferencias entre las dos líneas celulares se encontraron a 21°C (figura 3-24 panel inferior izquierdo). A 17°C la relación F_v/F_m descendió en ambas líneas celulares, mostrándose, de nuevo, el mutante STR7 más sensible a la fotoinhibición que el WT. De esta forma, el mutante STR7 perdía un 50 % del valor F_v/F_m inicial en menos de 2 h de tratamiento en condiciones HL, mientras que en el WT fueron necesarias 3 h de tratamiento para niveles de descenso similares (figura 3-24 panel inferior derecho). Además, el descenso de la relación F_v/F_m fue sensiblemente más rápido a 17°C que a 21°C en el WT, mientras que el mutante STR7 mostró menores diferencias en la velocidad del descenso de F_v/F_m a estas temperaturas. Cabe destacar también que, el perfil de fotoinhibición

Resultados

mostrado por el WT a 17 °C, fue similar al mostrado por el mutante STR7 a la temperatura normal de crecimiento (24 °C).

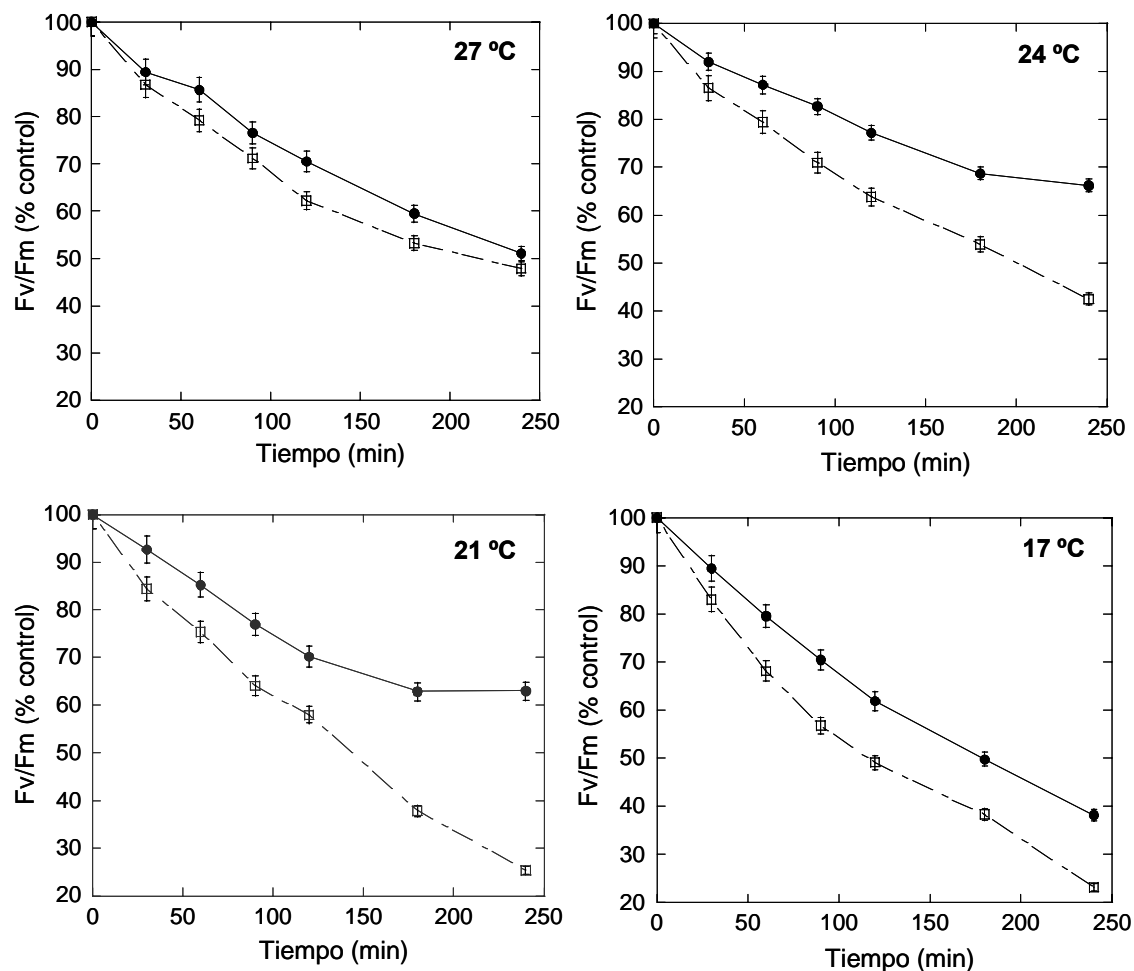


Figura 3-24: Fotoinhibición en la línea celular WT (●) y en la línea celular mutante STR7 (□) a diferentes temperaturas. Las células fueron crecidas bajo LL ($70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e incubadas posteriormente en HL ($750 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a varias temperaturas: 27 °C, 24 °C, 21 °C y 17 °C. La fluorescencia variable se determinó a lo largo del tiempo de incubación. Los valores iniciales de Fv/Fm fueron 0,78 y 0,73 para las células WT y STR7 respectivamente. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Con el fin de estudiar el efecto de la temperatura en la recuperación de la actividad fotosintética, las células fueron fotoinhibidas a distintas

temperaturas (17 °C, 21 °C, 24 °C y 27 °C) como se ha descrito anteriormente, hasta que perdieron alrededor del 40 % del valor inicial de la relación Fv/Fm. Tras la fotoinhibición, las células se incubaron a las distintas temperaturas bajo condiciones de iluminación normales (LL; 70 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y se analizaron los cambios en los valores de la relación Fv/Fm (figura 3-25). A 24 °C, las células WT recuperaron la actividad fotosintética más rápidamente que las células STR7. Así, el WT recuperó casi el 100 % de la actividad tras 125 min de incubación en LL, mientras el mutante STR7 recuperaba el 75 % de la actividad fotosintética en el mismo tiempo de incubación (figura 3-25 panel superior derecho). A 27 °C, el mutante STR7 mostró una velocidad de recuperación de la actividad fotosintética similar a la mostrada a 24 °C, mientras que la recuperación del WT fue más lenta (figura 3-25 panel inferior izquierdo). Como consecuencia, ambas líneas celulares recuperaron alrededor del 85-90 % de la actividad fotosintética tras 180 min de incubación. Estos datos confirman los perfiles de fotoinhibición obtenidos en la figura 3-24, resultando que las temperaturas superiores a la temperatura normal de crecimiento producen efectos más negativos en las células WT que en el mutante STR7. Del mismo modo, las temperaturas menores que la temperatura normal de crecimiento afectaron en mayor medida al mutante STR7 que al WT. Así, a 21 °C, la velocidad de recuperación del mutante STR7 se encontró mucho más afectada que la del WT (figura 3-25 panel inferior izquierdo). Como consecuencia, el mutante STR7 apenas recuperó un 10 % de la actividad fotosintética al cabo de 3 h y la diferencia entre las dos líneas celulares fue incluso mayor a 21 °C que a la temperatura normal de crecimiento. A 17 °C, de nuevo la recuperación de las células STR7 fue muy baja (menos del 5 % tras 3 h de incubación) aunque la recuperación de las células WT también se redujo significativamente

Resultados

alcanzándose sólo un 15 % de recuperación. Tal y como ocurría con los perfiles de fotoinhibición, el perfil de recuperación de la línea WT a 17 °C se mostró prácticamente idéntico al perfil de recuperación de la línea STR7 a la temperatura normal de crecimiento (24 °C).

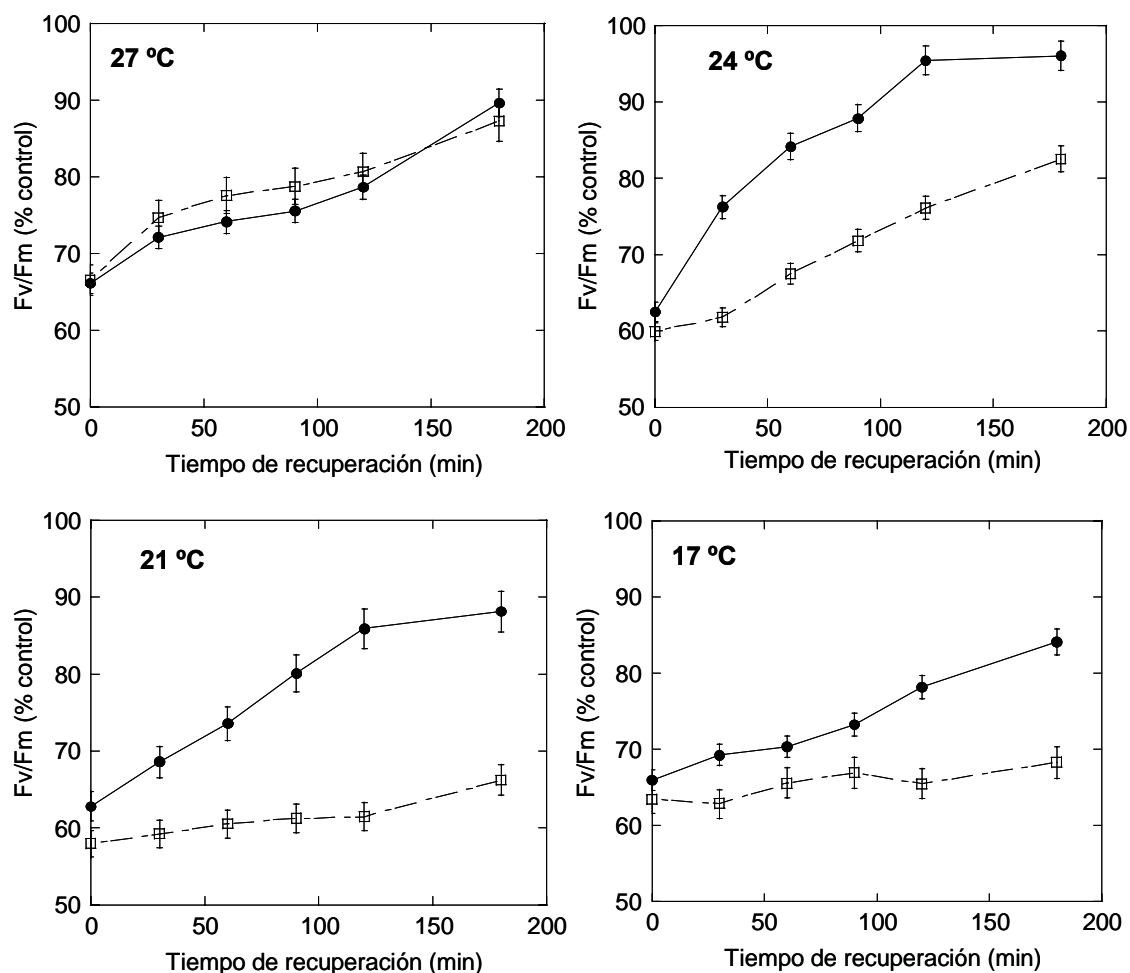


Figura 3-25: Recuperación de la actividad fotosintética a distintas temperaturas tras la fotoinhibición en la línea celular WT (●) y en la línea celular mutante STR7 (□) a diferentes temperaturas. Las células fueron fotoinhibidas a $750 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 27, 24, 21 ó 17 °C hasta la pérdida del 40 % de los valores iniciales de fluorescencia (fase reversible). A continuación, el cultivo se incubó en condiciones normales de iluminación ($70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 27, 24, 21 ó 17 °C. Para evaluar la recuperación de los valores de Fv/Fm se tomaron alícuotas de los cultivos a distintos tiempos. Los valores iniciales de Fv/Fm fueron 0,78 y 0,73 para las células WT y STR7 respectivamente. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

3.2.6. Síntesis *de novo* e incorporación de la proteína D1 a las membranas tilacoidales

Vistos los resultados expuestos hasta el momento, decidimos estudiar en detalle el mecanismo de recambio de la proteína D1 en ambas líneas celulares. Como se ha comentado en la Introducción, en este proceso pueden distinguirse dos etapas: por un lado, la propia síntesis de D1 que comprende la iniciación de la síntesis, la elongación y la maduración de la proteína y, por otro lado, la incorporación de la proteína D1 recién sintetizada y su ensamblaje en el PS II. Para determinar los productos de traducción de D1 en ambas líneas celulares, realizamos experimentos de marcaje y seguimiento (“pulse-chase”) utilizando metionina radiactiva en condiciones LL. Los resultados de un experimento de marcaje típico se muestran en la figura 3-26. En primer lugar se detectó una banda marcada, correspondiente a la proteína D1, cuya intensidad aumentó con el tiempo de marcaje, lo cual es consistente con un aumento de la síntesis de D1 en iluminación. Además de la banda correspondiente a D1, se detectó una banda marcada radiactivamente con menor intensidad y de mayor peso molecular que D1. Esta banda posiblemente representa los complejos formados por tRNA y las cadenas nacientes de D1 que permanecen asociados con las membranas durante el aislamiento de las muestras (Zhang y col., 2000). De cualquier forma, estos complejos desaparecen conforme aumentamos el tiempo de incubación con metionina fría acumulándose concomitantemente proteína D1. La proteína D1 fue la proteína del PS II marcada más abundante de acuerdo con observaciones anteriores realizadas *in vivo* (Matoo y col., 1981; van Wijk y col., 1995; Zhang y col., 2000). La cantidad de proteína D1 madura marcada aumentó en las dos líneas celulares con el tiempo de iluminación, no encontrándose diferencias significativas entre ambas (figura

Resultados

3-26A). En cuanto al precursor de la proteína D1 (pD1), prácticamente no se detectó o se detectó en pequeñas cantidades, ya que el procesamiento de D1 ocurre rápidamente (3-5 min) en los cloroplastos de plantas (van Wijk y col., 1995). La ausencia de diferencias significativas entre ambas líneas celulares indica que la síntesis y el procesamiento de la proteína D1 no parece ser el paso limitante en el recambio de D1 en el mutante STR7.

