



Identificación de mecanismos reguladores de la síntesis de isoprenoides plásticos mediante la caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Catalina Perelló Llabrés

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Identificación de mecanismos reguladores
de la síntesis de isoprenoides plastídicos
mediante la caracterización
de mutantes de *Arabidopsis thaliana*

Catalina Perelló Llabrés

Tesis Doctoral
2013



Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG)

Departamento de Genética Molecular

Universidad de Barcelona (UB)

Facultad de Biología

Departamento de Biología Vegetal

“Identificación de mecanismos reguladores de la síntesis de isoprenoides plastídicos mediante la caracterización de mutantes de *Arabidopsis thaliana*”

Memoria presentada por Catalina Perelló Llabrés para optar al grado de

Doctora por la Universidad de Barcelona

Firmado:

Doctoranda

Catalina Perelló Llabrés

Co-director

Dr. Pablo José Pulido
Gómez

Tutor

Dr. Joaquim Azcón Bieto

Director

Dr. Manuel Rodríguez Concepción

Barcelona, 2013

AGRADECIMIENTOS

He aprendido muchísimo de todos aquellos que han dedicado fuerza, trabajo y cariño para que este trabajo pudiera salir adelante. Gracias Manuel por los proyectos, la paciencia y la guía durante todos estos años y Pablo porque has empujado buena parte de esta tesis. A Jordi Pérez que me enseñó desde el principio tantísimas cosas, a los compañeros del grupo Águila, Míriam, Rosa, Briardo, Mike Phillips, Lucio, Jordi Bou y a los que ya acabaron. Aprecio muchísimo a todos los compañeros y amigos del CRAG que hicieron este proceso más fácil,

Agradezco a Vincent que me aceptara en su laboratorio de para llevar a cabo una parte importante de este trabajo, la experiencia profesional y personal de esa estancia tiene un valor excepcional para mí,

Hubiera sido imposible realizar todo este trabajo sin el apoyo de mis padres, Baltasar y María Antonia, y de toda mi familia de Mallorca a quien agradezco y me disculpo de haberles robado el tiempo que no pude estar con ellos,

A mis compañeros de Taiji, no creo que hubiera acabado esta tesis sin todo lo que me han enseñado, por fin aprendí a respirar,

Agradezco a Maite Peñafiel que me dio de nuevo la oportunidad de volver al oficio de la Farmacia en estos últimos meses,

A Gabi y Daniel que han estado siempre para echar una mano, y Alejandro del Río por la casa estos últimos meses,

Con la fuerza de ALe empecé este trabajo y lo seguí, me diste tantas ideas, tanto corazón, recursos y razones para seguir adelante,

A Josep, no habría acabado a tiempo de no ser por el empeño y cariño que le pusiste; este libro no sería tan bonito,

Barcelona, Setiembre 2013.

*Dedicado a todos los que siembran,
y esperan ver crecer.*

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Plantas e Isoprenoides.	7
1.1 Conceptos generales sobre isoprenoides.	8
1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio de isoprenoides.	9
2. Biosíntesis de Isoprenoides.	11
2.1 La vía del Mevalonato (MVA).	12
2.2 La vía del Metileritritol 4-fosfato (MEP).	14
2.2.1 Síntesis de MEP.	15
2.2.2 Conversión de MEP en IPP y DMAPP.	18
2.3 Coordinación entre la vía del MEP y del MVA.	18
3. Regulación de la vía del MEP.	19
3.1 Regulación transcripcional de la vía del MEP.	20
3.1.1 Regulación transcripcional de la vía del MEP por luz.	21
3.1.2 Regulación transcripcional de la vía del MEP por reloj circadiano.	21
3.2 Regulación postranscripcional de la vía del MEP.	24
3.2.1 Regulación de la actividad de los enzimas del MEP.	25
3.2.2 Regulación de los niveles de los enzimas del MEP.	26
3.2.3 Sistemas de chaperonas cloroplastídicas.	27
3.2.4 Comparimentación de la vía del MEP.	31
OBJETIVOS	33

MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. Métodos de manipulación de <i>A. thaliana</i>.	39
1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.	39
1.2 Esterilización de semillas.	39
1.3 Cultivo <i>in vitro</i> de plántulas <i>A.thaliana</i> .	39
1.4 Cultivo en tierra de <i>A.thaliana</i> .	40
2. Métodos bioquímicos y de biología molecular aplicados a <i>A.thaliana</i>.	41
2.1 Métodos bioquímicos aplicados.	41
2.1.1 <i>Seedling establishment</i> (%SE) .	41
2.1.2 Determinación de Pigmentos (clorofilas y carotenoides).	41
2.2 Genómica	42
2.2.1 Identificación de líneas mutantes de <i>A. thaliana</i> .	42
2.2.2 Cuantificación de niveles de expresión génica	45
2.2.3 Ensayo de Complementación Bimolecular (BiFC)	46
2.2.4 Método de transformación por inmersión floral	49
2.3 Proteómica	52
2.3.1 Extracción de proteína total y <i>western blot</i> .	52
2.3.2 Método de extracción total de proteína y análisis por electroforesis bidimensional.	55
2.3.3 Ensayos de inmunoprecipitación de proteína.	57
3. Métodos de Biología Molecular general y ensayos <i>in vitro</i>.	61
3.1 Métodos de Clonaje.	61
3.1.2 Extracción de gDNA	61
3.1.3 PCR sobre gDNA o DNA plasmídico.	61
3.1.4 Gel de agarosa y purificación del producto de PCR.	61
3.1.5 Inserción del fragmento amplificado en pTOPOTA.	62
3.1.6 Transformación y procedimientos en <i>E.coli</i> .	63
3.2 Purificación de proteínas truncadas en <i>E.coli</i> .	65
3.3 Ensayo de actividad enzimática DXR	66
3.4 Ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H).	67
4. Métodos de microscopía e imagen.	69

4.1 Microscopía	69
4.2 Ensayos histológicos	69
4.2.1 Protocolo de Inmunolocalización por microscopía óptica.	70
4.2.2 Protocolo de Inmunolocalización por microscopía electrónica.	73
4.3 Fotografía e Imagen	77
5. Software y bases de datos.	78
RESULTADOS	85
1.1 Identificación de mutantes del reloj circadiano de	
<i>A. thaliana</i> que resisten a un bloqueo de la vía MEP.	85
1.2 La disrupción del reloj circadiano conlleva un aumento	
en los niveles de proteína DXR.	88
1.3. Los niveles de transcrito DXR no varían en <i>toc1-1</i> con respecto al wt.	89
1.4 La resistencia a FSM del mutante <i>toc1-1</i> es un efecto	
del mal funcionamiento del reloj circadiano.	90
1.5 El fotoperiodo y la cantidad de luz influyen en los	
niveles de DXR y en la resistencia a FSM en los mutantes <i>toc1</i>.	91
1.6 Abordajes para el estudio de una posible modificación	
postranscripcional de DXR en el mutante <i>toc1-1</i>.	96
1.7 El mecanismo postranscripcional de regulación de DXR	
implica el aumento de los niveles de enzima activa.	104
1.8 La proteína DXR-GFP se encuentra compartimentada en	
abundantes vesículas subplastídicas en el mutante <i>toc1-1</i>.	106
1.8.1 La fusión de GFP a DXR podría disminuir la actividad de DXR-GFP.	107
1.8.2 DXR-GFP se localiza en acúmulos subplastídicos	
en mayor abundancia y en plastos pequeños en <i>toc1-1</i>.	108
1.8.3 La sobreexpresión de DXR-GFP causa la formación de vesículas en los plastos.	110
2.1 Regulación de la conformación nativa de DXR.	114
2.2 DXR interacciona <i>in vivo</i> con las isoformas plastídicas de la familia Cpn60.	116

2.3 Screening de mutantes de <i>A. thaliana</i> de subunidades Cpn60 con fenotipo a FSM.	124
2.4 Posible efecto postranscripcional de Cpn60 α 1 sobre DXR.	128
2.5 Screening de mutantes de <i>A. thaliana</i> de subunidades Cpn10 y Cpn20 con fenotipo a FSM.	129
2.6 Cpn60 α 1 regula postranscripcionalmente a DXR.	132
2.6.1 La sobreexpresión de Cpn60 α 1 causa una disminución de los niveles de DXR.	135
2.6.2 DXR se degrada con mayor celeridad en <i>arc2</i> y las líneas <i>Cpn60α1-GFP</i> que en el wt.	136
2.7. Posible papel de TOC1 en la regulación de DXR a través de las chaperonas plastídicas Cpn60.	138
2.7.1 Los niveles de transcrito de los genes Cpn60 no presentan cambios en plantas con niveles alterados de TOC1.	138
2.7.2 Los niveles disminuidos de proteína Cpn60 β en <i>toc1-1</i> sugieren una regulación postranscripcional de DXR por TOC1 a través del complejo Cpn60.	142
DISCUSIÓN	145
1. Reloj circadiano y regulación de la vía del MEP.	147
1.1. La alteración de la función de TOC1 y del reloj circadiano provoca una acumulación específica de DXR.	147
1.2. La acumulación de DXR responde a la disrupción de mecanismos de regulación postranscripcional posiblemente encaminados a conseguir niveles estables de enzima.	151
1.3 El mayor tamaño aparente de DXR en el mutante <i>toc1-1</i> no influye en su estabilidad o actividad.	152
2. Niveles elevados de DXR-GFP generan la aparición de vesículas subplastídicas.	155
3. Regulación postranscripcional de DXR.	159
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	169

APÉNDICES

187

ARTÍCULO 1

New Insights into Plant Isoprenoid Metabolism

ARTÍCULO 2

Quantification of plant resistance to isoprenoid biosynthesis inhibitors.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Grupos de isoprenoides.

Tabla 2. Enzimas de la ruta del MVA en *A.thaliana*.

Tabla 3. Isoformas de IDI en *A.thaliana*.

Tabla 4. Enzimas de la ruta del MEP en *A.thaliana*.

Tabla 5. Componentes del reloj circadiano en *A.thaliana*.

Tabla 6. Chaperonas plastídicas Cpn60 y Cpn20 en *A.thaliana*.

Tabla 7. Componentes del medio para cultivo *in vitro* de plántulas de *A.thaliana*.

Tabla 8. Suplementos utilizados en el medio MS

Tabla 9. Composición de la mezcla de reacción de PCR.

Tabla 10. Condiciones de reacción de PCR para la detección de la mutación *toc1-1*.

Tabla 11. Condiciones de reacción de PCR para la detección de la mutación *arc2*.

Tabla 12. Componentes de la mezcla de reacción para la ligación de fragmentos de DNA en vectores.

Tabla 13: Contenido de los tampones TfBI y TfBII para la resuspensión de *E.coli* y la preparación de células competentes.

Tabla 14. Composición de los precultivos para la preparación de células competentes de levadura.

Tabla 15. Protocolo de fijación con EtOH y formaldehído.

Tabla 16. Protocolo de inclusión en parafina.

Tabla 17. Disolventes para la eliminación de la parafina.

Tabla 18. Soluciones para lavado y bloqueo.

Tabla 19. Protocolo para la deshidratación de muestras.

Tabla 20. Protocolo para la imbibición de resina LRW.

Tabla 21. Protocolo para la inmunolocalización de secciones para TEM.

Tabla 22. Protocolo para la inmunolocalización de secciones para TEM sobre *grids*.

Tabla 23. Programas y bases de datos utilizadas.

Tabla 24. *Primers* utilizados para el genotipado de líneas mutantes SALK.

Tabla 25. *Primers* utilizados para q-RT-PCR.

Lista de tablas y figuras

Tabla 26. Construcciones y *primers* para la sobreexpresión de proteína DXR en *E.coli*.

Tabla 27. Construcciones y *primers* para los experimentos de Complementación Fluorescente Bimolecular (BiFC).

Tabla 28. Construcciones y *primers* para experimentos de doble híbrido en levadura.

Tabla 29. Líneas mutantes y sobreexpresoras de *A.thaliana* de componentes del reloj circadiano

Tabla 30. Proteínas identificadas mediante la base de datos *Arabidopsis Interaction Viewer*

Tabla 31. Mutantes de *A.thaliana* seleccionados para este estudio.

Figuras

Figura 1. Síntesis de prenildifosfatos.

Figura 2. Rutas de biosíntesis de los isoprenoides en plantas y su compartimentación.

Figura 3. Modelo del reloj circadiano en *A.thaliana*.

Figura 4. Modelo de funcionamiento del complejo Cpn60.

Figura 5. Posible composición de la estequiometría del complejo Cpn60.

Figura 6. Esquema de las regiones del gen y del T-DNA y región de anillamiento de primers para genotipado.

Figura 7: Segregación de líneas transgénicas para la obtención de individuos homocigotos T3.

Figura 8. Esquema para proceder al clonaje de genes por enzimas de restricción.

Figura 9. Resistencia a CLM de mutantes del reloj circadiano.

Figura 10. Resistencia a FSM de mutantes del reloj circadiano.

Figura 11. Resistencia a FSM de líneas de sobreexpresión de componentes del reloj circadiano.

Figura 12. Proteína DXR en mutantes del reloj circadiano.

Figura 13. Proteína DXR en líneas sobreexpresoras de componentes del reloj circadiano

Figura 14. Resistencia a FSM y proteína DXR de la línea *toc1-1* y el wt a distintos periodos.

Figura 15. Niveles de transcrito *DXR* en *toc1-1* y wt.

Figura 16. Proteína DXR en líneas *toc1-1* y wt en diferentes fotoperiodos.

Figura 17. Fenotipo y resistencia a FSM de mutantes *toc1* y wt a diferentes fotoperiodos.

Figura 18. Fenotipo de resistencia a FSM de mutantes *toc1* y wt a diferentes fotoperiodos e intensidad de luz.

Lista de tablas y figuras

Figura 19. Resistencia a FSM de mutantes *toc1* y wt a diferentes fotoperiodos e intensidad de luz.

Figura 20. Bandas de la proteína DXR identificadas por *western blot* en fondo *toc1-1* y wt

Figura 21: Análisis por *western blot* de la proteína DXR por separación en geles bidimensionales.

Figura 22. Experimentos para la identificación de posibles cambios postranscripcionales sobre DXR.

Figura 23. Fragmentación de péptidos de la proteína DXR-GFP e identificación del extremo N-terminal.

Figura 24. Proteínas DXR recombinantes expresadas en *E.coli* y gel PAGE-SDS con las proteínas purificadas.

Figura 25. Bandas de la proteína DXR identificadas por *western blot* en diferentes fondos mutantes y ecotipos silvestres de *A.thaliana*.

Figura 26. Proteína DXR-GFP en líneas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP*.

Figura 27. Proteína DXR y DXR-GFP en las líneas *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*

Figura 28. Fenotipo y resistencia a FSM de mutantes *toc1-1*, wt, *toc1-1/DXR-GFP*, *DXR-GFP*.

Figura 29. Niveles de DXR y DXR-GFP en las líneas sobreexpresoras *35S:DXR (DXR)* y *35S:DXR-GFP (DXR-GFP)*.

Figura 30. Localización de la proteína DXR-GFP en fondo wt y *toc1-1*.

Figura 31. Tamaño de los plastos (área) de las líneas wt, *toc1-1*, *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*.

Figura 32. Imágenes de plastos de un individuo F2 *PGL34-YFP x DXR-GFP* por microscopía láser confocal

Figura 33. Inmunolocalización por TEM de proteína DXR y DXR-GFP y morfología en líneas wt, *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP* a diferentes aumentos.

Figura 34. Morfología y detalle de las vesículas de células de los cotiledones de un individuo de la línea *toc1-1/DXR-GFP*.

Figura 35. Esquema de las construcciones utilizadas para el clonaje de las secuencias codificantes para las proteínas a ensayar por Y2H.

Figura 36. Análisis de la interacción de DXR con isoformas plastídicas de Cpn60 por Y2H

Figura 37. Análisis de la interacción de DXR con isoformas plastídicas de Cpn60 por BiFC.

Figura 38. Imágenes representativas de las interacciones entre las isoformas Cpn60-YFP.C y DXR-YFP.N por BiFC.

Figura 39. Inmunoprecipitación de la proteína DXR-GFP.

Figura 40. Inserciones de los mutantes escogidos para el estudio de los genes que codifican para las isoformas de Cpn60.

Figura 41. Fenotipo de resistencia a FSM de mutantes *cpn60*.

Lista de tablas y figuras

Figura 42. Resistencia a FSM de mutantes *cpn60*.

Figura 43. Proteína DXR en mutantes *cpn60*.

Figura 44. Tránsito *DXR* en el mutante *arc2* y wt

Figura 45. Inserciones de los mutantes escogidos para el estudio de los genes que codifican para las isoformas de Cpn10 y Cpn20.

Figura 46. Fenotipo de resistencia a FSM de mutantes *cpn10-cpn20*.

Figura 47. Proteína DXR y cuantificación de la resistencia a FSM de los mutantes de las chaperoninas *cpn10-cpn20*.

Figura 48. Fenotipo y resistencia a FSM de mutantes de las líneas wt (Ler), *arc2*, *DXR-GFP* y *arc2/DXR-GFP*.

Figura 49. Localización subcelular de la proteína DXR-GFP en las líneas hermanas *DXR-GFP* y *arc2 DXR-GFP*. Figura 58. Imagen de un cloroplasto tomada por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).

Figura 50. Niveles de DXR, fenotipo resistencia a FSM de la línea mutante *arc2* y su parental silvestre Ler y las líneas de sobreexpresión *Cpn60α1-GFP* y su parental silvestre Col-0.

Figura 51. Localización subcelular de la proteína Cpn60α1-GFP en una línea *Cpn60α1-GFP*.

Figura 52. Cinética de degradación de DXR en las líneas wt, *arc2* y *Cpn60α1-GFP*.

Figura 53. Niveles de transcritos *Cpn60* en las líneas *toc1-1* y wt.

Figura 54. Niveles de transcritos *Cpn60α1* y *Cpn60α2* en las líneas *toc1-1* y wt.

Figura 55. Niveles de transcrito *TOC1*, *DXR*, *Cpn60α1* y *Cpn60α2* de las líneas wt, *toc1-2*, *TOC-YFP* y *TOC-MYC*.

Figura 56. Fenotipo y niveles de transcrito *TOC1*, *Cpn60α1*, *Cpn60α2* en plántulas *Alc:TOC1*.

Figura 57. Proteína Cpn60β en *toc1-1* y el wt.

Figura 58. Imagen de un cloroplasto tomada por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM).

Figura 59. Modelo para explicar posibles mecanismos de regulación postranscripcional de DXR.

INTRODUCCIÓN

1. Plantas e Isoprenoides

Los organismos fotosintéticos son esenciales para la vida en la tierra ya que fijan CO₂ atmosférico, liberan O₂ y suplen biomasa que aprovechan los organismos heterótrofos. Hasta el año 2011 se han descrito más de 300.000 especies pertenecientes al Reino *Plantae* de las cuales unas 260.000-290.000 son plantas vasculares (Mora *et al.* 2011). A diferencia de especies de otros Reinos, las plantas son capaces de obtener energía química (carbohidratos) a partir de energía lumínica mediante la fotosíntesis. Una característica fundamental de las plantas es que son organismos sésiles. La adecuación esta condición requiere procesos y mecanismos de adaptación desde el nivel molecular hasta la arquitectura vegetal. Por ejemplo, las plantas terrestres son capaces de interactuar con su entorno para dispersar semillas, atraer polinizadores o repeler fitófagos sintetizando sustancias alelopáticas que almacenan en compartimentos subcelulares independientes; tienen paredes celulares que les proporcionan rigidez estructural y les permiten adaptarse a los cambios osmóticos y otras condiciones de estrés ambiental; además, disponen de mecanismos moleculares que les permiten adaptarse o anticiparse a los cambios periódicos y estacionales.

Todos estos procesos de adaptación se originan a partir la información codificada en el genoma de cada especie vegetal y requieren de diferentes niveles de regulación a que estos procesos están sujetos. Las interacciones entre estos niveles de regulación pueden entenderse a través redes de regulación y comprender su funcionamiento es hoy un reto en Biología; uno de los niveles más complejos es el que afecta al metabolismo vegetal. La presencia de plastos y otros compartimentos subcelulares en las células vegetales las distingue del resto de células eucariotas y las dota de rutas metabólicas y metabolitos únicos lo que genera un elevado nivel de complejidad. Por ejemplo, algunas vías metabólicas se encuentran duplicadas en distintos compartimentos subcelulares (como la glicolisis y la gluconeogénesis) y algunas moléculas se encuentran en diferentes compartimentos formando parte de rutas de biosíntesis diferentes (por ejemplo, el piruvato). El trabajo de esta tesis se centra en entender mejor cómo se regula una de las vías que las plantas poseen gracias a la existencia de plastos y que les proporciona una manera alternativa a la presente en otras

células eucariotas para producir isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP), los precursores universales de los isoprenoides.

1.1 Conceptos generales sobre isoprenoides.

Los isoprenoides son moléculas derivadas del IPP y DMAPP de los que se conocen por lo menos 50.000 metabolitos (Thulasiram *et al.* 2007; McGarvey y Croteau 1995). La importancia de los isoprenoides radica en que son esenciales para cualquier forma de vida conocida (Vranova *et al.* 2013). Los isoprenoides vegetales intervienen en procesos celulares imprescindibles como la fotosíntesis (clorofilas y carotenoides), la respiración (ubiquinonas), la arquitectura de las membranas (esteroles) y la regulación del crecimiento y desarrollo (brasinosteroides, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, estrigonolactonas). En la Figura 1 se presenta una clasificación de los isoprenoides según el número de átomos de carbono y su denominación.

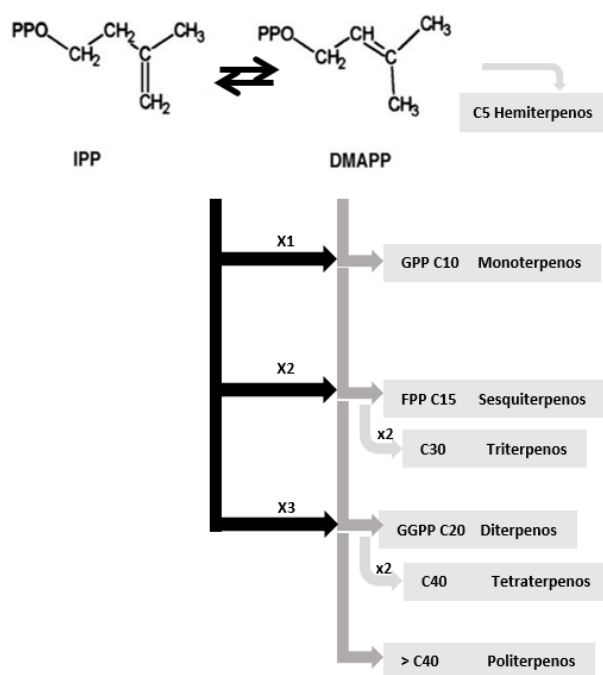


Figura 1. Síntesis de prenildifosfatos. En la parte superior se representan las estructuras químicas de los precursores universales de los isoprenoides IPP y DMAPP. Las flechas negras indican el número de moléculas necesarias de IPP que pueden reaccionar con una molécula de DMAPP y dar lugar a compuestos como GPP (geranil pirofosfato), FPP (farnesil pirofosfato), GGPP (geranilgeranil pirofosfato). En los recuadros grises se indica el número de átomos de carbono de cada grupo de compuestos, así como la denominación específica de cada grupo.

La gran variedad de compuestos y las características de los derivados de los isoprenoides los convierte en moléculas de elevado interés terapéutico, alimentario e industrial. En la Tabla 1 se presentan ejemplos de algunos derivados de isoprenoides de alto interés biotecnológico. Considerando la importancia de los isoprenoides, el estudio de la regulación de estas vías de biosíntesis y la aplicación de técnicas de ingeniería genética y metabólica que mejoren su producción tiene tanto un interés científico teórico como aplicado.

1.2 *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio de isoprenoides.

Arabidopsis thaliana Heynh. es una planta de la familia Brassicaceae conocida y utilizada ampliamente como modelo en Biología vegetal. Algunas características de esta planta que la han convertido en un referente son su corto ciclo vital que permite obtener semillas de sucesivas generaciones en un espacio relativamente breve de tiempo, su pequeño tamaño, y su pequeño genoma constituido sólo por 5 cromosomas (125 Mb) y aproximadamente 25500 genes (Arabidopsis Genome 2000) que facilita el estudio genético. Es fácilmente transformable mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent 1998), lo cual ha favorecido las investigaciones moleculares. Existen además colecciones de mutantes disponibles para la comunidad científica cuyo principal conservador y distribuidor en Europa es el *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC).

Se ha discutido acerca de la idoneidad de esta especie para el estudio de los isoprenoides (Facchini *et al.* 2004; D'Auria y Gershenzon 2005) sin embargo, actualmente se sigue aceptando como un modelo idóneo incluso para el estudio de volátiles y metabolitos secundarios complejos ya que además de los isoprenoides esenciales *A. thaliana* es capaz de biosintetizar sustancias alelopáticas volátiles (Dudareva *et al.* 2004).

Introducción

Átomos de C	Grupo de Isoprenoides	Molécula/s de interés	Principales especies vegetales	Función en plantas	Aplicaciones biotecnológicas
5	Hemiterpenos	Citokininas	Todas	Hormona	Regulación del crecimiento en agricultura
		Isoprenil t-RNA	Todas	Participación en la traducción del mRNA	Diana para antibióticos
		Isopreno	Todas	Protección del estrés térmico	cis-1,4-poliisopreno (caucho sintético)
10	Monoterpenos	Mentol, limoneno, pineno	Géneros <i>Mentha</i> , <i>Citrus</i> , <i>Pinus</i>	Volátiles, defensa	Saborizantes, perfumes, repelentes, etc.
		10-hidroxiageraniol	Familia <i>Apocynaceae</i>	Presursor de alcaloides indol-monoterpénicos	Citostáticos (vincristina, vinblastina), nootrópicos (vincamina), etc.
15	Sesquiterpenos	Farnesilación de proteínas	Todas	Señalización celular	Diana para antibióticos
		Bisabolanos	<i>Boronia megastigna</i> , <i>Zingiber officinale</i>	Fitoalexina	Antibióticos, antisépticos, perfumes, especies gastronómicas, biocombustible etc.
		β -Cariofileno	<i>Syzygium aromaticum</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Fitoalexina	Antiinflamatorio
		Artemisina	<i>Artemisia annua</i>	Fitoalexina	Antimalárico
		Curcumalactona	<i>Curcuma wenyujin</i>	Fitoalexina	Especies gastronómicas
20	Diterpenos	Giberelinas	Todas	Hormonas	Regulación del crecimiento en agricultura
		Fitol	Todas	Cadena lateral de la clorofila	Precursor sintético de la vitamina E y K
		Tocoferol	Todas	Protección frente a estrés	Vitamina E
		Filoquinonas	Todas	Aceptor de electrones en la fotosíntesis	Vitamina K
		Paclitaxel (Taxol®)	<i>Taxus sp.</i>	Fitoalexina	Citostático
		Gingkólidos	<i>Ginkgo biloba</i>	Fitoalexinas	Nootrópicos
30	Tripterpenos	Brasinosteroides	Todas	Hormona	Regulación del crecimiento en agricultura
		Fitosteroles	Todas	Arquitectura de la membrana plasmática, precursores hormonales	Complementos dietéticos
40	Tetraterpenos	Carotenoides	Todas	Fotoprotección, pigmentación, precursores hormonales	Vitamina A, colorantes, antioxidantes, etc.
		Ácido abscísico	Todas	Hormona	En agricultura inhibe la germinación y maduración de frutos
>40	Politerpenos	Cadena lateral de ubiquinona y plastoquinona	Todas	Transporte de electrones en la membrana mitocondrial y tilacoidal	Antioxidantes dietéticos
		Caucho	Familia <i>Euphorbiaceae</i>	Savia de células laticíferas	Fabricación de gomas, neumáticos, etc.

Tabla 1. Grupos de isoprenoides. Principales familias de isoprenoides y ejemplos de moléculas de interés en plantas.

2. Biosíntesis de Isoprenoides.

Se han descrito dos vías para la síntesis de los precursores universales de los isoprenoides, IPP y DMAPP (Figura 2): la vía del mevalonato (MVA) y la vía del metileritritol 4-fosfato (MEP) (Pulido *et al.* 2012; Vranova *et al.* 2012). La vía del MVA está presente en la mayoría de organismos, algunas bacterias gram-positivas (Wilding *et al.* 2000), arqueobacterias (Smit y Mushegian 2000), levaduras (Disch y Rohmer 1998) y animales (Kovacs *et al.* 2002) mientras que la mayoría de bacterias gram-negativas (Rohmer *et al.* 1993), cianobacterias (Proteau 1998) y algas verdes (Disch *et al.* 1998) utilizan sólo la vía del MEP. Mientras que la mayoría de organismos sólo disponen de una u otra vía para la biosíntesis de isoprenoides, las plantas superiores y algunas algas rojas y pardas (Lange y Croteau 1999; Lichtenthaler 1999) poseen ambas rutas aunque localizadas en distintos compartimentos subcelulares (Figura 2). Los enzimas de la ruta del MVA se distribuyen entre el citosol, el retículo endoplasmático y los peroxisomas (Tabla 2) y generan IPP para la síntesis de isoprenoides citosólicos y mitocondriales (Figura 2). El IPP se isomeriza a DMAPP gracias a la actividad de enzimas isomerasas (Tabla 3). Los enzimas de la ruta del MEP son codificadas por el genoma nuclear e importadas a plastos (Tabla 4) donde generan IPP y DMAPP para la síntesis de isoprenoides plásticos (Figura 2). La existencia de estas dos vías de síntesis, su diferente compartimentación, la interrelación entre ambas y su distribución en las especies se presenta como un interesante modelo para el estudio de vías y redes metabólicas (Vranova *et al.* 2013), transferencia lateral de genes y evolución de las especies (Sangari *et al.* 2010).

Como se presenta en la Figura 1, la adición de unidades IPP a DMAPP genera moléculas prenil difosfato de longitud creciente que a su vez serán los precursores de los distintos tipos de isoprenoides: geranil difosfato (GPP, C10), farnesil difosfato (FPP, C15) y geranilgeranil difosfato (GGPP, C20). Modificaciones posteriores de estos esqueletos derivados de prenil difosfatos generan la enorme variedad de metabolitos isoprenoides conocida (Tabla 1 y Figura 2).

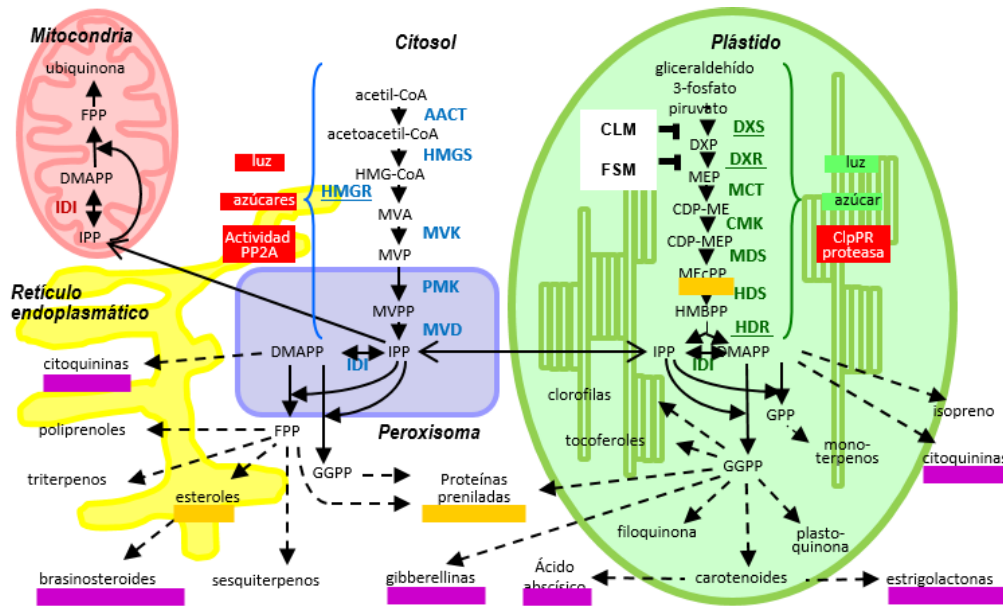


Figura 2. Rutas de biosíntesis de los isoprenoides en plantas y su compartimentación. Los enzimas de la vía del MVA están marcados en azul mientras que los de la vía del MEP están en verde. Los acrónimos de los enzimas y metabolitos se explican en las tablas T2,T3,T4. Los enzimas propuestos como principales reguladores de las rutas de biosíntesis del MVA (HMGR) y del MEP (DXS, DXR y HDR) están subrayados. En negrita y fondo blanco se resaltan los pasos bloqueados por inhibidores farmacológicos de la vía del MEP clomazona (CLM) y fosmidomicina (FSM). Los posibles mecanismos reguladores positivos y negativos de la rutas a niveles postranscripcional se marcan en los recuadros verdes y rojos, respectivamente. Las flechas discontinuas indican múltiples etapas de biosíntesis y las flechas abiertas representan transporte de metabolitos entre diferentes compartimentos celulares. Los isoprenoides con funciones reguladoras (metabolitos hormonales) se marcan en morado mientras que otros compuestos reguladores se subrayan en naranja. Adaptado de Pulido et al 2012, anexo.

2.1 La vía del Mevalonato (MVA).

La vía del MVA fue la primera que se descubrió hacia 1950 (Goldstein y Brown 1990). Sintetiza IPP en seis etapas catalíticas (Figura 2) catalizadas por enzimas presentes en el citoplasma celular, el retículo endoplasmático y los peroxisomas (Tabla 2) (Leivar *et al.* 2011; Pulido *et al.* 2012; Simkin *et al.* 2011). La ruta se inicia con dos moléculas de acetil-CoA que se condensan y forman una molécula de acetoacetyl-CoA mediante el enzima acetoacetyl-CoA tiolasa (AACT; EC 2.3.1.9). La molécula de acetoacetyl-CoA es convertida en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) mediante el enzima HMG-CoA sintasa (HMGS; EC 2.3.3.10) para ser reducida en ácido mevalónico (MVA) por el principal enzima regulador de la vía HMG-CoA reductasa (HMGR; EC 1.1.1.34). A continuación, el MVA se fosforila para producir MVA 5-difosfato en dos reacciones sucesivas catalizadas

por la MVA kinasa (MVK; EC 2.7.1.36) y posteriormente la fosfo-MVA kinasa (PMK; EC 2.7.4.2). Finalmente, el IPP se obtiene a partir de la decarboxilación ATP-dependiente del MVA 5-difosfato mediado por el enzima MVA 5-difosfato decarboxilasa (MVD; EC 4.1.1.33). Un último paso catalizado por el enzima IPP isomerasa (IDI; EC 5.3.3.2) convierte el IPP en el isómero alílico DMAPP (Tabla 3).

Acrónimo	Enzima	EC	AGI	Localización subcellular
AACT1	Acetil-CoA C-acetiltransferasa	2.3.1.9	At5g47720	Cit
AACT2			At5g48230	Cit/ Per
HMGS	3-hidroxi-3metilglutaril-CoA sintasa	2.3.3.10	At4g11820	Cit
HMGR1	3-hidroxi-3metilglutaril-CoA reductasa	1.1.1.34	At1g76490	RE-Cit
HMGR2			At2g17370	RE-Cit
MVK	MVA kinasa	2.7.1.36	At5g27450	Cit
PMK	Fosfo-MVA kinasa	2.7.4.2	At1g31910	Per
MVD1	Difosfo-MVA decarboxilasa	4.1.1.33	At2g38700	Per
MVD2			At3g54250	Per

Tabla 2. Enzimas de la ruta del MVA en *A.thaliana*. Se indica su correspondiente EC (*Enzyme Commission Number*), AGI (*Arabidopsis Genome Initiative Number*) y localización subcelular (Cit, citosol; RE-Cit, anclada al retículo endoplasmático; Per, peroxisomas). Adaptado de Pulido *et al.*, 2012 (ver *Artículo 1*).