Con el fin de analizar en detalle la elongación de la proteína D1 en ambas líneas celulares y estudiar la acumulación de los intermediarios de síntesis de D1, realizamos experimentos en los que cloroplastos marcados radioactivamente y solubilizados con un detergente no iónico suave fueron sometidos a inmunoprecipitación con exceso de anticuerpo de D1. Experimentos similares publicados anteriormente han sugerido la acumulación de intermediarios durante la elongación de la proteína D1 (Zhang y col., 1999; Zhang y col., 2000). El anticuerpo de D1 precipitó varios polipéptidos marcados radioactivamente (figura 3-26B). Tras 5 min de incubación con metionina fría toda la radioactividad se detectó en la proteína D1 madura. La cantidad de D1 madura acumulada durante los distintos periodos de incubación con metionina fría, fue muy similar en ambas líneas celulares, sugiriendo que no existen diferencias en la elongación de D1. Además de la proteína D1 de longitud completa, se precipitaron con el anticuerpo de D1 dos productos de alrededor de 25 y 17 kDa (figura 3-26B) que podrían corresponder con los intermediarios de la elongación de 25 y 17 kDa que han sido detectados por otros grupos (Zhang y col., 1999; Zhang y col., 2000). Aunque estos intermediarios de la elongación de D1 parecen ligeramente más abundantes en el mutante que en el WT tras 2,5 min de incubación con metionina fría, el patrón de acumulación durante el resto de la incubación es similar en ambas líneas celulares. Estos resultados sugieren

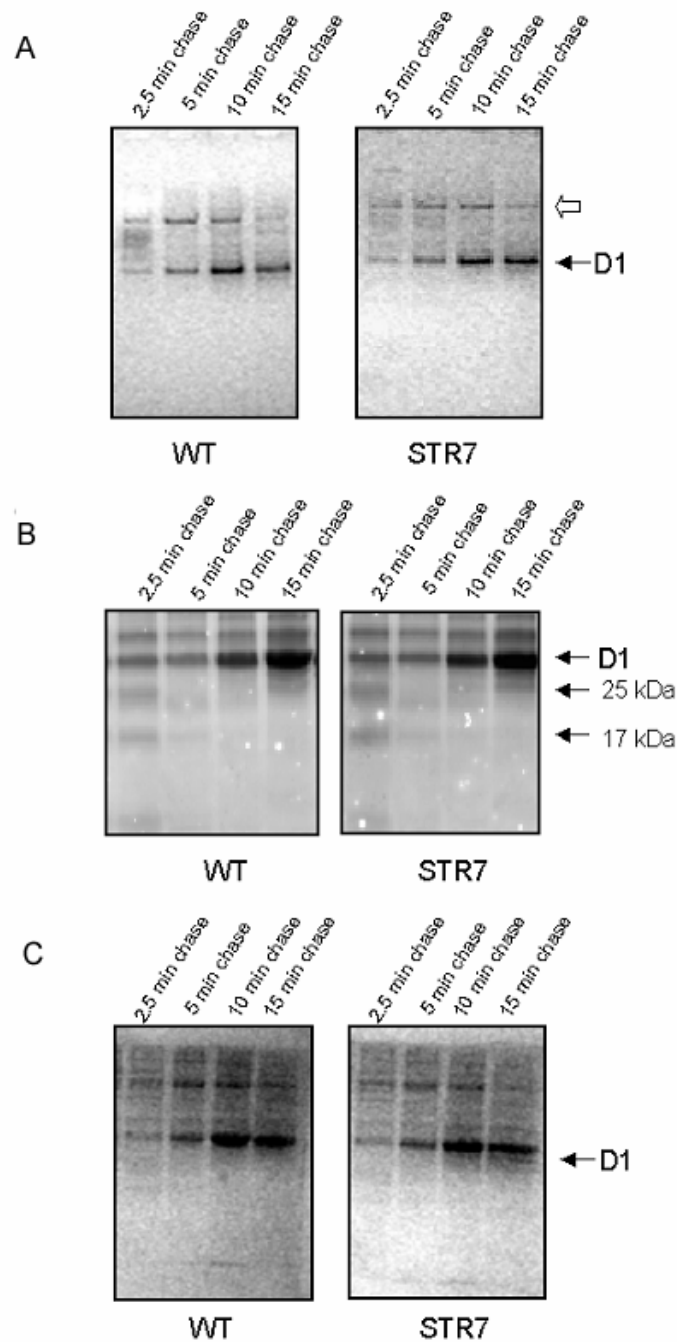


Figura 3-26: Síntesis de la proteína D1 en la línea celular WT y en la línea STR7. (A) Autorradiograma de los productos traducidos de novo marcados con ^{32}S en experimentos de marcaje y seguimiento (“pulse chase”) en cloroplastos intactos aislados de las células WT y STR7 en condiciones LL. La flecha indica el posible complejo tRNA-péptido naciente de D1. (B) Inmunoprecipitación de los productos de la traducción de D1 marcados. (C) Autorradiograma de los productos traducidos de novo marcados con ^{32}S en experimentos de marcaje y seguimiento realizados en cloroplastos intactos de células WT y STR7 bajo condiciones HL. Todos los experimentos fueron repetidos tres veces.

que no existen diferencias en la síntesis y elongación de D1 entre ambas líneas celulares en condiciones normales de iluminación (LL).

Como en condiciones de intensidad de luz alta (HL) debe aumentar la velocidad de síntesis de D1, decidimos estudiar la síntesis de D1 bajo estas condiciones de iluminación para descartar que posibles diferencias en la capacidad de síntesis de D1 pudieran causar la mayor sensibilidad de las células mutantes a la fotoinhibición (figura 3-26C). Tal y como se esperaba, la cantidad de metionina marcada incorporada en D1 era mayor en condiciones HL que en condiciones LL, pero ambas líneas celulares mostraron una velocidad de síntesis de D1 similar (figura 3-26C). En conclusión, la síntesis de D1 no se encuentra relacionada con la mayor sensibilidad a la intensidad de luz alta detectada en la línea mutante STR7.

3.2.7. Análisis del ensamblaje del PS II mediante centrifugación en gradiente de sacarosa

Descartadas la síntesis y la elongación de D1 como posibles etapas limitantes en la recuperación del estrés luminoso en el mutante STR7, decidimos estudiar el ensamblaje del PS II. Durante las primeras etapas del proceso de ensamblaje del PS II, la proteína D1 se inserta en la membrana de forma cotraduccional e interacciona rápidamente con la proteína D2. El dímero formado por D1 y D2 une el resto de proteínas que forman parte del PS II mientras migra de las zonas no apiladas a las zonas apiladas de los tilacoides, produciéndose finalmente partículas de PS II maduras en forma dimérica (Zhang y col., 1999; van Wijk y col., 1995).

El ensamblaje del PS II fue analizado en cloroplastos aislados de la línea WT y de la línea STR7 siguiendo el método descrito por van Wijk y col. (1995). Este método consiste en una solubilización de los cloroplastos de

plantas crecidas en condiciones LL con el detergente n-dodecil maltósido (DM) seguida de un fraccionamiento en gradiente de sacarosa. Nosotros realizamos el mismo experimento pero con cloroplastos aislados a partir de las suspensiones celulares de soja crecidas en condiciones de LL. En la figura 3-27A se muestra un esquema del patrón de bandas obtenido en una centrifugación en gradiente de sacarosa de las muestras. Como podemos observar, se obtuvieron seis bandas que numeramos con números romanos desde el fondo hasta la boca del tubo. De acuerdo con el fraccionamiento similar realizado por van Wijk y col. (1995), la banda VI contiene pigmentos y proteínas libres (15-30 kDa) en micelas de detergente junto con las proteínas extrínsecas hidrofílicas del complejo de desprendimiento de oxígeno (OEE). La banda V, correspondiente a la fracción 2 (40-70 kDa), se encuentra integrada mayoritariamente por proteínas de unión de clorofila a/b, por complejos LHCII monoméricos y algunas proteínas D1 y D2 libres. La banda IV, que corresponde a las fracciones 3 y 4 (80-150 kDa) contiene complejos de LHCII triméricos y centros de reacción del PS II. La banda III, correspondiente a la fracción 6 (195-240 kDa), contiene partículas de PS II sin las proteínas del OEE mientras que la banda II (fracciones 7 y 8; 280-360 kDa) contiene complejos del PS II ensamblados con las proteínas del OEE y monómeros de PS I. Por último la banda I, correspondiente a la fracción 9 (más de 500 kDa) contiene mayoritariamente dímeros de PS I.

En la figura 3-27B se muestra un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie de las diez fracciones en las que se dividieron los gradientes tras la centrifugación de los cloroplastos solubilizados de ambas líneas celulares. A este nivel, la diferencia más notable se detectó en las proteínas de peso molecular comprendido entre 25 y 28 kDa, entre las que se encuentran principalmente los complejos antena LHCII. Mientras que en el WT la mayor

3.2.7.1. Patrón de distribución de las proteínas D1 y D2

La distribución en las fracciones de los gradientes de sacarosa de algunas de las proteínas que constituyen el PS II se analizó utilizando anticuerpos específicos. En concreto, se analizó la presencia de D1, D2, LHCII y la proteína extrínseca OEE33 (figura 3-28). La proteína D1 se detectó a lo largo de prácticamente todo el gradiente en los cloroplastos WT, observándose la mayor cantidad de esta proteína en las bandas II y III (figura 3-28). Estos resultados corroboran los obtenidos en cloroplastos de espinaca por van Wijk y col. (1995). La banda III contenía monómeros de PS II formados por D1, D2, CP43, CP47, citocromo *b₅₅₉* y *psbI*, mientras que la banda II contenía principalmente dímeros del PS II. Estos resultados indican que en el WT la mayoría de la proteína D1 se encuentra en complejos ensamblados, encontrándose la mayor cantidad de ella en partículas de PS II en forma dimérica (el grado de ensamblaje más alto). Sin embargo, el patrón de distribución de la proteína D1 a lo largo del gradiente resultó distinto en el caso del mutante STR7. Aunque D1 se detectó en todas las fracciones del gradiente, incluyendo en las bandas II y III, la mayor diferencia en la acumulación de D1 respecto al WT se observó en las bandas IV y V (figura 3-28). De acuerdo con la composición de cada banda detallada anteriormente, la proteína D1 se encontraría en la banda IV formando parte de centros de reacción del PS II y en estado libre en la banda V. Así, en el mutante STR7 encontramos menos proteína D1 formando parte de PS II con alto grado de ensamblaje que en el WT. Estos resultados fueron confirmados analizando la distribución de la proteína D2 en el gradiente. La distribución de D2 en el WT resultó ser muy similar a la de D1 (figura 3-28) sugiriendo que en esta línea celular D1 interacciona rápidamente con D2 formando núcleos de PS II que se ensamblan normalmente produciendo complejos de PS II maduros. Por el

contrario, en el mutante STR7, D2 apareció mayoritariamente en las bandas III, IV y V que contienen centros de reacción y núcleos del PS II (figura 3-28). Estos datos sugieren que aunque D1 parece interaccionar normalmente con D2 en el mutante, ambas proteínas no se ensamblan tan eficientemente en complejos de PS II, produciéndose más monómeros de PS II y menos complejos de PS II diméricos maduros.

3.2.7.2. Patrón de distribución de LHCII y OEE33

Los mecanismos de síntesis e incorporación de las proteínas LHCII y OEE33, ambas codificadas por genes nucleares, en los complejos de PS II difieren de los de D1, por lo que nos propusimos analizar su patrón de distribución en los gradientes (figura 3-28). En los cloroplastos WT, la mayor cantidad de LHCII se localizó en la banda V y, sobre todo, en la banda IV. Estos datos sugieren que estos complejos antena en las células WT se encuentran en forma oligomérica. En los cloroplastos de STR7, a pesar de que también se detectó antena en estado oligomérico, se detectó una cantidad significativa de LHCII en la banda V, reduciéndose los niveles localizados en la banda IV. Estos resultados corroboran los obtenidos en la electroforesis SDS-PAGE de las fracciones de los gradientes (figura 3-28) e indican que, a pesar de la presencia de LHCII en forma oligomérica, la mayoría de los complejos LHCII se encuentran en forma de monómeros en los cloroplastos del mutante STR7.

La distribución de la proteína OEE33 también se muestra en la figura 3-28B. El precursor de la proteína OEE33 se traduce en el citoplasma y atraviesa la envuelta del cloroplasto antes de ensamblarse en el PS II (Theg y Scott, 1993). Se ha propuesto que la proteína OEE33 se ensambla en los núcleos de PS II en las regiones no apiladas de los tilacoides migrando a

continuación a los grana (Hashimoto y col., 1997). En los cloroplastos de WT, OEE33 se detectó a lo largo de todo el gradiente mostrándose en mayor cantidad en las bandas III, IV y V. En el caso del mutante STR7, al igual que en el WT, se detectó mayor cantidad de OEE33 en las bandas IV y V aunque también se observó una cantidad significativa en la banda VI.

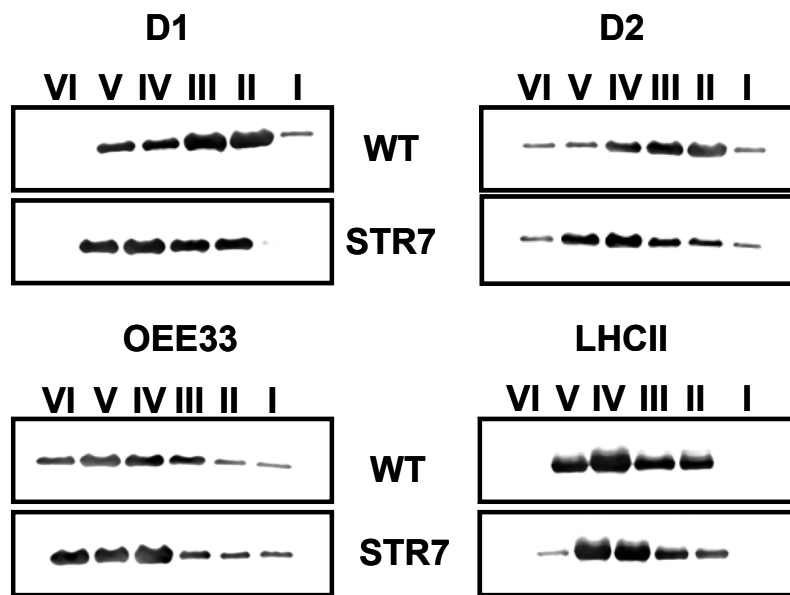


Figura 3-28: Detección mediante Western blot de las proteínas del PS II D1, D2, OEE33 y LHCII en las distintas bandas del gradiente.

4. DISCUSIÓN

4.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS DE PLANTAS

4.1.1. La luz como factor regulador de la expresión de los genes de las desaturasas

Nuestro conocimiento sobre el funcionamiento de las desaturasas de plantas aumentó considerablemente a finales de los años 80 cuando, gracias al análisis bioquímico y genético de una colección de mutantes de *Arabidopsis* (Miquel y Browse, 1998), pudimos conocer aspectos básicos sobre la biología de las desaturasas desconocidos hasta el momento, tales como su número, su posible localización subcelular y especificidad de sustrato. Sin embargo, el estudio de los mecanismos de regulación de estas enzimas se ha visto limitado fundamentalmente por la dificultad para purificar estas proteínas debido a su fuerte carácter hidrofóbico (todas ellas excepto FAB2 son proteínas integrales de membrana) y para obtener herramientas moleculares específicas para cada desaturasa debido al alto grado de homología de sus secuencias. Sin duda alguna, una de las principales cuestiones que quedan por resolver en el metabolismo lipídico es qué factores determinan el grado de insaturación de un glicerolípido específico en una membrana en particular; en definitiva, definir qué factores controlan la actividad de las desaturasas. Tal y como se ha comentado en la Introducción, sabemos que las desaturasas de ácidos grasos son sensibles a varios factores ambientales como la temperatura (Heppard y

col., 1996; Horiguchi y col., 2000; Berberich y col., 1998; Gibson y col., 1998; Matsuda y col., 2004; Tang y col., 2005; García-Díaz y col., 2002), diversas hormonas (Slocombe y col., 1994; Yamamoto y col., 1994; Lightner y col., 1994; Matsuda y col., 2001) o el ataque por patógenos (Kirsch y col., 1997; Nishiuchi y col., 1997). Sin embargo los mecanismos a través de los que se producen estas regulaciones no se conocen en detalle y todavía estamos lejos de identificar elementos claves en la transducción de señal como proteínas reguladoras, factores de transcripción o, incluso, el propio funcionamiento de dichos mecanismos de regulación. Un objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar estos mecanismos de regulación y, concretamente, el posible papel de la luz como factor regulador de la actividad de las desaturasas utilizando suspensiones celulares de soja, intentando aportar nuevos datos que permitan profundizar en nuestro conocimiento general sobre la regulación de las desaturasas de plantas.

Los análisis de la composición de ácidos grasos indican que los niveles de ácidos grasos poliinsaturados descienden en ausencia de luz mientras que los niveles de ácidos grasos saturados sufren un aumento. El descenso de los ácidos grasos poliinsaturados parece, además, producirse de forma secuencial, disminuyendo en primer lugar el porcentaje de 18:3 y a continuación el de 18:2. Los datos relativos al descenso del 18:3 en oscuridad son consistentes con los ya descritos en hojas de trigo (Horiguchi y col., 1996) y en el alga *Chlamydomonas* (Klyachko-Gurvich y col., 1999). En nuestro estudio, los cambios detectados en la composición de ácidos grasos han podido ser relacionados con cambios en la expresión de los genes de las desaturasas, realizando un especial esfuerzo en analizar la mayoría de la ruta de desaturación. De esta forma, el análisis mediante RT-PCR de los niveles de mRNA de los genes que codifican las desaturasas indica que, en el caso de

nuestras células de soja, la luz regula la acumulación del mRNA de los genes *FAB2*, *FAD2*, *FAD3*, *FAD6* y *FAD8* lo que sugiere la presencia de un control transcripcional. Sin embargo, el gen *FAD7* no parece regulado por la luz de la misma manera, encontrándose en oscuridad cantidades de su mRNA similares a las detectadas en luz. Teniendo en cuenta el fuerte descenso de 18:3, estos resultados indican la presencia de un control postranscripcional para este gen.

La implicación de la luz en la regulación de las desaturasas ya ha sido sugerida en los trabajos realizados en trigo (Horiguchi y col., 1996) o en algas verdes (Klyachko-Gurvich y col., 1999). Sin embargo, tal vez donde el mecanismo ha sido estudiado con mayor profundidad, al menos a nivel molecular, ha sido en cianobacterias. Así, Kis y col. (1998) describen como en luz aumentan los niveles de mRNA de los genes *desA*, *desB* y *desD* que codifican algunas de las desaturasas de la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803. Sólo *desC* no es sensible a la luz. La presencia de mecanismos similares tanto en plantas como en cianobacterias sugeriría que el efecto regulador por parte de la luz estaría conservado durante la evolución. Desconocemos todavía cuales pueden ser los elementos implicados en esta regulación por luz. Evidentemente sería revelador poder utilizar fusiones transcripcionales con genes informadores (*lux*, *GFP*) que nos permitiesen estudiar en detalle algunos de estos elementos presentes, sin duda, en el promotor de estos genes. A ese respecto, un estudio realizado sobre las secuencias del promotor de los genes de las desaturasas disponibles en las bases de datos utilizando el programa PLANTCARE, nos ha permitido identificar algunos de estos potenciales elementos de regulación. Los resultados de este estudio, que se muestran en la tabla 4-1, revelan la presencia de varios elementos de secuencia implicados en la respuesta a algunos factores ambientales como la luz, la temperatura o

las hormonas. Un dato relevante obtenido en este análisis es que el número de posibles elementos implicados directamente en la regulación por luz es mayor que los de cualquier otra señal ambiental como, por ejemplo, la temperatura clásicamente vinculada a la regulación de estos genes (tabla 4-1). Sin embargo, sería necesario estudiar estos elementos reguladores mediante fusiones transcripcionales para poder determinar su funcionalidad real. En el caso de *Arabidopsis*, un fragmento de 825 pb del promotor de *FAD7* que contiene varios elementos *cis* conservados en muchos genes regulados por la luz, confiere regulación por la luz de la expresión de genes informadores en plantas transgénicas de tabaco (Nishiuchi y col., 1995).

Gen	Promotor	Señales ambientales		Hormonas					
		Luz	Temperatura	MeJA	Aux.	Giber.	ABA	Ac.Sal	Etileno
<i>FAD3</i> ¹	854 bp	16	2 (frío) 1 (calor)	2	2	2		1	
<i>FAD7</i> ²	1081 bp	16	1 (frío) 1 (calor)	2	1	2	1		1
<i>FAD2</i> ³	163 bp	9		2	1		1	1	
<i>FAD6</i> ⁴	116 bp	4	1 (calor)					1	
<i>FAD6</i> ⁵	73 bp	3	1 (frío)	2					

Tabla 4-1: Análisis utilizando el programa PLANTCARE de la secuencia de los promotores de los genes de las desaturasas disponibles en las bases de datos. (1) *Glycine max*, (2) *Arabidopsis*, (3) *Arabidopsis*, (4) *Arabidopsis*, (5) *Glycine max*.

4.1.2. Implicación del transporte electrónico fotosintético en la regulación de la expresión de los genes de las desaturasas

El análisis de la composición de ácidos grasos de las suspensiones celulares en las cuales se había inhibido parcialmente el transporte electrónico

fotosintético reveló la presencia de modificaciones en los niveles de algunos ácidos grasos saturados (16:0) e insaturados (18:3). La variación de la composición de ácidos grasos como consecuencia del tratamiento con atrazina ha sido descrita anteriormente. Así, se ha comprobado que el tratamiento con atrazina produce un descenso del 18:3 y un aumento del 16:0 del MGDG y del DGDG en hojas de judía (Ivanova y col., 1999). Nuestros resultados muestran, además, que los cambios en la composición de ácidos grasos producidos por el tratamiento con atrazina no son tan drásticos como los obtenidos en oscuridad. Estas diferencias en la composición de ácidos grasos entre ambos tratamientos también se manifiestan en el patrón de expresión de los genes de las desaturasas. De esta forma, y en el rango de concentración utilizada en este estudio, los resultados obtenidos con inhibidores del transporte electrónico fotosintético mostraron que la expresión de los genes que codifican las desaturasas *FAD3*, *FAD6* y *FAD7*, son sensibles a la inhibición del transporte electrónico fotosintético. Esta regulación se produce en el caso de *FAD3* y *FAD6* a nivel transcripcional y en el caso de *FAD7* a nivel postranscripcional, modificándose la estabilidad de su mRNA. El caso de *FAD7* se discutirá en detalle en el siguiente apartado de este capítulo. La sensibilidad de la expresión de los genes de las desaturasas a la inhibición del transporte electrónico fotosintético ya se ha descrito en la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (Kis y col., 1998). En esta cianobacteria, la inducción producida por la luz de los niveles de mRNA de los genes *desA*, *desB* y *desD* depende del transporte electrónico fotosintético. Por el contrario, los genes *FAD2*, *FAD8* y *FAB2* no son sensibles a modulaciones del transporte electrónico fotosintético, al menos en el rango de inhibición estudiado, aunque sí que parecen ser sensibles a la luz. Estos datos sugieren que la luz posiblemente regula la expresión de los genes de las desaturasas a través de

dos rutas diferentes, una fuertemente dependiente del estado redox del cloroplasto y otra menos sensible *a priori* a las señales redox plastidiales. Sin embargo, como todas las desaturasas sensibles al transporte electrónico fotosintético son también sensibles a la luz, no podemos descartar que la ruta sensible al transporte electrónico fotosintético forme parte de otra ruta de regulación por luz más compleja donde otros elementos como los fotorreceptores pudiesen estar también implicados. Tampoco podemos descartar que concentraciones superiores de inhibidor pudiesen afectar la expresión de los genes que a concentraciones más bajas no muestran sensibilidad. Sin embargo, el hecho de que con tan sólo un 20-25 % de inhibición de la actividad fotosintética los niveles de mRNA de los genes *FAD3*, *FAD6* y *FAD7* muestren cambios tan claros, sugiere que el efecto modulador del transporte electrónico fotosintético sobre la expresión de estos genes es realmente específico. No es extraño que señales redox cloroplásticas modulen la expresión de *FAD6* o *FAD7*. Se ha comprobado que genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas, como es el caso de *FAD6* o *FAD7* (Yadav y col., 1993), son sensibles a la luz y al transporte electrónico fotosintético (Rodermel, 2001; Sullivan y Gray, 2002). Más difícil de explicar es el caso de *FAD3*, que codifica una proteína localizada en el retículo endoplásmico. Aunque se conocen menos ejemplos, también se ha encontrado regulación redox de genes nucleares que codifican proteínas que no se localizan en el cloroplasto, como ocurre con las ascorbato peroxidasas citosólicas *APX1* y *APX2* (Karpinski y col., 1997). Sin embargo, un argumento que permitiría explicar el por qué de su aparente regulación redox es que, tanto *FAD3* como *APX1* y *APX2*, codifican proteínas importantes para la función del cloroplasto aunque no se encuentren localizadas en dicho orgánulo. Así, las ascorbato peroxidasas participan en la eliminación de las especies reactivas de oxígeno,

en concreto del peróxido de hidrógeno, que causan daños en el aparato fotosintético (Karpinski y col., 1997). FAD3 sintetiza parte del 18:3 que se encuentra en las membranas cloroplásticas y que es fundamental para la correcta formación de dichas membranas (Selstam, 1998).

Como se ha comentado en la Introducción, el mecanismo o mecanismos a través de los cuales el transporte electrónico fotosintético controla la expresión de genes nucleares en plantas no se conoce en profundidad, aunque muy probablemente se encuentran implicadas señales del cloroplasto. Los estudios realizados en los últimos años, sugieren la existencia de varias rutas de señalización del cloroplasto al núcleo entre las que destacan una ruta derivada de señales redox fotosintéticas (Fey y col., 2005) y otra dependiente de precursores de la síntesis de clorofila (Nott y col., 2006). Nuestros datos apuntan a que FAD3 y FAD6 serían regulados por luz a través de una ruta de señalización retrógrada derivada del transporte electrónico fotosintético. Sin embargo la observación de que el norflurazon, un inhibidor de la síntesis de carotenos y clorofila, inhibe también la síntesis de 18:3 a partir de 18:2 (St. John, 1976a; St. John y col., 1976b), parece sugerir que *FAD3* podría estar también regulado por una señal retrógrada derivada de los intermediarios de la síntesis de tetrapirroles.

4.1.3. Regulación postranscripcional del gen *FAD7*

Según indican los resultados expuestos en este trabajo, y a diferencia de lo que ocurre con el resto de los genes de las desaturasas, la luz parece regular la expresión del gen *FAD7* a nivel postranscripcional a través de un mecanismo dependiente del transporte electrónico fotosintético. La regulación postranscripcional puede afectar diversas etapas de la expresión génica desde los procesos de “splicing” y “editing” del RNA, hasta su traducción, siendo la

modificación de la estabilidad del RNA uno de los mecanismos más comunes de dicha regulación. En el caso de los genes que codifican proteínas cloroplásticas esta regulación de la estabilidad del RNA es especialmente frecuente. De acuerdo con esto, la inhibición de la transcripción en las suspensiones de soja fotoautótrofas con actinomicina D, indicó que la estabilidad del mRNA de *FAD7* aumentaba fuertemente en oscuridad y en presencia del inhibidor del transporte electrónico fotosintético atrazina, siendo degradado con más rapidez en luz (figura 3-13 y figura 3-14). Estos resultados son consistentes con los observados en trigo, donde se ha comprobado que los niveles de mRNA de *FAD7* son parecidos en las hojas crecidas en luz y en oscuridad (Horiguchi y col., 1996), aunque en este trabajo no se analizó la estabilidad del mRNA de *FAD7*. Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral aportan, de hecho, los primeros datos sobre cambios en la estabilidad del mRNA y su implicación en los mecanismos de regulación de las desaturasas de plantas. Sin embargo, el papel de los cambios en la estabilidad de mRNA ya ha sido descrito al estudiar la regulación de las desaturasas de cianobacterias. Así, la regulación en respuesta a la temperatura del gen *desB*, que codifica la desaturasa ortóloga de *FAD7* en la cianobacteria *Synechococcus* PCC 7002 (Sakamoto y Bryant, 1997) y en la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (Los y col., 1997), se basa en la modificación de la estabilidad del mRNA de *desB*. En ambos casos, el descenso de temperatura desde 38 °C y 34 °C respectivamente hasta 22 °C conlleva un aumento de los niveles de mRNA de *desB* causados en parte por un aumento de su estabilidad. En las plantas, muchos genes regulados por la luz, algunos de ellos genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas como es el caso de *FAD7*, presentan cambios en la estabilidad del mRNA como resultado de cambios en la iluminación, siendo estos cambios en la estabilidad sensibles al transporte electrónico

fotosintético en algunos casos (Petracek y Thompson, 2000; Tang y col., 2003). La presencia de esta cantidad de mRNA estable de *FAD7* en oscuridad podría representar alguna ventaja para la célula. Se podría especular con el hecho de que ese mRNA podría servir para una rápida traducción de la proteína *FAD7* una vez que las condiciones favorables (luz) regresaran. *FAD7* es esencial en la producción de ácidos grasos trienoicos en el cloroplasto que son muy importantes en el mantenimiento de la estructura de las membranas tilacoidales, siendo además el 18:3 el precursor de la síntesis del ácido jasmónico.