Acrónimo	Enzima	EC	AGI	Localización subcellular
IDI	Isopentenil difosfato isomerasa 1	5.3.3.2	At5g16440	Per/Plasto/Mit
	Isopentenil difosfato isomerasa 2		At3g02780	Per/Mit/Plasto

Tabla 3. Isoformas de IDI en *A.thaliana*. Se indica su correspondiente EC (*Enzyme Commission Number*), AGI (*Arabidopsis Genome Initiative Number*) y localización subcelular (Per, peroxisomas; Mit, mitocondria). Adaptado de Pulido *et al.*, 2012 (ver *Artículo 1*).

Acrónimo	Enzima	EC	AGI	Localización subcellular
DXS	1-Deoxy-D-xilulosa 5-fosfato sintasa	2.2.1.7	At4g15560	Plasto
DXR	1-Deoxy-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa	1.1.1.267	At5g62790	Plasto
MCT	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato citidililtransferasa	2.7.7.60	At2g02500	Plasto
CMK	4-(Citidin 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritritol kinasa	2.7.1.148	At2g26930	Plasto
MDS	2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa	4.6.1.12	At1g63970	Plasto
HDS	4-Hidroxi-3-metilbut-2-enil-difosfato sintasa	1.17.7.1	At5g60600	Plasto
HDR	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa	1.17.1.2	At4g34350	Plasto

Tabla 4. Enzimas de la ruta del MEP en *A.thaliana*. Se indica su correspondiente EC (*Enzyme Commission Number*), AGI (*Arabidopsis Genome Initiative Number*) y localización subcelular. Adaptado de Pulido *et al.*, 2012 (ver *Artículo 1*).

2.2 La vía del Metileritritol 4-fosfato (MEP).

En la última década del pasado siglo se propuso la existencia de una vía alternativa a la del MVA para la síntesis de IPP y DMAPP, actualmente conocida como la vía del MEP (Rohmer *et al.* 1993). Numerosas evidencias sugerían una vía de biosíntesis en bacterias y en los plastos independiente de la vía del MVA, hipótesis que se confirmó inicialmente mediante abordajes bioquímicos (Lichtenthaler *et al.* 1997; Rohmer 1999). Posteriormente, abordajes genéticos y moleculares, con el importante impulso de la secuenciación del genoma de *A.thaliana*, permitieron que hacia el 2002 se hubiesen identificado todos los genes de los enzimas de la vía del MEP en bacterias y plantas (Rodríguez-Concepcion y Boronat 2002). Estudios posteriores han demostrado que las bacterias muestran una gran plasticidad para producir intermediarios de este vía y que utilizan otros enzimas además de los descritos como canónicos de la vía del MEP (Perez-Gil y Rodríguez-Concepcion 2013). Sin embargo no parece que las plantas presenten esta diversidad.

La vía del MEP sintetiza IPP y DMAPP en siete reacciones catalíticas (Figura 2). Los enzimas de la vía del MEP (Tabla 4) están codificados por genes nucleares de la célula vegetal y posteriormente se importan a plastos. Para la descripción de la ruta en esta

tesis se ha dividido en dos partes: una primera parte de la ruta como la obtención de MEP y una segunda secuencia de reacciones que conducen a la biosíntesis de IPP y DMAPP.

2.2.1 Síntesis de MEP.

Se considera que la primera reacción de la vía es el resultado de la condensación de la (hidroxietil)-tiamina derivada del piruvato con el C1 del grupo aldehído de una molécula de D-gliceraldehído-3-fosfato (3-GAP) mediante el enzima DXP sintasa (DXS; EC 2.2.1.7) para producir DXP en una reacción irreversible y que conlleva la pérdida de CO₂ (Lange *et al.* 1998; Lois *et al.* 1998); DXS es considerado uno de los enzimas más relevantes para el control del flujo metabólico de la vía (Pulido *et al.* 2012). DXS es el único enzima de la vía del MEP para el que se han identificado varios genes homólogos en *A.thaliana* (Rodríguez-Concepcion y Boronat 2002): *DXS1/CLA1* (At4g15560), *DXS2* (At3g21500) y *DXS3* (At5g11380). Sin embargo, sólo se ha identificado un rol específico en la vía del MEP para la isoforma DXS1. La sobreexpresión de *DXS1* en plantas transgénicas produce un aumento de los niveles de isoprenoides derivados de la vía del MEP (Estevez *et al.* 2001; Carretero-Paulet *et al.* 2006; Munoz-Bertomeu *et al.* 2006) y puede complementar los defectos del desarrollo y de los niveles reducidos de pigmentos de los mutantes defectivos en *DXS1* (Crowell 2000). La adición de deoxixilulosa (metabolito defosforilado de DXP, el producto de la actividad DXS) al medio es capaz de rescatar el fenotipo albino de los mutantes *cla1* (deficientes en *DXS1*) (Estevez *et al.* 2001). Sin embargo, los mutantes deficientes en *DXS2* no tienen fenotipo aparente y el gen *DXS2* no es capaz de complementar la pérdida de función de *DXS1* en *A.thaliana* (Carretero-Paulet *et al.* 2013). Aunque no existen datos experimentales sobre la posible actividad de *DXS3*, la ausencia de residuos clave en su secuencia sugieren que, como en el caso de *DXS2*, no posee actividad DXS (Rodríguez-Concepcion y Boronat 2002; Phillips *et al.* 2008b).

DXP es un metabolito intermediario para la biosíntesis de MEP y que puede ser una molécula precursora de la biosíntesis de la tiamina (Julliard y Douce 1991) o piridoxal (Rohmer 1999) ya que recientemente se ha propuesto un mecanismo alternativo para los enzimas tiamina dependientes (Brammer *et al.* 2011). La primera reacción específica de la ruta del MEP es un arreglo intramolecular que reduce DXP en MEP y es catalizada

por el enzima DXP reductoisomerasa (DXR; EC 1.1.1.267) con la participación del cofactor NADPH (Takahashi *et al.* 1998). DXR está codificada por un único gen en *A.thaliana* (Rodriguez-Concepcion y Boronat 2002) y está expresado en toda la planta, especialmente en plántulas e inflorescencias (Carretero-Paulet *et al.* 2002). La sobreexpresión de DXR en *Mentha piperita* provoca un aumento de aceites esenciales monoterpénicos en hojas en comparación con el wt (Mahmoud y Croteau 2001). Por otro lado, la silenciación de DXR en plantas ingenierizadas provoca una reducción del acúmulo de aceites esenciales monoterpénicos en plantas de menta, lo que es consistente con el aumento de estos metabolitos en las líneas sobreexpresoras de DXR. Se ha visto también una correlación positiva entre la acumulación de los niveles de transcrito DXR y apocarotenoides en micorrizas de plantas monocotiledóneas (Walter *et al.* 2000) y de alcaloides indol monoterpénicos en suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* (Veau *et al.* 2000). No parece que DXR desempeñe un papel limitante en la maduración del fruto del tomate ya que se observaron los mismos niveles de transcrito DXR antes y después del proceso de maduración sin embargo DXR sí tendría un papel relevante en la carotenogénesis ya que el tratamiento del fruto del tomate con FSM (un inhibidor específico de DXR) disminuye los niveles de carotenoides (Rodriguez-Concepcion *et al.* 2001). Los mutantes letales con inserción de T-DNA en el gen DXR que presentan un fenotipo albino, lo que revela la importancia de este gen para el desarrollo de las plántulas (Budziszewski *et al.* 2001; Xing *et al.* 2010). La supresión de de los niveles de DXR causa en las plántulas un fenotipo variegado, disminución de la pigmentación y defectos en el desarrollo de los cloroplastos, mientras que las líneas sobreexpresoras de DXR muestran un aumento de la acumulación de clorofilas y carotenoides (Carretero-Paulet *et al.* 2006); DXR es por tanto un punto de control importante de la ruta del MEP.

Las dos reacciones bioquímicas conducentes a la formación de MEP son pasos limitantes de la vía (Rodriguez-Concepcion 2010) y por tanto el estudio de su regulación es muy relevante. Dicho estudio se ha beneficiado de la existencia de inhibidores específicos (Figura 2). La inhibición de la vía del MEP de plántulas en presencia del inhibidor de DXS clomazona (CLM) (Zeidler *et al.* 2000; Matsue *et al.* 2010) o del inhibidor de DXR fosmidomicina (FMS) (Steinbacher *et al.* 2003) causa una inhibición dependiente de concentración de las hojas verdaderas que dan lugar al desarrollo de la plántula (Laule *et al.* 2003; Rodriguez-Concepcion *et al.* 2004; Carretero-Paulet *et al.* 2006; Flores-Perez

et al. 2008b) además de una disminución de pigmentos fotosintéticos debido al bloqueo que obviamente se produce al inhibir su síntesis. Por lo tanto, el recuento de plántulas que desarrollan hojas verdaderas con respecto al total de plántulas germinadas (*Seedling Establishment, %SE*) y la cuantificación de niveles de clorofilas y carotenoides son métodos muy buenos para determinar la resistencia dosis-dependiente a estos inhibidores (Laule *et al.* 2003; Rodríguez-Concepcion *et al.* 2004; Carretero-Paulet *et al.* 2006; Flores-Perez *et al.* 2008). Una diferencia entre el fenotipo de las plántulas crecidas en medio suplementado con CLM o FSM es que la CLM sólo causa un blanqueamiento de las hojas verdaderas (pero no de los cotiledones) a bajas concentraciones de inhibidor, mientras que la reducción de los niveles de pigmentos fotosintéticos es similar en cotiledones y hojas verdaderas de plántulas tratadas con FSM. El motivo del fenotipo de las plántulas al tratamiento con CLM podría ser que la CLM no es la molécula activa que inhibe DXS, sino que la CLM debe convertirse en keto-CLM en las hojas para ser un inhibidor biológicamente activo (Zeidler *et al.* 2000; Matsue *et al.* 2010). En general, la determinación de pigmentos es un método más lento pero válido para la cuantificación de la resistencia a CLM, mientras que para la cuantificación de la resistencia a FSM el %SE resulta un método más robusto.

La resistencia a los inhibidores CLM y FSM (observada como un aumento de los niveles de la %SE o acumulación de pigmentos fotosintéticos) puede ser debida a los incrementos de actividad de DXS o DXR, respectivamente. Las líneas sobreexpresoras de DXS presentan resistencia a CLM y a FSM (debido a una mayor producción de DXP, que compite con la FSM por el sitio catalítico de DXR) mientras que las sobreexpresoras de DXR son resistentes a FSM pero no a CLM (Rodríguez-Concepcion *et al.* 2004; Carretero-Paulet *et al.* 2006).

La utilización de estos inhibidores para la identificación por *screening* de mutantes resistentes es un método muy efectivo que ha permitido identificar mecanismos de control postranscripcionales que regulan los niveles o la actividad de los enzimas inhibidos pero también ha permitido descubrir otras vías reguladoras que modulan la biosíntesis de isoprenoides en el plasto (Crowell *et al.* 2003; Rodríguez-Concepcion *et al.* 2004; Sauret-Gueto *et al.* 2006; Flores-Perez *et al.* 2008b; Flores-Perez *et al.* 2010).

2.2.2 Conversión de MEP en IPP y DMAPP.

A partir de la formación de MEP, este es convertido a 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol (CDP-ME) por el enzima 4-MEP citidiltransferasa (MCT; EC 2.7.7.60). CDP-ME se fosforila en una reacción dependiente de ATP por el enzima CDP-ME kinasa (CMK; EC 2.7.1.148) para formar CDP-ME 2-fosfato (CDP-MEP) y que se transforma a continuación en 2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato (MEcPP) mediante el enzima MEcPP sintasa (MDS; EC 4.6.1.12). MEcPP se reduce a (E)-4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato (HMBPP) en una reacción catalizada por HMBPP sintasa (HDS; EC 1.17.7.1). Finalmente se obtiene conjuntamente IPP y DMAPP en una proporción aproximadamente 5:1 a partir de la reducción de HMBPP mediante la actividad del enzima HMBPP reductasa (HDR; EC 1.17.1.2). Los isómeros IPP y DMAPP son interconvertibles en una reacción reversible catalizada por enzimas IDI presentes en los plastos (Phillips *et al.* 2008a) (Tabla 3).

Los mutantes con pérdida de función de los genes *CMK*, *MDS*, *HDS* y *HDR* en *A.thaliana* exhiben también el fenotipo de plántulas albinas incapaces de desarrollarse descrito para *cla1* (Gutierrez-Nava Mde *et al.* 2004; Guevara-Garcia *et al.* 2005). Los tilacoides no se desarrollan y los niveles de pigmentos fotosintéticos apenas son detectables en estos mutantes.

2.3 Coordinación entre la vía del MEP y del MVA.

La compartimentación de las dos vías de biosíntesis de isoprenoides posiblemente supone una ventaja adaptativa más de las plantas a su condición de organismos sésiles, ya que de esta forma se podría optimizar la biosíntesis de isoprenoides según la fijación de carbono y la disponibilidad de ATP. La presión selectiva en diferentes condiciones ambientales puede haber favorecido la existencia de dos vías metabólicas que facilitaran la compartimentación de los isoprenoides; estudios realizados en líneas de *Streptomyces sp* han demostrado la especialización de algunos metabolitos isoprenoides a través de la vía del MVA o la vía del MEP en función de las condiciones de crecimiento (McCarty *et al.* 2011; Dairi 2005). Asimismo, la producción de algunas moléculas tóxicas para la propia planta puede haber favorecido también la compartimentación de metabolitos no sólo en diferentes suborgánulos celulares sino

algunos pasos específicos de la ruta del MEP en diferentes tipos celulares; tal podría ser el caso de la distribución de los enzimas DXS, DXR y MCS en células específicas del floema en *Catharanthus roseus* que implicaría la traslocación de metabolitos intermedios de la ruta del MEP para la biosíntesis de alcaloides (Burlat *et al.* 2004).

En *A.thaliana* se ha demostrado un intercambio de los precursores de los isoprenoides IPP y DMAPP entre distintos compartimentos subcelulares mediante intermediarios marcados, el análisis de mutantes y la utilización de inhibidores de enzimas específicos de cada ruta (Laule *et al.* 2003; Rodriguez-Concepcion *et al.* 2004). No obstante, parece ser que este intercambio es limitado ya que el bloqueo de una de las dos vías es letal para la planta (Rodriguez-Concepcion *et al.* 2004)

Ambas vías de biosíntesis de isoprenoides están reguladas a nivel transcripcional y postranscripcional (Hemmerlin *et al.* 2012). El análisis de gran cantidad de datos de expresión génica ha permitido establecer redes de coexpresión génica mediante diferentes algoritmos. Los genes de la vía del MVA y de la vía MEP se han visto agrupados pero no interconectados (Vranova *et al.* 2012) lo que sugiere la regulación independiente de cada vía. En general, hoy se acepta que las dos vías de síntesis de isoprenoides en plantas están reguladas independientemente (Hemmerlin *et al.* 2012).

3. Regulación de la vía del MEP.

En un principio se propusieron los dos primeros enzimas de la vía del MEP y los dos últimos (DXS, DXR, HDS y HDR) como posibles puntos de control del flujo metabólico hacia isoprenoides plastídicos. Los primeros estudios en tomate sugerían un papel para DXR y HDR pero no para DXS o HDS, debido a la correlación entre la acumulación de transcritos y proteínas de estos genes y a la producción de productos derivados de la ruta del MEP durante la maduración del fruto de tomate (Lois *et al.* 2000; Rodriguez-Concepcion *et al.* 2001). Durante la desetiología de plántulas de *A.thaliana*, se necesitan elevados niveles de IPP y DMAPP para suplir una alta demanda de clorofilas, carotenoides y otros isoprenoides plastídicos, sin embargo el análisis de la acumulación en plántulas desetiologadas de los niveles de transcritos de los genes que codifican para los enzimas de la vía del MEP están sobreexpresados después del tratamiento con luz (Botella-Pavia *et al.* 2004; Carretero-Paulet *et al.* 2006; Hsieh y Goodman 2006; Cordoba

et al. 2009). Se observó que la sobreexpresión o supresión de los niveles de DXS, DXR o HDR en líneas transgénicas de *A.thaliana* correlacionaba con cambios en los niveles de isoprenoides derivados del MEP como clorofilas y carotenoides (Estevez *et al.* 2001; Botella-Pavia *et al.* 2004; Carretero-Paulet *et al.* 2006). Líneas transgénicas de tomate sobreexpresoras de DXS de bacterias mostraron un incremento significativo en la producción de carotenoides (Enfissi *et al.* 2005) mientras que, como ya se ha citado, la sobreexpresión de DXR causa un incremento de derivados monoterpénicos de la vía del MEP (Mahmoud y Croteau 2001). Por otro lado, no se observó efecto en la acumulación de derivados isoprenoides de la vía del MEP en las líneas transgénicas sobreexpresoras de HDS (Flores-Perez *et al.* 2008a). Estos resultados demuestran que no todos los enzimas de la vía del MEP causan cambios significativos en el flujo de la vía cuando se alteran sus concentraciones, lo que implica que algunos de ellos pueden controlar el flujo de la vía. Según los estudios de sobreexpresión mencionados anteriormente, el control de la ruta del MEP estaría limitada por los enzimas DXS, DXR y HDR, mientras que la contribución de HDS sería mucho menor. Por otro lado, se conoce poco todavía de la contribución de los demás enzimas de la ruta del MEP sobre el control del flujo metabólico (MCT, CMK y MDS).

3.1 Regulación transcripcional de la vía del MEP.

Un primer nivel de regulación de la vía del MEP en *A.thaliana* es la regulación transcripcional. Sin embargo, no puede explicarse la regulación de esta vía metabólica sólo a través de la regulación transcripcional sino que debe considerarse la regulación postranscripcional (Vranova *et al.* 2013); los cambios en la expresión génica son un mecanismo de control de los enzimas de la vía del MEP pero no siempre se observan cambios en cuanto a niveles de proteína, actividad enzimática o síntesis de metabolitos (Carretero-Paulet *et al.* 2006). Factores ambientales como la luz, el estrés biótico y abiótico provocan modificaciones en los niveles de transcrito de los genes del MEP. La luz es uno de los principales factores que regulan positivamente la vía del MEP (Carretero-Paulet *et al.* 2006; Rodríguez-Concepcion *et al.* 2001). Se ha visto un aumento de los niveles de transcrito *DXS*, *DXR* y *HDR* a primera hora del día (Hsieh y Goodman 2005; Cordoba *et al.* 2009; Carretero-Paulet *et al.* 2006) así como de todos los genes de

la vía del MEP durante la desetiología (Carretero-Paulet *et al.* 2006). Estudios *in silico* de los promotores de diversos genes muestran la existencia en algunos genes de motivos tipo G/E-BOX que se asocian a regulación por luz. Por otro lado, los niveles de transcrito *DXS*, *DXR* y *HDS* se han visto también aumentados en estrés biótico y abiótico (Phillips *et al.* 2007) así como en micorrizas (Hans *et al.* 2004).

3.1.1 Regulación transcripcional de la vía del MEP por luz.

Los genes de la vía del MEP se inducen por luz y se ha observado un incremento de monoterpenos e isopreno (Kessler y Baldwin 2001) tras la iluminación. La biosíntesis de los carotenoides y las cadenas de fitol necesarios para la fotosíntesis dependen de la luz, por lo que probablemente debido a su localización subcelular, la vía del MEP está regulada por la intensidad lumínica (Arimura *et al.* 2008). *Screenings in silico* han mostrado que la mayoría de los promotores de las regiones que controlan la expresión de los genes de la vía del MEP revelaron la presencia de posibles elementos reguladores por luz o reloj circadiano en *A.thaliana* (Vranova *et al.* 2013). Se ha propuesto a *DXS* como una diana secundaria de los factores de transcripción PIFs (*Phytochrome Interacting Factors*) (Toledo-Ortiz *et al.* 2010) y que PIF1 se une al promotor del gen fitoeno sintasa (*PSY*) para reprimir su expresión (Toledo-Ortiz *et al.* 2010). Bajo condiciones de alta intensidad lumínica y tras una hora las plantas tratadas con fosmidomicina reducen su capacidad fotosintética, probablemente debido a la disminución de la síntesis *de novo* de pigmentos fotosintéticos (Possell *et al.* 2010). Todos los genes de la vía del MEP, así como la biosíntesis de metabolitos, están estimulados por luz, probablemente a través del sistema de fitocromos (von Lintig *et al.* 1997).

3.1.2 Regulación transcripcional de la vía del MEP por reloj circadiano.

La señal lumínica es transducida por los fitocromos al reloj circadiano (Quail 2002; Castillon *et al.* 2007). El reloj circadiano es un mecanismo molecular que recibe estímulos ambientales y genera ritmos de aproximadamente 24 horas en muchos procesos metabólicos y fisiológicos (McClung 2001).

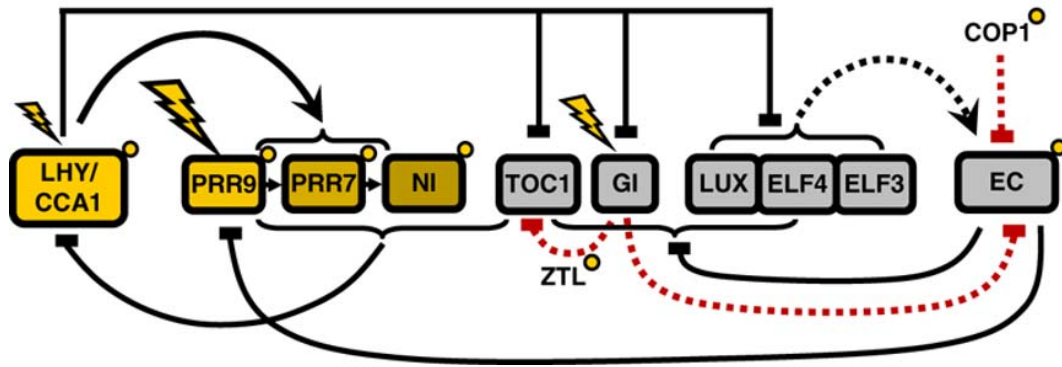


Figura 3. Modelo del reloj circadiano en *A.thaliana*. Los genes del *morning loop* y el *evening loop* se representan en amarillo y gris respectivamente. La regulación transcripcional se muestra con líneas negras continuas. La formación del complejo EC (LUX, ELF4, ELF3) se ha resaltado con una línea negra discontinua. La regulación postranslacional de TOC1 y el EC por GI, ZTL y COP1 se presentan en líneas discontinuas rojas. Las respuestas debidas a *inputs* agudos de luz se representan como *flashes*. Los círculos amarillos representan la regulación postraslacional por luz de las proteínas del EC, ZTL y COP1. (Adaptado de Pokhilko *et al*, 2012).

Actualmente se acepta que el reloj circadiano en *A.thaliana* está constituido por una serie de bucles transcripcionales y postranscripcionales de retroalimentación que modulan una amplia parte del genoma (Figura 3, Tabla 5) (McClung 2011). El primero de estos bucles de retroalimentación que se describió (Alabadi *et al.* 2001) y está constituido por los factores de transcripción tipo MYB, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1) (Wang y Tobin 1998) y LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) (Schaffer *et al.* 1998) que regulan negativamente la expresión del factor de transcripción *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* o *PSEUDORESPONSE REGULATOR 1* (TOC1 o PRR1) (Strayer *et al.* 2000; Makino *et al.* 2002; Gendron *et al.* 2012). TOC1 se propuso inicialmente como un activador de la expresión de CCA1 y de LHY ya que el mutante *toc1* presentaba bajos niveles de expresión de CCA1/LHY (Alabadi *et al.* 2001) lo que genera un bucle de activación/represión de estos genes de forma rítmica (conocido como *evening loop*). Sin embargo existían resultados contradictorios como los bajos niveles de CCA1/LHY en líneas de sobreexpresión de TOC1 (Makino *et al.* 2002; Mas *et al.* 2003); resultados más recientes con líneas inducibles de TOC1 (Shin *et al.* 2009; Gendron *et al.* 2012; Covington *et al.* 2009) y modelos validados matemáticamente (Pokhilko *et al.* 2012) proponen que TOC1 actúa como un represor de CCA1/LHY. En el segundo bucle (conocido como *morning loop*), CCA1 y LHY activan la expresión de *PRR7* y *PRR9*, que a su vez reprimen CCA1/LHY (Farre *et al.* 2005; Nakamichi *et al.* 2005; Salome y McClung 2005). Más

recientemente se ha incluido también en el modelo una regulación recíproca entre TOC1 y el componente asociado a reloj GIGANTEA (GI) (Fowler *et al.* 1999; Park *et al.* 1999; Pokhilko *et al.* 2012). GI interacciona y estabiliza ZEITLUPE (Kim *et al.* 2007), una proteína tipo *F-box* que marca TOC1 (Mas *et al.* 2003) y PRR5 (Kiba *et al.* 2007) para su degradación en el proteasoma. El componente asociado a reloj EARLY FLOWERING 3 (ELF3) (McWatters *et al.* 2000) es un represor de los componentes centrales del reloj y se asocia al promotor del gen *PRR9* para regular su expresión (Dixon *et al.* 2011).

Otros componentes incluidos en el actual modelo son EARLY FLOWERING 4 (ELF4) (Doyle *et al.* 2002) y LUX ARRHYTHMO (LUX) (Hazen *et al.* 2005), que junto con ELF3 muestran una actividad coordinada formando el denominado *Evening Complex (EC)*, complejo regulado diurnamente (Nusinow *et al.* 2011), regula el crecimiento vegetal uniéndose directamente a los promotores PIF4 y PIF5, por lo que se ha propuesto para el *EC* un papel en el crecimiento regulado por control circadiano (Nusinow *et al.* 2011). Para CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1), una ligasa E3 involucrada en la ubiquitinación de proteínas para la degradación, se ha propuesto un papel en la degradación de ELF3 lo que alteraría la composición del *EC* (Pokhilko *et al.* 2012; Pokhilko *et al.* 2013) . En el último modelo hasta la fecha publicado se ha incluido el efecto activador del ABA en la transcripción de *TOC1* a través de la proteínkinasa SnRK2 (Raghavendra *et al.* 2010; Pokhilko *et al.* 2013).

Acrónimo	AGI	Pérdida de función	Sobreexpresión	Referencias
CCA1	At2g46820	Periodo corto	Arrítmicas	Alabadí et al 2001 Farre et al 2005
ELF3	At2g25930	Arrítmicas en luz continua	periodo largo	Dixon et al, 2011
ELF4	At2g40080	Arrítmicas	desconocido?	Dixon et al, 2011
GI	At1g22770	Periodo corto, menor amplitud	Periodo corto, menor amplitud	Fowler et al, 1999 Park et al, 1999 Kim et al, 2007
LHY	At1g01060	Periodo corto	Arrítmicas	Alabadí et al 2001 Farre et al 2005
LUX	At3g46640	Arrítmicas	Arrítmicas	Hazen et al, 2005
PRR7	At5g02810	Periodo largo	desconocido?	Farre et al 2005 Salome and Mclung 2005 Nakamichi et al 2005
PRR9	At2g46790	Periodo largo	periodo corto	Farre et al 2005 Salome and Mclung 2005
TOC1	At5g61380	Periodo corto	Arrítmicas	Strayer et al 2000
ZTL	At5g57360	Periodo largo	Arrítmicas	Kiba et al, 2007 Kim et al, 2007

Tabla 5. Componentes del reloj circadiano en *A.thaliana*. Se indica su función conocida y el efecto de su pérdida y su sobreexpresión. Adaptada de Mclung *et al.*, 2006 y Nakachimi *et al.*, 2011.

Uno de los factores más importantes de control de la vía del MEP es la regulación por luz. Se ha descrito que genes de la vía del MEP están regulados diurnamente (Cordoba *et al.* 2009) y que los niveles de transcrito se inducen tras la iluminación (Carretero-Paulet *et al.* 2006). Algunos genes de la vía del MEP y de los carotenoides (Covington *et al.* 2008) como *DXS* y *HDR* presentan un patrón de expresión génica circadiano (Hsieh y Goodman 2005; Cordoba *et al.* 2009). El reloj circadiano tiene un impacto importante sobre biosíntesis de isoprenoides, los terpenoides volátiles (Dudareva *et al.* 2005; Abel *et al.* 2009) y el isopreno (Loivamaki *et al.* 2007; Wilkinson *et al.* 2006) ya que tienen un ritmo de emisión diurno. La acumulación de ABA, citokininas, gibberelinas muestra también variaciones diurnas en *A.thaliana* (Hedden y Kamiya 1997; Novakova *et al.* 2005; Barta y Loreto 2006). Algunos genes de las vías de biosíntesis de los tocoferoles, carotenoides y de la biosíntesis del ABA tienen también perfiles de expresión circadiana (Dudareva *et al.* 2005; Hsieh y Goodman 2005; Covington *et al.* 2008; Cordoba *et al.* 2009). Se sabe que en el triple mutante *prr9/prr7/prr5* la expresión de genes y niveles de metabolitos de las clorofilas, carotenoides, ABA y tocoferoles están aumentados lo que sugiere a los factores PRR9/PRR7/PRR5 como reguladores negativos de estas vías biosintéticas (Fukushima *et al.* 2009). La mayoría de estudios hasta ahora sólo han explorado la regulación transcripcional de los del MEP por los componentes del reloj circadiano, sin embargo, poco se ha investigado acerca de la regulación circadiana de la acumulación de los enzimas de la vía o de su actividad.

3.2 Regulación postranscripcional de la vía del MEP.

Además de la regulación transcripcional de la vía del MEP, numerosas evidencias sugieren que una parte importante del control de la ruta se lleva a cabo a nivel postranscripcional. Estos efectos postranscripcionales pueden abordarse como cambios en la actividad del enzima o cambios en los niveles totales de proteína, que implicarían sistemas de control de calidad de las proteínas (chaperonas y proteasas), sistemas de regulación redox, fosforilación y posiblemente de subcompartimentación plastídica. Si bien existen muchos antecedentes experimentales que sugieren mecanismos postranscripcionales para la regulación de algunos enzimas del MEP poco se conoce

acerca de los mecanismos específicos que controlan estos cambios de actividad enzimática o de acumulación de proteína.

3.2.1 Regulación de la actividad de los enzimas del MEP.

Algunos enzimas de la vía MEP se han visto sorprendentemente aumentado sin cambios en los niveles de transcrito en los mutantes de la vía del MEP o mediante el bloqueo con los inhibidores específicos de la ruta. El bloqueo parcial de la vía del MVA y del MEP en plántulas de *A.thaliana* crecidas en presencia de concentraciones subletales de inhibidores específicos causa una reducción de los niveles de isoprenoides sin cambios en los niveles de expresión génica (Laule *et al.* 2003). Los niveles de proteína DXS, pero no de transcrito, están sobreexpresados en plántulas de *A.thaliana* tratadas con FSM, observándose un incremento de proteína DXS y HDR en mutantes *knock out* de genes de la vía del MEP (Guevara-Garcia *et al.* 2005). La regulación postranscripcional parece modular también la acumulación de proteínas de la vía del MEP durante el desarrollo de las plántulas, resultando en pequeños cambios de los niveles de proteína a pesar de una sobreexpresión génica (Guevara-Garcia *et al.* 2005). Estos y otros resultados sugieren que la acumulación de al menos algunos de los enzimas del MEP (incluidas las que controlan el flujo metabólico, DXS y HDR) pueden estar sujetas a cambios por el flujo metabólico de la vía.

Existen también modificaciones covalentes que pueden modular la actividad de los enzimas del MEP. Estudios cristalográficos han mostrado que el enzima MCS contiene un dominio hidrofóbico que puede unirse a metabolitos isoprenoides (Ni *et al.* 2004) y estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) han revelado que MCS se une a residuos fosfato, IPP o DMAPP, GPP y FPP (Kemp *et al.* 2005). Estos metabolitos se sintetizan dos, tres o cuatro enzimas por debajo de MCS por lo que se podría considerar a MCS como un punto de control de la vía (Hunter 2007).

La luz desempeña también un papel en la regulación postranscripcional de algunos enzimas del MEP ya que algunos pueden ser sustratos de la tiorredoxina. En estudios proteómicos se han identificado como putativos sustratos de las tiorredoxinas los enzimas HDS y HDR (Balmer *et al.* 2003). Los dos últimos enzimas de la vía, HDS y HDR, son reductasas, que necesitan para su actividad enzimática un *cluster* de [4Fe-

4S]⁺¹, por lo que ambos enzimas son sustratos de la tiorredoxina (Balmer *et al.* 2003; Lemaire y Miginiac-Maslow 2004). Por otra parte, la ferredoxina puede transferir electrones al *cluster* [4Fe-4S]⁺¹ de HDS en condiciones lumínicas y reducirla en ausencia de cofactores reductores. Estos hallazgos demuestran la presencia de mecanismos postraduccionales tipo redox en la regulación de la actividad de algunos enzimas del MEP.

3.2.2 Regulación de los niveles de los enzimas del MEP.

La identificación de mutantes de *A.thaliana* resistentes a FSM (mutantes *rif*) ha revelado un nuevo mecanismo para el control de la acumulación postranscripcional de enzimas activos de la vía del MEP (Sauret-Gueto *et al.* 2006; Flores-Perez *et al.* 2008b). La caracterización de mutantes *rif1* y *rif10* mostró que el fenotipo de resistencia a FSM es el resultado de la sobreexpresión de los niveles de DXS y DXR sin cambios en la expresión de los niveles de los correspondientes genes. Ambas proteínas, RIF1 y RIF10 (Sauret-Gueto *et al.* 2006; Flores-Perez *et al.* 2008b). Son necesarias para para la expresión del genoma plastídico (el plastoma) y la pérdida de función en las líneas *rif1* y *rif10* causan una reducción en la producción de proteínas codificadas por el plastoma relacionadas con la acumulación postranscripcional de DXS, DXR, HDS y HDR en los plastos mutantes. Las plántulas mutantes mostraron niveles alterados de proteína ClpP1, una proteína codificada por el plastoma, que corresponde a una subunidad catalítica del complejo estromal Clp proteasa (Peltier *et al.* 2004), causando probablemente una disminución de la actividad proteolítica de complejo como consecuencia de la alteración de la estequiometría del complejo (Sjogren *et al.* 2006). Los mutantes con niveles de actividad proteasa Clp disminuida mostraron también un incremento de niveles activos de DXS y DXR, causando un aumento de la resistencia a FSM (Flores-Perez *et al.* 2008b). Aunque la participación de la Clp proteasa en la degradación de al menos algunos enzimas de la vía del MEP es clara (Flores-Perez *et al.* 2008b). Los estudios actuales no permiten concluir que estos enzimas son dianas o sustratos directos de esta proteasa. Es posible que la disminución de actividad de Clp en plastos resulte en cambios que son responsables de la acumulación de DXS, DXR y/u otros sustratos propuestos para este complejo proteolítico.

3.2.3 Sistemas de chaperonas cloroplastídicas.

Recientemente, se ha propuesto que la proteína AtJ20 es capaz de identificar formas inactivas o dañadas de DXS y liberarla al sistema de chaperonas plastídicas Hsp70 para su correcto plegamiento (en condiciones normales) o degradación (en situaciones de estrés) (Pulido 2013); experimentos de inmunoprecipitación mostraron que AtJ20 y DXS se encuentran unidas por lo que se confirmó la presencia de chaperonas Hsp70 en complejos DXS. Los mutantes defectivos en actividad AtJ20 acumulan niveles muy elevados de proteína DXS pero no transcritos y bajos niveles de actividad enzimática DXS, lo que apunta a que la pérdida de función AtJ20 provoca una acumulación postranscripcional de DXS inactiva. Este nuevo mecanismo sugiere la posibilidad que modificaciones postraduccionales mediante chaperonas plastídicas intervienen en la regulación de los enzimas de la vía del MEP.