4.1.4. Acumulación de la proteína *FAD7* y regulación de su actividad

La inmunodetección de la proteína *FAD7* con el anticuerpo específico obtenido en este trabajo, muestra que, a pesar de un cierto descenso, siempre hay una cantidad considerable de *FAD7* en oscuridad. Estos datos indican que la disponibilidad de proteína *FAD7* no es impedimento para la producción de 18:3 en oscuridad. El tratamiento con cicloheximida, un inhibidor de la traducción en el citoplasma, sugiere que esta cantidad de *FAD7* presente en oscuridad no es consecuencia de la traducción activa del mRNA estable de *FAD7*, si no que representa parte del “pool” inicial de la proteína. De acuerdo con estos resultados, *FAD7* sería una proteína muy estable, siendo además su estabilidad independiente de la luz. Estos resultados coinciden con los obtenidos al estudiar la respuesta de *FAD7* y *FAD8* a la temperatura en *Arabidopsis*, mostrándose *FAD7* también muy estable frente a las variaciones de temperatura entre 22 y 27 °C (Matsuda y col., 2005). Estos resultados sugieren que la estabilidad de *FAD7* no parece depender de las condiciones ambientales y es, por tanto, una característica intrínseca de la proteína. En ausencia de más datos es difícil apuntar una causa para este comportamiento

de FAD7. En el caso de FAD8, los determinantes de su desestabilización al aumentar la temperatura de 22 a 27 °C parecen estar localizados en el extremo C-terminal (Matsuda y col., 2005), aunque éste no parece ser el caso de FAD7. Los datos disponibles de la proteína FAD3 en raíces de trigo también indican que esta desaturasa no es tan estable como FAD7 o, al menos, que su estabilidad varía en respuesta a la temperatura. Así, tras tres días de exposición a 30 °C, se detecta menos del 30 % de la cantidad inicial de FAD3 en *Arabidopsis* (Horiguchi y col., 2000). De forma similar, la estabilidad de una de las dos isoenzimas de FAD2 específicas de semillas presentes en soja, FAD2-1A, también es sensible a la temperatura (Tang y col., 2005). Así, tras 4 h de exposición a 30 °C se produce degradación de FAD2-1A, mientras que la estabilidad de la otra isoenzima, FAD2-1B, no se ve afectada por este tratamiento (Tang y col., 2005). El comportamiento de FAD8, FAD3 y FAD2-1A es distinto al observado para FAD7 en respuesta a la temperatura (Matsuda y col., 2005) o a la luz, como se muestra en esta Tesis Doctoral. Estos datos sugieren que la alta estabilidad es una característica intrínseca de FAD7, al menos a temperaturas superiores a 20 °C. En el caso de FAD2-1B habría que determinar si su estabilidad sigue sin alterarse tras un tratamiento más prolongado (24 h), como el que se aplicó a FAD7 (Matsuda y col., 2005).

La comparación del dramático descenso de los niveles de 18:3 con los niveles de proteína FAD7 tras 14 y 21 días en oscuridad sugiere que la disponibilidad de FAD7 no es una limitación para la producción de 18:3. Nuestros datos indican que la proteína FAD7 presente en oscuridad se encuentra probablemente inactiva. Estos datos sugerirían la existencia de un mecanismo de control postraducciona l dependiente de la luz, implicado en la activación e inactivación de la proteína. Con los resultados presentados en esta Tesis Doctoral no podemos conocer qué factores estarían implicados en

este mecanismo de control, pudiendo explicar este comportamiento varias hipótesis de trabajo. Alguna modificación postraducciona de la proteína, como por ejemplo una fosforilación, podría encontrarse implicada en este mecanismo de activación/desactivación. La fosforilación es una modificación postraducciona implicada en la regulación reversible de la actividad enzimática (Huber y Hardin, 2004). Recientemente se ha comprobado que las dos isoformas de FAD2-1 de soja son fosforiladas durante la formación de las semillas (Tang y col., 2005) y que esta fosforilación parece reducir la actividad enzimática de estas proteínas. La posible fosforilación de FAD7 podría ser producida por una kinasa cuya actividad dependa de la luz. Recientemente se han identificado varias kinasas cuya actividad depende de la luz (Bonardi y col., 2005). Otra posible explicación de la inactivación de FAD7 en oscuridad podría estar relacionada con el descenso de ferredoxina reducida. La ferredoxina reducida es el donador de electrones de las desaturasas plastidiales. Es evidente que en ausencia de iluminación, la cantidad de ferredoxina reducida desciende dramáticamente. En ausencia de ferredoxina reducida, o cuando el nivel de ferredoxina reducida descienda por debajo de una concentración umbral, FAD7 carecería de su donador natural de electrones y, por tanto, dejaría de ser activa. Aunque entre más en el terreno de la especulación que en el de las hipótesis, podría ser que el mismo elemento que controla la activación/inactivación del enzima pudiese intervenir también en el control de la expresión génica. Así, la ferredoxina podría ser el componente del transporte electrónico fotosintético implicado en la regulación redox de la estabilidad del mRNA de *FAD7* y, por tanto, el mismo elemento que controla el mecanismo de activación/desactivación del enzima, controlaría también la expresión del gen que la codifica (figura 4-1). Un comportamiento similar ha sido descrito para la enzima nitrato reductasa, cuya actividad

enzimática y expresión génica parecen reguladas por un componente del transporte electrónico fotosintético localizado tras el *pool* de plastoquinona (Sherameti y col., 2002).

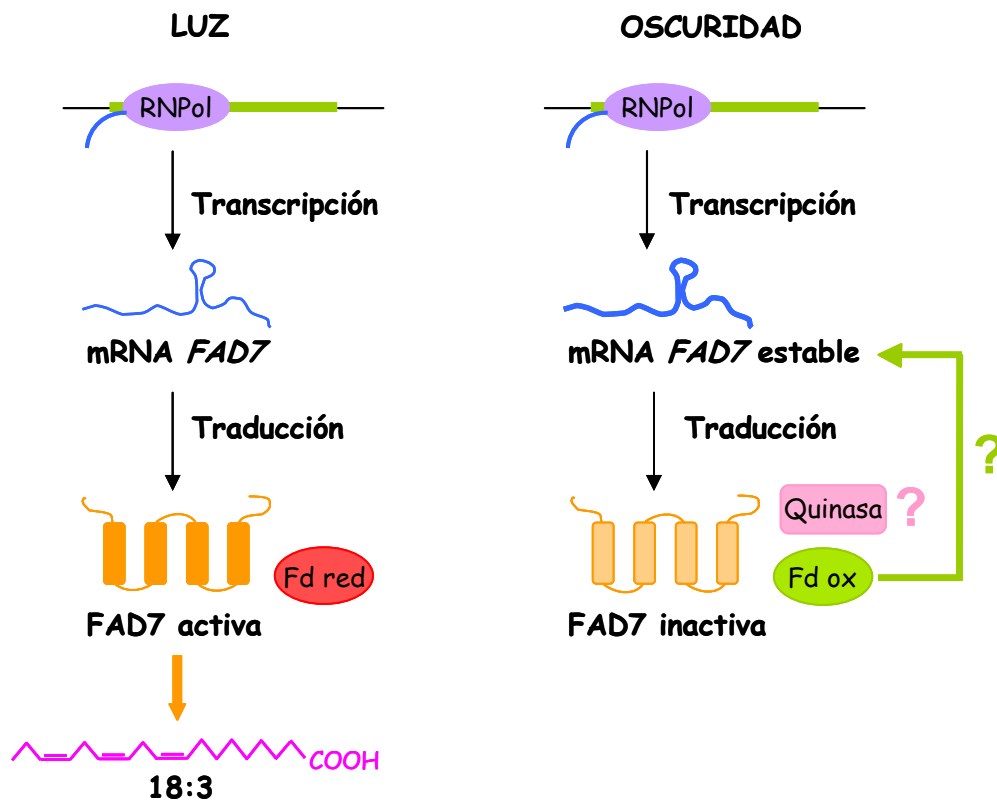


Figura 4-1: Modelo hipotético del mecanismo de regulación de la estabilidad del mRNA de FAD7 y de la actividad de la proteína. En luz, sin limitaciones de ferredoxina reducida, la desaturasa FAD7 sería activa produciendo 18:3. En oscuridad la existencia de alguna modificación postraduccional como una fosforilación producida por alguna quinasa, o la disminución de ferredoxina reducida podrían producir la inactivación del enzima. La ferredoxina podría ser también el componente del transporte electrónico fotosintético responsable del aumento de la estabilidad del mRNA de FAD7 detectado en oscuridad.

4.1.5. Interacción de la luz y la temperatura y su posible influencia en la expresión de las desaturasas

La composición de ácidos grasos saturados e insaturados de los lípidos de membrana varía con la temperatura, existiendo una relación inversa entre el grado de insaturación y la temperatura de crecimiento (Rennie y Tanner, 1989; Thompson, 1993). Heppard y col. (1996) demostraron que, en semillas y hojas de soja, los niveles de 18:2 y de 18:3 aumentan cuando la temperatura disminuye. Sin embargo, los niveles de mRNA de *FAD2-2*, *FAD2-1* y *FAD6* no aumentaron en respuesta al descenso térmico, lo que sugiere la presencia de un mecanismo de control posttranscripcional. En raíces de trigo se ha descrito que la temperatura también regula la expresión de *FAD3* a nivel posttranscripcional, no observándose cambios en los niveles de mRNA y aumentando la cantidad de proteína al descender la temperatura (Horiguchi y col., 2000). Nuestros datos indican que la luz regula la acumulación de los mRNA de *FAD2*, *FAD3*, *FAD6* y *FAD8* sugiriendo que, bajo nuestras condiciones experimentales, la luz regula *FAD2*, *FAD3* y *FAD6* a través de un mecanismo fundamentalmente transcripcional. La comparación de nuestros resultados con los descritos anteriormente para la respuesta térmica, sugieren que la luz y la temperatura podrían regular las desaturasas de ácidos grasos a través de diferentes rutas. En el caso de las cianobacterias, la regulación por la luz y la temperatura se ha estudiado más detalladamente. Así, en *Synechocystis* PCC 6803, *desA*, *desB* y *desC* son regulados por la luz a nivel transcripcional (Kis y col., 1998). Sólo *desC* no es sensible a la luz. En *Synechococcus* PCC 7002, *desA*, *desB* y *desC* son sensibles a las bajas temperaturas (Sakamoto y Bryant, 2002). Tanto *desA* como *desB* presentan cambios en la estabilidad del mRNA indicando la presencia de un control posttranscripcional. Aunque no podemos eludir la presencia de mecanismos

específicos de cada especie, estos datos indicarían que, en cianobacterias, la luz y la temperatura regulan las desaturasas a través de mecanismos específicos e independientes. Nuestros resultados parecen sugerir que algo similar ocurre en plantas excepto para FAD7. En el caso del gen *FAD7*, los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral indican que la luz regula su expresión a dos niveles: a nivel postranscripcional aumentando la estabilidad del mRNA y a nivel postraduccional modificando la actividad de la proteína. Los datos disponibles en la literatura indican que la temperatura también podría regular la expresión de *FAD7* a los mismos niveles. Así, se ha visto que la acumulación del mRNA de *FAD7* es prácticamente insensible a cambios en la temperatura dentro del rango fisiológico (Gibson y col., 1994; Iba y col., 1993) y la actividad de FAD7 parece descender a bajas temperaturas (Browse y col., 1986).

4.1.6. Inmunolocalización de la proteína FAD7

La ausencia de anticuerpos específicos ha dificultado enormemente la realización de estudios de inmunolocalización que permitieran precisar la localización subcelular de las desaturasas. En el caso de las desaturasas reticulares FAD2 y FAD3, los estudios de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra un epítipo (myc) unido a la desaturasa, han permitido localizar ambas proteínas en la misma región del retículo endoplásmico y revelar su orientación en la membrana (Dyer y Mullen, 2001). Durante mucho tiempo se ha asumido que las desaturasas cloroplásticas se encontraban localizadas exclusivamente en la envuelta del cloroplasto. Diversos datos, como el aislamiento de envueltas con actividad desaturasa (Schmidt y Heinz, 1990) o la localización en la envuelta de las enzimas responsables de la síntesis de galactolípidos (Dörmann y Benning, 2002), respaldaban esta idea.

Más recientemente, estudios de proteómica de la envuelta cloroplástica, permitieron identificar a FAD6 y a FAD7 entre las proteínas localizadas en la envuelta interna (Ferro y col., 2003; Froehlich y col., 2003). Nuestros datos de inmunomarcado con partículas de oro, así como la inmunodetección de FAD7 en las distintas fracciones cloroplásticas, muestran que, aunque no podamos descartar la presencia de FAD7 en la envuelta, la desaturasa FAD7 se encuentra preferentemente en las membranas tilacoidales. Este resultado sería consistente con los datos obtenidos en la localización inmunocitoquímica de las desaturasas de *Synechocystis* PCC 6803, que muestra que dichas desaturasas se encuentran tanto en la membrana citoplasmática como en las membranas tilacoidales (Mustardy y col., 1996).

El donador de los electrones necesarios para que las desaturasas cloroplásticas realicen su función es la ferredoxina. Esta ferredoxina reducida se produce en la luz en los tejidos fotosintéticos a través del fotosistema I que se encuentra en las membranas tilacoidales. En condiciones de oscuridad y en los tejidos no fotosintéticos, la ferredoxina reducida se produce a través de la enzima ferredoxina-NADP⁺ oxidoreductasa (FNR) que se encuentra asociada a los tilacoides. No es extraño pues que la desaturasa FAD7 se localice también en los tilacoides, dado que en ellos se localiza la cadena de transporte que le suministra electrones. En la envuelta sin embargo no se ha identificado qué proteínas estarían implicadas en la transferencia de electrones a las desaturasas, aunque se han detectado señales de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica correspondientes a proteínas de hierro-azufre, semiquinonas y flavinas que podrían ser componentes de una o varias cadenas de transferencia de electrones (Jäger-Vottero y col., 1997). También podría suceder que la ferredoxina reducida producida en los tilacoides dado su

carácter de proteína soluble difundiera por el estroma hasta la envuelta interna donde interaccionaría con la proteína FAD7 (Schmidt y Heinz, 1990).

Otros datos que apoyan la probable localización tilacoidal de FAD7 provienen del papel que desempeña esta enzima en la ruta de síntesis de jasmonatos. El producto de la desaturación realizada por FAD7, el ácido linolénico, es el precursor de la síntesis de jasmonatos. Los jasmonatos regulan diversos aspectos del desarrollo de las plantas y de la adaptación a estreses ambientales. Las etapas iniciales de la síntesis de estas moléculas transcurren en los cloroplastos gracias a las enzimas lipoxigenasa, alleno óxido sintasa y alleno óxido ciclasa (Schaller y col., 2005). Estas tres enzimas son solubles y los estudios de proteómica del tilacoide, realizados recientemente, han permitido detectar la presencia de la alleno óxido sintasa y la alleno óxido ciclasa en el tilacoide como proteínas periféricas (Peltier y col., 2004). La presencia en el tilacoide de FAD7 permitiría sintetizar el precursor de la síntesis de jasmonatos en la misma membrana en la que éste se incorpora a la síntesis de jasmonatos, lo que es compatible con la rapidez de la respuesta hormonal.

4.2. FOTOINHIBICIÓN Y ENSAMBLAJE DEL FOTOSISTEMA II EN EL MUTANTE STR7

4.2.1. Implicación del ensamblaje del PS II en la mayor sensibilidad a la fotoinhibición del mutante STR7

Como segundo objetivo de esta Tesis Doctoral, hemos estudiado la inactivación inducida por la luz del PS II y la recuperación de la actividad fotosintética en suspensiones celulares de soja. Para ello hemos utilizado la línea celular silvestre (WT) y la línea celular mutante STR7 tratando de

identificar la etapa o etapas responsables de la sensibilidad a la luz mostrada por la línea STR7 y definir la importancia de los únicos elementos implicados hasta ahora en el aumento de la sensibilidad a la fotoinhibición: las mutaciones en D1 (Kirilovsky u col., 1989; Sundby y col., 1993; Constant y col., 1996; Alfonso y col., 1996) y la alteración del grado de insaturación de los ácidos grasos (Moon y col., 1995; Vijayan y Browse, 2002). De esta forma, en primer lugar analizamos el proceso de fotoinactivación. Los experimentos de fotoinhibición *in vivo*, mostraron una mayor sensibilidad a la fotoinhibición del mutante STR7. Sin embargo, cuando los mismos experimentos se realizaron en ausencia del mecanismo de síntesis y reparación (en presencia de cloramfenicol o en tilacoides *in vitro*), la cinética de fotoinactivación del PS II en ambas líneas celulares fue muy similar. Estos resultados indican que el proceso de fotoinactivación no es el responsable de la mayor sensibilidad frente a la fotoinhibición encontrada en el mutante STR7. De hecho, la velocidad de degradación de D1 en ambas líneas celulares es muy similar. Una hipótesis de trabajo propuesta por Mulo y colaboradores para explicar la mayor sensibilidad a la fotoinhibición establecía que, como consecuencia de las mutaciones de D1, se producía algún cambio en la configuración de las proteína precisamente en el entorno del sitio de unión de Q_B, haciéndola más accesible al ataque por la proteasa específica que degrada D1 (Mulo y col., 1998). Nuestros resultados indican que la velocidad de fotoinactivación y de degradación de D1 son similares en el mutante STR7 y en el WT y, por tanto, no parecen depender de la existencia de mutaciones en D1. Estos resultados son consistentes con los descritos en varios mutantes del gen *psbA* en cianobacterias (Kirilovsky y col., 1989; Nixon y col., 1995; Mulo y col., 1998), lo que demostraría que la estructura de D1 no está relacionada con el proceso de fotoinactivación.

La fotoinhibición supone un balance dinámico entre el proceso de fotoinactivación y el proceso de recuperación de la actividad fotosintética. Como el proceso de fotoinactivación parece ser idéntico en ambas líneas celulares, el proceso de recuperación de la actividad fotosintética podría ser el responsable de la mayor sensibilidad frente a la fotoinhibición del mutante STR7, y de hecho así quedó demostrado en los experimentos de recuperación de la actividad fotosintética presentados en las figuras 3-23 y 3-25. El proceso de recuperación de la actividad fotosintética implica varias etapas desde la síntesis *de novo* de la proteína D1 hasta el ensamblaje de los complejos de PS II totalmente activos (van Wijck y col., 1995; Zhang y col., 1999). alguna de estas etapas podría estar alterada en la línea celular mutante STR7. Nuestros datos indican que la síntesis y elongación de la proteína D1 transcurren a la misma velocidad en la línea celular WT y en la STR7 tanto en intensidad de luz normal de crecimiento (LL) como en intensidad de luz alta (HL) (figura 3-26). Sin embargo, el ensamblaje de la proteína D1 recién sintetizada en los complejos de PS II se encuentra alterada en la línea STR7 incluso bajo condiciones LL. Además, otras proteínas del PS II como D2 o el complejo antena LHCII también presentan modificaciones en su ensamblaje en la línea mutante. Los resultados obtenidos indican que la principal alteración no se encuentra relacionada con las primeras etapas del ensamblaje de los complejos de PS II activos: la elongación de D1 transcurre aparentemente de forma similar en ambas líneas celulares tal y como demuestran los experimentos de inmunoprecipitación. Del mismo modo, el perfil de distribución de D2 es muy similar al de D1 sugiriendo que la interacción de D1 con D2 durante la elongación de D1 no está alterada significativamente. Sin embargo, las últimas etapas del ensamblaje, en las que los complejos incompletos de PS II se asocian para formar complejos de PS II totalmente

activos en forma dimérica, sí que parecen estar alteradas (figura 4-2). Nuestros resultados sugieren que estas alteraciones en el ensamblaje del PS II podrían estar limitando en el mutante la recuperación de la actividad fotosintética en condiciones HL, condiciones en las que se acelera el recambio de la proteína D1, pudiendo explicarse así la mayor sensibilidad frente a la fotoinhibición de la línea celular mutante STR7.

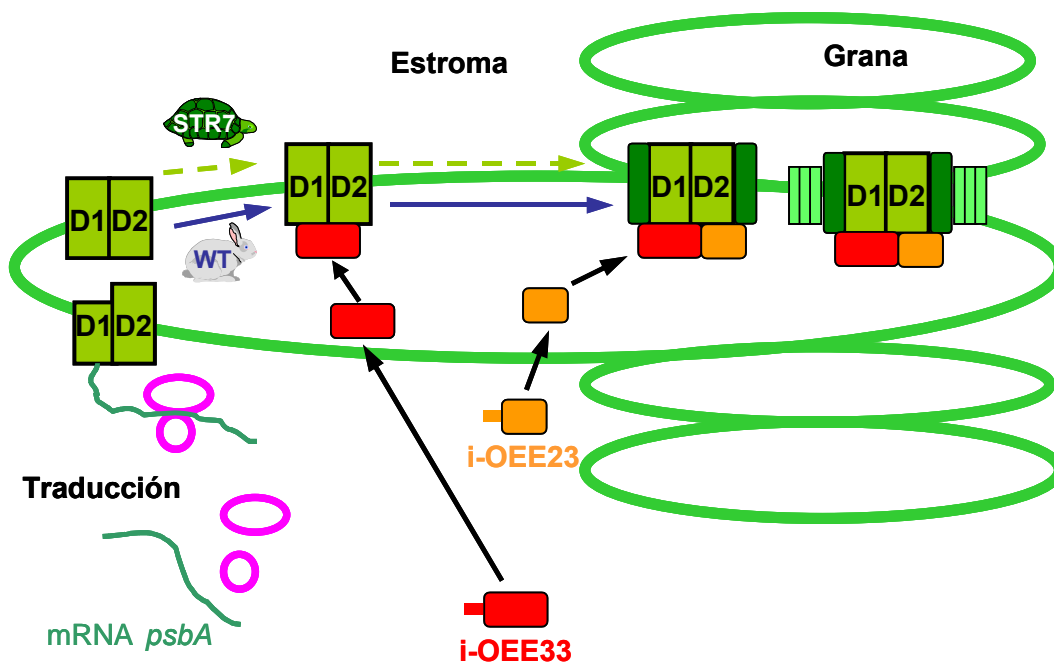


Figura 4-2: Modelo de ensamblaje del Fotosistema II en la línea celular mutante STR7 y en la línea WT.

4.2.2. Influencia de la composición de ácidos grasos y de la mutación de D1 en el ensamblaje del PS II

Las diferencias en el ensamblaje del PS II que presenta la línea STR7 podrían estar relacionadas con las propiedades dinámicas de la membrana. La recuperación de la actividad fotosintética es un proceso dinámico complejo en el que las proteínas del PS II tienen que ser sintetizadas e insertadas en la

membrana tilacoidal y migrar de las zonas no apiladas a las zonas apiladas de la membrana, los grana, durante el ensamblaje de los PS II maduros. De esta forma, las propiedades de las membranas tilacoidales desempeñarían un papel muy importante en el proceso de recuperación de la actividad fotosintética. A este respecto, la línea STR7 presenta mayor contenido en ácidos grasos saturados que la línea WT, lo que proporciona diferencias en las propiedades fisico-químicas de sus membranas tilacoidales como demuestran trabajos previos realizados en este laboratorio. Utilizando calorimetría diferencial de barrido (Alfonso y col., 2001) y EPR (Yruela y col., 2001) se ha comprobado que la membrana tilacoidal del mutante STR7 es más rígida que la del WT. Estos cambios en la fluidez de la membrana podrían afectar al proceso de fotoinhibición y a la recuperación de la actividad fotosintética. En este sentido, es importante la observación de que la fotoinhibición y la recuperación de la actividad fotosintética se ven afectadas por variaciones de la temperatura alrededor de 24 °C en ambas líneas celulares pero en sentidos contrarios (temperaturas más altas obstaculizan más la recuperación del WT y las temperaturas más bajas afectan dramáticamente la del STR7). La mayor diferencia en la recuperación entre ambas líneas celulares aparece a 21 °C, demostrando que un descenso de tan sólo tres grados respecto a la temperatura normal de crecimiento produce un efecto dramático en la recuperación de la actividad fotosintética del STR7. Estos datos son similares a los obtenidos en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la insaturación de ácidos grasos (Vijayan y Browse, 2002). Además, la velocidad de fotoinhibición y de recuperación del WT a 17 °C es muy similar a la que presenta el STR7 a 24 °C lo que sustenta la idea de que la insaturación de los ácidos grasos y la fluidez de la membrana intervienen en las alteraciones en el ensamblaje del PS II encontradas en el mutante STR7. Curiosamente, esta diferencia de 7 °C

corresponde con la diferencia en las temperaturas de transición de fase de la membrana de cada línea celular determinadas espectroscópicamente (Alfonso y col., 2001; Yruela y col., 2001).

Nuestros datos apuntan a que los ácidos grasos de los lípidos de la membrana desempeñan un papel fundamental en el ensamblaje del PS II. En este sentido diversos datos indican que los lípidos de las membranas tilacoidales y los ácidos grasos que los constituyen desempeñan un papel fundamental en la organización de los complejos proteicos presentes en dichas membranas. De esta forma se ha comprobado que, en plantas, el PG se encuentra implicado en la dimerización del PS II *in vitro* (Kruse y col., 2000) y las especies de PG que contienen el ácido graso 16:1(3t) en la trimerización de la antena LHCII (Trémolières y Siegenthaler, 1998; McCourt y col., 1985).

Sin embargo, a pesar de todo lo dicho anteriormente, no podemos descartar completamente la posibilidad de que las diferencias en el ensamblaje del PS II detectadas en el mutante STR7 fueran consecuencia de la mutación de D1. El residuo S268, debido a su posición estratégica en el sitio de unión de Q_B al principio de la hélice E de D1 (Zouni y col., 2001), podría contribuir a la estabilidad de la estructura de D1. La mutación de este residuo podría introducir algún cambio conformacional en D1 que hiciera a los centros de reacción mutados menos eficientes a la hora de interactuar con los otros componentes del PS II durante el proceso de ensamblaje del PS II para completar dímeros activos (van Wijck y col., 1995; Zhang y Aro, 2002).

Con los resultados obtenidos no podemos concluir cual de los dos factores, la composición de ácidos grasos o la mutación de D1, es el determinante en las alteraciones mostradas por STR7 en el ensamblaje del PS II. En principio podría esperarse que la mutación produjera algún efecto en el proceso de fotoinactivación o en la elongación de la D1 mutada y en su

interacción con D2. Sin embargo estos procesos no parecen estar afectados en la línea STR7. Además, algunos hechos favorecerían la hipótesis de los ácidos grasos. En primer lugar, la fotoinhibición y la recuperación del STR7 se encuentra muy afectada en un rango de temperaturas cercano a la temperatura normal de crecimiento. En segundo lugar, la velocidad de fotoinhibición y de recuperación del WT a 17 °C es prácticamente idéntica la del STR7 a la temperatura normal de crecimiento (24 °C). Por último, además de D1, otras proteínas del PS II como D2, OEE33 y LHCII, que no se encuentran mutadas en STR7, también presentan alterado su patrón de ensamblaje en el mutante STR7. Sin duda, el análisis de la síntesis de D1 y del ensamblaje del PS II en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la insaturación de los ácidos grasos ayudarán a clarificar esta cuestión.