Entre los sistemas de control de calidad de la proteína se encuentran también las proteasas. Estos sistemas funcionarían coordinadamente con los sistemas de chaperonas (Pulido *et al.*, 2013) previniendo la acumulación de proteínas defectuosas y favoreciendo el rescate de las dañadas para su reactivación. DXS y DXR se acumulan en los mutantes de *A.thaliana clpP*, con una actividad del complejo proteasa estromática ClpP reducida, lo que sugiere la posible implicación de esta proteasa en la degradación de estos enzimas del MEP (Flores-Perez *et al.* 2008b).

Las chaperonas son proteínas que asisten otras proteínas celulares durante su ciclo molecular; también se han denominado *heat shock proteins* debido a que normalmente se inducen cuando el organismo se somete a temperaturas elevadas. Se ha descrito la implicación de las chaperonas moleculares en procesos de plegamiento de proteínas desnaturalizadas a proteínas nativas, ensamblaje de complejos proteicos, facilitación de transporte de proteínas a través de membranas, desacoplamiento de agregados proteicos y transferencia de proteínas a degradación proteolítica (Boston *et al.* 1996). Por lo tanto, las chaperonas pueden determinar tanto la actividad de las proteínas (controlando su plegamiento o forma activa) como su acumulación (desplegándolas para ser degradadas por distintos tipos de proteasas cuando no pueden ser recuperadas).

Introducción

Se han descrito chaperonas citosólicas como Hsp90, Hsp70 y 14-3-3 que asisten y evitan la degradación o agregación de preproteínas plastídicas (esto es, proteínas dirigidas al plasto con el péptido de tránsito) y las dirigen al complejo TOC en la superficie del plasto; las chaperonas Hsp93 y Hsp70 están implicadas en el importe de proteínas. Una vez importadas las proteínas en el estroma, otras chaperonas pliegan, ensamblan y dirigen estas proteínas a compartimentos subplastidiales de destino; ejemplos de estas proteínas son las Hsp70, Cpn60, Cpn10 o cpSRP43 (Flores-Perez y Jarvis 2013).

Existen algunos indicios de que varios sistemas de chaperonas plastídicas pueden controlar los niveles de actividad o la acumulación de los enzimas del MEP. La identificación en el laboratorio de Manuel Rodríguez de una proteína AtJ20 que interaccionaba con DXS por análisis de doble híbrido en levadura supuso el inicio de un estudio que propone que AtJ20 se adapta a DXS para liberarla a Hsp70, una chaperona molecular (Pulido *et al.*, 2013). Anteriormente, la caracterización del mutante resistente a FSM *rif36* se identificó como un mutante de ganancia de función de At5g18820, que codifica para una isoforma de la chaperona plastídica Cpn60 α 2 (Cairó Calzada 2009).

Proteína	AGI	Secuencia de aa con P.T.	Secuencia de aa sin P.T.
Cpn60- α 1	At2g28000	575	543
Cpn60- α 2	At5g18820	586	541
Cpn60- β 1	At1g55490	596	567
Cpn60- β 2	At3g13470	596	547
Cpn60- β 3	At5g56500	600	547
Cpn60- β 4	At1g26230	611	574
Cpn20	At5g20720	253	203
Cpn10	At3g60210	138	100
Cpn10	At2g44650	139	100

Tabla 6. Chaperonas plastídicas Cpn60 y Cpn20 en *A. thaliana*. Se indica el nombre la chaperona y su correspondiente AGI así como la longitud de la proteína según su número de aminoácidos (aa), con y sin péptido de tránsito (P.T.).

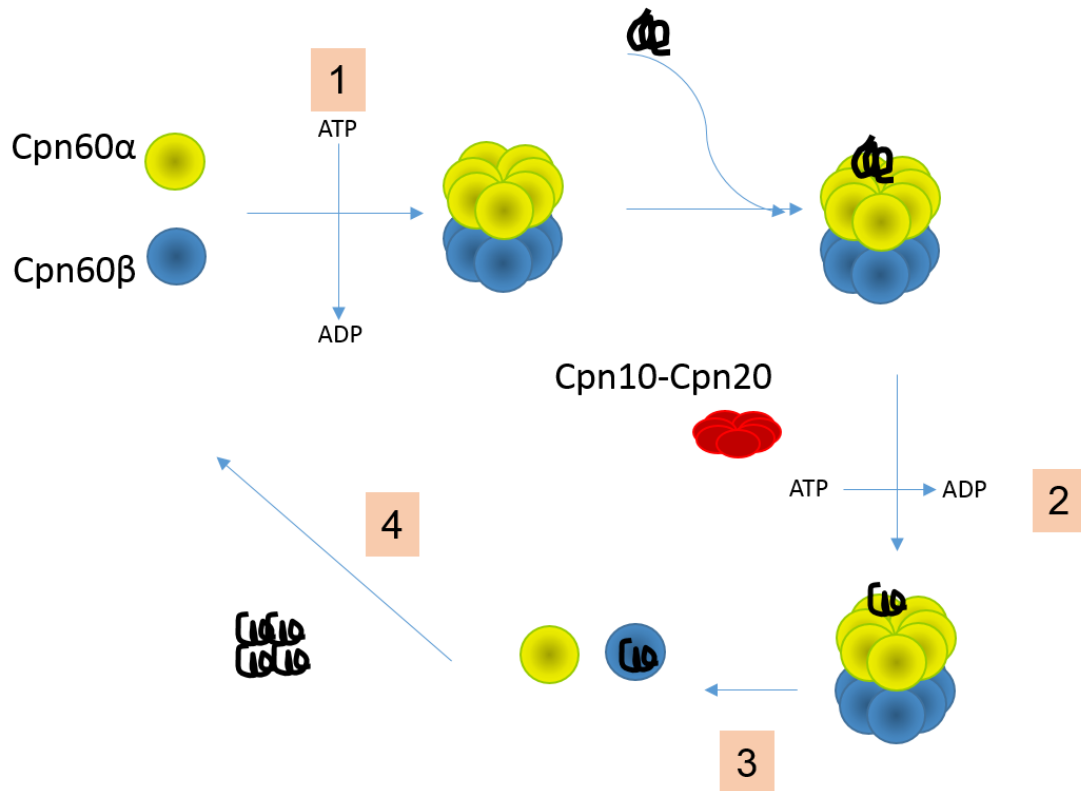


Figura 4. Modelo de funcionamiento del complejo Cpn60. En gris se presentan las subunidades Cpn60 α y Cpn60 β que se ensamblan en oligómeros espontáneamente con asistencia de ATP (paso 1). Los sustratos desplegados se unen a oligómeros Cpn60 y sufren cambios conformacionales en presencia de las cochaperonas y ATP/Mg (Paso 2). Los oligómeros Cpn60 se desacoplan en monómeros y los sustratos plegados se liberan de la chaperonina (paso 3). Los sustratos plegados se unen en unidades funcionales y las subunidades Cpn60 se unen de nuevo en oligómeros.

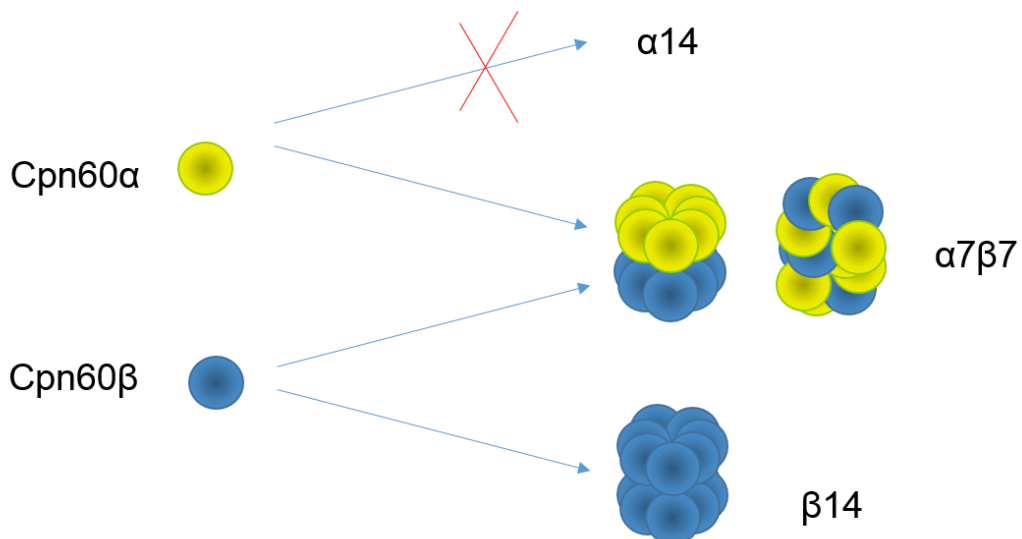


Figura 5. Posible composición de la estequiometría del complejo Cpn60. Los complejos íntegramente constituidos por subunidades α ($\alpha 14$) no se han descrito, mientras sí los que están constituidos por subunidades α y β ($\alpha 7\beta 7$) y sólo β ($\beta 14$) (Vitlin *et al.*, 2013).

Las Cpn60s son una familia de chaperonas que en plantas se clasifican como chaperoninas tipo I, localizadas en mitocondrias y cloroplastos, y tipo II, que se encuentran en citoplasma (Hill y Hemmingsen 2001). En la Tabla 6 se presentan las chaperonas cloroplastídicas y los tamaños de esta proteína antes de ser importadas al plasto (con el péptido de tránsito) y después de su importe (sin el péptido de tránsito). Las Cpn60 cloroplastídicas son homólogas de las chaperonas bacterianas GroEL tipo Hsp60 y funcionan como dos anillos heptaméricos compuestos por siete subunidades formando un complejo tetradecamérico (Figura 4); el tipo I de chaperoninas Cpn60 está compuesta por dos clases de subunidades, α y β (Tabla 6) cuya estequiometría para la función de estos complejos es todavía poco conocida (Bonshtien *et al.* 2009) aunque en algunos estudios se propone la existencia de complejos $\alpha_7\beta_7$ y β_{14} pero no de complejos α_{14} (Figura 5) (Vitlin Gruber *et al.*, 2013). Las proteínas sustrato entran en la cavidad del complejo Cpn60 donde las condiciones de hidrofobicidad permiten el plegamiento adecuado de la proteína con el consumo de ATP. Dentro de grupo de chaperoninas tipo I se encuentran también las cochaperoninas Cpn10 y Cpn20 (o Cpn21) (Viitanen *et al.* 1998) de 10kDa o 21kDa respectivamente que cooperan formando oligómeros de 7 subunidades con las chaperonas Cpn60 (Bonshtien *et al.* 2009). La interacción *in vitro* de oligómeros se ha visto entre Cpn60- β y Cpn10 (Vitlin *et al.* 2011; Kuo *et al.* 2013). Recientemente se ha descrito que Cpn20 activa la FeSOD (hierro superóxidodismutasa) lo que podría indicar que estas cochaperonas podrían tener funciones independientes a las de Cpn60 (Kuo *et al.* 2013). La familia de chaperonas Cpn60 participan en el proceso de ensamblamiento de las subunidades de RubisCo (Roy 1989; Salvucci 2008) así como en la división plastídica (Suzuki *et al.* 2009). El mutante *knock down arc2* para la isoforma Cpn60 α_1 presenta bajos niveles de pigmentos fotosintéticos de origen isoprenoide como clorofilas y carotenoides (Suzuki *et al.* 2009). Por todo ello, se consideró la posibilidad que el complejo Cpn60 tuviera una implicación en la regulación postranscripcional de la vía del MEP.

3.2.4 Compartimentación de la vía del MEP.

La mayoría de abordajes proteómicos y aproximaciones bioinformáticas sitúan los enzimas del MEP en el estroma plastídico (Tabla 4) (Joyard *et al.* 2009; Pulido *et al.* 2012; Vranova *et al.* 2013); estudios de inmunolocalización por microscopía láser confocal situaban también a DXR en el estroma plastídico (Carretero-Paulet *et al.* 2002). Sin embargo, algunos análisis computacionales sugerían que DXS se localiza en tilacoides (Krushkal *et al.* 2003) y recientemente se ha visto que la proteína de fusión DXS-GFP se expresa aparentemente en acúmulos subplastidiales y no de forma homogénea en el estroma (Pulido P *et al.*, 2013). Igualmente, existen algunos estudios *in silico* mediante las herramientas CloroP y LumenP que predicen que DXR presenta un péptido señal de localización subplastídica y otro que supuestamente dirige DXR al lumen tilacoidal (Krushkal *et al.* 2003; Fung *et al.* 2010) sin embargo esta localización de DXR no se ha demostrado *in vivo*.

Algunas etapas para la biosíntesis de los isoprenoides se encuentran compartimentadas en diferentes tejidos vegetales o en suborgánulos celulares específicos (Lunn 2007). Los genes que codifican para los enzimas DXS, DXR y MECS se encuentran expresados en células del floema interno del parénquima en *Catharanthus roseus* lo que implica la translocación de algunos metabolitos de uno a otro tipo celular (Burlat *et al.* 2004) así como la localización específica del enzima HDS en las células del floema del parénquima interno en *Catharanthus roseus* (Oudin *et al.* 2007).

La compartimentación de enzimas o metabolitos puede ser considerada también una forma de regulación de las vías metabólicas, bien con una función de almacenaje o regulando la actividad metabólica. En los plastos se han identificado suborgánulos de origen tilacoidal denominados plastoglóbulos (Vidi *et al.* 2007); análisis proteómicos han identificado que en el interior de estos orgánulos lipófilos se encuentran enzimas de la ruta de los tocoferoles y metabolitos como prenilquinonas, carotenoides y plastoquinonas (Nacir y Brehelin 2013) por lo que se les ha propuesto como orgánulos metabólicamente activos.

OBJETIVOS

Objetivos

Objetivos

Objetivo general:

- Identificar nuevos mecanismos de regulación de la vía del MEP y en concreto del enzima que cataliza el primer paso específico de la vía, DXR.

Objetivos específicos:

- Evaluación del posible papel del reloj circadiano en general y de TOC1 en particular en la regulación postranscripcional de DXR.
- Estudio de la participación del complejo de chaperonas plastídicas Cpn60 en la regulación postranscripcional de DXR.

Objetivos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Métodos de manipulación de *A. thaliana*.

1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.

El material vegetal utilizado ha sido procedente de la planta *A. thaliana*. La mayoría de experimentos se han realizado con plántulas de 10-15 días crecidas en medio *Murashigue & Skoog* (MS) en cámaras con temperatura, intensidad de luz y humedad relativa controladas.

1.2 Esterilización de semillas.

Previamente a la siembra de semillas sobre placas de medio MS, la esterilización se lleva a cabo para eliminar contaminaciones por hongos o bacterias. Todas estas operaciones se realizan debajo de una campana de flujo laminar.

-Una cantidad equivalente a 100µL de semillas se agitan durante 5 minutos en un tubo Eppendorf® con 400 µL de una solución de etanol 70% y Tritón-X 0.01%.

-A continuación se elimina la solución anterior y se agitan de nuevo las semillas con 400 µL de etanol absoluto durante 10 minutos.

-Se elimina el etanol absoluto y se dejan secar las semillas bajo la campana de flujo laminar.

Alternativamente, la esterilización puede llevarse a cabo con sólo EtOH absoluto durante 10 minutos en agitación o con lejía al 5% durante 5 minutos.

1.3 Cultivo *In Vitro* de plántulas *A.thaliana*.

El medio MS se ha utilizado para germinar las semillas y crecer las plántulas en placas de Petri en condiciones estériles (Tabla 7).

Componente	Marca comercial	Cantidad
MS	<i>Duchefa</i> ®	2.2 g
MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico)	<i>Sigma</i> ®	0.25 g
Agar	<i>Duchefa</i> ®	4 g
H ₂ O mQ		c.s.p. 1 L

Tabla 7. Componentes del medio para cultivo *in vitro* de plántulas de *A.thaliana*.

El medio MS se ajusta a pH 6 con KOH 0.1 mg/mL y se autoclava durante 20 minutos con calor húmedo (121°C). Se añaden los suplementos requeridos después de

atemperar el medio, cuando es el caso (Tabla 8). A continuación se vierte el medio en placas de Petri, se deja secar y se distribuyen las semillas en la placa.

Suplemento	Marca comercial	Aplicación
Fosmidomicina	<i>Sigma</i> [®]	Inhibidor de la ruta MEP
Clomazona	<i>Sigma</i> [®]	Inhibidor de la ruta MEP
Fosfinotricina	<i>Sigma</i> [®]	Selección de líneas transgénicas
Higromicina	<i>InvivoGen</i> [®]	Selección de líneas transgénicas

Tabla 8. Suplementos utilizados en el medio MS

Las semillas estériles se siembran en placas de Petri con medio MS en una campana de flujo laminar. Cada placa se sella con un esparadrapo transpirable (*Leukopor*[®]), se recubre con papel de aluminio para protegerla de la luz y se guarda a 4°C de 2 a 4 días (estratificación). Posteriormente, las placas (sin papel de aluminio) se trasladan a las cámaras de cultivo.

Las condiciones de las cámaras de cultivo en este estudio, excepto cuando se indica lo contrario, han sido 16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad (LD), 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad (ND), 8 horas de luz/ 16 horas (SD) de oscuridad según se han diseñado los experimentos. La temperatura de las cámaras ha sido de 22°C y la Intensidad de luz 100 $\mu\text{Einstein}$ s ($1 \mu\text{E} = 1 \mu\text{mol de fotones} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$), a menos que se indique lo contrario.

1.4 Cultivo en tierra de *A.thaliana*.

Las plántulas germinadas y crecidas en placa de Petri de unos 10-15 días se transfieren a macetas para propagar semillas. Para ello cada plántula se separa del medio MS de la placa y se trasplanta a tiestos con sustrato sólido previamente hidratado. El sustrato sólido consiste en una mezcla de perlita: vermiculita: turba en las proporciones 1:1:1. Los tiestos son colocados en bandejas.

Después de ser trasplantadas, las plantas se trasladan a cámaras o invernaderos con luz, temperatura y fotoperiodo controlados. Los dos primeros días los tiestos se cubren con plástico transparente (*Saran Wrap*[®]) para mantener condiciones de humedad elevada, después se retira el plástico.

2. Métodos bioquímicos y de biología molecular aplicados a *A.thaliana*

2.1 Métodos bioquímicos aplicados

Como medida de la actividad de los enzimas del MEP se han utilizado el método *Seedling Establishment* (SE%) y la determinación de pigmentos.

2.1.1 *Seedling establishment* (%SE)

Este método consiste en el conteo de plántulas que producen hojas verdaderas fotosintéticamente activas y por tanto capaces de dar lugar al total desarrollo de la planta frente a aquellas que no son capaces de desarrollarlas. Las plántulas crecidas en placas de MS suplementadas con FSM o CLM son inspeccionadas visualmente para llevar a cabo el conteo.

El procedimiento se lleva a cabo como sigue:

- Preparar placas de MS, sembrar las semillas, estratificar y colocar las placas en cámara de crecimiento.
- En el día 15, contar el total de plántulas que producen hojas verdes y que no las producen de las placas de MS y MS con inhibidor.
- Calcular el porcentaje de plántulas con hojas verdaderas con respecto al total de plántulas de la placa. El total de plántulas debe ser corregido por el porcentaje de plántulas germinadas en MS con respecto al total de plántulas sembradas.

2.1.2 Determinación de Pigmentos (clorofilas y carotenoides).

El total de carotenoides y clorofilas se extraen y cuantifican según el método descrito por (Fraser *et al.* 2000).

- Recoger plántulas de día 15 en microtubos de centrífuga, pesar el tejido en balanza de precisión (25-50 mg por muestra) y congelar en N₂ líquido.
- Triturar las muestras con bolas de cristal de 3mm en el equipo *Tissue Lyzer*[®], con ayuda de pistilo Dounce o bien en morteros.
- Añadir a cada muestra 400 µL de metanol y mezclar en un agitador multitubos durante 30 min en una cámara de 4°C y en oscuridad.
- Añadir un volumen de 400 µL de Tris-HCl 50 mM pH7.5, NaCl 1 M a cada muestra e incubar en agitación durante 10 min.

Materiales y métodos

-Añadir 400 µL de cloroformo, incubar a temperatura ambiente en agitación constante durante 3 min.

-Centrifugar la mezcla a 12000g durante 5 min a 4°C.

-Recuperar la fase orgánica (superior) y transferir a nuevos microtubos.

-Secar el sobrenadante por corriente de N₂ o por evaporación.

-Conservar a -80°C hasta el análisis de pigmentos por espectrofotometría.

Análisis de pigmentos por espectrofotometría (ver Artículo 2).

-Para la determinación de clorofilas totales y carotenoides, añadir 50 µL de acetato de etilo a cada muestra.

-Añadir 25µL del anterior extracto de acetato de etilo a una cubeta de cuarzo que contiene 775 µL de acetona. Mezclar con una pipeta.

-Realizar la medición de pigmentos en un espectrofotómetro-UV a longitudes de onda 470.0 nm, 644.8 nm and 661.6 nm respectivamente.

-El total de clorofilas y carotenoides son calculados mediante las ecuaciones:

Total de clorofilas = (1 000 x Ca + b x 4) ng / mg peso fresco

Total de carotenoides = (1 000 x Cx + c x 4) ng / mg peso fresco

Ca = 11.24A661.6 – 2.04A644.8 Cb = 20.13A644.8 – 4.19A661.6

Ca + b = 7.05A661.6 – 18.09A644.8 Cx + c = (1 000A470.0 – 1.90Ca – 63.14Cb) / 214

Para la determinación espectrofotométrica en esta tesis se ha utilizado el equipo *Spectramax*[®].

2.2 Genómica

2.2.1 Identificación de líneas mutantes de *A. thaliana*.

Las líneas mutantes de *Arabidopsis* tanto por inserción de T-DNA (eg. SALK 012440) como mutaciones puntuales (eg. *arc2*) fueron analizadas por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para confirmar su genotipo mediante el siguiente protocolo:

1) Extracción de DNA genómico (gDNA)

-Tomar 2-4 plántulas de una misma línea o 1 hoja de roseta (o caulinar) de un individuo de *A.thaliana*, colocar en un microtubo de centrífuga, congelar en N₂ líquido y triturar con un pistilo Dounce.

Materiales y métodos

- Añadir 400 μL de tampón TENS (200 mM Tris-HCl, pH 7.5; 250mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS).
- Centrifugar 5 minutos a 14000g.
- Transferir el sobrenadante a microtubos nuevos y añadir 400 μL de isopropanol.
- Mantener a temperatura ambiente durante 30 min como mínimo.
- Centrifugar durante 15 minutos a 14000g.
- Eliminar el sobrenadante, añadir 400 μL de etanol 70% a los microtubos y centrifugar por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y secar los microtubos a temperatura ambiente.
- Añadir 40 μL de agua estéril a los microtubos que contienen el gDNA y congelar a -20°C .

2) PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Esta técnica se ha utilizado ampliamente a lo largo de esta tesis. Para la amplificación de secuencias génicas con el fin de genotipar mutantes o líneas de inserción de T-DNA se utilizaron en general las siguientes condiciones de reacción (Tabla 9):

Reactivos	Volumen (μL)
Master Mix*	5
Oligonucleótido sentido**	0.5
Oligonucleótido anti-sentido**	0.5
gDNA	1
Agua estéril	3

Tabla 9. Composición de la mezcla de reacción de PCR.

*Master Mix 2x (*Roche Green Master*) contiene TAQ polimerasa, nucleótidos, magnesio y tampón de reacción

**5 μM

Identificación de líneas mutantes

En caso de inserciones de T-DNA se utiliza una estrategia basada en realizar una PCR sobre el gDNA utilizando oligonucleótidos de regiones flanqueantes al T-DNA y el oligonucleótidos del T-DNA. La presencia de bandas específicas del T-DNA indicará homocigosis, heterocigosis o azigosis para la inserción. Este método se utilizó en esta tesis para la identificación de los mutantes de la colección SALK de los genes de Cpn60,

Cpn10 y Cpn20. Los primers específicos de la T-DNA de la colección SALK y como los de las regiones génicas adyacentes al T-DNA vienen detallados en la Figura 6 y Tabla 24.

En el caso de las líneas con mutaciones puntuales se han utilizado oligonucleótidos específicos para la detección de estas mutaciones. Para confirmar que la mutación está presente en los dos alelos del gen (mutación en homocigosis), la estrategia consiste en realizar dos PCR sobre un gDNA:

(1) PCR del gen mutado: PCR con dos oligonucleótidos (sentido y antisentido) donde uno de ellos debe anillar en el último nucleótido mutado.

(2) PCR del gen no mutado: PCR con dos oligonucleótidos (sentido y antisentido) correspondientes a la región wt donde se hallaría la mutación.

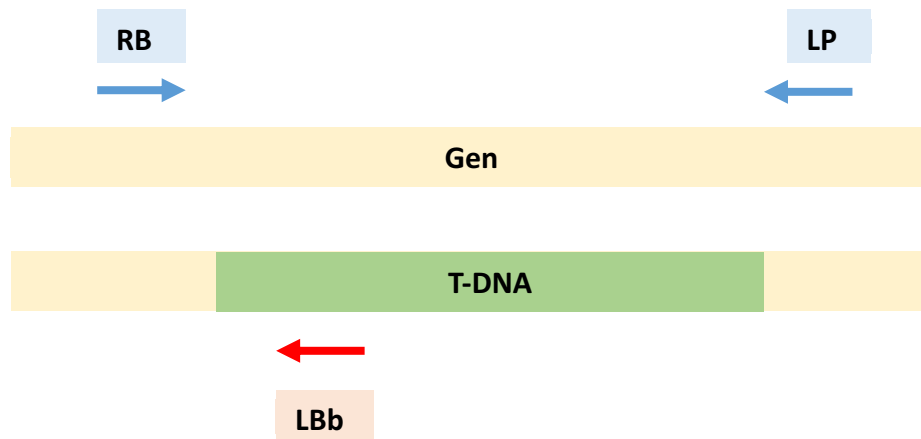


Figura 6. Esquema de las regiones del gen y del T-DNA y región de anillamiento de primers para genotipado. En azul los primers de las regiones génicas flanqueantes al T-DNA (RB y LP) y en rojo la región del T-DNA (Lb).

La PCR se realiza variando las temperaturas de unión de los oligonucleótidos a la región del gDNA, de modo que una línea con los dos alelos mutados estaría en homocigosis para la mutación y sólo se observaría el producto de la PCR en la reacción (1) mientras que un wt sólo daría reacción en (2). La mutación en heterocigosis produciría reacción en (1) y (2). Esta estrategia ha sido utilizada para identificar alelos mutados *toc1-1* (Tabla 10) y *arc2* (Tabla 11). Debido a la especificidad de la mutación y a las condiciones de PCR a se detallan las condiciones para su detección:

Detección de la mutación <i>toc1-1</i> por PCR		
Reacción gen wt <i>Primers</i>	toc wt - F	toc wt - R
	5' GTGAATAGGAAACGCCTTGC 3'	5' TCAACGAACTAAGCTAAACC 3'
Reacción gen mutado <i>Primers</i>	toc mut - F	toc wt - R
	5' GTGAATAGGAAACGCCTTGT 3'	5' TCAACGAACTAAGCTAAACC 3'
Condiciones de PCR		
Paso reacción	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	1 min
Desnaturalización	94°	1 min
Anillamiento	62°	1 min
Extensión	72°	30 s
Extensión final	72°	6 min

Tabla 10. Condiciones de reacción de PCR para la detección de la mutación *toc1-1*.

Detección de la mutación <i>arc2</i> por PCR		
Reacción gen wt <i>Primers</i>	60A1 wt - F	60A1 wt - R
	5' CACGGTCGAAGTTGAAGAAG 3'	5' GTCCATGGCTAGGTACTCAG 3'
Reacción gen mutado <i>Primers</i>	60A1 wt - F	arc2 mut - R
	5' CACGGTCGAAGTTGAAGAAG 3'	5' GTCCATGGCTAGGTACTCAA 3'
Condiciones de PCR		
Paso reacción	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°	1 min
Desnaturalización	94°	1 min
Anillamiento	56°	50 s
Extensión	72°	1 min
Extensión final	72°	6 min

Tabla 11. Condiciones de reacción de PCR para la detección de la mutación *arc2*.

2.2.2 Cuantificación de niveles de expresión génica

Los niveles expresión génica (tránsito o RNA mensajero (mRNA) fueron cuantificados mediante q-RT-PCR (*quantitative Real Time PCR*). La técnica requiere la extracción de RNA de tejido vivo, síntesis de cDNA a partir de RNA y posterior cuantificación por q-RT-PCR. Los *primers* utilizados se muestran en la Tabla 25.

La extracción de RNA se llevó a cabo según el protocolo comercial de *Pure Link® RNA Mini kit* de *Invitrogen®* y la síntesis de cDNA a partir de 2000 ng de RNA con el kit *Transcriptor First Strand® cDNA Synthesis kit* de *Roche®*. Para la cuantificación de niveles de expresión génica en muestras de cDNA se utilizaron 50-100ng de cDNA con el método de detección por fluorocromos no específicos (*Sybr Green®*) mediante el equipo *LightCycler® 480 Real-Time PCR System*. Los valores de *CT* (*cycle threshold*) del gen de interés de cada muestra fueron normalizados al valor de *CT* del gen control de cada muestra mediante la ecuación:

$$R = \frac{CT_{ref}^{EF_{ref}}}{CT_{gen}^{EF_{gen}}}$$

2.2.3 Ensayo de Complementación Bimolecular (BiFC)

Los experimentos de BiFC se realizaron sobre monocapas de células de cebolla (*Allium cepa*) o puerro (*Allium ampeloprasum*) siguiendo el protocolo de microbombardeo del Sistema *BioRad® PDS100/He-Particle Delivery System*.

La técnica empleada para preparar los clonajes que se testaron en estos ensayos así como los genes, vectores y oligonucleótidos utilizados se describen en el apartado Métodos de clonaje.

1) Preparación del material para microbombardeo.

-Placas de MS1, en cápsulas de Petri de 9cm.

-Etanol 100%.

-Glicerol 50% autoclavado: 125mL de glicerol y 125mL de agua.

-Espermidina 0.1M "free base" (*Sigma®*). En alícuotas de 14 µL en tubos *Eppendorf®* de 1.5mL. Previamente, calentar 5 minutos a 65°C, y añadir 986µL de agua estéril.

-CaCl₂ 2.5M. Preparar 25mL de solución (9.1888g en 25mL), autoclavar y alicuotar 1mL en tubos *Eppendorf®* de 1.5mL.

-Preparación de la cebolla/puerro: Utilizar las parte más internas de la cebolla. Si es puerro, intentar utilizar la misma zona (longitudinal) del puerro. Cortar las capas (1.5cmx1.5cm) con bisturí y pinzas. Colocar la capa/s en el centro de la placa de Petri.

-Preparar los microproyectiles.

2) Preparación de microproyectiles para microbombardeo.

- Lavar 60mg de partículas de oro (Au, 1µm de diámetro, *BioRad*®) con 1mL de etanol absoluto.
- Agitar con el vórtex múltiple a velocidad máxima por 10 minutos.
- Centrifugar 1 minuto a 14000 g y eliminar sobrenadante.
- Lavar con 1mL de glicerol estéril 50% y colocar en el vórtex a la máxima velocidad por 30 segundos.
- Centrifugar 1 minuto a 14000 g y eliminar el sobrenadante.
- Repetir pasos 4-5.
- Reservar en tubos *Eppendorf*® de 1.5mL en un volumen de 40µL. Guardar a -20°C, máximo 2 meses.

3) Precipitación del DNA

- Preparar tubos *Eppendorf*® de 1.5mL (numerados con cada combinación de plásmidos).
- Agitar los 40µL de Au de cada tubo.
- Añadir secuencialmente y agitar en el vórtex múltiple 5 minutos después de cada paso:
- Añadir el plásmido control DsRed (3µg).
- Añadir el plásmido N-YFP (3µg).
- Añadir el plásmido C-YFP (µug).
- Añadir H₂O estéril hasta 100µL.
- Añadir 150µL de CaCl₂/espermidina (125uL CaCl₂ 2.5M + 25µL espermidina 0.1M). Preparar esta solución antes de utilizar.
- Sedimentar las partículas en hielo en posición vertical por 15 minutos.
- Realizar un *spin* 30 segundos y descartar el sobrenadante con una pipeta.
- Añadir 500µL de EtOH absoluto y agitar en el vórtex 20 segundos.
- Repetir una vez estos dos últimos pasos.
- Resuspender en 15µL de EtOH y colocarlo en hielo.
- Sonicar 10 segundos y agitar en el vórtex 10 segundos dos veces consecutivas con cada muestra.

Materiales y métodos

-Mantener las muestras en hielo hasta el procedimiento de microbombardeo.

4) Preparación PDS1000/He

-Encender la cabina de flujo laminar. Esterilizar el equipo de microbombardeo *BioRad*[®] *PDS100/He-Particle Delivery System* con etanol absoluto. En placas de Petri esterilizar las membranas portadoras y las rejillas de parada con etanol 100%; esterilizar los discos de ruptura (de 900 psi* para cebolla y puerro) en isopropanol. Dejar secar sobre papel en campana; colocar cada uno de los elementos para el disparo en orden debajo de la campana.

-Encender la bomba de vacío. Abrir la llave del manómetro en sentido antihorario. Abrir la llave del tanque de helio en sentido antihorario. El marcador "A" dará la presión, normalmente por encima de 1700 psi.

-Cerrar la llave 2 en sentido antihorario hasta que marque una presión de 200 psi por encima de la presión de resistencia de los discos de ruptura (e.g. 1100 psi).

-Ajustar la membrana portadora sobre el soporte con ayuda de pinzas.

**(1 pound per square inch=6894.75729 pascals).*

5) Procedimiento de microbombardeo

-Depositar 8µL de muestra sobre la membrana portadora y se deja secar.

-Poner la rejilla de parada en el soporte disparador y a continuación el soporte con la membrana portadora. La distancia entre ambas es de 11 mm.

-Poner el disco de ruptura en su soporte y enroscarla en el extremo del cilindro de gas hasta que quede fijo. Si es necesario, ajustar con la palanca.

-Colocar el soporte disparador al nivel más próximo de la base.

-Poner la placa con la muestra vegetal en el nivel 4 y cerrar la cámara.

-Accionar la bomba de vacío hasta que marque 27 (0.1 atm) y fijar.

-Accionar el botón de disparo (*fire*) hasta oír la ruptura del disco e inmediatamente dejar de presionar y extraer el vacío. Sacar la muestra.

-Sacar el soporte de ruptura y comprobar que se ha roto el disco. Hacer el mismo montaje para la segunda réplica del disparo.

-Al finalizar, recoger todas las placas y envolverlas en papel de plata y colocarlas en una cámara de 22º hasta el día siguiente (han de pasar 12-48h ya que la expresión es transitoria).

-Para cerrar el aparato: cerrar la llave 1, hacer el vacío y disparar el gas, y ver cómo bajan las dos presiones. A continuación cerrar el aparato y la bomba.

2.2.4 Método de transformación por inmersión floral

El método de inmersión floral mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent 1998) se utilizó para la obtención de líneas transgénicas de *A.thaliana*. Este procedimiento se utilizó para transformar las líneas *toc1-1* con el plásmido At.DXRnS-pB7FWG2rc (a lo largo de esta tesis citadas como líneas 35S:DXR-GFP) y plantas Col-0 con el vector pCAMBIA1302 35S:Cpn60 α 1-GFP:

-Crecer unas 10 plantas en condiciones de LD y cortar las inflorescencias primarias.

-Después de 5-7 días, recién crecidas las inflorescencias secundarias, sumergir las plantas en medio de agroinfiltración.

-Colocar la suspensión contenedora de *A.tumefaciens* GV3101 transformadas con el plásmido de interés en recipientes de plástico y sumergir las plantas por 2 minutos en agitación suave.

-Colocar las plantas horizontalmente sobre papel secante en bandejas y recubiertas con plástico *Saran Wrap*[®] para retener humedad. Estas bandejas se colocan en cámaras en penumbra y se mantienen durante un día.

-Una vez recuperadas las plantas (T0) eliminar la película de plástico y reubicar las plantas en cámaras de LD para que acaben su ciclo.

-Las semillas resultantes (T1) fueron esterilizadas y sembradas en placas de MS e higromicina 50 μ g/mL o fosfotricina 20 μ g/mL. Las plántulas resistentes fueron trasplantadas a tierra.

1) Preparación del medio de agroinfiltración

-Sembrar una estría a partir de un cultivo congelado a -80°C en glicerol 50% en una placa de medio YEB/agar con los antibióticos selectivos de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GV3101-pMP90 (rifampicina (25 μ g/mL) y gentamicina (50 μ g/mL) y los antibióticos del vector binario introducido (kanamicina (50 μ g/mL) o espectinomicina (50 μ g/mL). Incubar la placa a 28°C 2-3 días hasta obtener una colonia aislada.

Materiales y métodos

-Inocular una colonia de *A. tumefaciens* en 3mL de medio YEB líquido con los antibióticos antes mencionados e incubar en un agitador a 190 rpm a 28°C durante una noche.

-Al día siguiente inocular el anterior precultivo en 500 mL de YEB suplementado con los antibióticos en un recipiente tipo Erlenmeyer. Mantener el cultivo durante una noche en agitación a 190 rpm y 28°C.

-Transferir el cultivo a tubos de centrifuga, mantenerlos sobre hielo (4°C) y centrifugar a 4°C a 5000 g durante 5 minutos.

-Eliminar sobrenadante y resuspender las células de *A. tumefaciens* en una solución de 300mL agua destilada al 5.5% de sacarosa (p/v), 0.2% MgCl₂ y 0.5% del detergente *Silwet L-77* (v/v).

2) Procedimientos específicos de *A. tumefaciens*

1. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*.

-Inocular una colonia de *A. tumefaciens* en 10 mL de medio YEB suplementado con rifampicina (25 µg/mL) y gentamicina (50 µg/mL)

-Inocular 50 mL de YEB - rifampicina (25 µg/mL) - gentamicina (50 µg/mL) en una dilución 1/1000 del precultivo anterior. Incubar en agitación a 190 rpm y 28°C durante una noche.

-Centrifugar las células durante 5 minutos a 5000 g y 4°C en un rotor JA-10 enfriado a 4°C. A partir de ese momento, mantenerlas en hielo y manipularlas delicadamente ya que pueden lisarse mecánicamente.

-Resuspender suavemente el sedimento en 10 mL de solución NaCl 0.15M previamente enfriada a 4°C.

-Centrifugar las células durante 5 minutos a 5000g y 4°C, el rotor JA-10 enfriado y resuspender el sedimento resultante en 1 mL de una solución 20mM CaCl₂.

-Distribuir la suspensión en alícuotas de 20 µL en tubos de microcentrífuga, congelar en N₂ líquido y reservar a -80°C.

2. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens*

-Descongelar sobre hielo una alícuota de células competentes.

Materiales y métodos

-Añadir 1-3 µg de DNA (plásmido), mezclar suavemente e incubar sobre hielo durante 30 minutos.

-Congelar en N₂ líquido durante 1 minuto y a continuación colocar en un baño a 37°C hasta que la muestra esté totalmente descongelada.

-Añadir 1 mL de medio YEB e incubar durante 2-4 horas a 28°C en agitación suave (120 rpm).

-Extender 200 µL de cultivo con ayuda de una asa de siembra en una placa con medio YEB sólido suplementado con rifampicina, gentamicina y kanamicina o espectinomicina.

-Incubar a 28°C durante 2-3 días protegida de la luz.

-Comprobar la presencia del vector insertado en las colonias mediante PCR sobre las colonias. Inocular esta colonia en medio YEB con los antibióticos de selección, mantener a 190 rpm a 28°C durante una noche. Reservar una alícuota a -80°C de esta suspensión celular en presencia de glicerol 50% 1:1. Esta alícuota servirá para iniciar la preparación del medio de agroinfiltración.

3) Selección de plantas transgénicas homocigotas para el transgén.

De las semillas obtenidas en la generación T1 sólo unas pocas incorporan el transgén y a veces algunas pueden incorporar más de uno. Para seleccionarlas se utiliza el marcador de selección del transgén presente en el T-DNA. El proceso para conseguir las líneas homocigotas se describe en la Figura 7.

-Esterilizar las semillas como se describe en el apartado 1.1

-Sembrar las semillas en placas de medio MS suplementadas con 40µg/mL de higromicina (Hyg) o 15 µg/mL de fosfotricina (PPT).

-A los 10-15 días observar la presencia de plantas resistentes que serán capaces de desarrollar hojas verdaderas.

-Transferir los individuos resistentes a macetas para que completen su ciclo biológico, se autofecunden y produzcan semillas. Se obtiene la generación T2 sobre la que se analiza el número de copias de T-DNA que se han incorporado al genoma. Para ello se estudia el carácter de la resistencia al transgén en placas suplementadas con Hyg o PPT. Las líneas que segregan en una proporción mendeliana 1:3 (sensibles:resistentes) se escogen ya que presentan un único locus para el transgén en el genoma de la planta.

Materiales y métodos

-Entre 5-10 individuos con las características descritas anteriormente se trasladan a macetas para completar su ciclo y obtener semillas. Para seleccionar líneas uniformes en cuanto al carácter de resistencia a Hyg o PPT se tiene que confirmar que todas las semillas descendientes, generación T3, son resistentes al marcador (Figura 7).

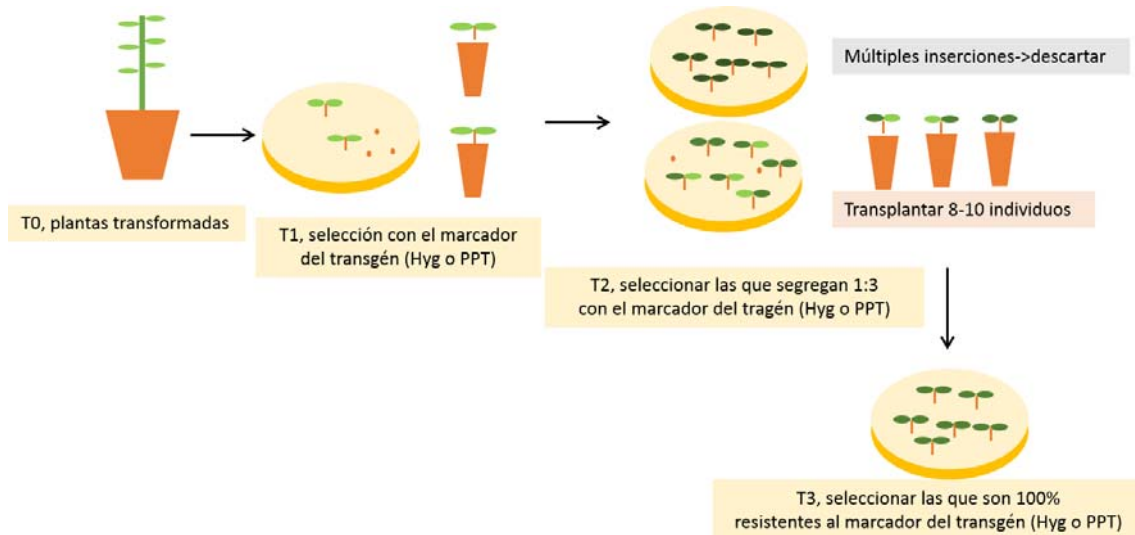


Figura 7: Segregación de líneas transgénicas para la obtención de individuos homogocigotas T3.

2.3 Proteómica

2.3.1 Extracción de proteína total y *western blot*.

1) Preparación de extractos de proteínas totales

El tejido se obtuvo a partir de plántulas crecidas *in Vitro* en MS (~ 50 mg)

- Triturar las muestras congeladas con N₂ líquido en el equipo *Tissue Lyzer*[®] (*Quiagen*[®]), mediante dos bolas de vidrio.

- Añadir un volumen de 150 µL de tampón TKMES*.

- Centrifugar la suspensión a 200g durante 10 min a 4 °C.

- Recuperar el sobrenadante para una segunda etapa de centrifugación a 200g durante 10 min a 4 °C.

- Determinar la concentración del extracto proteico mediante el método de Bradford utilizando el reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay*[®] (*Bio-Rad Laboratories*).

*Composición del tampón TKMES (reservar a 4°C):

100mM Tricina-KOH pH7.5

10mM KCl

Materiales y métodos

1mM MgCl₂

1Mm EDTA

10% (p/v) sacarosa

Extemporáneamente, añadir los siguientes reactivos para que la concentración final sea la siguiente:

0.2% (v/v) TritónX-100

1mM DTT

100 µg/mL PMSF

3 µg/mL E64

20 µg/mL *Protease inhibitor cocktail* (Sigma)

2) Gel de poliacrilamida Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La desnaturalización y separación de las proteínas se llevó a cabo con geles SDS-PAGE utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN® (*Bio-Rad*®). Se utilizan placas de vidrio de ~ 10 x 8 cm y de 1 mm de espesor. Los geles se preparan en tubos de 50mL. Estos geles constan de dos partes de concentraciones diferentes de poliacrilamida cada una:

- Gel 10% separador (inferior): preparar 2 mL de Tris-HCl 1,5 M de pH 8,8; 2,66 mL de acrilamida: bis-acrilamida solución 37.5:1 (*Bio-Rad Laboratories*), 80 µL SDS 10%, 40 µL de amonio persulfato 10%; agua destilada hasta 8 mL volumen total, y 4 µL de TEMED (tetrametiletilenediamina) y verter esta solución entre los vidrios previamente instalados en el módulo para su preparación.

- Gel 4% apilador (superior): 1 mL de Tris-HCl 0,5 M de pH 6,8; 533 µL acrilamida: bis-acrilamida solución 37.5:1 (*Bio-Rad Laboratories*), 40 µL SDS 10%, 20 µL de amonio persulfato 10%; agua destilada hasta 4 mL volumen total, y 4 µL de TEMED. Verter esta solución entre los vidrios.

-Verter la solución de gel separador en las placas de vidrio, y añadir 1 mL de 2-propanol. El 2-propanol favorece la polimerización del gel, puesto que aísla el gel del O₂ atmosférico, que es un inhibidor de la reacción radicalaria de acrilamida; además, procura un frente totalmente horizontal que facilita la separación de las proteínas.

-Durante unos 30 minutos a temperatura ambiente se polimeriza el gel separador. Una vez polimerizado, eliminar el 2-propanol.

-Verter la solución del gel de apilamiento en las placas de vidrio e insertar los peines con los pocillos inmediatamente.

Previo a la electroforesis, se lleva a cabo la desnaturalización de la muestra de proteínas en el tubo de microcentrífuga con la solución 4x: Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glicerol 40%, 8% SDS; β -mercapthoethanol 4% (v / v), azul de bromofenol 0.025%), calentado a 95°C durante 5 minutos. Tras la ebullición de las proteínas, los tubos de microcentrífuga que contienen el extracto desnaturalizado se centrifugan por 10 minutos a máxima velocidad y se enfría a temperatura ambiente antes de cargarlos en los pozos del gel. Las proteínas se separan en geles sumergidos en el equipo Mini-PROTEAN® en tampón de electroforesis (SDS-PAGE: Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%) a 100 V (constante) hasta que el azul de bromofenol alcanza la parte inferior del gel.

Después de SDS-PAGE, los geles son teñidos o transferidos a una membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride) (*Hybond-P-Amersham Pharmacia Biotech*®) para el ensayo de Inmunoblot.

3) Tinción Coomassie

La tinción se lleva a cabo durante al menos 30 minutos en azul brillante Coomassie 0,6% (w/v), etanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y 50% agua (v/v). A continuación, el gel se mantiene en la solución de destinción etanol 40% v/v; ácido acético 10% v/v y 50% hasta que las bandas de la proteína se hacen claramente visibles.

4) Ensayo Inmunoblot (*western blot*)

Para el análisis de inmunoblot (*western blot*), las proteínas se transfieren de los geles SDS-PAGE a una membrana PVDF, utilizando el equipo *Bio-Rad Mini Trans-Blot*®.

-Empapar las membranas de PDVF durante 10 segundos en metanol, y luego mantenerlas en tampón de transferencia (16,7 mM Tris, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v)). El procedimiento de transferencia se sigue según instrucciones del fabricante.

-Colocar el gel sobre papel *Wattman* previamente empapado con el tampón de transferencia, y sobre el gel la membrana y otro papel *Wattman*. Esta disposición se coloca en el sistema de forma que las proteínas se transfieran desde el polo negativo al positivo.

-Después de completar la transferencia de proteína a la membrana, estabilizar las membranas en tampón fosfato salino (PBS pH 7.6: Na₂HPO₄ 80 mM, NaH₂PO₄ 20 mM,

Materiales y métodos

10 mM de NaCl) durante 5 min, seguida de una incubación de 1 h en solución de bloqueo leche PBS-T (PBS pH 7.6, Tween-20, 0,05% v / v, secado de leche en polvo al 5% w / v).

-Incubar la membrana en un agitador a temperatura durante la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario diluido en 10 mL de leche en PBS-T.

-Lavar las membranas tres veces durante 5 minutos con PBS-T en un agitador a temperatura ambiente.

-Incubar durante 30 minutos con el anticuerpo secundario diluido en leche PBS-T en un agitador a temperatura ambiente.

-Lavar la membrana cuatro veces con PBS-T y una vez con PBS, cada vez durante 5 minutos, en un agitador a temperatura ambiente.

-La detección de bandas se realizó mediante el reactivo *ECL Plus*[®] (Amersham[®]). La señal quimioluminiscente se visualizó con el analizador de imágenes *LAS-3000*[®] (Fujifilm[®]).

-La cuantificación de la señal se llevó a cabo utilizando el *software Multi Gauge*[®] (Fujifilm[®]). Para la cuantificación de los *western blot* de DXR se normaliza la banda de DXR con una banda inespecífica que se detecta en los *western blot* y que depende de la carga total de proteína.

2.3.2 Método de extracción total de proteína y análisis por electroforesis bidimensional.

Para estos experimentos, los extractos de proteína se obtuvieron mediante el protocolo indicado en el anterior apartado. Sin embargo, la separación de proteínas por electroforesis bidimensional requiere que éstas se encuentren perfectamente solubilizadas y se sometan a un tratamiento de desnaturalización mayor.

1) Electroforesis bidimensional

Para estos experimentos, los extractos de proteína fueron obtenidos como se ha indicado anteriormente. Sin embargo, esta técnica requiere que las proteínas estén perfectamente solubilizadas y se sometan a un tratamiento de desnaturalización mayor.

Primera dimensión: separación por carga isoelectrica.

Precipitación de proteínas:

- Añadir ácido tricloroacético en una concentración final de 5% a la solución de 50 µg de proteína.
- Mantener 30 minutos en hielo, centrifugar a 13000 rpm a 4°C durante 20 minutos.
- Eliminar sobrenadante y se añadir 200µL de acetona fría.
- Eliminar sobrenadante y repetir el lavado con acetona.
- Secar el precipitado al aire.

Rehidratación de proteínas:

- Añadir 122 µL de tampón de rehidratación de composición 8M de urea (desnaturalización), 2% CHAPS (3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio] -1-propanosulfonato, detergente no iónico, desnaturalizante), 50mM DTT (Ditiotreitol, reductor de puentes disulfuro), otros amfolitos y azul de bromofenol.
- Someter la muestra al vórtex y 10 minutos de ultrasonidos. Añadir 1 µL de buffer IPG (activador de amfolitos, específico para cada rango de pH) y 2 µL de *Deastreak*[®] (*Amersham Biosciences*[®]) (reductor).
- Colocar en el centro del sarcófago (7cm) 125 µL de muestra que se distribuye con las tiras de pH 3-10 o pH 4-7 (*Amersham Biosciences*[®]) con ayuda de unas pinzas y una aguja.
- Añadir 1mL de aceite mineral y se cubrir el sarcófago con su tapa.
- Someter la muestra en el sarcófago a un proceso de rehidratación (6h a 50V) seguido del siguiente gradiente de voltajes: 6.5h a 30V, 1h a 500V, 1h a 1000V, 7h a 5000V.
- Congelar las tiras a -80°C en tubos de plástico para evitar la difusión de las proteínas.

Segunda Dimensión: separación por peso molecular

- Descongelar las tiras conservadas en -80°C y equilibrarlas en 5 mL de buffer de equilibrado I para la reducción final de puentes disulfuro (6M de urea, 2%SDS, 0.375 M Tris pH8.8, 20% glicerol, 10 mg/mL DTT y azul de bromofenol) y agitar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Materiales y métodos

-Cambiar el buffer de equilibrado I por 5mL de buffer de equilibrado II que inhibe posibles reacciones de carbamilación entre la urea y las proteínas (6M de urea, 2%SDS, 0.375 M Tris pH8.8, 20% glicerol, 25 mg/mL de yodoacetamida y azul de bromofenol) y agitar 15 minutos a temperatura ambiente.

-Equilibrar la tira sumergiéndola en agua bidestilada e insertarla entre dos vidrios de 7cm de *Mini-Protean*® *BioRad* que contiene un gel del 10% de acrilamida-bisacrilamida de unos 6 cm (preparado como el que se ha descrito en el apartado de *western blot*), colocar el marcador de pesos impregnado en papel *Wattman* 0.5x0.5 cm y sellar con agarosa 1% y azul de bromofenol.

-Proceder a la electroforesis de la misma manera que en el apartado 3.3 de este capítulo; transferir las proteínas del gel a la membrana de PVDF y continuar con el proceso de inmunoblot como se ha descrito anteriormente.

2.3.3 Ensayos de inmunoprecipitación de proteína.

1) Ensayo de co-inmunoprecipitación

Este ensayo conocido también como coimmunoprecipitación de proteína se utiliza para detectar interacciones proteína-proteína y consiste en la unión de un anticuerpo a una resina que en contacto con un extracto de proteína de plantas captura proteínas presentes en el extracto. Se eluyen las proteínas capturadas por el anticuerpo, se separan las proteínas por electroforesis y se analiza mediante tinción específica del gel con las proteínas (Coomassie o AgNO₃) o por *western blot* para detectar proteínas específicas.

Unión del anticuerpo a la resina.

-Lavar la resina (*GammaBind Plus Sepharose*®, *GE Healthcare*®) con tampón de unión (BF, *binding buffer*) con 3 lavados en una centrífuga a 800g.

-Añadir el anticuerpo primario (anti-GFP, anti-DXR) en una proporción 25µL para 1mL de resina (1mL resina = 500µL resina + 500µL BF).

-Incubar O/N en una plataforma rotatoria a 4°C.

Preparación del tejido vegetal

- Recoger tejido fresco de plántulas de *A.thaliana* de día 15 y triturar las muestras congeladas en N₂ con mortero.
- Añadir tampón RIPA (1/2 o 1/3 p/v) e incubar en una plataforma rotatoria durante 30 minutos a 4°C.
- Filtrar a través de dos capas de *Miraclloth*[®] (*Millipore*[®]).
- Guardar una alícuota para control de "input".

Inmunoprecipitación de proteína

- Equilibrar la resina con tampón RIPA.
- Añadir 50 µL de resina con anticuerpo primario por cada gramo de tejido triturado.
- Incubar en una plataforma rotatoria durante 4 horas a 4°C.
- Centrifugar a 800g a 4°C para recuperar la resina.
- Guardar una alícuota de sobrenadante como fracción "unbound".
- Lavar la resina x4-x5 con tampón RIPA sin detergentes.

Elución

- Llevar a 1x con RIPA con detergentes el buffer de carga (4x) usado para desnaturalizar los extractos de proteína descritos en el apartado de *western blot*.
- Las muestras se desnaturalizan a 95°C durante 5 minutos y se centrifugan a 14000g por 5 minutos.
- A continuación se cargan los extractos de proteínas en geles de acrilamida para su separación.

Además de la tinción con azul Coomassie o la transferencia de proteínas a membranas de PVDF, los geles de acrilamida pueden teñirse con AgNO₃ ya que al ser una técnica altamente sensible, puede teñir proteínas en muy baja cantidad que hayan sido capturadas por los anticuerpos unidos a la resina.

2) Tinción con AgNO₃: Protocolo modificado para espectrometría de masas

Esta tinción se realiza siempre en recipientes de vidrio y se manipula muy cuidadosamente con guantes. Todos los recipientes deben lavarse con agua milli-Q. Las soluciones siempre se preparan con agua milli-Q y se reservan a 4°C protegidas de la luz.

Materiales y métodos

- Fijación de las proteínas mantener 30 minutos los geles en una solución 40% Etanol, 10% ácido acético.
- Sensibilización de las proteínas mantener 5 minutos en 30% etanol $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ p/v.
- Lavar las membranas 3 veces durante 5 minutos con agua milli-Q.
- Teñir durante 20 minutos con una solución de AgNO_3 2.5g/L.
- Lavar 2 veces durante 1 minuto con agua milli-Q.
- Para el velado del gel mantener 2-5 minutos en Na_2CO_3 25 g/L, HCOH 35% p/v.
- Parar la reacción manteniendo 10 minutos en EDTA- Na_2 2 H_2O 14.6 g/L.
- Lavar 3 veces durante 5 minutos en agua milli-Q.

Destinción de geles teñidos con plata

- Poner el gel en una solución 1% de ácido cítrico con 5 mL/L de permanganato potásico concentrado. Preparar la solución justo antes de utilizarla.
- Limpiar con agua destilada.

3) Identificación de proteínas y determinación de masa molecular

Este protocolo se utilizó para analizar el peso molecular de la proteína DXR-GFP inmunoprecipitada, separada y transferida a una membrana de PVDF a partir de extractos de líneas transgénicas de *A.thaliana DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*.

Las bandas de peso molecular aparente correspondiente a DXR-GFP fueron recortadas y analizadas por MALDI-TOF-TOF mediante el procedimiento siguiente.

1. Digestión enzimática de proteínas

La digestión de proteínas con Tripsina porcina (*Promega*[®]) se llevó a cabo en el robot *Progest*[®] (*Genomic solutions*[®]).

- Lavar secuencialmente las bandas con un tampón 25 mM NH_4HCO_3 y CH_3CN .
- Reducir la muestra con un tratamiento con 10 mM DTT durante 30 minutos a 56°C.
- Alquilar la muestra con yodoacetamida 55 mM a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Digerir las proteínas con 80 ng de tripsina a 37°C durante una noche.
- El residuo de péptidos trípticos se secaron al vacío en el sistema *Speed vac*[®].

2. Análisis por MALDI-TOF-TOF

-Resuspender los péptidos digeridos en 5 µL de una solución 0.1% ácido trifluoroacético y para analizar por espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF (*Proteomics Analyzer*[®] de *Applied Biosystems*[®]).

-Cocrystalizar 0.5 µL de la solución peptídica con 0.8 µL de solución 5 mg/mL de matriz CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico, Waters) en 0,1% de tetrahidrofurano en 50% CH₃CN/H₂O.

3. Parámetros de adquisición y análisis

Rango de peso molecular MS: 600-4000 Da

Método de adquisición MS: Reflector Positivo

Método de adquisición MS/MS : MSMS Positivo

Intensidad láser MS: 3100

Intensidad Láser MS/MS: 4100

Número de iones fragmentados: hasta los 7 más intensos

4. Identificación por LC-MS/MS

Se utilizó un cromatógrafo líquido acoplado a espectrómetro de masas (*Cap-LC-nano-ESI-Q-TOF*[®], *Micromass-Waters*[®]).

-Resuspender los péptidos digeridos con tripsina en 50 µL de ácido fórmico al 1% e inyectar 4 µL para la separación cromatográfica en una columna capilar de fase reversa C₁₈ (diámetro 75 µm, 15cm, *PepMap column*[®], *LC Packings*[®]). Gradiente de elución utilizado: 5-65% B en 30 min (A: 2% CH₃CN/98% H₂O, 0.1% HCOOH; B: 90% CH₃CN, 0.1% HCOH).

-Ionizar los péptidos eluidos con una aguja nano-ES (*PicoTip*[™], *New Objective*[®]). Los voltajes aplicados fueron los siguientes: 2200V en el capilar y 80V en el cono. La energía de colisión en el CID (*Collision-Induced Dissociation*) fue de 20-35 eV y el gas utilizado fue el argón.

3. Métodos de Biología Molecular general y ensayos *in vitro*.

3.1 Métodos de Clonaje.

El clonaje de genes se ha realizado en la mayoría de casos sobre DNA genómico. En la Figura 8 se esquematiza el procedimiento para clonar genes de *A.thaliana* a partir de DNA genómico en plásmidos comerciales. Todas las construcciones que se realizaron para la presente tesis están en la Tabla (26, 27, 28). Los protocolos específicos para cada paso se detallan a continuación del esquema. Se utilizó el método de clonaje por enzimas de restricción.

3.1.2 Extracción de gDNA (ver apartado 2.2.1)

3.1.3 PCR sobre gDNA o DNA plasmídico.

La PCR para amplificar genes para clonaje se realizó con el enzima *AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity*. Según el molde de DNA se utilizaron diferentes condiciones de reacción detalladas según el fabricante.

3.1.4 Gel de agarosa y purificación del producto de PCR.

Para la comprobación de la amplificación DNA se utiliza comúnmente un gel de agarosa 1% preparado extemporáneamente y por electroforesis se separa el producto o productos de PCR por masa molecular y carga. Tras la amplificación de un fragmento con *Taq DNA Polymerase High Fidelity®* puede resolverse realizar una purificación del producto amplificado a través del lavado de la reacción entera mediante el kit de purificación *Agarose gel purification kit®* de Roche®. Otra opción es separar el producto de la PCR en un gel de agarosa 1% cuando sospechamos que puede haber varios productos de PCR en la reacción y sólo nos interesa uno de ellos; en ese caso hay que aislar la banda de interés desde un gel de agarosa y recuperar el producto mediante el kit *Agarose gel purification kit®* de Roche®.

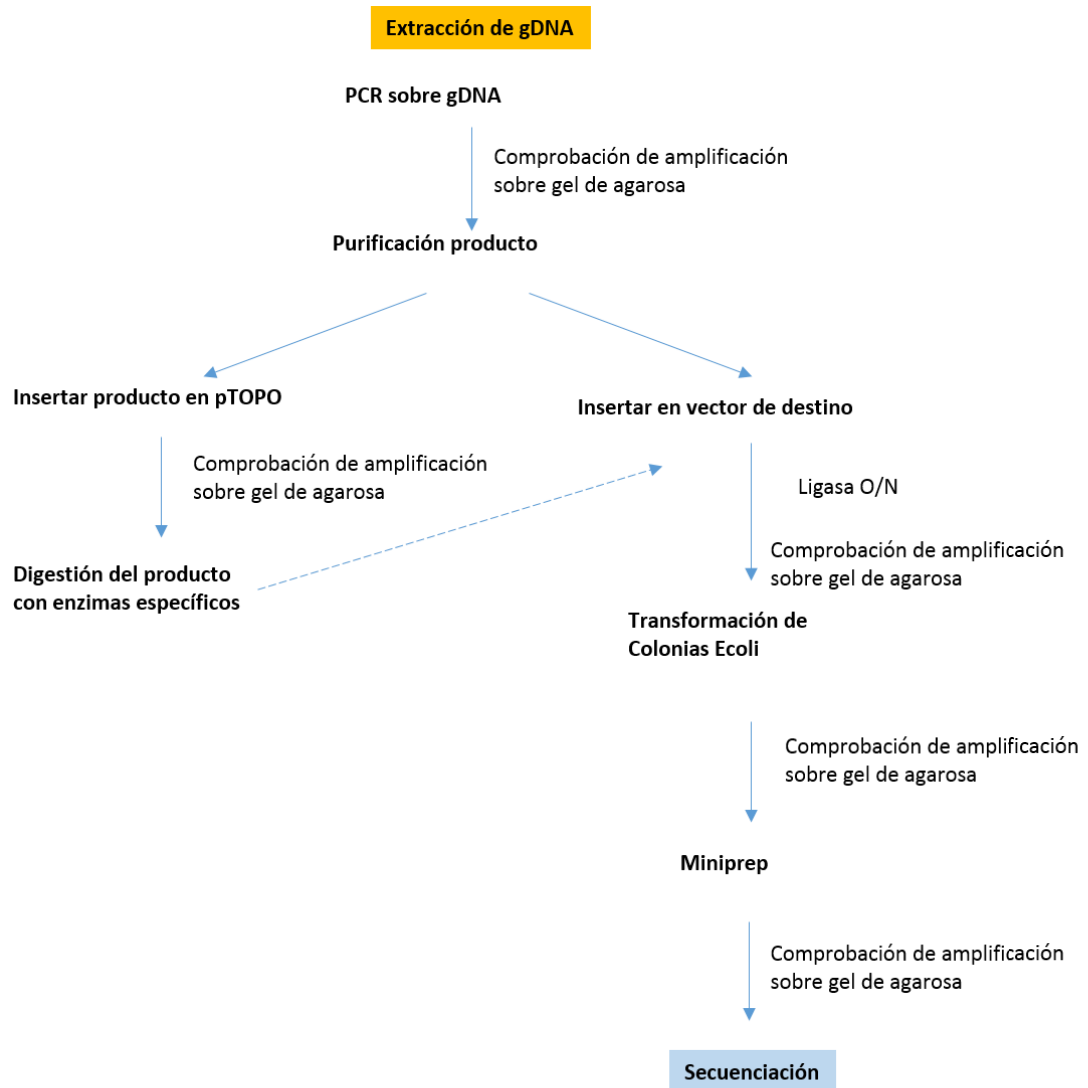


Figura 8. Esquema para proceder al clonaje de genes por enzimas de restricción.

3.1.5 Inserción del fragmento amplificado en pTOPOTA.

Tras la purificación del fragmento amplificado éste puede insertarse directamente en el vector de destino o bien insertarse en un vector intermedio *Invitrogen TOPO TA® Cloning kit*. Este es un sistema independiente de ligasa que se fundamenta en la formación de un enlace fosfodiéster entre cadenas de DNA, por tanto la reacción es prácticamente inmediata y sin necesidad de ligasa. La reacción según el kit del fabricante tiene lugar en 5 minutos en una mezcla de reacción que contiene el

vector linearizado pCRii/pCR2.1, el fragmento de DNA purificado y el tampón de reacción suministrado en el kit.

Si se decide insertar directamente el fragmento en el vector de destino, éste debe ser linearizado previamente en las dianas de restricción de interés mediante los enzimas apropiados y purificar el vector linearizado. La linearización de los enzimas se realiza normalmente con un solo enzima, el tampón adecuado de reacción y normalmente unos 1-4 µg de plásmido en 10 µL totales de reacción. A continuación se purifica el plásmido linearizado con el kit *Agarose gel purification kit*[®] de Roche[®].

La reacción de ligación entre el fragmento de interés y el vector de destino se realiza normalmente en una reacción que se muestra en la Tabla 12. Esta reacción se mantiene a 4°C durante toda la noche. La reacción es utilizada al día siguiente para transformar una suspensión de células competentes DH5α de *E.coli*.

Mezcla de reacción	
Fragmento de DNA	ng calculados*
Plásmido linearizado	40-50 ng
Tampón 10x	1 µL
Ligasa T4	1 µL
H ₂ O estéril	Hasta 10 µL

Tabla 12. Componentes de la mezcla de reacción para la ligación de fragmentos de DNA en vectores.

*Para calcular los ng de fragmento de DNA a incorporar en la reacción se utiliza una relación molar plásmido:inserto 1:2 según la fórmula:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de plásmido} \times \text{tamaño del inserto (pb)} \times \text{relación molar}}{\text{tamaño del plásmido}}$$

3.1.6 Transformación y procedimientos en *E.coli*.

La transformación por *shock* térmico de células de *E.coli* exige un tratamiento previo para que las células bacterianas sean capaces de incorporar el plásmido de interés del medio. Este protocolo consiste en la preparación de células competentes para choque térmico.

Materiales y métodos

1) Preparación de células competentes de *E.coli*.

-El primer día se crecen sobre placa y antibiótico de selección de la cepa para obtener colonias aisladas.

-Al día siguiente se inocula una colonia en 3 mL de medio LB con antibiótico y se incuba en un agitador durante toda la noche a 37°C y 180 rpm.

-Al tercer día se inocula 1 mL del precultivo anterior a 100 mL de medio LB y se incuba en agitación a 37°C y 180 rpm hasta una $DO_{600} = 0.5$.

-Se centrifuga 15 minutos a 5000 rpm a 4°C para recolectar el *pellet*.

-Resuspender las células en 7.5 mL de tampón TfBI (Tabla 13) sobre hielo.

-Incubar durante 5 minutos en hielo.

-Centrifugar 5 minutos a 5000 rpm a 4°C.

-Resuspender el *pellet* en 2 mL de tampón TfBII (Tabla 13) frío y repartirlo en alícuotas de 50 μ L que se congelan en N_2 líquido y se conservan a -80°C.

Tampón TfBI	Csp. 250 mL	Tampón TfBII	Csp. 100 mL
30 mM KAc	636.1 mg	10 mM MOPS pH=7	209.3 mg
50 mM MnCl ₂	2474 mg	75 mM CaCl ₂	15 mL
100 mM RbCl	3023 mg	10 mM RbCl	120.9 mg
10 mM CaCl ₂	5 mL (500mM)	5% glicerol en H ₂ O	5mL
15% glicerol	37.5 mL		
Ajustar pH=5.8 con ácido acético			

Tabla 13: Contenido de los tampones TfBI y TfBII para la resuspensión de *E.coli* y la preparación de células competentes.

2) Transformación de células de *E.coli* por choque térmico.

-Una de las alícuotas de células competentes de *E.coli* se descongela sobre hielo y se le añade 100-200 ng de plásmido para transformar o de una reacción de ligación.

-Dejar reposar 20-30 minutos sobre hielo.

-Aplicar 37°C durante 1 minuto por choque térmico o baño.

-Recuperar las células manteniendo en tubo *Eppendorf*® 5 min sobre hielo.

Materiales y métodos

- Añadir 1 mL de medio LB estéril.
- Incubar las células a 37°C y 180 rpm durante 1 hora.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto y eliminar 200µL del sobrenadante.
- El resto de la solución, resuspenderla y verterla sobre una placa de agar con LB y antibiótico de selección. Incubar la placa una noche a 37°C.

3) Minipreps

- Varias colonias obtenidas en las placas con antibiótico de selección se inoculan en 5 mL de medio LB con antibiótico de selección en un agitador a 37°C y 180 rpm durante una noche.
- Al día siguiente, se extrae el tubo del agitador y se tratan las células con el kit de *Invitrogen PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit* para obtener el plásmido purificado. Una vez obtenido el plásmido purificado se analiza la secuencia del inserto para verificar la ausencia de mutaciones. El método de secuenciación está basado en el uso de didesoxinucleótidos por el método de Sanger (Sanger y Coulson 1975).

3.2 Purificación de proteínas truncadas en *E.coli*.

- Transformar por choque térmico las líneas de *E.coli* BL21 pLYS, BL21 pGROE, pRARE ROSSETA, con las construcciones preparadas para la sobreexpresión de proteína (ver anexo, pET23, pET28).
- Crecer en placas de agar LB con antibióticos de selección ampicilina (para pET23), kanamicina (para pET28) y cloranfenicol durante la noche a 37°C.
- Inocular una colonia con cada construcción en 3-5 mL de cultivo líquidos LB con los antibióticos de selección y crecer toda la noche a 37°C a 200-250 rpm.
- Añadir los 3-5 mL de precultivos crecidos a 100 mL de medio con antibióticos de selección y dejar crecer hasta $OD_{600} \geq 0.5$. Añadir IPTG en una concentración final de 0.4 mM.
- Crecer las células durante una noche en agitación a 28°C a 200-250 rpm.
- Centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm en tubos tipo Beckman de 250 mL.
- Resuspender las células en 5 mL de tampón de lisis A más los complementos adicionales*.