5. CONCLUSIONES

1. La luz modula la composición de ácidos grasos de las suspensiones celulares de soja. Las células crecidas en oscuridad presentan menos ácidos grasos poliinsaturados (18:2 and 18:3) y más ácidos grasos monoinsaturados y saturados que las células crecidas en luz.
2. La luz ejerce un papel regulador en la expresión de los genes de las desaturasas de soja. Los mecanismos de regulación actúan a distintos niveles de la expresión génica, controlando la expresión de los genes *FAD2*, *FAD3*, *FAD6*, *FAD8* y *FAB2* al menos a nivel transcripcional y la del gen *FAD7* a nivel postranscripcional.
3. La inhibición del transporte electrónico fotosintético mimetiza parcialmente el efecto de la oscuridad: descienden los niveles de 18:3 y aumentan los de 16:0, 18:0 y 18:1.
4. El transporte electrónico fotosintético influye en la expresión de los genes *FAD3* y *FAD6* a nivel transcripcional y en la de *FAD7* a nivel postranscripcional. La expresión del resto de los genes de las desaturasas (*FAD2*, *FAD6*, *FAD8* y *FAB2*) no parece ser sensible al estado redox del cloroplasto en el rango de inhibición del transporte electrónico estudiado.
5. La luz parece regular la expresión del gen *FAD7* a través de un mecanismo postraduccional adicional que implicaría la activación/inactivación de la proteína *FAD7*. La naturaleza de este mecanismo de activación/desactivación es aún desconocida.
6. Los análisis de inmunomarcado con oro han proporcionado evidencias de que la proteína *FAD7* se encuentra localizada principalmente en las membranas tilacoidales.

Conclusiones

7. La mayor sensibilidad frente a la fotoinhibición del mutante STR7 no se debe a una deficiencia en los procesos de degradación, síntesis e inserción de la proteína D1, sino a la incapacidad de ensamblar eficientemente el PS II. Esta incapacidad parece estar relacionada con el mayor porcentaje de ácidos grasos saturados que presenta STR7 en sus membranas tilacoidales y no con un efecto de la mutación sobre la estructura de D1.

- Alfonso, M., Collados, R., Yruela, Y., Picorel, R. 2004. Photoinhibition and recovery in a herbicide-resistant mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid unsaturation. *Planta* 219:428-439
- Alfonso, M., Perewoska, I., Kirilovsky, D. 2000. Redox control of *psbA* gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome *b6/f* complex. *Plant Physiology* 122:505-515
- Alfonso, M., Yruela, I., Almárcegui, S., Torrado, E., Pérez, M. A., Picorel, R. 2001. Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Planta* 212:573-582
- Alfonso, M., Pueyo, J. J., Gaddour, K., Etienne, A-L., Kirilovsky, D., Picorel, R. 1996. Induced new mutation of D1 serine-268 in soybean photosynthetic cell cultures produced atrazine resistance, increased stability of $S_2Q_B^-$ and $S_3Q_B^-$ states and increased sensibility to light stress. *Plant Physiology* 112:1499-1508
- Alfonso, M., Montoya, G., Cases, R., Rodríguez, R., Picorel, R. 1994. Core antenna complexes, CP43 and CP47, of higher plant Photosystem II. Spectral properties, pigment stoichiometry and aminoacid composition. *Biochemistry* 10:494-500
- Allen, J. F. 1992. How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? *Trends in Biochemical Science* 17:12-17
- Allen, J. F. 1993. Redox control of transcription: sensors, response regulators, activators and repressors. *FEBS Letters* 332:203-207
- Allison, L. A. 2000. The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* 82:537-548
- Anbudurai, P. R., Mor, T. S., Ohad, I., Shestakov, S. V., Pakrasi, H. B. 1994. The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the Photosystem II reaction center complex. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 91:8082-8086
- Andersson, B., Aro, E.-M. 2001. Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II. In: Aro, E.-M., Andersson, B. (Eds.). *Regulation of Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 377-393

- Andersson, B., Barber, J. 1996. Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of Photosystem II. In: Baker, N.R. (Ed.). *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 101-121
- Aro, E. M., Virgin, I., Andersson, B. 1993. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143:113-134
- Baena-Gonzalez, E., Baginsky, S., Mulo, P., Summer, H., Aro, E. M., Link, G. 2002. Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathion-mediated phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression. *Plant Physiology* 127:1044-1052
- Baginsky, S., Tiller, K., Link, G. 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *The Plant Cell* 9:627-640
- Baginsky, S., Tiller, K., Pfannschmidt, T., Link, G. 1999. PTK, the chloroplast RNA polymerase associated protein kinase from mustard (*Sinapsis alba*), mediates redox control of plastid *in vitro* transcription. *Plant Molecular Biology* 39:1013-1023
- Bao, X., Focke, M., Pollard, M., Ohlrogge, J. B. 2000. Understanding *in vivo* carbon precursor supply for fatty acid synthesis in leaf tissue. *The Plant Journal* 22:39-50
- Barbato, R., Shipton, C. A., Giacometti, G. M., Barber, J. 1991. New evidence suggests that the initial photoinduced cleavage of the D1 protein may not occur near the PEST sequence. *FEBS Letters* 290:162-166
- Bassi, R. 1990. Chlorophyll binding proteins with antenna function in higher plants and green algae. *Photochemistry and Photobiology* 52:1187-1206
- Bauer, C. E., Elsen, S., Bird, T. H. 1999. Mechanisms for redox control of gene expression. *Annual Review of Microbiology* 53:495-523
- Benson, A. A., Mauro, B. 1958. Plant phospholipids. I. Identification of the phosphatidylglycerols. *Biochimica et Biophysica Acta* 27:189-195
- Berberich, T., Harada, M., Sugawara, K., Kodama, H., Iba, K., Kusano, K. 1998. Two maize genes encoding ω -3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Molecular Biology* 36:297-306

- Bernal, M., Testillano, P. S., Risueño, M.C., Yruela, I. 2006a. Excess copper induces structural changes in cultured photosynthetic soybean cells. *Functional Plant Biology* 33:1001-1012
- Bernal, M., Testillano, P. S., Alfonso, M., Risueño, M.C., Picorel, R., Yruela, I. 2006b. Identification and subcellular localization of the soybean copper P_{1B}-ATPase GmHMA8 transporter. *Journal of Structural Biology* doi: 10.1016/j.jsb.2006.10.016
- Bilyeu, K. D., Palavalli, L., Sleper, D. A., Beuselinck, P. R. 2003. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute to soybean linolenic acid levels. *Crop Science* 43:1833-1838
- Bligh, E. G., Dyer, W. S. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917
- Block, M. A., Dorne, A.-J., Joyard, J., Douce, R. 1983. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplast. *Journal of Biological Chemistry* 258:13281-13286
- Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R. 2005. Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* 437:1179-1182
- Bowyer, J. R., Camilleri, P., Vermaas, W. F. J. 1991. Photosystem II and its interaction with herbicides. In: Baker, N.R., Percival, M.P. (Ed.). *Topics in Photosynthesis*. Elsevier Scientific Publishers, pp. 27-85
- Bowyer, J. R., Packer, J. C. L., McCormack, B. A., Whitelegge, J. P., Bobinson, C., Taylor, M. 1992. Carboxyl-terminal processing of the D1 protein and photoinactivation of water splitting in Photosystem II. *The Journal of Biological Chemistry* 267:5424-5433
- Browse, J., McCourt, P., Somerville, C. 1986. A mutant of Arabidopsis deficient in C18:3 and C16:3 leaf lipids. *Plant Physiology* 81:859-864.
- Brudvig, G., Beck, W., Paula, J. D. 1989. Mechanism of photosynthetic water oxidation. *Annual Review of Biophysics and Biochemistry* 18:25-46
- Cahoon, E. B., Crammer, A. M., Shanklin, J., Ohlrogge, J. B. 1994. D6 hexadecenoic acid is synthesized by the activity of a soluble $\Delta 6$ palmitoyl-

- ACP carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm. *The Journal of Biological Chemistry* 269:27519 - 27526
- Cahoon, E. B., Shanklin, J., Ohlrogge, J. B. 1992. Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 89:11184-11188
- Camm, E. L., Green, B. R. 1980. Fractionation of thylakoid membranes with the non ionic detergent octyl- β -D-glucopyranoside. *Plant Physiology* 66:428-432
- Cánovas, P. M., Barber, J. 1993. Detection of a 10 kDa breakdown product containing the C-terminal of the D1 protein in photoinhibited wheat leaves suggest an acceptor side mechanism. *FEBS Letters* 324:341-344
- Chang, C., Stewart, R. C. 1998. The two-component system. *Plant Physiology* 117:723-731
- Clayton, R. K. 1965. Reaction centers of photosynthetic bacteria. *Science* 149:1346-1347
- Constant, S., Perewoska, I., Nedbal, L., Miranda, T., Etienne, A.-L., Kirilovsky, D. 1996. A new phenotype for a herbicide resistant mutant of *Synechocystis* 6714 with a high sensitivity to photoinhibition. *Plant Science* 115:165-174
- Danon, A., Mayfield, S. P. 1994. ADP-dependent phosphorylation regulates RNA-binding: implications in light-modulated translation. *The EMBO Journal* 13:2227-2235
- De las Rivas, J., Andersson, B., Barber, J. 1992. Two sites of primary degradation induced by acceptor or donor side photoinhibition in Photosystem II core complex. *FEBS Letters* 30:246-252
- Deisenhofer, J., Michel, H. 1985. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO Journal* 8:2149-2169
- Diner, B., Petrouleas, V., Wendoloski, J. 1991. The iron-quinone electron-acceptor complex of Photosystem II. *Physiologia Plantarum* 81:423-436
- Diner, B. A., Ries, D. F., Cohen, B. N., Metz, J. G. 1988. COOH-terminal processing of polypeptide D1 of the Photosystem II reaction center of *Scenedesmus obliquus* is necessary for the assembly of oxygen evolving complex. *The Journal of Biological Chemistry* 263:8972-8980

- Dörmann, P. 2005. Membrane lipids. In: Murphy, D.J. (Ed.). *Plants Lipids-Biology, Utilisation and Manipulation*. Blackwell Publishing, pp. 123-161
- Dörmann, P., Benning, C. 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science* 7:112-118
- Drobak, B. K. 2005. Inositol - containing lipids: roles in cellular signalling. In: Murphy, D.J. (Ed.). *Plants Lipids - Biology, Utilisation and Manipulation*. Blackwell Publishing, pp. 303-328
- Dyer, J. M., Chapital, D. C., Cary, J. W., Pepperman, A. B. 2001. Chilling-sensitive, post-transcriptional regulation of a plant fatty acid desaturase expressed in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282:1019-1025
- Dyer, J. M., Mullen, R. T. 2001. Immunocytological localization of two plant fatty-acid desaturases in the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 494:44-47
- Enami, I., Kaneko, M., Kitamura, N., Koike, H., Sonoike, K., Inoue, Y.,Katoh, S. 1991. Total immobilization of the extrinsic 33 kDa protein in spinach photosystem II membrane preparations. Protein stoichiometry and stabilization of oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta* 1060:224-229
- Erickson, J. M., Rahire, M., Bennoum, P., Delepaire, P., Diner, B., Rochaix, J. D. 1984. Herbicide resistance in *Chlamydomonas reinhardtii* results from a mutation in the chloroplast gene for the 32 kDa protein of PSII. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 81:3617-3621
- Escoubas, J., Lomas, M., LaRoche, J., Falkowski, P. G. 1995. Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:10237-10241
- Ferro, M., salvi, D., Brugière, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N. 2003. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Proteomics* 2.5:325-345
- Fey, V., Wagner, R., Bräutigam, K., Wirtz, M., Hell, R., Dietzmann, A., Leister, D., Oelmüller, R., Pfannschmidt, T. 2005. Retrograde plastid redox signals in

- the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 280:5318-5328
- Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., McAndrew, R. S., Osteryoung, K. W., Gage, D.A., Phinney, B.S. 2003. Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteome Research* 2:413-425
- Fryer, M. J., Oxborough, K., Karpinski, S., Mullineaux, P. M., Baker, N. R. 2003. Control of ascorbate peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal* 33:691-705
- Fujino, Y., Miyazawa, T. 1979. Chemical structures of mono-, di-, tri- and tetraglycosylglycerides in rice bran. *Biochimica et Biophysica Acta* 572:442-451
- Garcia-Diaz, T., Martínez-Rivas, J. M., Mancha, M. 2002. Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum* 114:13-20
- Ghantonakis, D. F., Yocum, C. F. 1990. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:255-276
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., Somerville, C. 1998. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast ω -3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 106:1615-1621
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., Somerville, C. 1994. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast ω -3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 106:1515-1621.
- Golden, S. S., Haselkorn, R. 1985. Mutation to herbicide resistance maps within the *psbA* gene of *Anacystis nidulans* R2. *Science* 229:1104-1107
- Gombos, Z., Wada, H., Murata, N. 1992. Unsaturation of fatty acids in membrane lipids enhances tolerance of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 to low temperature photoinhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:9959-9963
- Gombos, Z., Wada, H., Murata, N. 1994. The recovery of photosynthesis from low-temperature photoinhibition is accelerated by the unsaturation of

- membrane lipids: a mechanism of chilling tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:8787-8791
- Green, B. R., Dunford, D. G. 1996. The chlorophyll-carotenoid protein of oxygen photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:685-714
- Greenberg, B. M., Gaba, V., Mattoo, A. K., Edelman, M. 1987. Identification of a primary *in vivo* degradation product of the rapidly-turning over 32 kDa protein of Photosystem II. *EMBO Journal* 6:2865-2869
- Gyula, N., Schafer, E., Nagy, F. 2003. Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6:446-452
- Hagio, M., Sakurai, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Wada, H. 2002. Phosphatidylglycerol is essential for the development of thylakoid membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 43:1456-1464
- Hamada, T., Nishiuchi, T., Kodama, H., Nishimura, M., Iba, K. 1996. cDNA cloning of a wounding-inducible gene encoding a plastid ω -3 fatty acid desaturase from tobacco. *Plant and Cell Physiology* 37:606-611
- Hanse, E. R., Petracek, M. E., Dickey, L. F., Thompson, W. F. 2001. The 5' end of the pea *ferredoxin-1* mRNA mediates rapid and reversible light-directed changes in translation in tobacco. *Plant Physiology* 125:770-778
- Harwood, J. L. 2005. Fatty acid biosynthesis. In: Murphy, D.J. (Ed.). *Plant Lipids - Biology, Utilisation and Manipulation*. Blackwell Publishing, pp. 27-66
- Hasimoto, A., Ettinger, W. F., Yamamoto, Y., Theg, S. M. 1997. Assembly of the newly imported oxygen-evolving complex subunits in isolated chloroplast: sites of assembly and mechanism of binding. *The Plant Cell* 9:441-452
- Haussühl, K., Andersson, B., Adamska, I. 2001. A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant Photosystem II. *EMBO Journal* 20:1-10
- Heppard, E. P., Kinney, A. J., Stecca, K. L., Miao, G. 1996. Developmental and growth temperature regulation of different microsomal ω -6 desaturase genes in soybean. *Plant Physiology* 110:311-319