Materiales y métodos

- Sonicar sobre hielo durante 30 segundos a 20-30 watt en tubos Beckman de 50 mL.
 - Centrifugar durante 25 minutos a 15000 rpm. Separar el sobrenadante del *pellet*.
 - Precipitar el DNA con sulfato de protamina 1%, mantener la relación 1:7 con el sobrenadante sobre hielo durante 10 minutos.
 - Centrifugar a 17500 rpm durante 30-40 minutos.
 - Filtrar 23 mL de sobrenadante con microfiltro de 0.22 μm .
- *El Tampón de lisis A (*buffer A*) es una solución Tris HCl 40-300 mM pH 7.5 y NaCl 100-500 mM. Los complementos a añadir son el EDTA 0.5 mM, la lisozima 1 mg/mL y las pastillas proteasa Roche [®] (1 pastilla/10 mL). Adicionalmente pueden añadirse sarcosil 2% o Tritón X-100 0.1%.

Purificación de proteína por cromatografía de afinidad

Todo el proceso se lleva a cabo en cámara de 4°C.

- Preparar 2 mL de resina de afinidad de níquel (Ni) (donde se unirán los residuos histidina (His) de la proteína recombinante sobrepresada) y en sobrenadante en tubos tipo *Falcon* [®] e incubar en una plataforma rotatoria durante 1-2 h a 4°C.
- Introducir la resina incubada en una columna de separación (*BioRad*[®]).
- Añadir 5 volúmenes de *buffer A** y recoger en diferentes fracciones.
- Añadir 5 volúmenes de *buffer A* e imidazol 10 mM y recoger en diferentes fracciones.
- Añadir 5 volúmenes de *buffer A* e imidazol 125-150 mM y recoger en diferentes fracciones.
- Someter la última(s) fracción(es) a membrana de diálisis en un vaso de precipitados en agitación magnética con H₂O destilada para concentrar la proteína.
- Reservar la proteína purificada a -20°C en glicerol 50% y sin glicerol a -80°C.

3.3 Ensayo de actividad enzimática DXR

El protocolo para la medida de la actividad DXR fue llevado a cabo mediante el método descrito en (Kuzuyama *et al.* 2000). Este ensayo se basa en la disminución de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH en NAD⁺ en la reacción de transformación de DXP en MEP.

Materiales y métodos

-Se prepara una solución de reacción que contiene distintas concentraciones de sustrato y cofactores.

-El experimento se lleva a cabo en placas de Elisa; se añaden 190 μ L de la solución de reacción y una cantidad equivalente a 5 μ g de enzima DXR purificada cuantificada por el método de Bradford.

-La reacción de oxidación del NADPH es monitorizada con el espectrofotómetro *Spectramax*® a 340 nm a 37°C.

Se considera que una unidad de actividad DXR equivale a la cantidad de enzima que causa la oxidación de 1 mmol de NADPH por minuto a 37°C.

3.4 Ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H).

Esta técnica se utilizó para el estudio de las interacciones *in vitro* entre DXR y algunas isoformas plásticas de Cpn60 en cepas modificadas genéticamente de *Saccharomyces cerevisiae*. Se utilizó el método de cotransformación (Fields y Song 1989) en la cepa de levadura AH 109 y el método de *mating* que se describe a continuación.

1) Preparación células de levadura competentes para transformación por choque térmico con plásmidos para Y2H (cepas pJ694 alfa y YM4271a para mating)

1. Preparar precultivo 0 en YPD+Adenina con 1mL de inóculo. Crecer O/N a 28-30°C en shaker 250-280 rpm.
2. Añadir un 1% del precultivo 0 al cultivo 1 (YPD+Adenina) a 28-30°C en shaker 250-280 rpm. Controlar el crecimiento a partir de las 3h hasta $OD_{600}=0.7$ (según la cepa y el volumen de cultivo puede tardar hasta 7h).
3. Lavado 1: Centrifugar a 6000rpm durante 10min y lavar con LiAc 100mM (40% del volumen inicial)
4. Lavado 2: Centrifugar a 6000rpm durante 10min y lavar con LiAc 100mM (20% del volumen inicial)
5. Resuspender en LiAc 100mM con 15% glicerol o 15% DMSO (30% del volumen inicial)
6. Alicuotar 100 μ L en tubos Eppendorf de 1.5mL. Congelar lentamente en -80°C (no congelar sobre N_2 líquido)

Precultivo 0 YPD+Adenina	Para 30 mL*	Para 50mL**
Cultivo 1	100mL + 1mL*	250mL+2.5mL**
Lavado1 LiAc	40mL	100mL
Lavado2 LiAc	20mL	50mL
Resuspensión final LiAc+glicerol	3mL	7.5mL
Tubos finales	50 aprox	100 aprox

Tabla 14. Composición de los precultivos para la preparación de células competentes de levadura.

2) Transformación levaduras para Y2H

Preparar la siguiente mezcla: 240uL 50% PEG, 36uL 10x LiAc (1M), 10uL ssDNA (salmon spermidin 10mg/mL)#, 69 uL agua estéril (Volumen total 360uL para 1 transformación).

1. Descongelar las células competentes en hielo. Centrifugar el tubo 1min a 14000 rpm. Retirar el sobrenadante con cuidado.
2. Añadir los 360uL de la mix y un volumen equivalente a 500ng/uL de plásmido de DNA. Incubar a 28-30°C en agitación durante 30min.
3. Añadir 36uL de DMSO. Incubar en baño de 42°C durante 15min.
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 1min. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en 200uL de agua estéril. Plaquear 50uL y 100uL en dos placas del medio adecuado de selección (LT- para comprobación de *mating*, AHLT- para comprobar la interacción).
5. Incubar las placas a 30°C durante 2-5 días.

#Desnaturalizar el esperma de salmón congelado a -20°C durante 3min a 95°C.

4. Métodos de microscopía e imagen.

4.1 Microscopía

Microscopía óptica

Para los estudios preliminares de localización subcelular, experimentos de interacción de proteínas por BiFC y comprobación de líneas transgénicas con proteínas se utilizó la lupa binocular de fluorescencia *Leica DC250*.

La toma y posterior análisis de imágenes de plastos se llevó a cabo mediante el equipo Aixophot DP70.

Microscopía láser confocal

Para la detección de las proteínas de fusión a *Green Fluorescent Protein* (GFP), *Yellow Fluorescent Protein* (YFP), *Discosoma sp. Red* (DsRed) y la clorofila en los experimentos de localización subcelular y de interacción de proteínas por BiFC se utilizó el microscopio láser confocal *Leica Scanning Confocal SP5 II* con objetivo 63x de inmersión en agua NA 1.2. Para la detección de GFP se utilizó un filtro BP515-525 tras la excitación con luz azul a 488 nm. YFP se excitó con láser de Argón y la luz emitida se recogió a 529 nm. La proteína DsRed se excitó con luz naranja mediante láser HeNe y la luz emitida se recogió a 559 nm. La autofluorescencia de la clorofila se detectó con un filtro LP590 tras la excitación con luz verde a 568 nm.

Microscopía Electrónica

Para el estudio de la localización subplastídica de DXR-GFP se planificaron experimentos de Inmunolocalización por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, *Transmission Electronic Microscopy*).

4.2 Ensayos histológicos

La puesta a punto de la concentración de anticuerpo a utilizar es un factor decisivo para el éxito en la técnica de Inmunolocalización por TEM (i-TEM). La concentración necesaria de anticuerpo en las diferentes técnicas de inmunolocalización es inversamente proporcional a la escala de detección de la proteína de interés. Por ejemplo, el ensayo de *western blot* (macroscópico) requiere, sucesivamente, una

concentración menor de anticuerpo que la detección por microscopía óptica, la microscopía confocal o la microscopía electrónica.

Para esta tesis se realizaron experimentos previos de *western blot* y e inmunolocalización por microscopía óptica (i-MO) para finalmente llevar a cabo los experimentos de i-TEM.

- 1) *Western blot*.
- 2) Inmunolocalización por microscopía óptica (i-MO).

4.2.1 Protocolo de Inmunolocalización por microscopía óptica.

1) Fijación e Inclusión de tejido vegetal en parafina

La finalidad de este proceso es deshidratar el tejido desde un medio acuoso a otro totalmente lipofílico (parafina):

H₂O → Etanol (EtOH) → tert-butanol (t-ButOH) → Parafina

1) Fijación en EtOH (día 0)

Plántulas de las líneas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* se recogen a día 10 y se procesan como sigue. Se introducen 10-15 individuos de cada línea en tubos *Falcon*® de 15mL y se alternan las soluciones (Tabla 15).

H ₂ O	Formaldehído*	Ácido acético	EtOH	Tiempo de incubación
35	3.7	5	50	O/N or 8h 4°C
50			50	10min x 3**

Tabla 15. Protocolo de fijación con EtOH y formaldehído.

*10% formalina.

**A partir de aquí las plántulas se pueden almacenar a 4°C hasta su inclusión en t-ButOH.

2) Fijación en t-ButOH e inclusión en parafina (Tabla 16).

Día	DEPC H ₂ O % *	EtOH 100%	t-ButOH	% R-OH	Parafina	Tiempo de incubación
1	50	40	10	50	-	1h
	30	50	20	70	-	1h
	15	50	35	85	-	1h
	-	45	55	100	Añadir eritrosina**	1h
	-	25	75	100***	-	1h
	-	-	100	100	-	O/N
2	-	-	-	-	-	
	-	-	100	-	-	1h
	-	-	50	-	50	5h
	-	-	50	-	50	O/N
3	-	-	-	-		
	-	-	-	-	100	
	-	-	-	-	100	O/N
4	-	-	-	-		
	-	-	-	-	100	
	-	-	-	-	100	O/N

Tabla 16. Protocolo de inclusión en parafina.

*Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (0.1% v/v) dos horas antes de su utilización y posteriormente autoclavada. DEPC es un agente inhibidor de enzimas RNasa.

**200µL de eritrosina 1% en 20 mL de solución acuosa

***Fundir t-ButOH a 30°C, Parafina a 60°C

2) Seccionamiento de las inclusiones y tratamiento de los cortes para i-MO

1) Seccionamiento y eliminación de parafina

-Seccionar las inclusiones de parafina con un micrótopo específico para cortes de parafina a 20 µm.

-Colocar las secciones de parafina en portas de vidrio precalentadas sobre una gota de agua.

-Dejar O/N la sección de parafina sobre el agua hasta que se seque completamente o sobre una estufa a 37°C para que se evapore el agua.

Materiales y métodos

-Eliminar la parafina de las secciones con los siguientes disolventes (trabajar debajo de campana extractora de gases ya que el xileno es neurotóxico) (Tabla 17):

Disolvente	Tiempo de exposición
Xileno	10min
Xileno	10min
EtOH 100%	5min
EtOH 100%	5min
EtOH 96%	5min
EtOH 70%	5min
EtOH 50%	5min
ddH ₂ O	5min
ddH ₂ O	5min

Tabla 17. Disolventes para la eliminación de la parafina.

2) Ensayo de inmunolocalización

-Colocar los portas en cajas especiales de cristal para inmunocitoquímica (IMQ).

-Tratar los portas dentro de las cajas especiales con las siguientes soluciones (Tabla 18):

Solución	Volumen	Tiempo de exposición
TTBS*	80-200mL	Solución de espera
TTBS-Glicina (0,15M)	80-200mL	30min
TTBS	80-200mL	5min
TTBS	80-200mL	5min
TTBS-leche (5% p/v)	80-200mL	30min-1h

Tabla 18. Soluciones para lavado y bloqueo.

*TTBS: 0.05% *Tween-20* en TBS (0.01M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.5).

- Colocar los portas en una cámara húmeda (puede utilizarse una pequeña campana de vacío humidificada), añadir 100 µL de una dilución de anticuerpo primario en TTBS-leche sobre la preparación y cubrir con un cubre de cristal. Mantener 2h 30min a temperatura ambiente o a 4°C O/N.

-Eliminar los cubres por gravedad.

-Colocar los portas en las cajas especiales para IMQ y comenzar una serie de 3 lavados con 80-200 mL de TTBS durante 10 min cada lavado.

Materiales y métodos

- Colocar los portas en la cámara húmeda y añadir 100 μ L de una dilución de anticuerpo secundario (1/500) en TTBE-leche en el centro del porta y cubrirlo con un cubre de cristal.
- Eliminar los cubres por gravedad.
- Colocar nuevamente los portas en las cajas especiales para IMQ y repetir una serie de 3 lavados con 80-200 mL de TTBS durante 10 min cada lavado.
- Enjuagar los portas con agua por unos segundos
- Revelar la reacción IMQ con BIPC/NBT (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato toluidina / *Nitro blue* tetrazolio) durante 10-15 min y limpiar con agua.
- Colocar los portas en las cajas IMQ y limpiar rápidamente varias veces el conjunto de portas con 80-200 mL de agua.
- Dejar secar los portas.
- Guardar los portas en estuches apropiados hasta su observación al microscopio óptico.

3) Microscopía óptica

Para la observación de las inmunolocalizaciones sobre parafina se utilizó un microscopio óptico Leica acoplado a una cámara fotográfica.

4.2.3 Protocolo de Inmunolocalización por microscopía electrónica.

1) Fijación e Inclusión de tejido vegetal en resina

Soluciones a preparar previo inicio de este protocolo:

- Preparación de la resina: 200mL de resina *LRWhite Sigma*[®] + 4g de catalizador (peróxido de benzoílo, *Sigma*[®]). Mantener en agitación magnética durante 24h. Conservar a 4°C (hasta un año).
- Solución 10x tampón fosfato sódico (NaP) pH7.5 (8mL NaH_2PO_4 1M + 42mL Na_2HPO_4 1M + 50mL H_2O). Conservar a 4°C.
- Fijadores: Glutaraldehído (G) 50% grado TEM (viales sellados, *Electron Microscopy Sciences*[®]) y formaldehído (F) 16% grado TEM (viales sellados, *Electron Microscopy Sciences*[®]). Conservar glutaraldehído a 4°C y formaldehído a temperatura ambiente (RT).

Materiales y métodos

Preparación de soluciones de fijación:

G/F (0:4) 2.5mL P 16% + 1mL 0.5M NaP + 6.5mL H₂O

G/F (0.1:2) 20μL G 50% + 1.25mL P 16% + 1mL 0.5M NaP + 7.73mL H₂O

G/P (1.25:2) 250μL G 50% + 1.25mL P 16% + 1mL 0.5M NaP + 7.5mL H₂O

Para este protocolo se utilizaron plántulas de *Arabidopsis* de 5 días, ya que se iban a analizar los cotiledones. Las muestras se recogieron con pinzas apropiadas y se transfieren a una placa de 24 pocillos, colocándose varios individuos de cada línea en uno de los pocillos con 2mL de solución de fijación.

-Aplicar 2 minutos de vacío por 5 veces a la placa de 24 pocillos en una cámara de vacío.

-Mantener las muestras en la solución de fijación durante 2h a RT. A partir de aquí, se procede a deshidratar las muestras:

H₂O (NaP) → Etanol (EtOH) → Resina LRW

-Realizar una serie de 3 lavados de 10min cada uno con la solución NaP 0,05M pH7.5.

Eliminar la solución con pipeta Pasteur.

- Proceder gradualmente a deshidratar las muestras con la siguiente serie de soluciones de EtOH (Tabla 19).

Solución	Volumen	Tiempo de exposición
30% EtOH	2mL	10min
50% EtOH	2mL	10min
70% EtOH	2mL	10min
80% EtOH	2mL	10min
95% EtOH	2mL	10min
100% EtOH	2mL	10min

Tabla 19. Protocolo para la deshidratación de muestras.

-La inclusión en resina (LRW) de las muestras se lleva también a cabo dentro las placas de 24 pocillos añadiendo gradualmente soluciones de LRW/EtOH (Tabla T20).

Solución LRW/100% EtOH	Volumen	Tiempo de exposición
1:2 (v/v)	2mL	1h RT
1:1 (v/v)	2mL	1h RT
3:1 (v/v)	2mL	1h RT
LRW 100%	2mL	1h RT
LRW 100%	2mL	o/n 4h
LRW 100%	2mL	o/n 4h
LRW 100%	2mL	o/n 4h

Tabla 20. Protocolo para la imbibición de resina LRW.

-Incluir las muestras en cápsulas de gelatina (volumen de las cápsulas = 0.1mL-0.3mL). Este procedimiento se lleva a cabo debajo de campana extractora de gases. Con mucho cuidado se introduce una sola plántula en cada cápsula y se añade LRW. Se pueden utilizar soportes tipo placas de Elisa para mantener las cápsulas fijas. Cerrar las cápsulas.

-Mantener las cápsulas de resina cerradas en un horno a 50°C durante 24h para polimerizar la resina LRW.

2) Seccionamiento y manipulación de muestras para cortes de 100nm sobre anillas

El seccionamiento de la resina embebida en las cápsulas para inclusión de muestras se realiza con un micrótopo rotativo de avance frontal para cortes de 100nm. Las muestras se recogen sobre agua en recipientes especiales para muestras de microscopía electrónica sobre anillas de plástico.

3) Ensayo de inmunolocalización sobre anillas

En este apartado se describen los procedimientos de bloqueo, exposición al anticuerpo primario y secundario (*immunogold*) y los correspondientes lavados sobre las anillas recogedoras de las secciones.

Soluciones a preparar

-Preparar las siguiente soluciones nuevas para cada experimento, filtrarlas con filtro de 0.2 µm.

TBS: 0.01M Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 7.5

TBS-Gly: 0.15M Glicina en TBS

Materiales y métodos

TBS-leche: 5% leche (p/v) en TBS

-Preparar las diluciones de anticuerpo primario DXR necesarias (1/10, 1/20, 1/50, 1/100...) en TBS-leche (Ab-TBS-leche) y *Protein-A Gold-10nm EM-grade (Electron Microscopy Sciences ®)* 1/25 en TBS-leche.

El procedimiento que figura en la Tabla 21 se lleva a cabo sobre una placa de silicona de 96 pocillos que contienen 50 µL de cada solución que se indica en la Tabla 21. Las arandelas de plástico de 50 mm de diámetro que contienen las muestras de 100 nm previamente seccionadas son transferidas sucesivamente mediante pinzas en los diferentes pocillos según los tiempos que indica la Tabla 21.

Solución	Volumen	Tiempo de exposición
TBS-Gly	50 µL	30min
TBS	50 µL	5x2min
TBS-leche	50 µL	30min
Ab-TBS-leche	50 µL	1-4h RT + O/N 4°C
Atemperar la solución a RT durante 15 min		
TBS	50 µL	7x 2min
Proteína A 1/25 in TBS-leche	50 µL	90 min-2h
TBS	50 µL	5 x 2min
H ₂ O _d	50 µL	3 x 2min
Post-fijación * 2.5% glutaraldehído ¹	50 µL	10min
H ₂ O _d	50 µL	3 x 2min
Transferir las secciones sobre anillas de 200-300 cuadrículas (<i>grid</i>) de níquel, o de 100 cuadrículas con film de carbono para resinas más blandas (LRW)		
Tinción potenciadora de plata* ²	50 µL	5min
Post-tinción 2% uranil acetato *	50 µL	2min
H ₂ O _d	50 µL	2 lavados rápidos

Tabla 21. Protocolo para la inmunolocalización de secciones para TEM.

*Opcional.

¹Fijación del complejo Anticuerpo primario (α-DXR) con la Proteína A-Au.

²*IntenSE® Silver Enhancement Reagents (Amersham®)*. Cubre con plata las partículas de Au unidas al anticuerpo primario.

³ Tinción negativa para reforzar relieves y estructuras subcelulares.

Alternativamente puede realizarse el protocolo de inmunolocalización sobre los *grid* en la placa de 96 pocillos de silicona si previamente se ha transferido las secciones de 100 nm sobre el *grid*; al igual que las arandelas, los *grid* se transfieren cuidadosamente de pocillo en pocillo mediante pinzas (Tabla 22).

4) Observación por el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

El microscopio utilizado fue un JEOL 120Kv utilizado a 80Kv y las imágenes fueron tomadas con una cámara digital Gatan.

Solución	Volumen	Tiempo de exposición
TTBS-Gly	50 µL	30min
TTBS	50 µL	4x5min
1% BSA-TTBS	50 µL	5 min
1% BSA-TTBS	50 µL	1h
Ab-BSA-leche	50 µL	1h RT
Ab-BSA-leche	50 µL	O/N
1% BSA-TTBS	50 µL	6x5min o 2x15min
Proteína A 1/25 in 1% BSA-TTBS	50 µL	90 min-2h
1% BSA-TTBS	50 µL	3x10min
TTBS	50 µL	3x10min
H ₂ O _d	50 µL	3 x 2min
Tinción potenciadora de plata*	50 µL	5min

Tabla 22. Protocolo para la inmunolocalización de secciones para TEM sobre *grids*.

*Opcional.

4.3 Fotografía e Imagen

Para el análisis de fenotipos de las líneas mutantes se utilizó la cámara Nikon D7000 acoplada a los objetivos AF-S NIKKOR 18-70 mm 1:3.5-4.5G y AF-S MICRO NIKKOR 105 mm 1:2.8G.

Alternativamente se utilizó el equipo *Scanner HP*[®] para el registro de experimentos con tratamientos a líneas mutantes con inhibidores de la ruta del MEP.

El equipo LAS 4000® Fujifilm® fue utilizado para la captura de imágenes de membranas de *Western Blot* tratadas con *ECL Plus*® (Amersham®) y se utilizó el filtro 510DF10 incorporado en este equipo para *screening* rápido de líneas transgénicas con proteínas de fusión fluorescente.

5. Software y bases de datos.

A lo largo de esta memoria se ha hecho referencia a algunas herramientas telemáticas utilizadas. Los principales programas informáticos más relevantes utilizados se resumen en la Tabla 23.

Software	Proveedor	Aplicación
<i>Microsoft Office Professional Edition 2013</i> ®	Microsoft®	Edición de textos, hojas de cálculo, procesamiento de imagen, etc.
<i>GraphPAD</i> ®	<i>Prism</i> ®	Procesamiento de datos y análisis estadístico.
<i>Image J</i>	Libre	Análisis de imagen
<i>XnView</i>	Libre	Procesamiento de imagen
<i>Multigauge</i> ®	<i>Fujifilm</i> ®	Análisis de imagen (<i>western blotting</i>)
<i>Fluoroview</i> ®	<i>Olympus</i> ®	Análisis de imagen (<i>microscopía confocal</i>)
<i>Vector NTI</i> ®	<i>Roche</i> ®	Alineamientos y análisis de secuencias de DNA
<i>EndNote v6</i> ®	<i>Thompson Reuters</i> ®	Gestión de bibliografía
Software Light cycler	Roche	Análisis CTs Q-RT-PCR
Directorio principal base de datos		Características
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/		US National Library of Medicine National Institutes of Health
http://www.arabidopsis.org/		The Arabidopsis information Resource
http://bar.utoronto.ca/welcome.htm		The Bio-Analytic Resource for Plant Biology
http://www.expasy.org/		SIB Bioinformatics Resource Portal
http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/		Herramienta para el alineamiento de secuencias de The European Bioinformatics Institute

Tabla 23. Programas y bases de datos utilizadas.

Gen	AGI	Alelo	Línea mutante	Primer RP (F)	Primer LP (R)
Inserción T-DNA LBb1	-	-	-	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	-
Cpn60 α 1	At5g18820	cpn60 α 2-1	SALK_144574	CTTTTCATCTGCAACACCCTG	TCAAAACAAATCCAATCTTCGG
		cpn60 α 2-2	SALK_014823	AAATGAGGGGACATATAGCCC	TCCTGCTCTTGCCTCTTGTAG
		cpn60 α 2-3	SALK_061417	TCGTTCAATTTAATCGCAACC	GGACGGGGACTATAGCTTCTG
Cpn6083	At5g56500	cpn6083-1	SALK_099972	TTTATTGTCCCACGAAGCTTG	GAGCAAAATACGGTTCCCCCTAG
		cpn6083-2	SALK_090531	ACCTGAATTACAGCAACACCCG	GCTCTTGTGGCTGAGTTGAAG
Cpn6084	At1g26230	cpn6084-1	SALK_064887	TCATGTTGCAGCAGTTAGTGC	AGGGCATCTTCAACCTTTAGC
		cpn6084-2	SALK_136518	TTGGTATTTCCAAAGCAAACCAG	CTGTCACCAAGAAGCTTCAGG
Cpn10-1	At3g60210	cpn10-1-1	SALK_093761	AGAAAGCTAAGGAATCACCCGG	ACATGTCCAATTTCCAAAAGCTG
Cpn10-2	At2g44650	cpn10-2-1	SALK_143422	ACCACACAAGGACAGGACAAC	GCATTACTGCTTCGGTGACTC
Cpn20	At5g20720	cpn20-1	SALK_083054	ACAGAAAGCAGCTTTGACAACC	CTATCTAACTCTCTCTACTGTC

Tabla 24. Primers utilizados para el genotipado de líneas mutantes SALK.

Gen	AGI	Primer q-RT-PCR F	Primer q-RT-PCR R
<i>DXR</i>	At5g62790	AGTAGCGGATGCGTTGAAGC	GCGGATGAATGACAAATCTCTATATCG
<i>Cpn60α1</i>	At2g28000	ATCCCGCCATTAAGGAGAC	GCTGAACATAATCTTTTCC
<i>Cpn60α2</i>	At1g24510	CTAATGGAAGATTTCATACG	GGTTGCTATGGCCATTGCAG
<i>Cpn60β1</i>	At1g55490	AACCCAATGGACAACTCAGG	GGCGATTCGAGATATTTCCG
<i>Cpn60β2</i>	At3g13470	GACCGACCAGGTTTGCTCGT	CACATTAATCTCTGGTTCA
<i>Cpn60β3</i>	At5g56500	TGGTTCTGTCTCCGATT	TTTGTGCATATCCTCGTTCCG
<i>Cpn60β4</i>	At1g26230	AGCTACCTCCTCCATGTTCCC	CGTGAAAAGTGGCTTCGAGT
<i>TOC1</i>	At5g61380	GTGGTCTTGGTGCTGATGGAAC	GACCCAGCAAGATGATCCAATG
<i>UBC</i>	At1g04810	CTGCTTGGACGCTTCAGTCTG	CGCAGTTAAGAGGACTGTCCG
<i>APT1</i>	At1g27450	GTTGCAGGTGTTGAAGCTAGAGGT	TGGCACCAATAGCCCAACGCAATAG

Tabla 25. *Primers* utilizados para q-RT-PCR.

Vector	Gen	AGI	Diana de Inserción 5'	Diana de Inserción 3'	Primer F	Primer R
pET23a(+)	<i>DXR</i>	At5g62790	NdeI	Sall	GCCATATGTCAGTAAAAGTGCAGCAG	ATGTCGACTGCATGAACTGGC
pET28a-c			NdeI	Sall	ATCATATGCCTCCTCCAGCATGGC	ATGTCGACTGCATGAACTGGC
			NdeI	Sall	GCCATATGTCAGTAAAAGTGCAGCAG	TTGTCGACTGCATGAACTGGC
			NdeI	Sall	ATCATATGCCTCCTCCAGCATGGC	TTGTCGACTGCATGAACTGGC

Tabla 26. Construcciones y *primers* para la sobreexpresión de proteína DXR en *E. coli*.

Vector	Gen	AGI	Diana de Inserción		Primer F	Primer R
			5'	3'		
pSCA- pSPYCE	<i>DXR</i>	At5g62790	BglII	SpeI	GCAAGATCTATGACATTAACACTCACTATC	AAAACTAGTTGCATGAACTGGCCTAGC
	<i>Cpn60α1</i>	At2g28000*	BglII	SpeI	AAAAATCTATGGCGTCTGCAAAACGCTC*	AAAACTAGTCACCATGAGACCCCTCAGGAG*
pSCA- pSPYNE	<i>Cpn60α2</i>	At1g24510	BglII	SpeI	AAAAATCTATGTTCCGCCGTATCACCCGTC	AAAACTAGTTGATGTGGGTATGCCAGG
	<i>Cpn60β1</i>	At1g55490	BglII	SpeI	AAAAGATCCATGGCGTCAAACTTTCACTGC	GGAACCTAGTGTATCCATATCCTGAGTTGTC
	<i>Cpn60β2</i>	At3g13470	BglII	SpeI	AAAAATCTATGGCATCGACATTCACCTGC	GGAACCTAGTGTATCCATAAACCTGAGTTGTC
	<i>Cpn60β3</i>	At5g56500	SpeI	Sall	AAAACTAGTGAAGCCGTAACCTGAATTGTC	AAAGTCGACGAAGCCGTAACCTGAAATTGTC
	<i>Cpn60β4</i>	At1g26230	BglII	SpeI	AAAAGATCCATGGCTTTCTCACAAGCTGC	AAAACTAGTCTTCCGTGGAAAGTGGCTTC

Tabla 27. Construcciones y primers para los experimentos de Complementación Fluorescente Bimolecular (BiFC). *Estos mismos primers y dianas de inserción se utilizaron para clonar *Cpn60α1* en el vector pCAMBIA 1302 para la obtención de la construcción 35S:Cpn60α1-GFP. La construcción pB7FWG2 AtDXRnSGFP fue clonada por el sistema GATEWAY por el Dr.M:Phillips (no publicado).

Vector	Gen	AGI	Diana de Inserción 5'	Diana de Inserción 3'	Primer F	Primer R
pGBKT7	<i>DXR</i>	At5g62790	NdeI	EcoRI	GCCATATGTCAGTGAAGTGCAGCAG	TTGAATTCTCATGCATGAACTGGC
pGADT7	<i>DXR</i>	At5g62790	HindIII	Sall	CAAGCTTATGTCAGTGAAGTGCAGCAG	ATGTCGACTCTGCATGAACTGGC
pGADT7	<i>Cpn60α1</i>	At2g28000	EcoRI	XhoI	AAGAATTCAATGGCGTCTGCAAAACG	AACTCGAGATTCACCATGAGACCCTCAGGAG
	<i>Cpn60α2</i>	At1g24510	NcoI	XhoI	AACCATGGATGTTGCCCGTATCACC	AACTCGAGTTATGATGTGGGTATGCC
	<i>Cpn60β1</i>	At1g55490	NcoI	XhoI	AACCATGGATGGCGTCAACTTTCACCTGC	AACTCGAGTTAGTATCCATATCCTGAG
	<i>Cpn60β2</i>	At3g13470	NcoI	XhoI	AACCATGGATGGCATCGACATTCACCTGC	AACTCGAGTTAGTATCCATAACCTGAG
	<i>Cpn60β3</i>	At5g56500	NcoI	XhoI	AACCATGGATGGCATCAACCTTTAGC	AACTCGAGTTAGAAAGCCGTAACCTGAAG
	<i>Cpn60β4</i>	At1g26230	NcoI	BamHI	AACCATGGATGGCTTCTCACAAG	AAGGATCCCTACTCCGTGGAAAGTGGCTTC

Tabla 28. Construcciones y primers para experimentos de doble híbrido en levadura.

RESULTADOS

Resultados

1.1 Identificación de mutantes del reloj circadiano de *A. thaliana* que resisten a un bloqueo de la vía MEP.

Para identificar mecanismos reguladores de la vía del MEP relacionados con el reloj circadiano se utilizó la estrategia de búsqueda de mutantes resistentes a inhibidores de la vía del MEP (ver apartado 2.2.1 y *Artículo 2*).

Fondo genético	Mutante	Fenotipo	Referencia
Col-0	<i>prr7-3/prr9-1</i>	Mutante <i>knock-out</i> de periodo largo.	Farre EM et al., 2005
	<i>gi-201</i>	Mutante <i>knock-down</i> , ritmicidad de baja amplitud, con diferente periodo dependiendo de la calidad de luz	Kim et al., 2007
	<i>elf3-9</i>	Mutante <i>knock-down</i> , arritmico	McWatters et al., 2000
	<i>ztl-4</i>	Mutante <i>knock-out</i> de periodo largo y ritmos de baja amplitud	Salome and McClung, 2005 Kiba et al., 2007
C24	<i>toc1-1</i>	Mutante <i>knock-down</i> de periodo corto y baja amplitud	Millar et al., 1995
WS	<i>cca1-11/lhy-21</i>	Mutante <i>knock-out</i> de periodo corto y baja amplitud	Hall et al., 2003

Fondo genético	Líneas	Fenotipo	Referencia
Col-0	<i>35S:CCA1</i>	Arritmicas	Mas et al 2003
	<i>35S:TOC-MYC</i>	Arritmicas	
C24	<i>35S:TOC-YFP</i>	Arritmicas	Mas et al 2005

Tabla 29. Líneas mutantes y sobreexpresoras de *A.thaliana* de componentes del reloj circadiano (A). Líneas mutantes del reloj circadiano utilizadas en este estudio. (B) Líneas sobreexpresoras del reloj circadiano utilizadas en este estudio.

Resultados

Se escogieron mutantes de componentes centrales (*core*) y componentes efectores (*outputs*) del reloj circadiano (Tabla 29) y se estudió su posible resistencia a CLM (inhibidor de DXS) y a FSM (inhibidor de DXR). La resistencia a estos inhibidores puede estimarse midiendo la cantidad de clorofilas y carotenoides en plantas silvestres y en mutantes crecidos en presencia de los mismos (Fraser *et al.* 2000) o bien por recuento del número de plántulas que desarrollan hojas verdaderas o *Seedling Establishment (%SE)* (Rodríguez-Concepcion *et al.* 2004) (ver apartado 2.2.1 y Artículo 2). La resistencia a CLM se cuantificó por el primer método ya que parece ser más robusto para este inhibidor. Como se observa en la Figura 9, en presencia de CLM ningún mutante presentó diferencias significativas en la pérdida de pigmentos en comparación con su parental silvestre, por lo que no parece que un funcionamiento alterado del reloj circadiano ejerza un efecto específico sobre la actividad DXS *in vivo*. A continuación se estimó la resistencia a FSM (Figura 10) utilizando el método de %SE, que funciona mejor para este inhibidor. En este caso, sí se encontraron diferencias significativas en cuanto a resistencia para los mutantes *toc1-1*, *cca1-11/lhy-21* y *elf3-9*, que eran más resistentes a FSM con respecto a sus parentales silvestres (Figura 10). Asimismo las líneas de sobreexpresión de TOC1 y CCA1 también presentaron una elevada resistencia con respecto a los parentales no transformados (Figura 11). Estos resultados sugieren que la alteración del reloj circadiano genera una mayor actividad DXR (pero no DXS) lo que acaba resultando en una mayor resistencia a FSM (pero no a CLM).

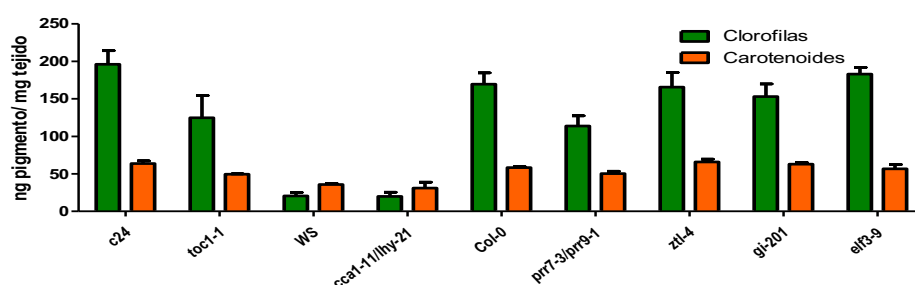


Figura 9. Resistencia a CLM de mutantes del reloj circadiano. Cuantificación de la resistencia a CLM en mutantes de componentes del reloj circadiano junto con su parental silvestre. Las plántulas se trataron con 4 μ M de CLM y se recogieron al día 14. La resistencia al inhibidor se estimó cuantificando los niveles de pigmentos en medio con CLM y se representa normalizada a los niveles en medio sin inhibidor y relativo a los valores de los correspondientes parentales silvestres. Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos

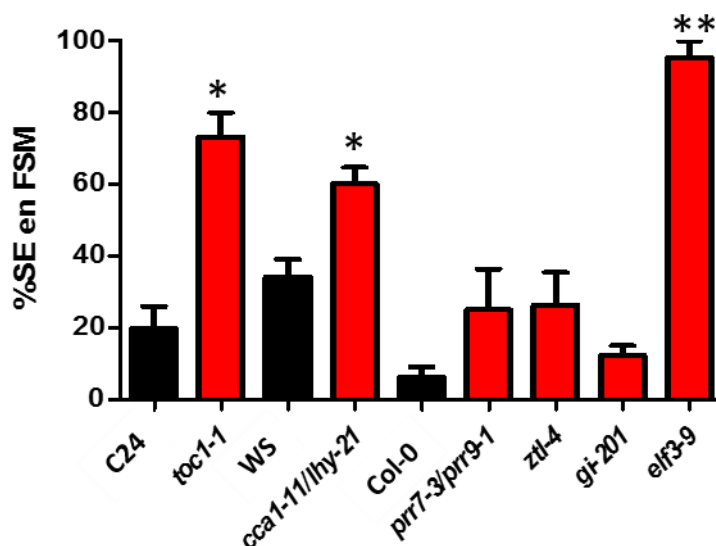


Figura 10. Resistencia a FSM de mutantes del reloj circadiano. Cuantificación de la resistencia a FSM por *Seedling Establishment* (%SE) de mutantes de componentes del reloj circadiano (en rojo) junto con su parental silvestre (en negro). Las líneas y mutantes en fondo C24 y Col-0 se han tratado con 40 μ M de FSM mientras que para el mutante *cca1-11/lhy-21* y su parental silvestre WS se utilizó 60 μ M. Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos. Test *t-student* *p<0.05, **p<0.01.

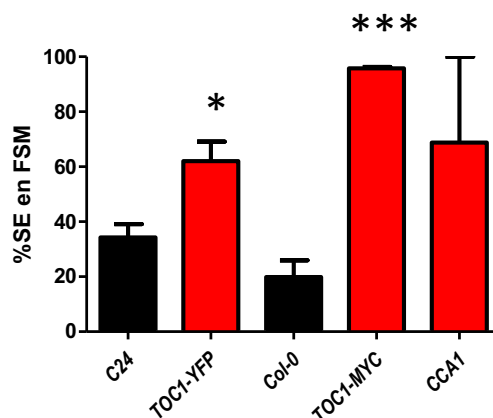


Figura 11. Resistencia a FSM de líneas de sobreexpresión de componentes del reloj circadiano. Cuantificación de la resistencia a FSM por *Seedling Establishment* (%SE) en líneas de sobreexpresión de componentes centrales del reloj circadiano (en rojo) junto con su parental silvestre (en negro) tratadas con 40 μ M. Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos Test *t-student* *p<0.05, ***p<0.005.

1.2 La disrupción del reloj circadiano conlleva un aumento en los niveles de proteína DXR.

La mayor resistencia a FSM de las plantas con un funcionamiento alterado del reloj circadiano podría explicarse con la acumulación de mayores niveles de proteína DXR que sus correspondientes parentales silvestres. El análisis de los niveles de proteína DXR en estas líneas mediante ensayos tipo *western blot* demostró que los mutantes *toc1-1* y *elf3-9*, poseían niveles aumentados de DXR mientras que el doble mutante *cca1-11/lhy-21*, que también mostraba niveles altos de resistencia a FSM (Figura 10), presentaba niveles de DXR similares a su parental silvestre WS (Figura 12). El resto de mutantes no resistentes a FSM también mostró niveles de proteína DXR similares a las de sus correspondientes parentales silvestres (Figura 12). La mayor resistencia a FSM de las líneas transgénicas sobreexpresoras de TOC1 y CCA1 también se correlacionó con mayores niveles de proteína DXR (Figura 13).

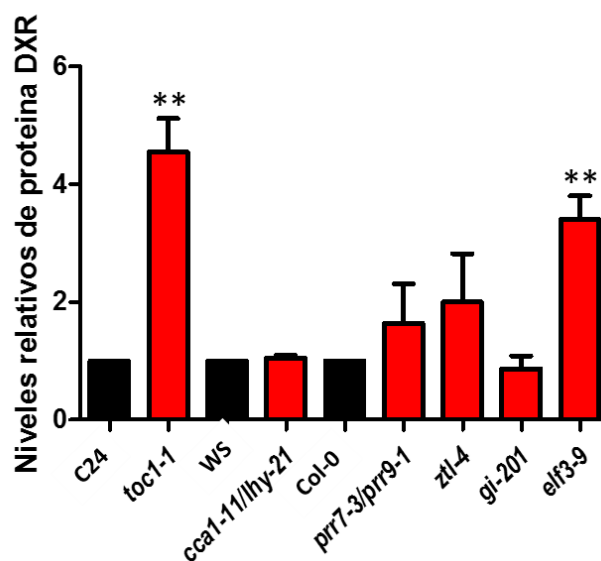


Figura 12. Proteína DXR en mutantes del reloj circadiano. Niveles relativos de proteína DXR en plántulas de mutantes de componentes del reloj circadiano (en rojo) y su parental silvestre (wt) en negro crecidas en día largo (LD) y recogidas a ZT=4h. Los valores han sido cuantificados a partir del análisis de imagen de membranas de *western blot* y normalizados al wt de cada línea mutante. Se representan las medias y el error estándar de n=2-4 experimentos Test *t-student* **p<0.01

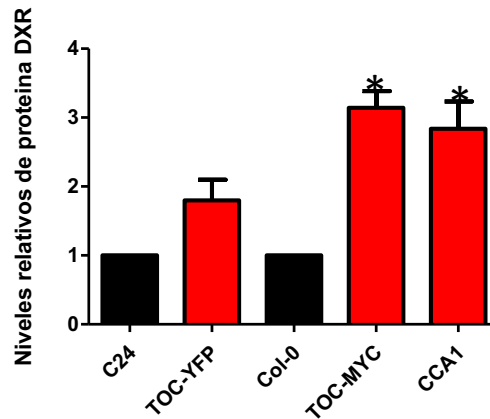


Figura 13. Proteína DXR en líneas sobreexpresoras de componentes del reloj circadiano. Niveles relativos de proteína DXR en plántulas de líneas sobreexpresoras de componentes del reloj circadiano (en rojo) y su parental silvestre (wt) en negro crecidas en día largo (LD) y recogidas a ZT=4h. Se representan las medias y el error estándar de n=4 experimentos. Test *t-student* **p<0.01, ***p<0.005

Dado que ELF3 no sólo participa en la regulación del reloj circadiano sino que ejerce efectos independientes del reloj sobre la fotomorfogénesis y la floración (Chou y Yang 1999) se decidió centrar el trabajo en TOC1, un componente central del reloj circadiano (Strayer *et al.* 2000).

1.3 Los niveles de transcrito DXR no varían en *toc1-1* con respecto al wt.

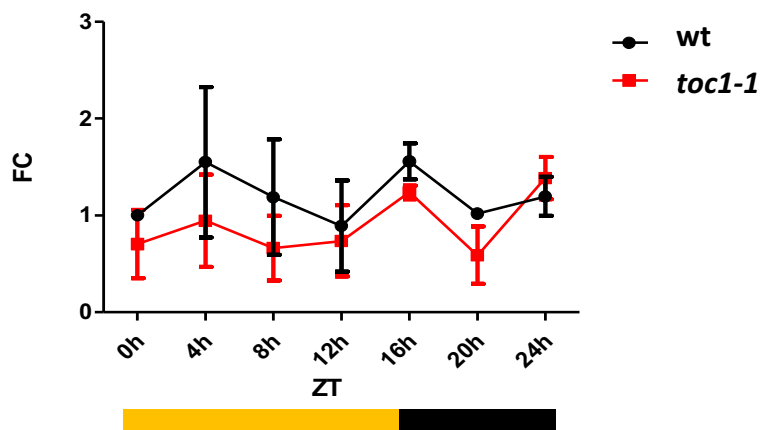


Figura 15. Niveles de transcrito DXR en *toc1-1* y wt. Niveles de transcrito DXR normalizado con los niveles de transcrito *UBC*, FC (Fold Change), y relativizados a ZT=0h de muestras de plántulas *toc1-1* (rojo) y wt (C24) (negro) crecidas en día largo (LD) y recogidas a día 12 a lo largo del día y de la noche. (ZT= tiempo). Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos.

El hecho de que el mutante *toc1-1* presente mayores niveles de proteína DXR podría deberse a un aumento de los niveles de transcrito *DXR* por lo que se analizaron los niveles de transcrito de estas líneas por q-RT-PCR. Para estos experimentos se escogieron condiciones de día largo y se recogieron muestras cada 4 horas en el día 12. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas de niveles de mRNA *DXR* entre *toc1-1* y el wt (C24) a lo largo del día (Figura 15). Por lo tanto, el acúmulo de proteína DXR en *toc1-1* no se debe a cambios en los niveles de transcrito sino que respondería a algún mecanismo de tipo postranscripcional.

1.4 La resistencia a FSM del mutante *toc1-1* es un efecto del mal funcionamiento del reloj circadiano.

Los mutantes y líneas transgénicas con niveles alterados de TOC1 presentaban resistencia a FSM debido a un aumento de los niveles de proteína DXR en períodos de luz/oscuridad de 24 horas (T24). Este efecto podría ser dependiente del defecto del reloj en estas líneas o por el contrario ser independiente del reloj, es decir, podría aparecer como consecuencia de alteraciones pleiotrópicas de los mutantes no directamente relacionadas con el reloj. Los mutantes *toc1-1* exhiben fenotipo wt cuando su período interno (de 20 horas en lugar de las 24 horas de las plantas silvestres) coincide (Millar *et al.* 1995; Strayer *et al.* 2000; Dodd *et al.* 2005); Se razonó por tanto que si el efecto sobre DXR y la resistencia a FSM se debía a un mal funcionamiento del reloj circadiano la resistencia a FSM debería atenuarse en mutantes *toc1-1* creciendo en su propio periodo (T20).

Para ensayar esta hipótesis se diseñó un experimento que consistió en comparar las resistencias a FSM y los niveles de DXR de las líneas *toc1-1* crecidos en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (T24) con ciclos de 10 horas de luz y 10 horas de oscuridad (T20). En la Figura 14 se muestra la cuantificación de la resistencia a FSM por %SE que se realizó a los 14 ciclos de cada periodo así como los niveles de proteína DXR. Cuando los mutantes *toc1-1* crecen en las condiciones que se ajustan a su reloj endógeno, T20, los niveles de proteína DXR y también la resistencia a FSM disminuyeron acercándose a los niveles del wt (C24) cuando este se encuentra en T24. Este resultado

confirma que la acumulación de DXR y la resistencia a FSM es un efecto dependiente del reloj circadiano.

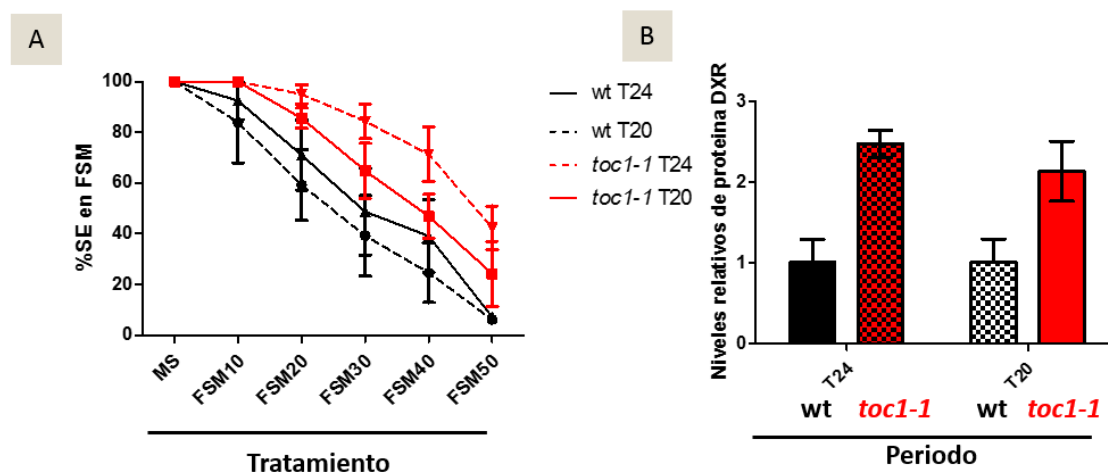


Figura 14. Resistencia a FSM y proteína DXR de la línea *toc1-1* y el wt a distintos periodos. (A). Cuantificación por *Seedling Establishment* de la resistencia a FSM del mutante *toc1-1* (rojo) y su parental silvestre wt (C24) (negro) crecidos en condiciones de período T24 (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y T20 (10 horas de luz y 10 horas de oscuridad). Las líneas continuas indican cuando el periodo (T) externo sincroniza con el reloj de *toc1-1* o wt; las líneas discontinuas indican cuando el reloj de *toc1-1* o wt no está sincronizado con el periodo externo. Se representan las medias y el error estándar de n=4 experimentos. (B). Niveles de proteína DXR medidos por *western blot* en plántulas del mutante *toc1-1* (rojo) y su parental silvestre wt (C24) (negro) crecidos en condiciones de período T24 (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y T20 (10 horas de luz y 10 horas de oscuridad); las muestras se recogieron a ZT=0h. Las barras en color sólido indican cuando el periodo (T) externo sincroniza con el reloj de *toc1-1* o wt; las barras en trama de cuadrícula indican cuando el reloj de *toc1-1* o wt no está sincronizado con el periodo externo. Se representan las medias y el error estándar de n=2 experimentos.

1.5 El fotoperiodo y la cantidad de luz influyen en los niveles de DXR y en la resistencia a FSM en los mutantes *toc1*.

Debido a que el mutante *toc1-1* presenta alteraciones de procesos regulados por fotoperiodo (Strayer *et al.* 2000) se decidió cuantificar los niveles de DXR en diferentes regímenes de fotoperiodo. Se diseñó un experimento en que se expusieron placas de MS con las líneas *toc1-1* y wt (C24) en diferentes condiciones de fotoperiodo: días cortos (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad, SD), días neutros (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, ND) y días largos (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, LD). Se recogieron

Resultados

muestras cada 4 horas a lo largo de la fase lumínica del día 10 y se analizaron los niveles de proteína DXR mediante ensayos *western blot*. Las mayores diferencias de proteína DXR en *toc1-1* con respecto al wt (C24) se observaron a primera hora del día (ZT=0h). En este punto, también llamado *End of Night* (EN), las plantas mutantes acumulaban más proteína DXR que en el wt en todos los fotoperiodos analizados, aunque las diferencias entre mutante y wt aumentaban a medida que se incrementaba el periodo de luz (mínimas en SD y máximas en LD; figura 8). La diferencia de niveles de DXR entre *toc1-1* y wt disminuía a lo largo del día, alcanzando su mínimo al final del día. En este punto, denominado *End of Day* (ED), no se encontraron diferencias significativas en los niveles de DXR entre plantas mutantes y wt crecidas en SD o ND, mientras que las crecidas en LD aún mostraban niveles mayores de proteína DXR en el mutante (Figura 16). En cuanto a las diferencias en los niveles de DXR entre los distintos fotoperiodos, los resultados mostraron una mayor abundancia de este enzima en condiciones SD con respecto a condiciones de ND y LD (Figura 16B) en el wt.

Para la cuantificación de la resistencia a FSM, se incluyó el mutante *toc1-2*. El fenotipo observado en *toc1-1* se debe a la pérdida parcial de la función de TOC1 mientras que el alelo *toc1-2* resulta en un *splicing* alternativo que resulta en una pérdida total de función de TOC1 (Strayer *et al.* 2000) por lo que *toc1-2* presenta otras alteraciones fotomorfogénicas adicionales (Mas *et al.* 2003). Los mutantes *toc1* se mostraron más resistentes que su parental silvestre C24, siendo *toc1-2* más resistente que *toc1-1* (Figura 17). Los resultados de resistencia a FSM de *toc1-2* sugieren que otras funciones de TOC1, además de la específica sobre el reloj circadiano, podrían alterar la resistencia a FSM. Para poder estudiar el papel específico del reloj circadiano sobre DXR, el estudio molecular se centró en el mutante *toc1-1*.

Resultados

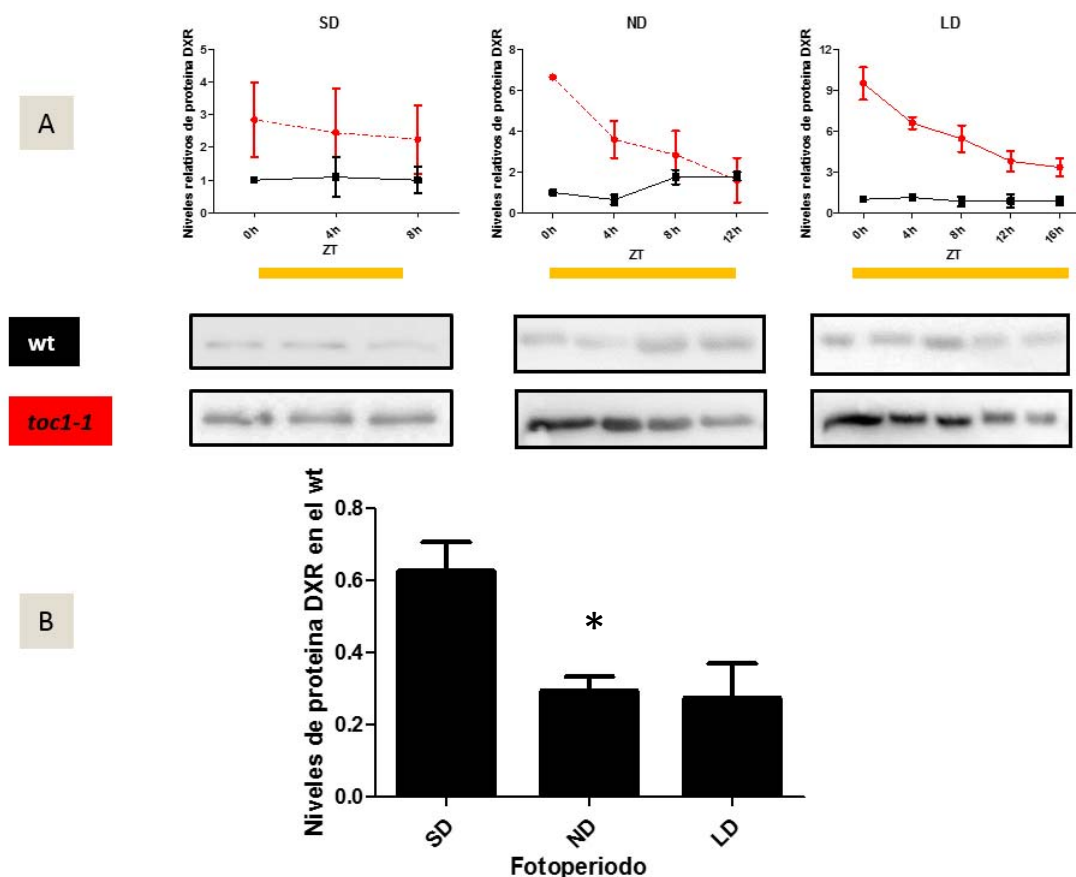


Figura 16. Proteína DXR en líneas *toc1-1* y wt en diferentes fotoperiodos. (A). Niveles de proteína DXR en plántulas *toc1-1* y wt (C24) crecidas en día corto (SD), día neutro (ND) y día largo (LD). Se representa la gráfica con valores promedios relativizados a ZT=0h del wt y una muestra representativa de las membranas de *western blot* para las dos líneas y cada fotoperiodo ensayado. (B). Niveles de proteína DXR medidos por *western blot* en el wt (C24) a ZT=0h en los fotoperiodos SD, ND, LD. Los niveles de proteína disminuyen conforme el día es más corto; se hallaron diferencias significativas entre los niveles de proteína DXR entre SD y ND **Test t-Student* $p < 0.05$ Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos.

Un aspecto importante de este experimento es que se demostró la buena correlación entre niveles de DXR y resistencia a FSM, como se muestra en la figura R9. Las plantas wt mostraron mayores niveles de resistencia en SD (50% SE en 40 μ M) que en LD (30% SE en 40 μ M), lo que es consistente con la presencia de mayores niveles de DXR en SD (Figura 16). Además, la mayor diferencia entre plantas wt y *toc1* se observa en LD, tanto a nivel de acumulación de DXR (Figura 16) como de resistencia a FSM (Figura 17). Estos resultados sugieren que la proteína acumulada corresponde a enzima activa

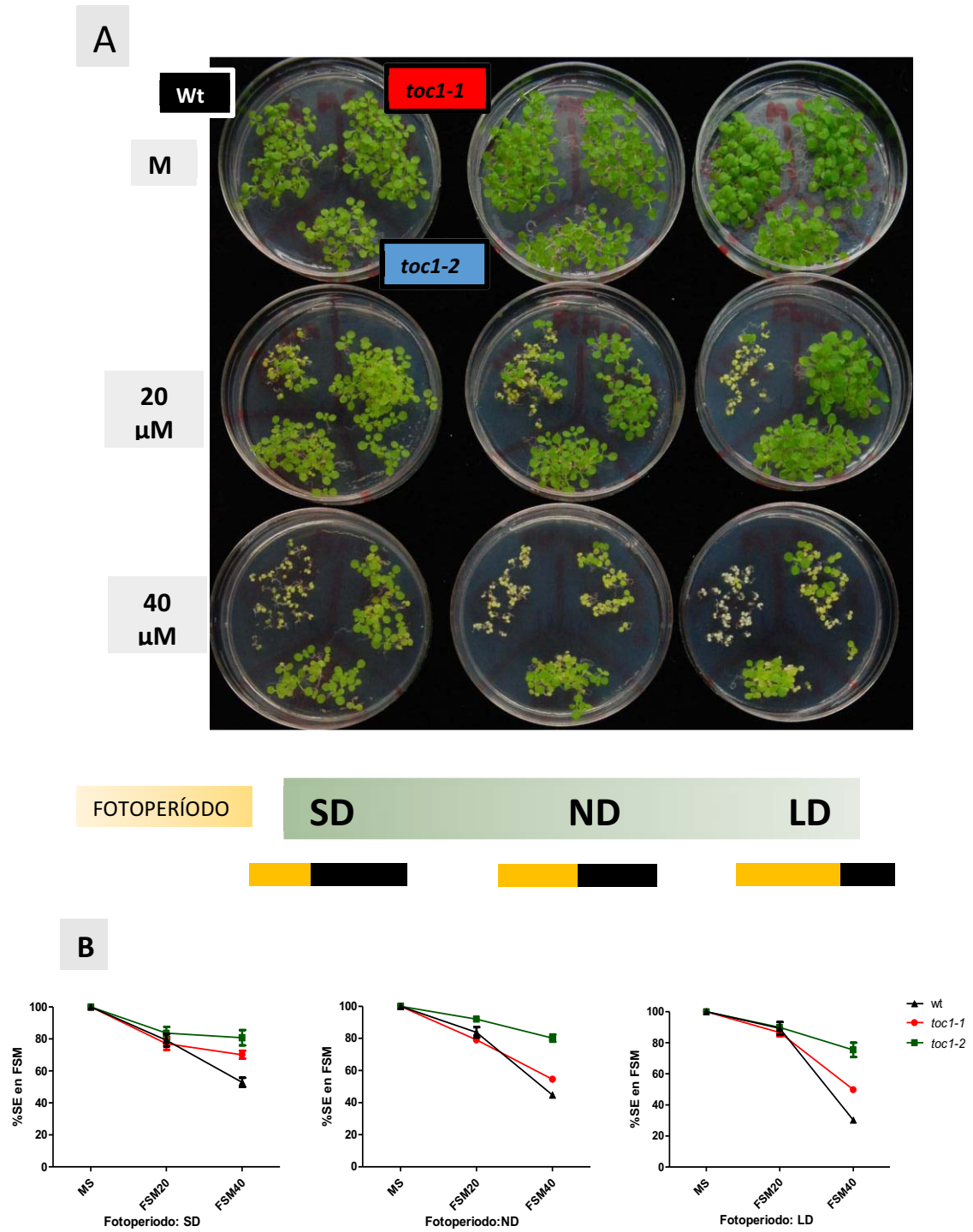


Figura 17. Fenotipo y resistencia a FSM de mutantes *toc1* y *wt* a diferentes fotoperíodos. (A). Fenotipo de las líneas *toc1-1*, *toc1-2* y *wt* crecidas en MS y a diferentes concentraciones de FSM en condiciones de día largo (LD), día neutro (ND) y día corto (SD). (B). Cuantificación de la resistencia a FSM de los mutantes *toc1-1* (línea roja), *toc1-2* (línea roja discontinua) y su parental silvestre (negro) Se representan las medias y el error estándar de n=4 experimentos.

Resultados

Los resultados sugieren en conjunto que TOC1 tiene un papel en la regulación por fotoperiodo de DXR. Sin embargo la acumulación de enzima DXR y la resistencia a FSM podría estar afectada no por el periodo sino por la cantidad de luz recibida (flujo de fotones). Para entender si la regulación de DXR depende del fotoperiodo o de la cantidad de fotones recibidos a lo largo de la fase lumínica se diseñó un experimento consistente en exponer el mutante *toc1-1* y el parental silvestre C24 en fotoperíodo SD (8 horas de luz e intensidad lumínica de 60 μ E), LD (16 horas de luz e intensidad lumínica de 60 μ E) y un fotoperíodo "LD-" (16 horas de luz e intensidad lumínica de 30 μ E). El fotoperíodo "LD-" se consiguió cubriendo las placas con un filtro blanco y colocándolas en la misma cámara que las que recibían el fotoperiodo LD, por lo que las placas "LD-" recibirían una cantidad equivalente de fotones a las placas en SD (Figura 18).

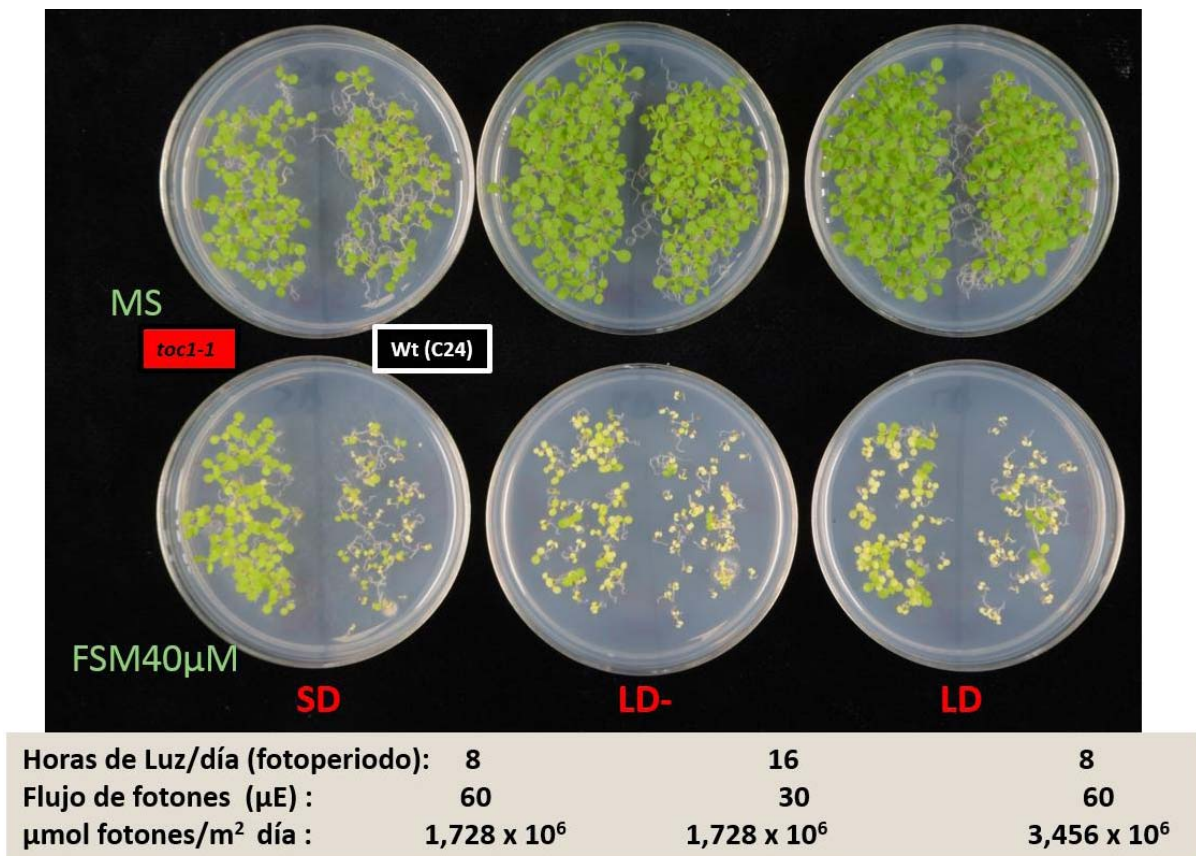


Figura 18. Fenotipo de resistencia a FSM de mutantes *toc1* y *wt* a diferentes fotoperiodos e intensidad de luz. Líneas *toc1-1* y *wt* (C24) tratadas con MS y 40 μ M FSM en condiciones de (día corto) SD, (día largo con baja intensidad de luz) LD- y (día largo) LD. En el recuadro se describen las condiciones de fotoperiodo y flujo de fotones a que fueron expuestas estas plántulas.

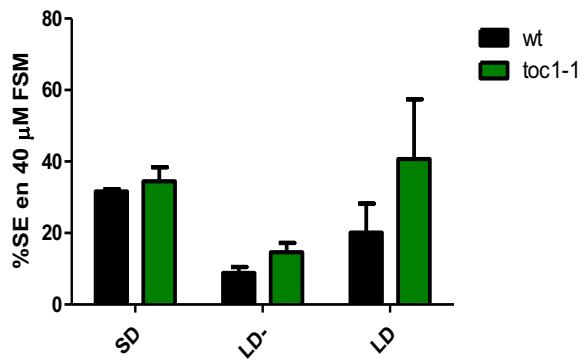


Figura 19. Resistencia a FSM de mutantes *toc1* y wt a diferentes fotoperiodos e intensidad de luz.

Cuantificación por *Seedling Establishment* (%SE) de la resistencia a 40 μM de FSM de plántulas en condiciones (día corto) SD, (día largo con baja intensidad de luz) LD- y (día largo) LD al día 14. Se representan las medias y el error estándar de n=6 experimentos

Si la resistencia a FSM no dependiera del fotoperiodo sino de la cantidad de fotones recibidos, las plántulas crecidas en “LD-” presentarían más resistencia total a FSM y una menor diferencia entre wt y mutantes que las plántulas crecidas en condiciones LD, es decir, presentarían un fenotipo similar a las plántulas crecidas en SD. Sorprendentemente, ambos genotipos resisten mucho menos a FSM en condiciones “LD-” (Figura 19). Este efecto sugiere que las diferencias entre plantas silvestres y *toc1-1* observadas no dependen tanto de la cantidad de luz sino de la extensión del día (fotoperiodo).

1.6 Abordajes para el estudio de una posible modificación postranscripcional de DXR en el mutante *toc1-1*.

Los datos obtenidos hasta ese momento indicaban que TOC1 podría regular negativamente la acumulación de DXR mediante un mecanismo postranscripcional. Curiosamente, los análisis por *western blot* habían mostrado que la proteína DXR aparecía en *toc1-1* como una banda de peso molecular aparente mayor que en el wt (C24) (Figura 20).

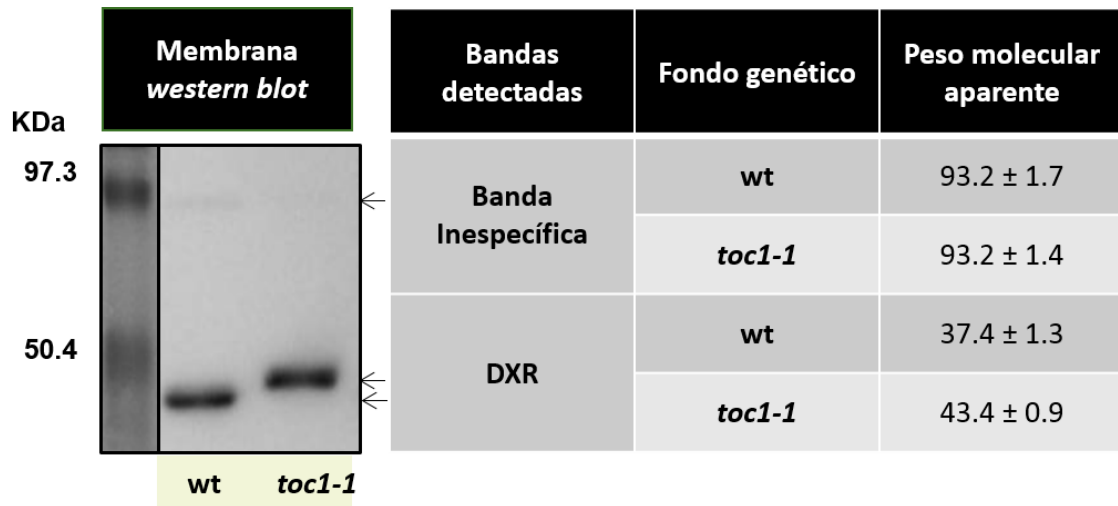


Figura 20. Bandas de la proteína DXR identificadas por western blot en fondo *toc1-1* y wt. Membrana de *western blot* contra DXR de extractos de proteína de las líneas wt (C24) y *toc1-1*. El anticuerpo identifica una banda inespecífica (superior) y una específica correspondiente a DXR (inferior) en ambos fondos genéticos. La tabla muestra los pesos moleculares aparentes en kDa de ambas calculadas por interpolación tras generar una curva de pesos moleculares con marcadores de tamaño conocido utilizando Image J.

Para intentar determinar si la función sobre el reloj circadiano de TOC1 alterada generaba cambios en la proteína DXR responsables del cambio de movilidad de la proteína observado en las plantas mutantes y, además, si ese cambio de movilidad era la causa de la mayor acumulación de proteína se llevaron a cabo varios abordajes experimentales:

1) El clonaje y secuenciación de la secuencia genómica y mRNA de DXR en fondo genético C24 y *toc1-1* no mostraron ninguna diferencia en la secuencia por lo que no parece que existan Open Reading Frames (ORFs) de distintos tamaños en *toc1-1* y wt (C24) o que el mRNA de DXR en estas líneas sufriera un *splicing* alternativo o procesamiento diferencial que pudiera explicar la diferencia de peso molecular aparente de la proteína DXR entre ambos genotipos.

2) La posibilidad de algún tipo de modificación diferencial de la proteína DXR en plantas wt y *toc1-1* se abordó mediante separación de proteínas de ambos genotipos en geles bidimensionales y posterior análisis por *western blot*. Estos análisis permiten separar las proteínas por punto isoeléctrico y por peso molecular y carga, lo que permiten identificar posibles isoformas de una misma proteína. Si existen diversos residuos de la proteína que están modificados (por ejemplo, por fosforilación), en un gel

Resultados

bidimensional se observarían varios puntos separados debido a su diferente peso molecular y diferente carga. Si existen diversos residuos de la proteína que están modificados (por ejemplo por fosforilación) en un gel bidimensional se observarían varios puntos separados debido a su diferente peso molecular y diferente carga. El experimento se realizó por una parte con extractos de proteína de plántulas *toc1-1* y wt (C24) separados y también con una mezcla de extractos de proteína de plántulas de ambos extractos con el fin de ver si los *spots* de proteína DXR de sendas líneas se superponían (Figura 21).