- Herbes, M., Allen, C. 1983. Lipid quantification of freshwater invertebrates: method modification for microquantitation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 40:1315-1317
- Hirschberg, J., McIntosh, L. 1983. Molecular basis of herbicide resistance in *Amarantus hybridus*. *Science* 222:1346-1349
- Horiguchi, G., Fuse, T., Kawakami, N., Kodama, H., Iba, K. 2000. Temperature-dependent translational regulation of the ER ω -3 fatty acid desaturase gene in wheat root tips. *The Plant Journal* 24:805-813
- Horiguchi, G., Iwakawa, H., Kodama, H., Kawakami, N., Nishimura, M., Iba, K. 1996. Expression of a gene for plastid ω -3 fatty acid desaturase and changes in lipid and fatty acid compositions in light- and dark-grown wheat leaves. *Physiologia Plantarum* 96:275-283
- Horiguchi, G., Kodama, H., Nishimura, M., Iba, K. 1996. Role of ω -3 fatty acid desaturases in the regulation of the level of trienoic fatty acids during leaf cell maturation. *Planta* 199:439-442
- Horvath, I., Glatz, A., Varvasovszki, V., Z., T., Pali, T., Balogh, G., Kovacs, E., Nadasdi, I., Benkő, S., Joó, F., Vigh, L. 1998. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: Identification of *hsp17* as a "fluidity gene". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3513-3518
- Huber, S. C., Hardin, S. C. 2004. Numerous posttranslational modifications provide opportunities for the intricate regulation of metabolic enzymes at multiple levels. *Current Opinion in Plant Biology* 7:318-322
- Hugly, S., Somerville, C. 1992. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Physiology* 99:197-202
- Iba, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 53:225-245
- Iba, K., Gibson, S., Nishiuchi, T., Fuse, T., Nishimura, M., Arondel, V., Hugly, S., somerville, C. 1993. A gene encoding a chloroplast ω -3 desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy

- number of the FAD7 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*. 268:24099-24105
- Ivanova, A., Stefanov, K., Yordanov, I. 1999. Effect of the herbicide atrazine on the bean leaf lipids. *Biologia Plantarum* 42:417-422
- Jackson, D. T., Froehlich, J. E., Keegstra, K. 1998. The hydrophilic domain of Tic110, an inner envelope membrane component of the chloroplastic protein translocation apparatus faces the stromal compartment. *The Journal of Biological Chemistry* 278:16583-16588
- Jäger-Vottero, P., Dorne, A. J., Jordanov, J., Douce, R., Joyard, J. 1997. Redox chains in chloroplast envelope membranes: spectroscopic evidence for the presence of electron carriers, including iron-sulfur centers. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 94:1597-1602
- Janssen, M. A. K., Depka, B., Trebst, A., Edelman, M. 1993. Engagement of specific sites in plastoquinone niche regulates degradation of D1 protein in Photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* 268:21246-21252
- Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C. A., Lutes, J., Benning, C., Chory, J. 2000. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:8175-8179
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., Krauss, N. 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2,5 Å resolution. *Nature* 411:909-917
- Kanervo, E., Aro, E. M., Murata, N. 1995. Low unsaturation level of thylakoid membrane lipids limits turnover of the D1 protein of Photosystem II at high irradiance. *FEBS Letters* 364:239-242
- Kanervo, E., Tasaka, Y., Murata, N., Aro, E. M. 1997. Membrane lipid unsaturation modulates processing of the photosystem II reaction center protein D1 at low temperatures. *Plant Physiology* 1997:841-849
- Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creisse, G., Mullineaux, P. M. 1997. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *The Plant Cell* 9:627-640

- Ke, J., Behal, R. H., Back, S. L., Nikolau, B. J., Wurtele, E. S., Oliver, D. J. 2000. The role of pyruvate dehydrogenase and acetyl-coA synthetase in fatty acid synthesis in developing *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* 123:497-508
- Kelly, A. A., Froehlich, J. E., Dormann, P. 2003. Disruption of the two digalactosyldiacylglycerol synthase genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* reveals the existence of an additional enzyme of galactolipid synthesis. *The Plant Cell* 15:2694-2706
- Kirilovsky, D., Ajlani, G., Picaud, M., Etienne, A. L. 1989. Mutations responsible for high light sensitivity in an atrazine-resistant mutant of *Synechocystis* 6714. *Plant Molecular Biology* 13:355-363
- Kirilovsky, D., Ducruet, J. M., Etienne, A. L. 1991. Apparent destabilization of the S1 state related to herbicide resistance in a cyanobacterium mutant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1060:37-44
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Reinold, S., Hahlbrock, K., Somissich, I. E. 1997. Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial ω -3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 94:2079-2084
- Kis, M., Zsiros, O., Farkas, T., Wada, H., Nagy, F., Gombos, Z. 1998. Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:4209-4214
- Klyachko-Gurvich, G. L., Tsoglin, L. N., Doucha, J., Kopetskii, J., Shebalina, I. B., Semenenko, V. E. 1999. Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiologia Plantarum* 107:240-249
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, C., Nishimura, M., Iba, K. 1994. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast omega-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiology* 105:601-605
- Kojima, M., Seki, K., Ohnishi, M., Ito, S., Fujino, Y. 1990. Structure of novel glyceroglycolipids in Aszuki bean (*Vigna angularis*) seeds. *Biochemistry and Cell Biology* 68:59-64

- Kovtun, Y., W.L., C., Tena, G., Sheen, J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:2940-2945
- Kramer, H. J. M., Pennoyer, J. D., van Grondelle, R., Westerhuis, W. H. J., Niederman, R. A., Amesz, J. 1984. Low-temperature optical properties and pigment organization of the B875 light-harvesting bacteriochlorophyll-protein complex of purple photosynthetic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 767:335-344
- Kruse, O., Hankamer, B., Koncak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A. Schmid G. H., Barber, J. 2000. Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *The Journal of Biological Chemistry* 275:6509-6514
- Kühlbandt, W., Wang, D. N., Fujiyoshi, Y. 1994. Atomic model of plant light harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367:614-621
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Larrson, U.K., Sundby, C., Andersson, B. 1987. Characterization of two different subpopulations of spinach light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHCII): polypeptide composition, phosphorylation pattern and association with photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 894:59-68
- Leone, A., Costa, A., Grillo, S., Tucci, M., Horvath, I., Vigh, L. 1996. Acclimation to low water potential determines changes in membrane fatty acid composition and fluidity in potato cells. *Plant Cell and Environment* 19:1103-1109
- Li, H., Sherman, L. A. 2000. A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology* 182:4268-4277
- Li, H. M., Moore, H., Keegstra, K. 1991. Targeting of proteins to the outer envelope membrane uses a different pathway than transport into chloroplast. *The Plant Cell* 3:709-717
- Liere, K., Link, G. 1997. Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Nucleic Acids Research* 25:2403-2408

- Lightner, J., James Jr., D. W., Dooner, H. K., Browse, J. 1994. Altered body morphology is caused by increased stearate levels in a mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 6:401-412
- Lin, C. T., Shalitin, D. 2002. Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 54:469-496
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., A.B., O., Adam, Z., Andersson, B. 2000. The thylakoid FtsH plays a role in the light-induced turn-over of the Photosystem II D1 protein. *The Plant Cell* 12:419-432
- Lindqvist, Y., Huang, W. J., Schneider, G., Shanklin, J. 1996. Crystal structure of a $\Delta 9$ stearyl-acyl carrier protein desaturase from castor seeds and its relationship to other diiron proteins. *The EMBO Journal* 15:4081-4092
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402-408
- Los, D., Murata, N. 2004. Membrane fluidity and its role in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta* 1666:142-157
- Los, D.A., Murata, N. 2000. Regulation of enzymatic activity and gene expression by membrane fluidity. *Science's Signal Transduction Knowledge Environment*:
http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2000/62/pe1
- Los, D.A., Ray, M.K., Murata, N. 1997. Differences in the control of the temperature-dependent expression of four genes for desaturases in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology*. 25:1167-1175.
- Los, D. A., Horvath, I., Vigh, L., Murata, N. 1993. The temperature-dependent expression of the desaturase gene *desA* in *Synechocystis* PCC6803. *FEBS Letters* 318:57-60
- Madey, E., Nowack, L. M., Su, L., Hong, Y., Hudak, K. A., Thompson, J. E. 2001. Characterization of plasma membrane domains enriched in lipid metabolites. *Journal of Experimental Botany* 52:669-679
- Martin, B. A., Horn, M. E., Widholm, J. M., Rinne, R. W. 1984. Synthesis, composition and location of glycerolipids in photoautotrophic soybean cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta* 796:146-154

- Martínez-Rivas, J. M., Sánchez-García, A., Sicardo, M. D., García-Díaz, M. T., Mancha, M. 2003. Oxygen-independent temperature regulation of the microsomal oleate desaturase (FAD2) activity in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum* 117:179-185
- Matoo, A. K., Pick, U., Hoffman-Falk, H., Edelman, M. 1981. Light-dependent turnover of the D1 protein subunit of the photosystem II reaction center. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 78:1572-1576
- Matsuda, O., Sakamoto, H., Hashimoto, T., Iba, K. 2005. A temperature-sensitive mechanism that regulates post-transcriptional stability of a plastidial ω -3 fatty-acid desaturase (FAD8) in *Arabidopsis* leaf tissues. *Journal of Biological Chemistry* 280:3597-3604
- Matsuda, O., Watanabe, C., Iba, K. 2001. Hormonal regulation of tissue-specific ectopic expression of an *Arabidopsis* endoplasmic reticulum-type omega-3 fatty acid desaturase (FAD3) gene. *Planta* 213:833-840
- McConn, M., Browse, J. 1998. Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 15:521-530
- McConn, M., Browse, J. 1996. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell* 8:403-416
- McConn, M., Hugly, S., Browse, J., Somerville, C. 1994. A mutation at the *fad8* locus of *Arabidopsis* identifies a second chloroplast ω -3 desaturase. *Plant Physiology* 106:1609-1614
- McCourt, P., Browse, J., Watson, J., Arntzen, C. J. 1985. Analysis of photosynthetic antenna function in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) lacking trans-hexadecanoic acid. *Plant Physiology* 78:853-858
- Michel, H., Deisenhofer, J. 1988. Relevance of the photosynthetic reaction centre from purple bacteria to the structure of photosystem II. *Biochemistry* 27:1-7
- Mikami, K., Kanasaki, Y., Suzuki, I., Murata, N. 2002. The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Molecular Microbiology* 46:905-915

Bibliografia

- Miquel, M., Browse, J. 1998. Arabidopsis lipids: A fat chance. *Plant Physiology and Biochemistry* 36:187-197
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148
- Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206:1148-1159
- Miyao, M., Murata, N. 1984. Role of the 33 kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen evolution system and its replacement by chloride ions. *FEBS Letters* 170:350-354
- Moon, B. Y., Higashi, S., Gombos, Z., Murata, N. 1995. Unsaturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low-temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:6219-6223
- Mulo, P., Laakso, S., Mäenpää, P., Aro, E.M. 1998. Stepwise photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology* 117:483-490
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H., Iba, K. 2000. Trienoic fatty-acids and plant tolerance to high temperature. *Science* 287:476-479
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, H., Yasaka, I., Nishida, I. 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* 356:710-713
- Murata, N., Los, D. A. 2006. Histidine kinase Hik33 is an important participant in cold-signal transduction in cyanobacteria. *Physiologia Plantarum* 126:17-27
- Murashige, T., Skoog, F. G. 1962. a revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497
- Murphy, D. J., Piffanelli, P. 1998. Fatty acid desaturases: structure, mechanism and regulation. In: H.L. (Ed.). *Plant Lipid Biosynthesis*. Cambridge University Press, pp. 95-130
- Mustardy, L., Los, D. A., Gombos, Z., Murata, N. 1996. Immunocytochemical localization of acyl-lipid desaturases in cyanobacterial cells: evidence that both thylakoid membranes and cytoplasmic membranes are sites of lipid desaturation. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 93:10524-10527

- Nakajima, Y., Yoshida, S., Inoue, Y., Yoneyama, K., Ono, T. 1995. Selective and specific degradation of the D1 protein induced by binding of novel Photosystem II inhibitor to the Q_B site. *Biochimica et Biophysica Acta* 1230:38-44
- Napier, J. A., Michaelson, L. V., Sayanova, O. 2003. The role of cytochrome *b*₅ fushion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 68:135-143
- Napier, J. A., Michaelson, L. V., Dunn, T. M. 2002. A new class of lipid desaturase central to sphingolipid biosynthesis and signalling. *Trends in Plant Science* 7:475-478
- Napier, J. A., Sayanova, O., Stobart, A. K., Shewry, P. R. 1997. A new class of cytochrome *b*₅ fushion proteins. *Biochemical Journal* 1:717-718
- Nickelsen, J., Link, G. 1993. The 54 kDa RNA-binding protein from mustard chloroplast mediates endonucleolytic transcript 3'-end formation *in vitro*. *Plant Journal* 3:537-544
- Nield, J., Barber, J. 2006. Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757:353-361
- Nilsson, R., Brunner, J., Hoffman, N. E., van Wijk, K. J. 1999. Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54. *EMBO Journal* 18:733-742
- Nishiuchi, T., Hadama, T., Kodama, H., Iba, K. 1997. Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid ω-3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. *The Plant Cell* 9:1701-1712
- Nishiuchi, T., Nakamura, T., Abe, T., Kodama, H., Nishimura, M., Iba, K. 1995. Tissue-specific and light-responsive regulation of the promoter region of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast ω-3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*). *Plant Molecular Biology* 29:599-609
- Nixon, P. J., Komenda, J., Barber, J., Deak, Z., Vass, I., Diner, B. A. 1995. Detection of the PEST-like region of photosystem II modifies the Q_B-binding pocket but does not prevent rapid turnover of D1. *Journal of Biological Chemistry*. 270:14919-14927