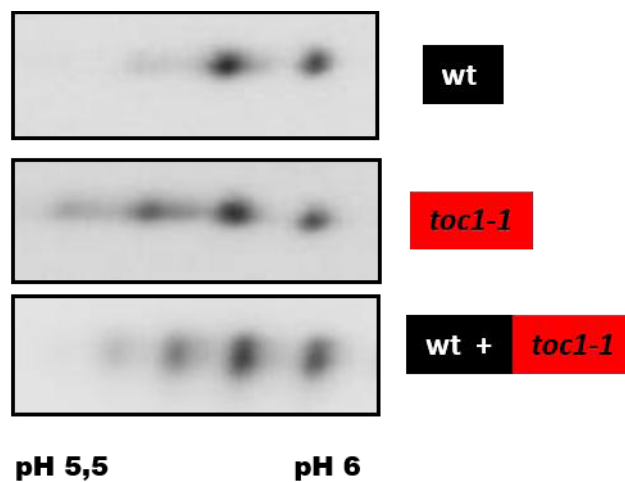


Figura 21: Análisis por *western blot* de la proteína DXR por separación en geles bidimensionales. Membranas de *western blot* contra DXR de muestras de wt (C24) y *toc1-1* y de mezcla wt+ *toc1-1* en geles bidimensionales en el rango pH5,5-6.

En estos experimentos se detectó la presencia de cuatro *spots* correspondientes a DXR con distinto punto isoeléctrico en un rango de pH 5.5-6. Las posibles isoformas de menor pH aparecieron más enriquecidas en el mutante *toc1-1* que en el wt (C24), en concreto las isoformas 1 y 2 (Figura 21) lo que podría sugerir que existen isoformas diferenciales entre el mutante y el silvestre. En el experimento realizado con la mezcla de los dos extractos de proteína (*toc1-1* y C24) se pudieron distinguir de manera muy sutil los posibles cambios de peso molecular entre las dos muestras (Figura 21) que se observan en las membranas recuperadas a partir de geles monodimensionales (Figura 20). Estos cambios podrían deberse a modificaciones postranscripcionales en DXR en fondo *toc1-1* como por ejemplo cambios postranscripcionales en el estado fosforilación (que podrían justificar el posible cambio de peso molecular y de punto isoeléctrico) o de oxidación (que podría justificar cambios en el punto isoeléctrico).

3) Puesto que existen sitios potenciales de fosforilación en DXR, una posibilidad que podría explicar la diferencia de peso molecular aparente en DXR en *toc1-1* podrían ser diferencias en los niveles de fosforilación de la proteína no detectadas en la separación bidimensional. Para estudiar si posibles fosforilaciones de la proteína DXR podían ser responsables de un cambio de peso molecular aparente se llevaron a cabo tratamientos con fosfatasa alcalina. Se trataron extractos de proteína de plántulas *toc1-1* y C24 con y sin fosfatasa alcalina (de gamba y de ternera) pero no se observó ningún cambio de peso molecular aparente entre los extractos tratados y sin tratar (Figura 22).

4) A propósito de investigar posibles cambios en los estados de oxidación de DXR se razonó la posibilidad que TOC1 regulara un sistema redox que afectara la oxidación de DXR. Se ha descrito además que algunos enzimas del MEP están regulados por las tiorredoxinas, como HDS y HDR (Balmer *et al.* 2003). Para comprobar diferentes estados de oxidación de DXR se trataron extractos de proteína con H_2O_2 sin agentes reductores; a continuación se realizaron experimentos de *western blot* para analizar cambios en la proteína DXR en los diferentes extractos pero no se observaron cambios en DXR que pudieran evidenciar distintos estados de oxidación de DXR en el mutante *toc1-1* con respecto al wt (Figura 22).

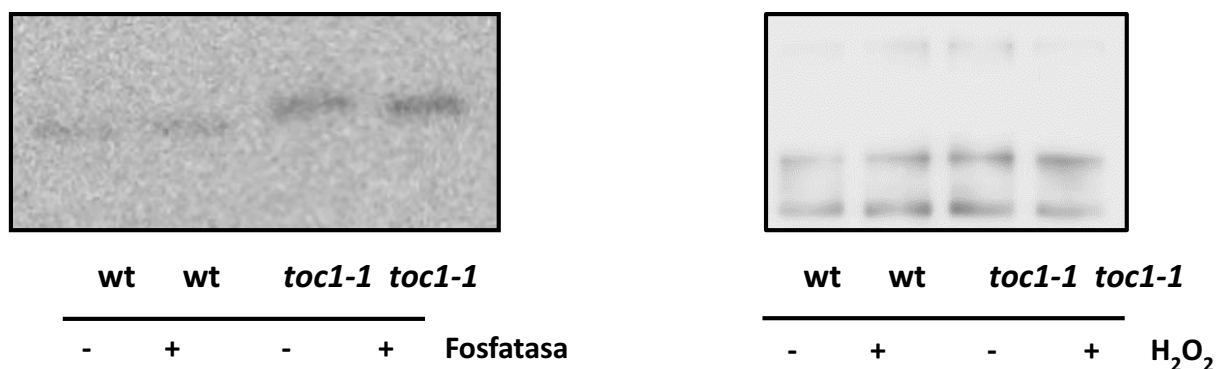


Figura 22. Experimentos para la identificación de posibles cambios postranscripcionales sobre DXR. (A). Membrana de *western blot* contra DXR de extractos de proteína de las líneas wt (C24) y *toc1-1*. Los extractos tratados con fosfatasa alcalina se indican con “+” y los no tratados con “-”. (B) Membrana de *western blot* contra DXR de extractos de proteína de las líneas wt (C24) y *toc1-1*. Los extractos tratados con H_2O_2 alcalina se indican con “+” y los no tratados con “-”.

5) Otra posibilidad era que la proteína DXR fuese procesada de forma diferencial en plantas wt y *toc1-1*. Para comprobarla, plantas sobreexpresoras de una proteína DXR fusionada a GFP por su extremo C-terminal (35S:DXR-GFP) se cruzaron con el mutante

Resultados

toc1-1 y se seleccionaron plantas F3 homocigotas para el transgén (estimado por la segregación del marcador de resistencia) y para el gen TOC1 tipo silvestre (líneas *DXR-GFP*) o tipo mutante (líneas *toc1-1/DXR-GFP*). A continuación, se optó por realizar un análisis del N-terminal de las proteínas DXR-GFP en ambos fondos genéticos por si había alguna modificación diferencial en esta parte de la proteína una vez eliminado el péptido de tránsito de plantas. En ocasiones, la secuencia N-terminal es una señal peptídica que determina su vida media (probabilidad de degradarse) (Bachmair *et al.* 1986), así que una posible secuencia diferencial en el extremo N-terminal de DXR-GFP podría permitir una mayor estabilidad de la proteína en fondo mutante. Tras un protocolo de inmunoprecipitación de extractos proteicos de estas líneas mediante un anticuerpo contra GFP unido a una resina, se recortó cuidadosamente la banda DXR-GFP de geles PAGE-SDS teñidos con AgNO₃ y se procedió al análisis del N-terminal por degradación de Edman y posterior detección de péptidos por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*). Se detectaron dos secuencias N-terminal diferentes en cada muestra por inferencia de los péptidos detectados con el buscador MASCOT y las bases de datos NCBI (Figura 23): SVKVQQQQPPPAWPGR y PPPAWPGR. Ambas secuencias estaban presentes en cantidades similares tanto en plantas *DXR-GFP* como *toc1-1/DXR-GFP* lo que sugiere que la secuencia terminal de la proteína madura tampoco explica el cambio aparente de la proteína DXR en ausencia de actividad TOC1.

6) Tras estos resultados, se consideró la posibilidad de intentar una nueva estrategia. Se intentó sobreexpresar las dos versiones de la proteína DXR madura identificadas en el apartado anterior por secuenciación, fusionadas a colas de histidina (Figura 24), en diversas cepas de *E.coli* para utilizar después las proteínas recombinantes purificadas para incubar con extractos de plantas wt (C24) o *toc1-1* y estudiar su posible modificación diferencial. Desafortunadamente DXR forma cuerpos de inclusión en *E. coli* que pueden verse en la (Figura 24) y muy poca proteína puede ser purificada. Además, con la escasa proteína purificada obtenida se realizaron los ensayos de actividad para DXR que mostraron que la proteína purificada no era activa.

Resultados

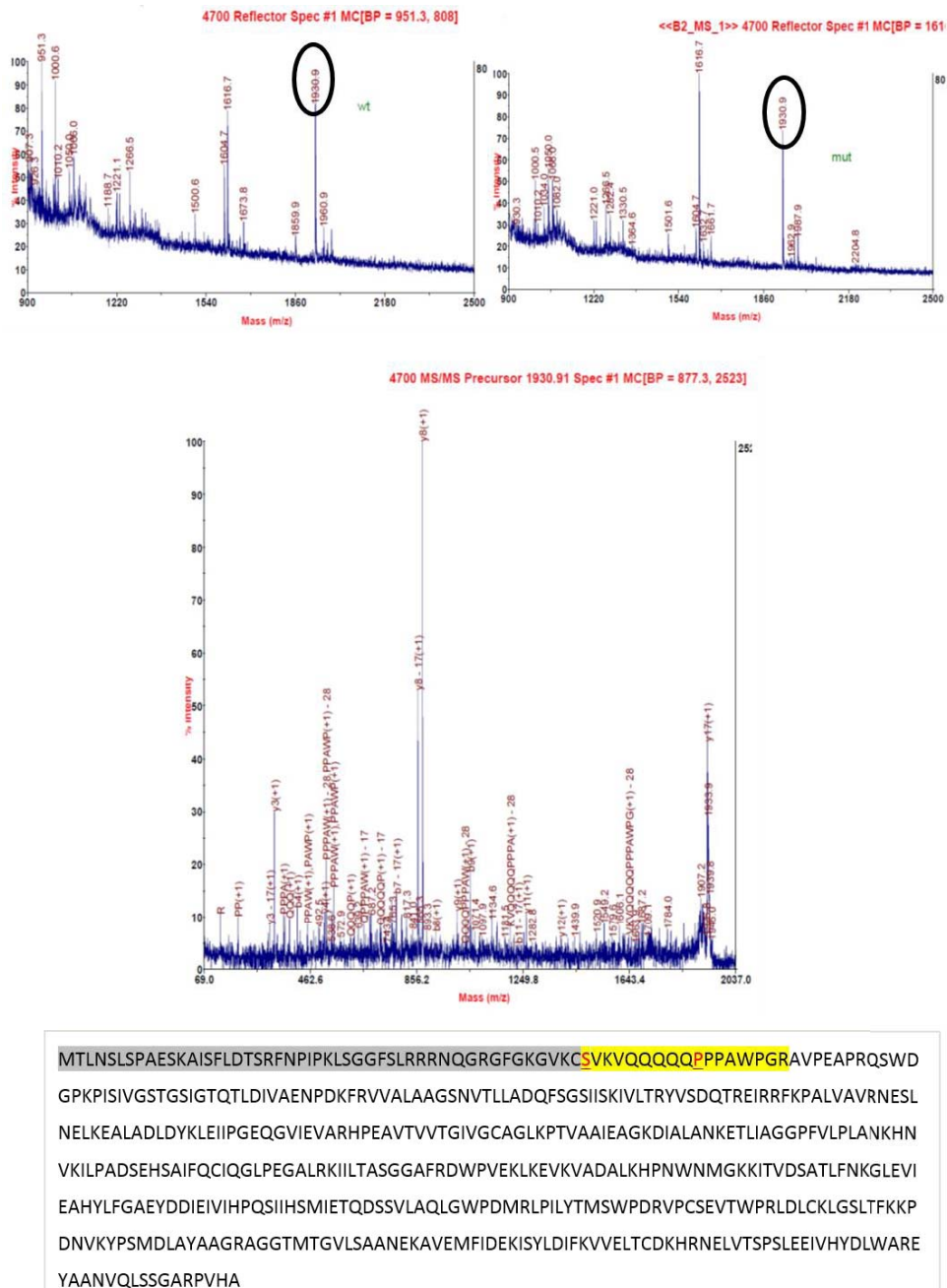
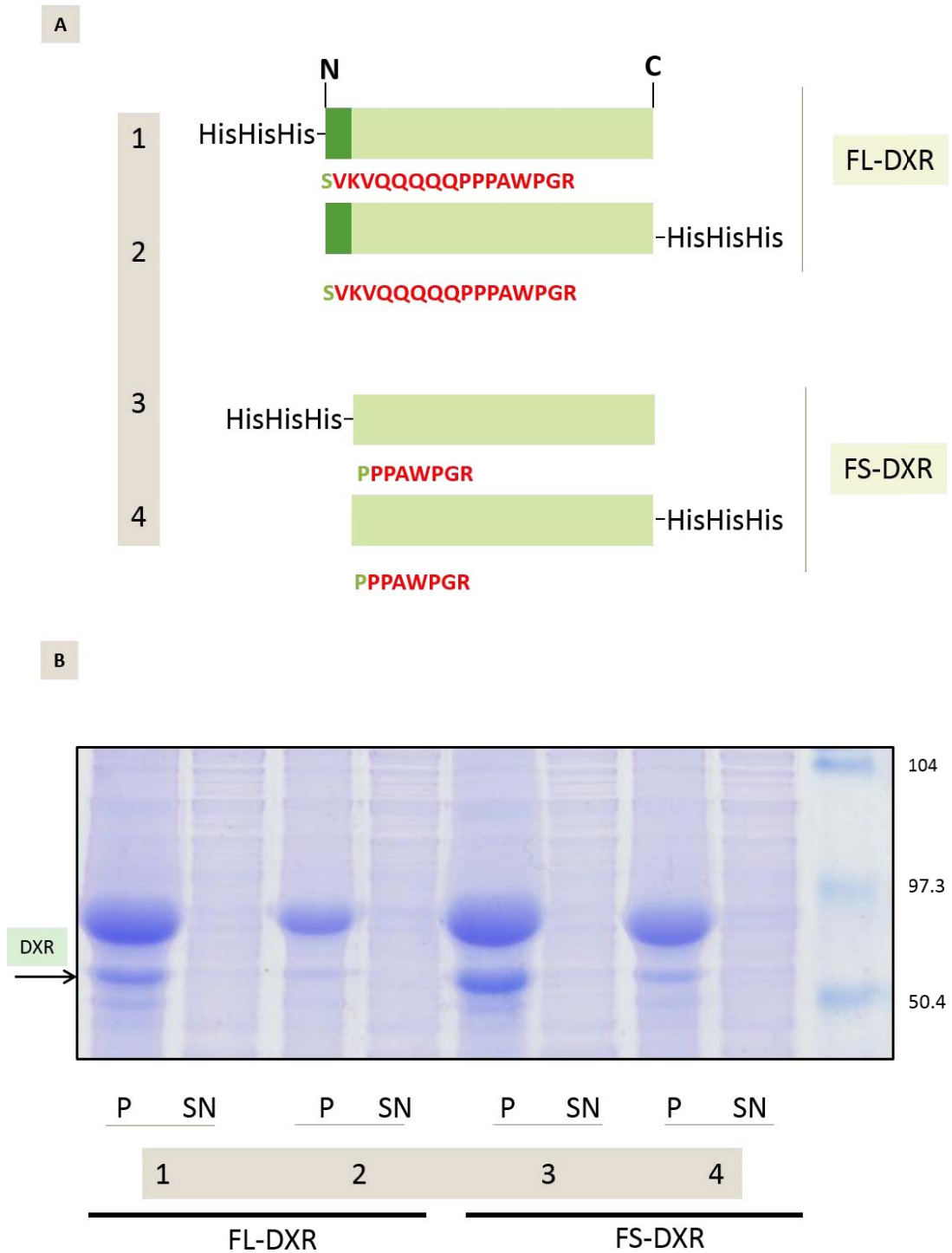


Figura 23. Fragmentación de péptidos de la proteína DXR-GFP e identificación del extremo N-terminal. A. Espectro MS (MALDI-TOF) comparativo de la digestión trípica de las bandas de *DXR-GFP* (superior) y *toc1-1/DXR-GFP* (inferior). En negro se señala el péptido SVKVQQQQQPPAWPGR. B. Espectro de fragmentación (MSMS adquirido en MALDI-Tof-Tof) del pico m/z 1930.9 que corresponden a la fragmentación teórica del péptido SVKVQQQQQPPAWPGR. C. Secuencia de la proteína DXR. En gris fragmento del péptido señal no detectado. En amarillo péptido confirmado por MSMS y en rojo subrayado los N-terminales confirmados por MSMS DE ambas muestras *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*.

Resultados



Figuras 24. Proteínas DXR recombinantes expresadas en E.coli y gel PAGE-SDS con las proteínas purificadas. (A). Esquema de las proteínas recombinantes de DXR diseñadas para ensayos *in vitro* para su expresión en *E.coli*. Se representan las dos formas largas de DXR con las colas de histidina (FL-DXR) en C y N terminal respectivamente, y las dos formas cortas (FS-DXR). Se indica la secuencia larga y corta del N terminal identificada por MALDI-TOF. (B). Análisis por PAGE-SDS y tinción Coomassie de extractos de *E. coli* transformadas con las construcciones representadas en (A) de esta figura. *pellet* (P) y *sobrenadante* (SN) aislados en geles de acrilamida en la cepa Rossetta. Se indica con una flecha la posible banda de DXR sobreexpresada en las fracciones de *pellet*.

Resultados

En este punto del trabajo se llevó a cabo una observación particularmente relevante. Al comprobar los niveles de DXR por *western blot* en distintos mutantes y fondos genéticos se observó la presencia de una proteína DXR de un tamaño aparente mayor que el de C24 y similar al de los mutantes *toc1* en los mutantes *gi-3* y *arc2* y en plantas de fondo Ler (Figura 25). Sin embargo, no se detectó ninguna correlación entre la presencia de proteína DXR de mayor peso molecular aparente y niveles aumentados de la misma o una mayor actividad DXR (resistencia a FSM) en comparación con los correspondientes fondos silvestres. Por lo tanto, independientemente de la naturaleza de esta diferencia en el peso molecular aparente, no parece que afecte ni a la actividad ni a la acumulación de DXR.

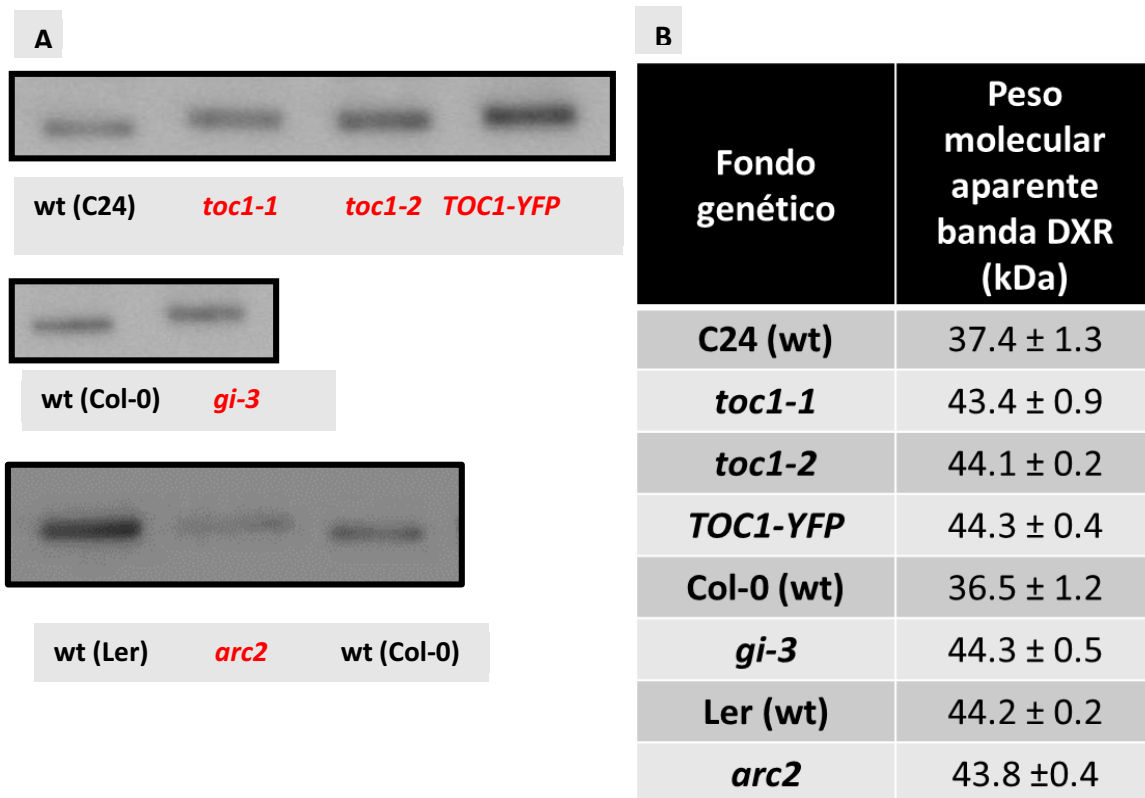


Figura 25. Bandas de la proteína DXR identificadas por *western blot* en diferentes fondos mutantes y ecotipos silvestres de *A. thaliana*. (A). Membranas de *western blot* contra DXR de mutantes en tres fondos genéticos silvestres diferentes wt (C24, Col-0, Ler) (en negro) y las líneas mutantes *toc1-1*, *toc1-2*, *TOC1-GFP*, *gi-3*, *arc2* (en rojo). (B). Pesos moleculares aparentes en kDa de las bandas de DXR que se calcularon por interpolación en una curva de pesos moleculares utilizando Image J.

1.7 El mecanismo postranscripcional de regulación de DXR implica el aumento de los niveles de enzima activa.

Al no detectarse modificaciones postranscripcionales en el enzima DXR causantes de su mayor acumulación en fondo *toc1-1*, se razonó que los elevados niveles de DXR en este mutante podían deberse a un mecanismo que regulaba los niveles de DXR o la actividad DXR a través de TOC1 pero que no implicara un cambio de peso molecular directamente sobre la proteína DXR. En los experimentos de inmunoprecipitación tampoco se observó ninguna modificación del extremo N-terminal de DXR-GFP en los fondos *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP* (Figura 23), por lo que se decidió estudiar los niveles de proteína DXR-GFP en las líneas *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*; si los elevados niveles de proteína en DXR en fondo *toc1-1* se debían a un mecanismo de regulación postranscripcional de la abundancia o actividad de DXR no dependiente de una modificación covalente sobre la proteína, deberían observarse elevados niveles de DXR-GFP en fondo *toc1-1/DXR-GFP* con respecto a *DXR-GFP*.

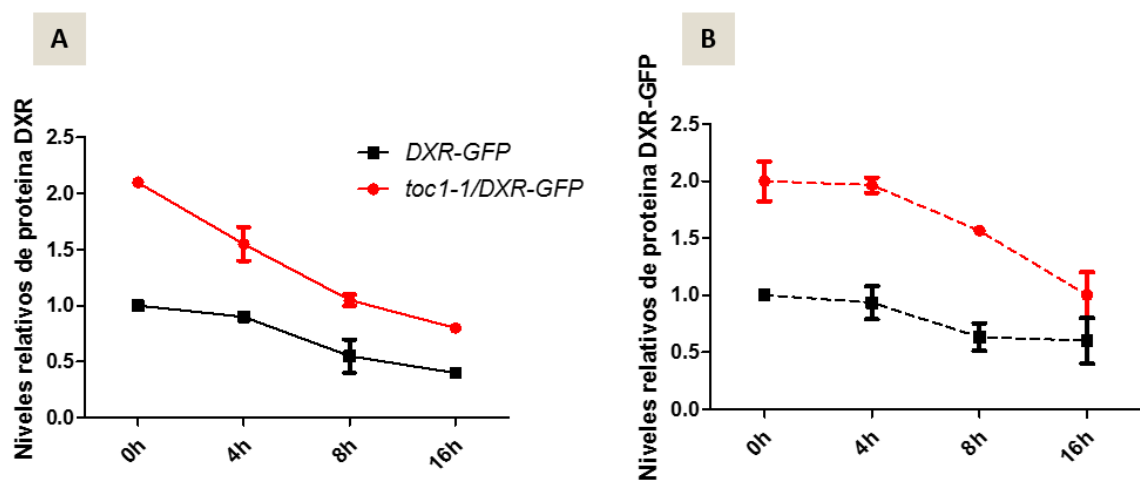


Figura 26. Proteína DXR-GFP en líneas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP*. (A). Niveles de DXR en líneas *toc1-1/DXR-GFP* (en rojo, línea continua) y *DXR-GFP* (en negro, línea continua) en muestras recogidas a lo largo del día en plántulas de día 12 crecidas en día largo LD. Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos. (B). Niveles de DXR-GFP en líneas *toc1-1/DXR-GFP* (en rojo, línea discontinua) y *DXR-GFP* (en negro, línea discontinua) en muestras recogidas a lo largo del día en plántulas de día 12 crecidas en día largo LD. Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos.

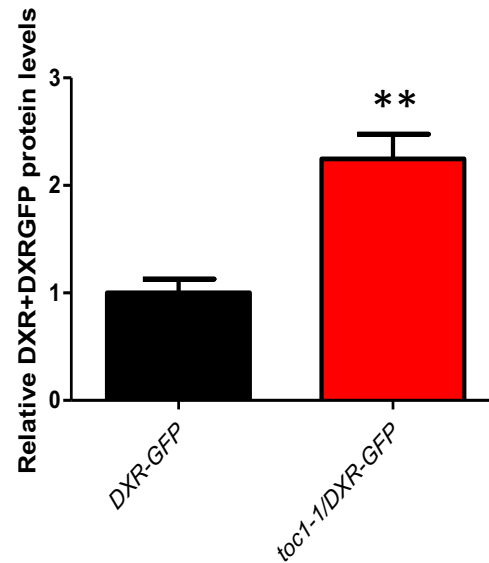


Figura 27. Proteína DXR y DXR-GFP en las líneas *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*. Promedio de proteína DXR+DXRGFP en muestras recogidas a 0L de día 12 en plántulas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* crecidas en MS. Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos. (**Test *t-student* $p < 0.01$)

Al igual que se realizó para el experimento de la (Figura 16), se recogieron muestras de plántulas de día 10 de las líneas hermanas de sobreexpresión constitutiva *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP* crecidas en día largo (LD) y se analizaron los niveles de proteína a lo largo del día. Los resultados muestran que tanto DXR como DXR-GFP se acumulan en *toc1-1/DXR-GFP* a principio del día y disminuyen hasta principios de la noche, igualándose en este punto los niveles de enzima con los de la línea *DXR-GFP* (Figura 26). Este comportamiento similar de las proteínas DXR y DXR-GFP, análogo al observado para DXR en las líneas *toc1-1* y wt (C24) aunque cambian los niveles relativos entre mutante y wt (Figura 16), sugiere que DXR y DXR-GFP estarían regulados por el mismo mecanismo postranscripcional dependiente de TOC1 que controlaría su abundancia. Para determinar si la proteína DXR-GFP acumulada en el mutante estaba activa se sembraron las líneas *toc1-1*, wt (C24), *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP* en FSM y se estimó la resistencia al inhibidor por %SE (Figura 28). Los resultados indican que las líneas *toc1-1/DXR-GFP*, que presentan niveles de enzima mayores que las líneas *DXR-GFP* (Figura 26,27), muestran también una mayor resistencia a FSM, lo que indica que la proteína acumulada está activa en fondo *toc1-1/DXR-GFP*.

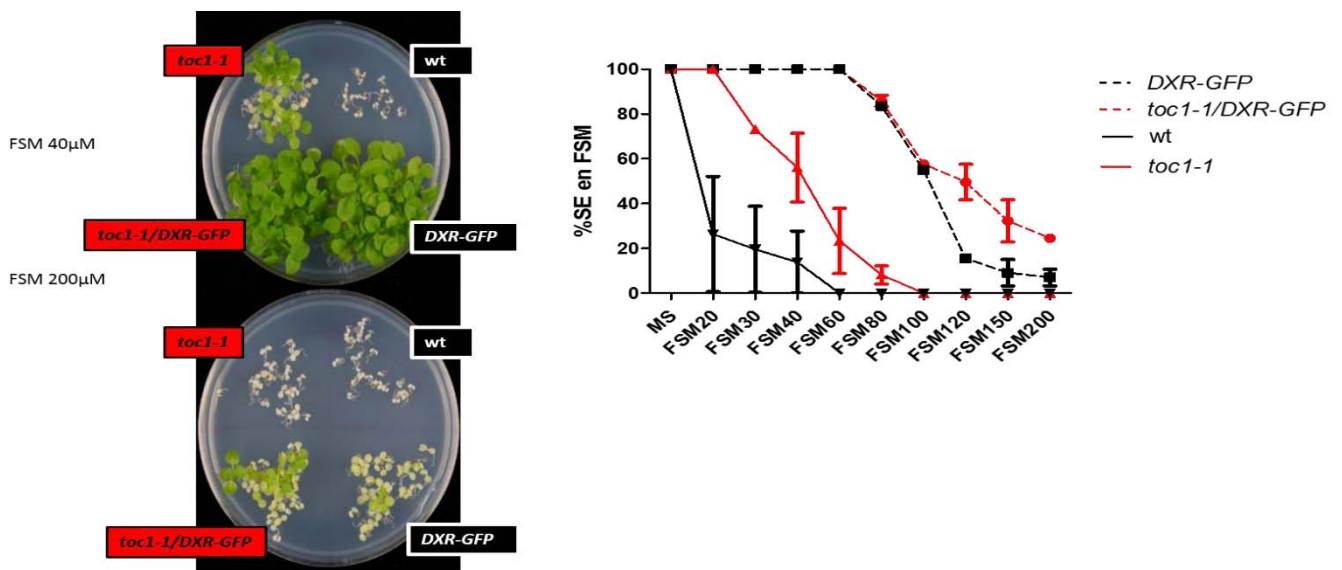


Figura 28. Fenotipo y resistencia a FSM de mutantes *toc1-1*, *wt*, *toc1-1/DXR-GFP*, *DXR-GFP*. (A). Fenotipo de resistencia a FSM a 40 y 200 μ M de las líneas *toc1-1*, *wt* (C24), *toc1-1/DXR-GFP*, *DXR-GFP*. (B). Cuantificación de la resistencia a FSM de las líneas *toc1-1* (en rojo), *wt* (C24) (en negro), *toc1-1/DXR-GFP* (en rojo discontinuo) y *DXR-GFP* (en negro discontinuo). Se representan las medias y el error estándar de n=4 experimentos.

En conjunto, estos resultados sugieren que TOC1 está controlando un mecanismo de regulación postranscripcional que estaría relacionado con el mantenimiento de niveles activos de enzima DXR.

1.8 La proteína DXR-GFP se encuentra compartimentada en abundantes vesículas subplastídicas en el mutante *toc1-1*.

Un posible mecanismo de regulación de los enzimas plastídicos es la subcompartimentación plastídica (Lunn 2007). La fusión de GFP a proteínas o enzimas es un método óptimo para la localización de enzimas a nivel subcelular ya que es posible localizarlas debido a que emiten fluorescencia al ser excitadas con láser (Lunn 2007). En el apartado anterior se ha descrito cómo DXR-GFP se comporta de forma análoga a DXR en los fondos *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* con respecto a las líneas no transgénicas *toc1-1* y *wt* (C24) por lo que se consideró que estas líneas eran óptimas para estudiar por una parte la localización subplastídica de DXR-GFP y por otra para investigar si TOC1 podía estar afectando la compartimentación de DXR-GFP a nivel subplastídico.

1.8.1 La fusión de GFP a DXR podría disminuir la actividad de DXR-GFP.

Para estudiar si la fusión de GFP interfería en la actividad de la proteína DXR-GFP se comparó la resistencia a FSM de líneas de sobreexpresión constitutiva de la proteína con a sin fusión a GFP. Las líneas *DXR-GFP* presentan mayores niveles de proteína DXR y DXR-GFP y mayor resistencia a FSM; por otro lado, las líneas que sobreexpresan *DXR* presentan menores niveles de proteína DXR y DXR-GFP y menor resistencia a FSM en comparación con las líneas *DXR-GFP* (Figura 29) El cálculo de la resistencia a FSM relativo, es decir, los valores relativos de resistencia absoluta entre los niveles de DXR resultan más elevados en las líneas sobreexpresoras de *DXR-GFP*. Mientras que los niveles de proteína en la línea DXR-GFP #13 son 9 veces mayores a las líneas DXR #2, la resistencia a FSM sólo es de 6 veces mayor. Por tanto, es posible que la presencia de GFP interfiera en la actividad DXR, aunque no de forma sustancial.

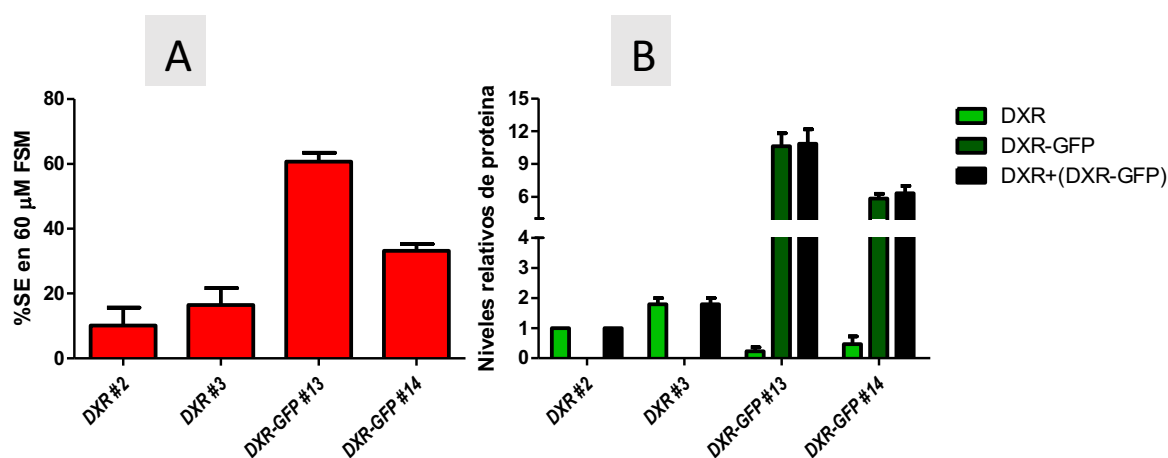
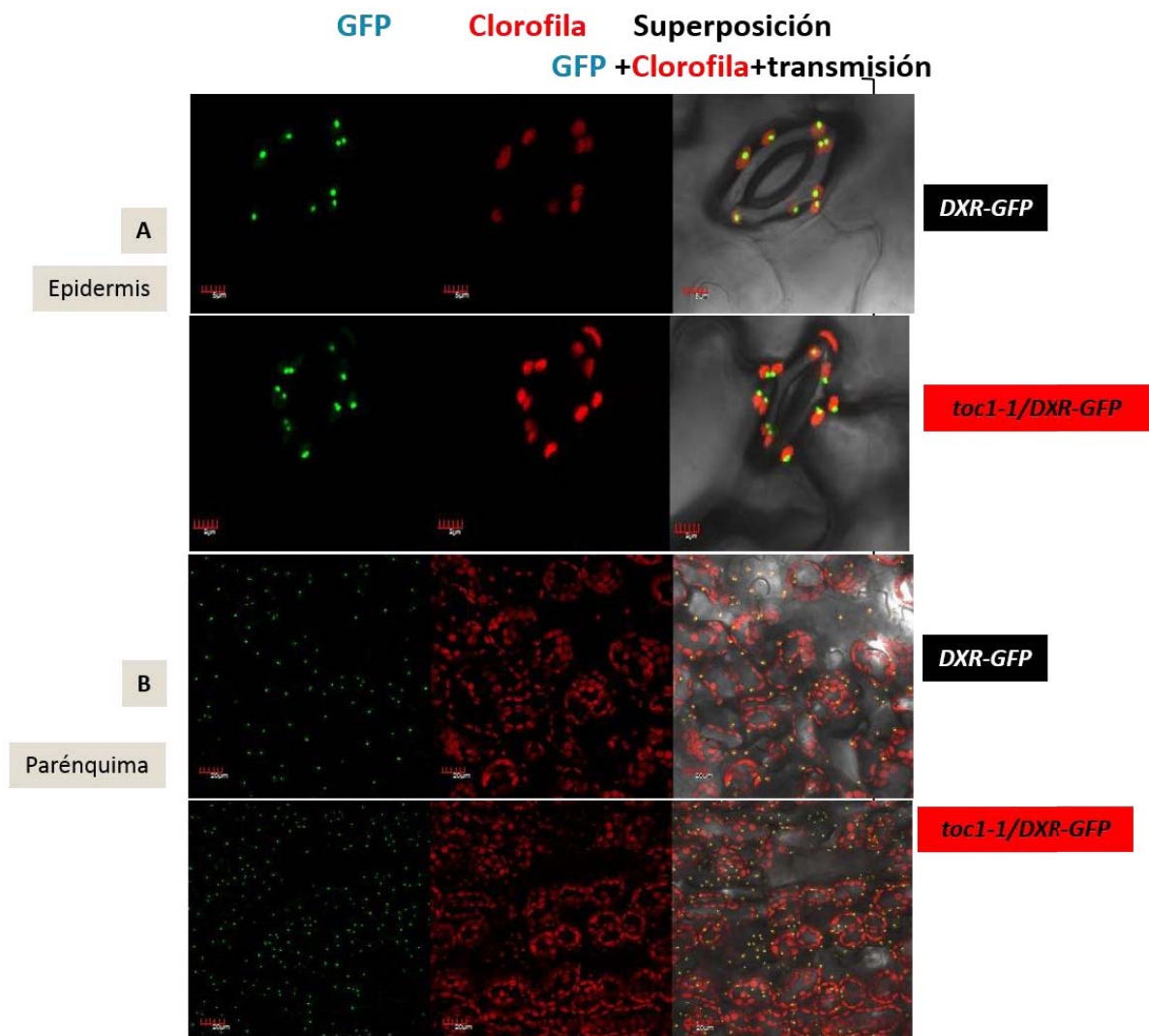


Figura 29. Niveles de DXR y DXR-GFP en las líneas sobreexpresoras 35S:DXR (DXR) y 35S:DXR-GFP (DXR-GFP). (A). Cuantificación por *Seedling Establishment* (%SE) de la resistencia a 80 µM de FSM de las líneas DXR #2, #3 y DXR-GFP #13, #14. (B). Niveles de proteína DXR, DXR-GFP y DXR+(DXR-GFP) (la suma de ambas) de estas líneas. (C) Niveles de resistencia relativa a 60 y 80 µM de FSM (resistencia relativa/niveles de proteína DXR) de las líneas DXR y DXR-GFP. Se representan las medias y el error estándar de n=3 experimentos.