Bibliografia

- Nott, A., Jung, H. S., Koussevitzky, S., Chory, J. 2006. Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annual Review of Plant Biology* 57:739-759
- Nuberger, S., Dörr, K., Wang, N., Kühlbrandt, W. 1993. Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *Journal of Molecular Biology* 234:347-356
- Ohlrogge, J. B., Browse, J. 1995. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 7:957-970
- Paddock, M. L., Rongey, S. M., Feher, G., Okamura, M. Y. 1989. Proton transfer in the reaction centre of purple bacteria. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 86:6602-6606
- Peltier, J. B., Ytterberg, A. J., Sun, Q., van Wijk, K. J. 2004. New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *The Journal of Biological Chemistry* 279:49367-49383
- Peter, T. P., Thornber, J. P. 1991. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 266:16745-16754
- Petracek, M. E., Dickey, L. F., Huber, S. C., Thompson, W. F. 1997. Light-regulated changes in abundance and polyribosome association of ferredoxin mRNA are dependent on photosynthesis. *The Plant Cell* 9:2291-2300
- Petracek, M. E., Thompson, W. F. 2000. Posttranscriptional light regulation of nuclear-encoded genes. In: J. K. Setlow (Ed.). *Genetic Engineering* Vol 22. Plenum Press, New York, pp. 1-10
- Pfannschmidt, T. 2003. Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science* 8:33-40
- Pfannschmidt, T., Allen, J. F., Oelmüller, R. 2001. Principles of redox control in photosynthesis gene expression. *Physiologia Plantarum* 112:1-9
- Piffanelli, P., Ross, J. H. E., Murphy, D. J. 1997. Intra- and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in *Brassica napus*. *The Plant Journal* 11:549-562
- Quail, P. H. 2002a. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology* 14:180-188

- Quail, P. H. 2002b. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3:85-93
- Reinsberg, D., Booth, P. G., Jegerschöld, C., Khoo, B. J., Paulsen, H. 2001. Folding, assembly and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHCII, in the presence of native lipids. *Biochemistry* 39:14305-14313
- Rennie, B. D., Tanner, J. W. 1989. Fatty acid composition of oil from soybean seeds grown at extreme temperatures. *Journal of American Oil Chemistry Society* 66:1622-1624
- Rhee, H. H., Morris, E. P., Barber, J., Kühlbrandt, W. 1997. Two-dimensional structure of plant photosystem II at 8 Å resolution. *Nature* 389:522-526
- Rodermel, S. 2001. Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends in Plant Science* 6:471-478
- Rogers, S. M. D., Ogren, W. L., Widholm, J. M. 1987. Photosynthetic characteristics of a photoautotrophic cell suspension culture of soybean. *Plant Physiology* 84:1451-1456
- Ruffle, S. V., Donnelly, D., Blundell, T. L., Nugent, J. A. 1992. A three-dimensional model of the Photosystem II reaction centre of *Pisum sativum*. *Photosynthesis Research* 34:287-300
- S.M., T., Scott, S. V. 1993. Protein import into chloroplasts. *Trends in Cell Biology* 3:186-190
- Sakakibara, H., Taniguchi, M., Sugiyama, T. 2000. His-Asp phosphorelay signaling: a communication avenue between plants and their environment. *Plant Molecular Biology* 42:273-278
- Sakamoto, T., Bryant, D. A. 1997. Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Molecular Microbiology* 23:1281-1292
- Sakamoto, T., Murata, N. 2002. Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Current Opinion in Microbiology* 5:206-210

- Sato, F., Shigematsu, Y., Yamada, Y. 1988. Selection of an atrazine-resistant tobacco cell line having a mutant *psbA* gene. *Molecular Gene Genetics* 24:358-360
- Schaller, F., Schaller, A., Stintzi, A. 2005. Biosynthesis and metabolism of jasmonates. *Journal of Plant Growth Regulation* 23:179-199
- Scheibe, R. 1991. Redox-modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. *Plant Physiology* 96:1-3
- Schmidt, H., Heinz, E. 1990. Desaturation of oleoyl groups in envelope membranes from spinach chloroplast. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 87:9477-9480
- Schmidt, H., Heinz, E. 1990. Involvement of ferredoxin in desaturation of lipid-bound oleate in chloroplasts. *Plant Physiology* 94:214-220
- Schneider, J. C., Nielsen, E., Somerville, C. 1995. A chilling-sensitive mutant of *Arabidopsis* is deficient in chloroplast protein accumulation at low temperature. *Plant, Cell and Environment* 18:23-32
- Schultz, D. J., Cahoon, E. B., Shanklin, J., Craig, R., Cox-Foster, D. L. Mumma, R.O. Medford, J.I. 1996. Expression of Δ^9 14:0 - acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of ω 5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium hortorum*). *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 93:8771-8775
- Schwender, J., Ohlrogge, J. B. 2002. Probing *in vivo* metabolism by stable isotope labelling of storage lipids and proteins in developing *Brassica napus* embryos. *Plant Physiology* 130:347-361
- Schwenger-Erger, C., Thiemann, J., Barz, W., Johanningmeier, u., Naber, N. 1993. Metribuzin resistance in photoautotrophic *Chenopodium rubrum* cell cultures. *FEBS Letters* 329:43-46
- Selstam, E. 1998. Development of thylakoid membranes with respect to lipids. In: Siegenthaler, P.-A., Murat, N. (Eds.). *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, pp. 209-224
- Shanklin, J., Cahoon, E. B. 1998. Desturation and related modifications of fatty acids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:611-641

- Shen, Y. X., Danon, A., Christopher, D. A. 2001. RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant and Cell Physiology* 42:1071-1078
- Sherameti, I., Sopory, S. K., Trebicka, A., Pfannschmidt, T., Oelmüller, R. 2002. Photosynthetic electron transport determines nitrate reductase gene expression and activity in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry* 277:46594-46600
- Sheu, J. J., Yu, T. S., Tong, W. F., Yu, S. M. 1996. Carbohydrate starvation stimulates differential expression of rice α -amylase genes that are modulated through complicated transcriptional and post-transcriptional processes. *The Journal of Biological Chemistry* 271:26998-27004
- Slocombe, S. P., Piffanelli, P., Fairbairn, D., Bowra, S., Hatzopoulus, P., Tsiantis, M., Murphy, D.J. 1994. Temporal and tissue-specific regulation of a *Brassica napus* stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Plant Physiology* 104. 1167-1176
- Somanchi, A., Mayfield, S. P. 2001. Regulation of chloroplast translation. In: Aro, E.-M., Andersson, B. (Ed.). *Regulation of Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, pp.137-151
- Somerville, C. 1995. Direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:6215-6218
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J. G., Ohlrogge, J. B. 2000. Lipids. In: Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (Eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist, pp. 456-527
- Spangfrot, M., Andersson, B. 1989. Subpopulations of the main chlorophyll a/b light-harvesting complex of photosystem II. Isolation and biochemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 977:130-170
- St. John, J. B. 1976a. Manipulation of galactolipid fatty acid composition with substituted pyridazinones. *Plant Physiology* 57:38-40

- St. John, J. B., Christiansen, M. N. 1976b. Inhibition of linolenic acid synthesis and modification of chilling resistance in cotton seedlings. *Plant Physiology* 57:257-259
- Strand, A. 2004. Plastid-to-nucleus signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 7:621-625
- Streatfield, S. J., Weber, A., Kinsman, E. A., Husler, R. E., Li, J., Post-Beittenmiller, D., Kaiser, W.M., Pyke, K.A., Flügge, U-I, Chory, J. 1999. The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid dependent nuclear gene expression. *The Plant Cell* 11:1609-1621
- Sullivan, J. A., Gray, J. C. 1999. Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark in roots of the pea *lip 1* mutant. *The Plant Cell* 11:901-910
- Sundby, C., Chow, W. S., Andersson, J. M. 1993. Effects on photosystem II function, photoinhibition, and plant performance of the spontaneous mutation of serine 264 in the photosystem II reaction center D1 protein in triazine-resistant *Brassica napus*. *Plant Physiology* 103:105-113
- Susek, R. E., Ausubel, S. M., Chory, J. 1993. Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development. *Cell* 74:787-799
- Tang, L., Bhat, S., Petracek, M. E. 2003. Light control of nuclear gene mRNA abundance and translation in tobacco. *Plant Physiology* 133:1979-1990
- Tang, G., Novitzky, W., Griffin, H., Huber, S., Dewey, R. 2005. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *The Plant Journal* 44:433-446
- Tenhaken, R., Rübeler, C. 1998. Induction of alkalization and an oxidative burst by low doses of cycloheximide in soybean cells. *Planta* 206:666-672
- Theg, S. M., Scott, S. V. 1993. Protein import into chloroplast. *Trends in Cell Biology* 3:186-190
- Thompson, J. A. J. 1993. Response of lipid metabolism to developmental change and environmental perturbation. *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 591-619

- Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 76:4350-4354
- Trebitsh, T., Levitan, A., Sofer, A., Danon, A. 2000. Translation of chloroplast *psbA* mRNA is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. *Molecular and Cellular Biology* 20:1116-1123
- Trebst, A. 1987. Three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction centre polypeptides of photosystem II. *Zeitschrift für Naturforschung* 42c:742-750
- Trémolières, A., Siegenthaler, P.A. 1998. Reconstitution of photosynthetic structures and activities with lipids. In: Siegenthaler, P.A. Murata, N. (Ed.). *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Kluwer Academic Publishers, pp. 175-189
- Tyystjärvi, E., Aro, E. M. 1996. The rate constant of photoinhibition, measured in lincomicin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA* 93:2213-2218
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2000. Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in Plant Science* 5:67-74
- van Wijk, K. J., Bingsmark, S., Aro, E.-M., Andersson, B. 1995. *In vitro* synthesis and assembly of photosystem II core proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270:25685-25695
- Vermaas, W. F. J., Renger, G., Arntzen, C. J. 1989. Herbicide/quinone binding interactions in photosystem II. *Zeitschrift für Naturforschung* 139c:368-373
- Verner, A. V., van Kan, P. J. M., Rich, P. R., B., A., Ohad, I. 1997. Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *b₆f* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase desactivation by a single turnover flash. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 94:1585-1590
- Vigh, L., Los, D., Horvath, I., Murata, N. 1993. The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in

- Synechocystis* PCC6803. *Proceedings of The National Academic of Sciences USA* 90:9090-9094
- Vijayan, P., Browse, J. 2002. Photoinhibition in mutants of *Arabidopsis* deficient in thylakoid unsaturation. *Plant Physiology* 129:876-885
- Virgin, I., Salter, A. H., Hagman, A., Vass, I., Styring, S., Andersson, B. 1992. Molecular mechanisms behind light-induced inhibition of Photosystem II electron transport and degradation of reaction center polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1101:139-142
- Wallis, J. G., Browse, J. 2002. Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Progress in Lipid Research* 41:254-278
- Widholm, J. M. 1972. The use of fluoresceine diacetate and phenosaphranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology* 47:189-194
- Wolter, F. P., Schmidt, R., Heinz, E. 1992. Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids. *The EMBO Journal* 11
- Wu, J., Browse, J. 1995. Elevated levels of high-melting-point phosphatidylglycerols do not induce chilling sensitivity in an *Arabidopsis* mutant. *The Plant Cell* 7:17-27
- Xiong, L., Schumaker, K., Zhu, J.-K. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* 14:S165-S183
- Yabuta, Y., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T., Shigeoka, S. 2004. Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology* 45:1586-1594
- Yadav, N. S., Wierzbicki, A., Aegerter, M., Caster, C. S., Pérez-Grau, L., Kinney, A.J., Hitz, W.D., Russell Booth, J., Schweiger, B., Stecca, K.L., Allen, S.M., Blackwell, M., Reiter, R.S., Carlson, T.J., Russell, S.H., Feldmann, K.A., Pierce, J., Browse, J. 1993. Cloning of higher plant ω -3 fatty acid desaturases. *Plant Physiology* 103:467-476
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2005. Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* 10:88-94
- Yamamoto, K. T. 1994. Further characterization of auxin-regulated mRNAs in hypocotyl sections of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek): sequence homology to genes for fatty acid desaturases and atypical late-

- embryogenesis-abundant protein and the mode of expression of the mRNAs. *Planta* 192:359-364
- Youvan, D. C., Bylina, E. J., Alberti, M., Begush, H., Hearst, J. E. 1984. Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction center, B870 antenna, and flanking polypeptides from *Rhodobacter capsulata*. *Cell* 37:949-957
- Yruela I., Alfonso, M., García-Rubio, I., Martínez, J. I., Picorel, R. 2001. Spin label electrón paramagnetic resonance study in thylakoid membranes from a new herbicide-resistant D1 mutant from soybean cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1515:55-63
- Yu, B., Xu, C., Benning, C. 2002. *Arabidopsis* disrupted in *SQD2* encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:5732-5737
- Zer, H., Ohad, I. 1995. Photoinhibition of photosystem II induces changes in the photochemical reaction centerabolishing the regulatory role of the Q_B site in the D1 protein degradation. *European Journal of Biochemistry* 231:448-453
- Zhang, L., Aro, E. M. 2002. Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II. *FEBS Letters* 512:13-18
- Zhang, L., Paakkarinen, V., van Wijk, K. J., Aro, E.M. 2000. Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: Regulation of translational elongation, insertion and assembly into Photosystem II. *The Plant Cell* 12:1769-1781
- Zhang, L. X., Paakkarinen, V., van Wijk, K. J., Aro, E. M. 1999. Cotranslational assembly of the D1 protein into Photosystem II. *The Journal of Biological Chemistry* 274:16062-16067
- Zouni, A., Witt H-Y, Kern J., Fromme, P., Krausse, N., Saenger, W., Orth, P. 2001. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409:739-743

Collados, R., Andreu, V., Testillano, P.-S., Risueño, M.C., Picorel, R., Alfonso, M. Immunocytochemical analysis of the plastid ω 3 fatty acid desaturase FAD7 from soybean: evidence of thylakoid membrane localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. (Enviado)

Collados, R., Picorel, R., Alfonso, M. Role of photosynthetic electron transport on fatty acid desaturases gene expression in soybean cell suspensions. (En preparación)