1.8.2 DXR-GFP se localiza en acúmulos subplastídicos en mayor abundancia y en plastos pequeños en *toc1-1*.

La investigación de la localización subplastidial de DXR-GFP se llevó a cabo mediante el análisis por microscopía láser confocal de las líneas sobreexpresoras de DXR-GFP *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP*. Las imágenes revelaron que DXR-GFP se localiza en acúmulos discretos dentro de los estomas de ambas líneas transgénicas (Figura 30) de ambas líneas transgénicas. La proteína fluorescente DXR-GFP se podía observar también en una localización similar en algunos en plastos pequeños del parénquima. Sin embargo, la mayoría de cloroplastos desarrollados del parénquima mostraron niveles mucho menores de fluorescencia y una distribución de la misma más homogénea, compatible con la presencia de DXR en el estroma cloroplastídico.



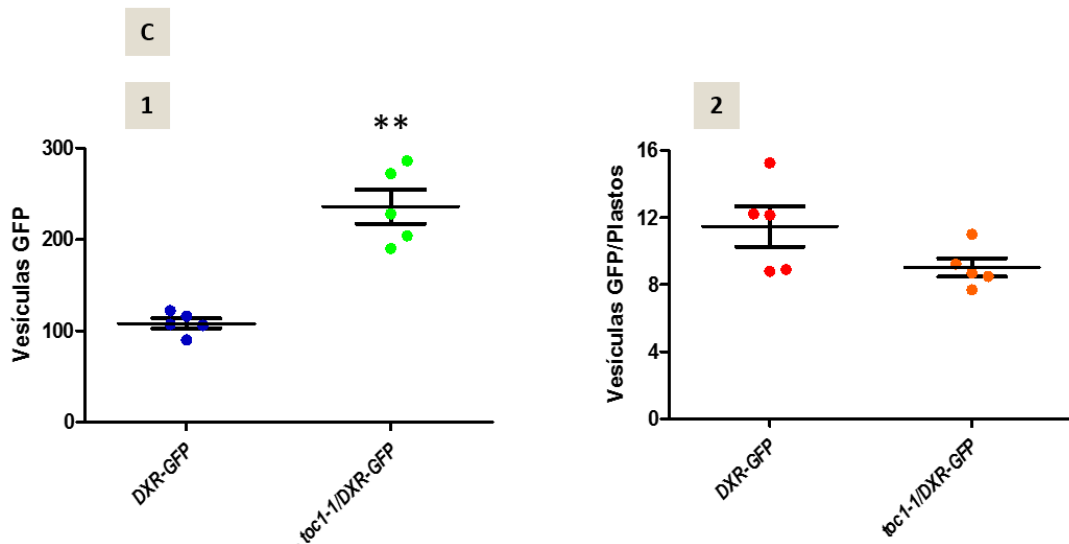


Figura 30. Localización de la proteína DXR-GFP en fondo *wt* y *toc1-1*.(A). Se muestra un estoma de la epidermis del haz de un cotiledón de plántulas de 10-12 días por microscopía confocal de las líneas *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*. (B) Parénquima en empalizada por microscopía confocal de las líneas *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*. (C) parénquima se analizaron cinco imágenes realizadas en las mismas condiciones para las dos líneas transgénicas. Se contaron el número de partículas con señal GFP y se representan en el gráfico (C.1) (**Test *t-student* $p < 0.01$); se estableció también una relación entre el número de partículas GFP y de cloroplastos (señal clorofila) en el gráfico (C.2) pero las diferencias no resultaron significativas.

Se había visto que a nivel molecular la línea *toc1-1/DXR GFP* presenta más proteína DXR-GFP que la línea hermana *DXR-GFP* (Figura 26) sin embargo, esta diferencia no parecía deberse a una mayor acumulación de DXR-GFP por cloroplasto, ya que se detectó diferencia en la intensidad de GFP. Para establecer si los mayores niveles de DXR-GFP en las plantas *toc1-1/DXR GFP* se debían a la presencia de más cloroplastos con acúmulos discretos de DXR-GFP, se cuantificó el número de acúmulos total y relativo (por plasto) en cinco imágenes de $150\mu\text{m}^2$ de la zona del parénquima de plántulas de estas líneas tomadas con el mismo objetivo y rango espectral, mediante la herramienta informática Image J. En la línea *toc1-1/DXR GFP* se encontraron más partículas GFP (DXR-GFP) que en la línea hermana *DXR-GFP* (Figura 30). Puesto que en las imágenes analizadas también había más plastos en la línea *toc1-1/DXR GFP*, una posible explicación a que hubiera mayor número de partículas DXR-GFP en la línea *toc1-1/DXR GFP* podría ser la presencia de un mayor número de plastos pequeños que expresan DXR-GFP en las células de la línea *toc1-1/DXR GFP* comparada con la línea *DXR-GFP*. Para confirmar esta posibilidad, se contaron el número de plastos en las mismas imágenes y se estableció una relación entre el número de partículas GFP y número de plastos. En este caso no se

observaron diferencias entre *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* (Figura 30), por tanto se razonó que los plastos en *toc1-1/DXR-GFP* podían ser más pequeños que los plastos en la línea hermana *DXR-GFP*. Para ello se midió el tamaño de los plastos en estas líneas y para confirmar que estas diferencias de tamaño entre *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* no se debían a la sobreexpresión de *DXR-GFP* se midió también el tamaño de los plastos en *toc1-1* y wt (C24) (Figura 31). Efectivamente, los resultados mostraron que los plastos en fondo genético *toc1-1* y *toc1-1/DXR-GFP* son más pequeños que en fondo wt (C24) y *DXR-GFP*, lo que podría sugerir un efecto de *TOC1* sobre la división plastídica.

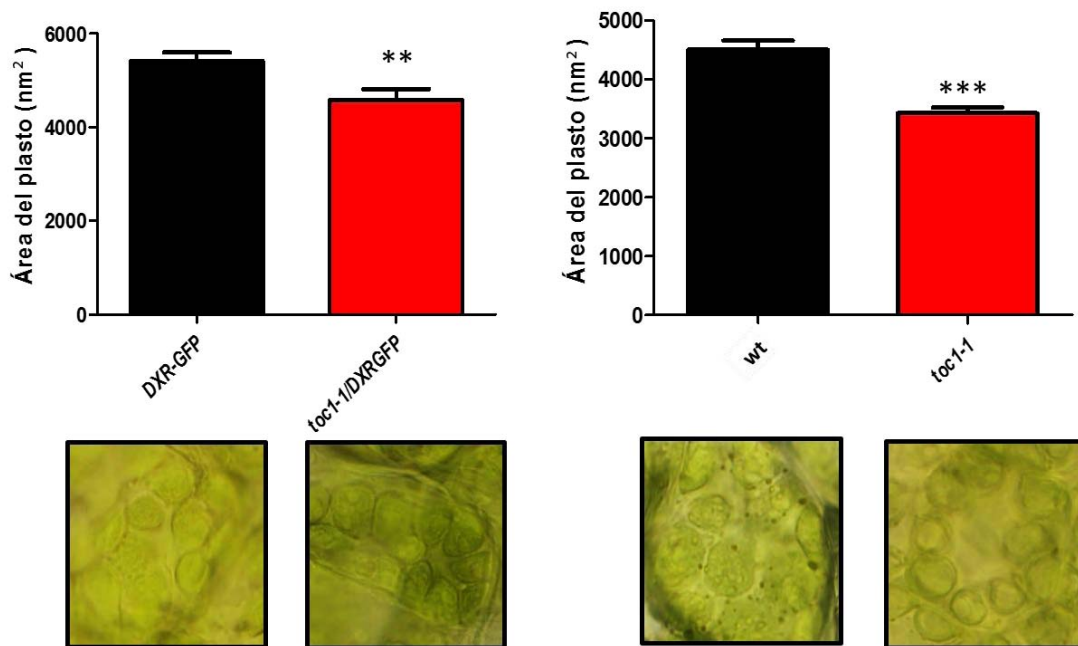


Figura 31. Tamaño de los plastos (área) de las líneas wt, *toc1-1*, *DXR-GFP* y *toc1-1/DXR-GFP*. Cuantificación del área de los plastos e imágenes de los plastos tomadas por microscopía. Test *t-student* *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

1.8.3 La sobreexpresión de *DXR-GFP* causa la formación de vesículas en los plastos.

Hasta el momento se ha propuesto, mediante aproximaciones proteómicas y de inmunolocalización, que *DXR* se localiza en el estroma plastídico (Joyard *et al.* 2009; Carretero-Paulet *et al.* 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos anteriormente sitúan a *DXR-GFP* localizada fundamentalmente en acúmulos discretos en el interior de plastos más pequeños que los cloroplastos desarrollados (Figura 30). Se han descrito, mediante técnicas de microscopía y abordajes proteómicos, unos suborgánulos plastídicos de origen tilacoidal denominados plastoglóbulos (Austin *et al.* 2006; Vidi *et*

Resultados

al. 2006). La sobreexpresión de una proteína de los plastoglóbulos, plastoglobulina34 (PGL34), fusionada a la proteína fluorescente YFP (PGL34-YFP) presenta una localización muy similar a DXR-GFP (Figura 32). Para investigar si DXR-GFP se localizaba en plastoglóbulos se realizaron cruces entre las líneas *toc1-1/DXRGFP* y *DXR-GFP* con la línea de sobreexpresión constitutiva de *PGL34-YFP*. Puesto que GFP e YFP se pueden observar por microscopía láser confocal en diferentes longitudes de onda (GFP=495-510 nm; YFP=560-600 nm), se pudieron identificar ambas proteínas de forma separada y sin solapamiento de fluorescencia en las líneas descendientes de estos cruces. En dichas líneas se observó que DXR-GFP y PGL34-YFP no colocalizaban en los plastoglóbulos ya que PGL34-YFP aparecía en un acúmulo muy bien localizado (previsiblemente correspondiente a plastoglóbulos) mientras que DXR-GFP perdía su acumulación característica en gránulos intraplastídicos y pasaba a distribuirse de forma homogénea en los plastos (Figura 32).

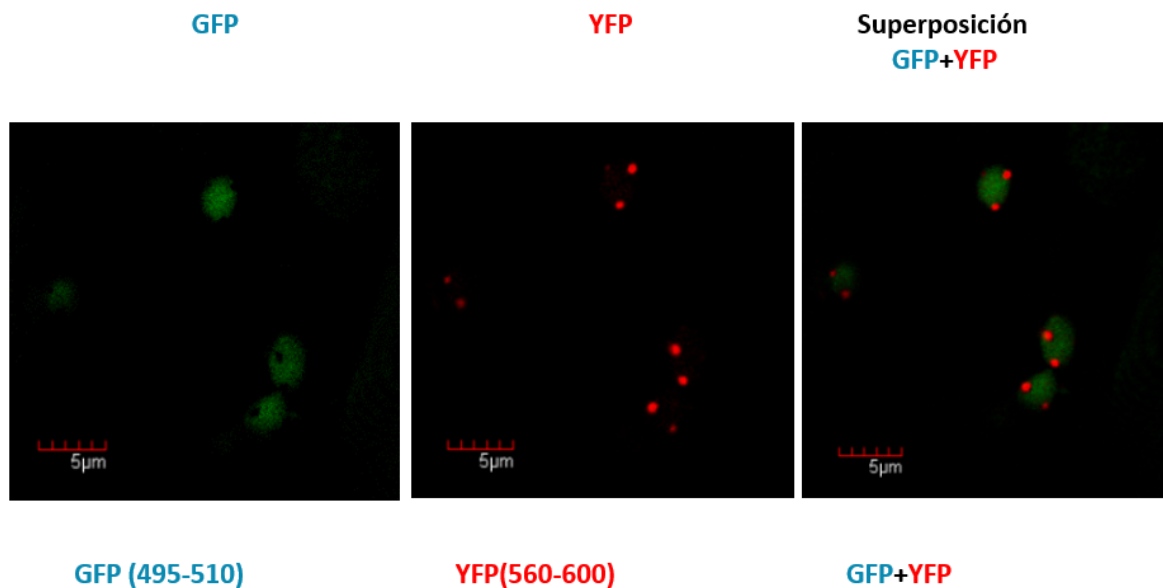


Figura 32. Imágenes de plastos de un individuo F2 *PGL34-YFP* x *DXR-GFP* por microscopía láser confocal. En verde la señal emitida por DXR-GFP y en rojo la señal emitida por PGL34-YFP. Se muestran también la superposición de las dos señales.

Puesto que la coexpresión con otras proteínas plastídicas parecía eliminar la opción que los acúmulos de DXR-GFP observados en las líneas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* se trataran de plastoglobulos se optó por investigar la naturaleza de estos acúmulos mediante Inmunolocalizaciones por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM). Se utilizó un anticuerpo primario contra DXR sobre secciones de 100nm de cotiledones de plántulas de las líneas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* crecidas en día largo (LD) y recogidas en la primera hora del día. Por TEM se identificaron *spots* debido a la unión de la proteína A-Oro con el anticuerpo contra DXR unido a la proteína DXR-GFP o DXR (Figura 33). Estos *spots* se encontraron principalmente en vesículas plastídicas *electrondensas* de un diámetro promedio de 500nm, aunque también se hallaron algunos *spots* en el estroma plastídico. Los plastos de plantas silvestres no mostraban señal con el anticuerpo ni vesículas intraplastídicas (Figura 33). Algunas de las vesículas donde se localizaba DXR/DXR-GFP aparentemente parecían separarse de los plastos. En la (Figura 33) se presentan imágenes a diferentes escalas de plastos y vesículas de las inmunolocalizaciones de DXR/DXR-GFP (*spots* en negro). Además de la existencia de estas vesículas intra y extraplastídicas con DXR el análisis de estas muestras permitió observar que los tilacoides de los plastos de las líneas de sobreexpresión estaban deformados o aparecían más separados en comparación con la línea wt (Figura 33,34). Los gránulos de almidón también presentaban un aspecto roto o quebrado en ambas líneas sobreexpresoras de DXR-GFP ya que aparecen zonas dispersas de baja densidad electrónica (blancas) que podrían corresponder al almidón en los plastos de estas líneas.

Los resultados obtenidos mediante microscopía confocal en los cruces *PGL34-YFP x DXR-GFP* (Figura 32) en los que se observa una localización dispersa en el plasto de DXR-GFP con respecto a las líneas *DXR-GFP* donde DXR-GFP se localiza en un acúmulo y los resultados de la localización de DXR-GFP en las líneas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* donde se aprecian vesículas contenedoras de DXR-GFP sugieren que estos acúmulos o vesículas se deben a un efecto de la sobreexpresión de DXR-GFP, ya que no se observan estas vesículas en líneas wt (C24). La alteración adicional que aparentemente sufren los plastos de las líneas *toc1-1/DXR-GFP* podría deberse a que la alteración de TOC1 causa alteraciones morfológicas en los plastos, y que estas alteraciones podría estar adicionalmente promovidas por la sobreexpresión de DXR-GFP.

Resultados

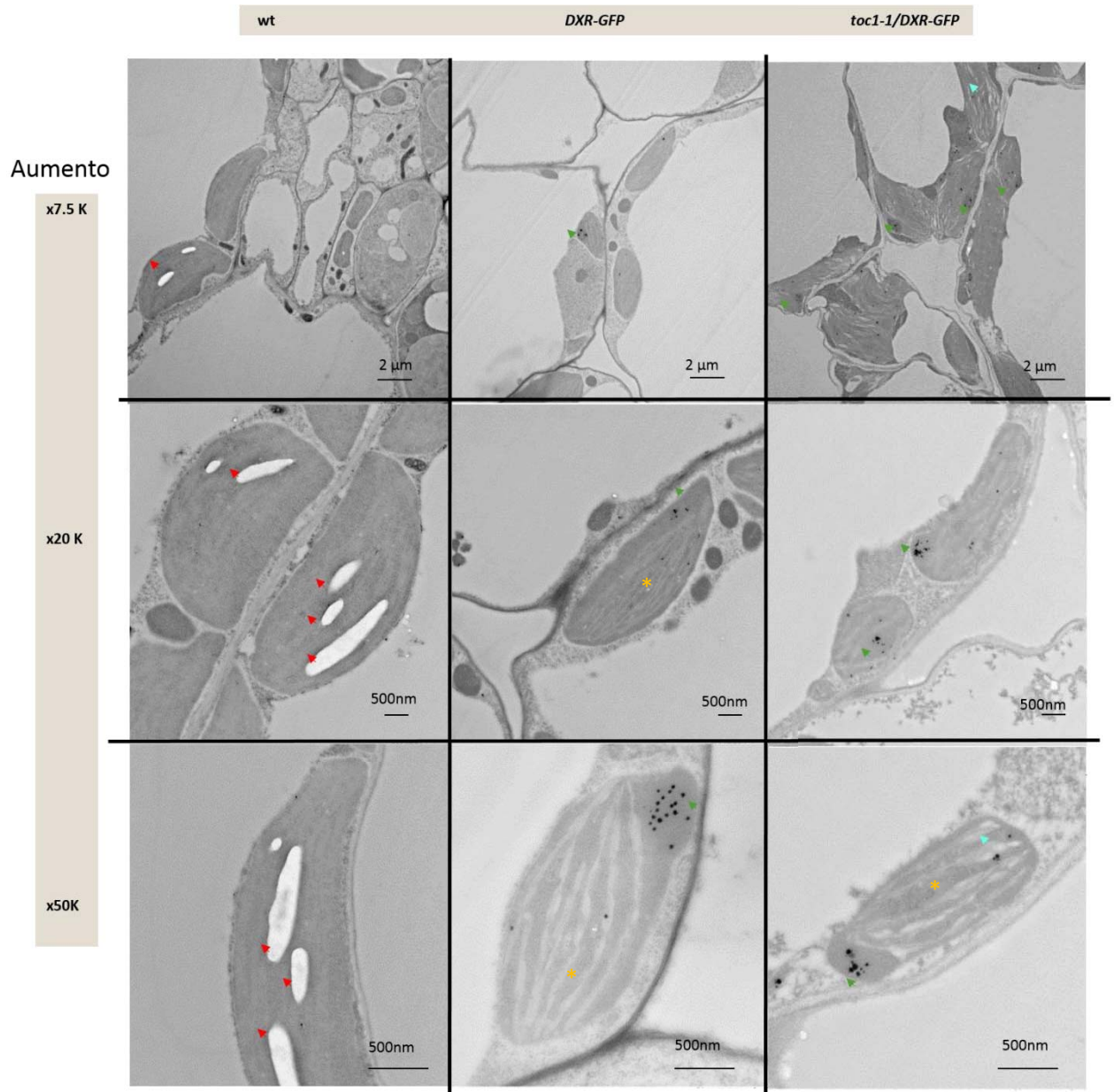


Figura 33. Inmunolocalización por TEM de proteína DXR y DXR-GFP y morfología en líneas wt, DXR-GFP y *toc1-1/DXR-GFP* a diferentes aumentos. Las flechas verdes indican las vesículas electrondensas donde se concentra la mayor parte de proteína DXR/DXR-GFP, las flechas rojas los gránulos de almidón bien definidos en el wt, las azul celeste los posibles gránulos de almidón dispersos observados en *toc1-1/DXR-GFP*. Se ha marcado con un asterisco naranja los posibles tilacoides alterados y abultamientos en las líneas sobreexpresoras con respecto al wt.

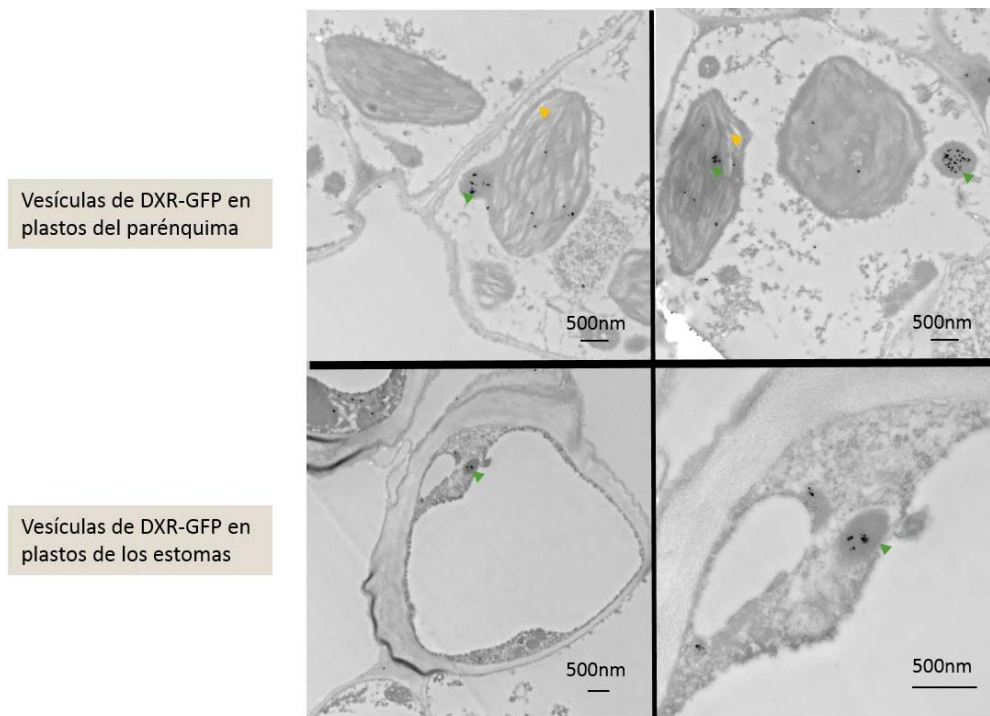


Figura 34. Morfología y detalle de las vesículas de células de los cotiledones de un individuo de la línea *toc1-1/DXR-GFP*. Se muestran las vesículas presentes en dos plastos de células de los vasos del parénquima y la presencia de vesículas en una célula estomática de la epidermis. Las flechas verdes indican las vesículas electrondensas donde se concentra la mayor parte de proteína DXR/DXR-GFP y en naranja los abultamientos observados en los plastos de estas líneas sobreexpresoras.

2.1 Regulación de la conformación nativa de DXR.

La segunda parte del trabajo se centró en la búsqueda de posibles mecanismos reguladores postranscripcionales de DXR. Para ello se llevó a cabo a un estudio *in silico* para ver posibles interactores de DXR con otras proteínas plastídicas utilizando la base de datos *Arabidopsis Interactions Viewer* que contiene 70944 proteínas interactoras predichas y 29777 proteínas interactoras confirmadas; esta base de datos utiliza datos de la Universidad de Southern Illinois para la predicción de proteínas interactoras y datos procedentes del Biomolecular Interaction Network Database (BIND) (datos de *screenings* de doble híbrido en levadura y métodos bioquímicos tradicionales), microarrays de proteína de *A.thaliana* (Popescu *et al.* 2007; Popescu *et al.* 2009), y unas 1190 fuentes más de literatura. Se identificaron tres proteínas capaces de interactuar con DXR en el sistema de doble híbrido de levadura y que se presentan en la Tabla 30. Entre ellas se encontró una chaperona HSP60 (*Heat Shock Protein 60* o Cpn60) que

Resultados

estaría localizada en vacuola, citoplasma, membrana plasmática, mitocondria o plastos; la proteína AtcpRRF (*Ribosome Recycling Factor*) que se ubicaría en plastos y la proteína APT4 (*Adenine Phosphoribosyl Transferasa 4*) de localización desconocida. Entre estas proteínas, las HSP60 o Cpn60 podrían desempeñar un papel regulador sobre DXR ya que se trata de chaperonas moleculares cuya función es la de plegar, ensamblar, proteger o guiar proteínas plastídicas (Flores-Perez y Jarvis 2013).

AGI	Proteína	Localización subcelular
At2g33210	HSP60-2/ <i>heat shock protein 60-2</i>	vacuola;plasto; citoplasma; membrana plasmática;mitocondria
At3g63190	AtcpRRF/ <i>ribosome recycling factor</i>	Plasto
At4g12440	APT4/ <i>adenine phosphoribosyl transferase 4</i>	N/A

Tabla 30. Proteínas identificadas mediante la base de datos *Arabidopsis Interaction Viewer* (http://bar.utoronto.ca/interactions/cgi-bin/arabidopsis_interactions_viewer.cgi).

La familia de las chaperonas Cpn60 incluye proteínas con y sin péptido de tránsito para plastos o mitocondrias (Hill y Hemmingsen 2001). En plastos de *A.thaliana* se han descrito seis subunidades en total, dos de tipo alfa (α) y cuatro tipo beta (β) que operan coordinadamente junto con las co-chaperonas plastídicas Cpn10 y Cpn20 (Hill y Hemmingsen 2001) para el plegamiento de sustratos específicos (Peng *et al.* 2011). Aunque ninguna de ellas (Tabla 6) se corresponde con la identificada por doble híbrido (Tabla 30) es posible que la homología de secuencia permita que DXR también pueda interactuar con al menos alguna Cpn60 plastídica se corresponde con la encontrada por doble híbrido

Además, trabajos previos en el laboratorio habían demostrado que la actividad de DXS está regulada por chaperonas moleculares tipo Hsp40 (DnaJ), Hsp70 y Hsp100 (Pulido P. *et al.*, 2013) por lo cual parecía plausible que otros enzimas de la vía del MEP estuvieran regulados por mecanismos análogos. Por tanto, se llevó a cabo un estudio más profundo de la posible interacción de DXR con las chaperonas Cpn60 presentes en plastos de *A.thaliana* (Tabla 6).

2.2 DXR interacciona *in vivo* con las isoformas plastídicas de la familia Cpn60.

Para estudiar si DXR y alguna de las isoformas de Cpn60 presentes en plastos podían interaccionar se realizaron experimentos de doble híbrido (*yeast two hybrid*, Y2H) en levadura.

La técnica basada en el sistema de YH2 en levadura se utiliza para identificar o confirmar interacciones proteína-proteína. Este sistema se sirve de una cepa de levadura modificada genéticamente para ser defectiva en la biosíntesis de ciertos nutrientes (aminoácidos como leucina, triptófano, adenina, histidina). Cuando estas cepas se cultivan en medio que carecen de estos nutrientes, no son capaces de sobrevivir. Esta cepa mutante es capaz de incorporar ADN foráneo vehiculado por un plásmido. Los plásmidos son diseñados para producir un producto proteico en el cual un dominio de unión al ADN (*DNA-binding domain*, BD) es fusionado con una de las proteínas (cebo) mientras que otro plásmido es diseñado para producir otro producto proteico en el que el dominio de activación de la transcripción (*activation domain*, AD) es fusionado con la otra proteína (presa). En nuestro caso se utilizaron los dominios BD y AD del factor de transcripción GAL4 se a estudiar.

Si las proteínas cebo y presa interaccionan (por ejemplo, uniéndose), se hace posible la conexión indirecta entre los dominios AD y BD, haciendo que el complejo se pueda unir al promotor de genes reportero y de activar su transcripción (en nuestro caso los genes reporteros de la cepa AH109 fueron *lac Z*, *HIS3* y *ADE2*). Si por el contrario no interaccionan, no se da la transcripción de los genes reporteros. De esta manera, una interacción entre las proteínas se puede asociar a un cambio fenotípico en la célula, que en nuestro caso pasa a ser capaz de crecer en medio sin los aminoácidos His y Ade.

Se ensayaron las posibles interacciones de DXR con Cpn60 α 1, Cpn60 α 2, Cpn60 β 1 y Cpn60 β 4; no se pudo ensayar las interacciones con Cpn60 β 2 y Cpn60 β 3 debido a que se presentaron dificultades técnicas para el clonaje. En cualquier caso, las isoformas Cpn60 β 2 y Cpn60 β 3 presentan una gran similitud de secuencia con Cpn60 β 1 (Hill y Hemmingsen 2001). Como cebo, se ensayaron dos versiones de DXR (Figura 35): una con el extremo N-terminal libre, (clonada en el vector p4BD) y otra con el extremo C-terminal libre (clonada en el vector pGBKT7). Como presa (fusionadas al AD de GAL4) se ensayaron las proteínas Cpn60 α 1, Cpn60 α 2, Cpn60 β 1 y Cpn60 β 4 clonadas en el vector

Resultados

pGADT7 (Figura 35). Como control positivo se usó como presa la propia proteína DXR fusionada a AD (Figura 35) ya que se ha descrito que DXR forma dímeros *in vitro* (Takahashi *et al.* 1998). Aunque sólo se observó interacción DXR-DXR cuando el N-terminal de DXR está libre en el BD y no con la versión BD-DXR, este experimento mostró que las condiciones experimentales eran adecuadas para detectar proteínas interactoras de DXR. Sin embargo en ningún caso se observó interacción positiva de DXR con ninguna de las isoformas Cpn60 (Figura 36). Para la transformación de levaduras se utilizaron tanto el método de cotransformación (cepa AH109) como de *mating* (cepas pJ694 alfa y YM4271a) con iguales resultados, aunque sólo se exponen los resultados obtenidos por cotransformación.

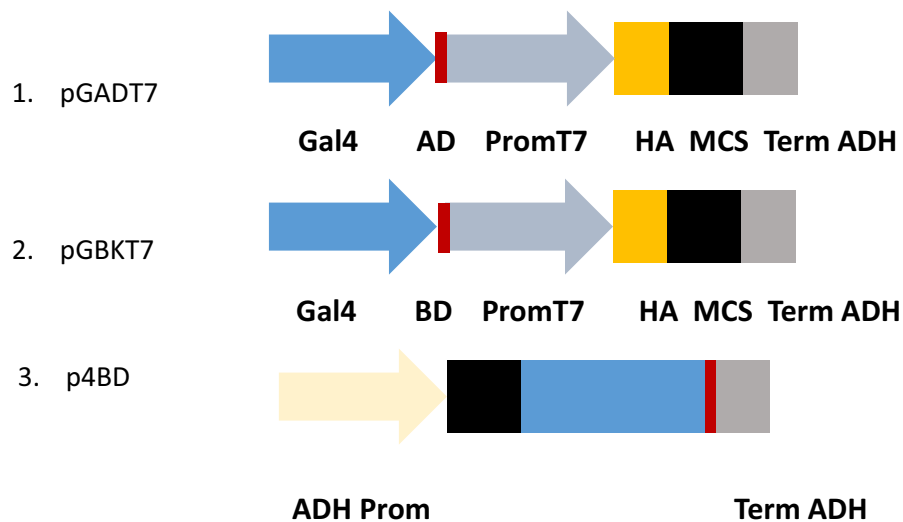


Figura 35. Esquema de las construcciones utilizadas para el clonaje de las secuencias codificantes para las proteínas a ensayar por Y2H. Se indican los promotores Gal4, Promotor T7 y Promotor ADH; los dominios de unión AD (*activation domain*) y BD (*binding domain*) así como la secuencia *tag* HA, el MCS (*multi cloning site*) y el terminador ADH de los vectores (1) pGADT7, (2) pGBKT7 y (3) p4BD.

Resultados

























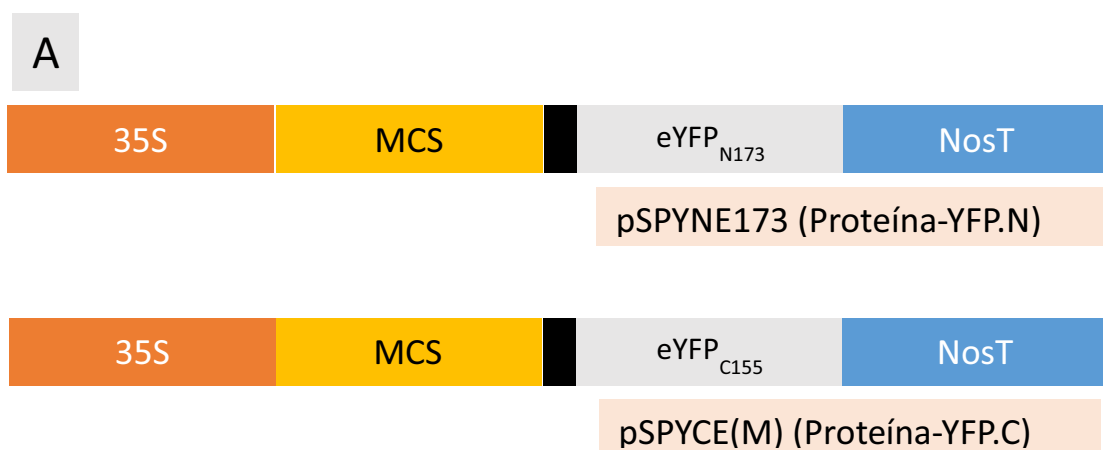
Vector BD	Proteína de fusión	Vector AD	Proteína de fusión	LT-	AHLT-
p4BD	-	pGADT7	-		
p4BD-DXR	DXR-BD	pGADT7-DXR	DXR-AD		
pGBKT7	-	pGADT7	-		
pGBKT7-DXR	BD-DXR	pGADT7-DXR	DXR-AD		
p4BD-DXR	DXR-BD	pGADT7-Cpn60α1	Cpn60α1-AD		
pGBKT7-DXR	BD-DXR	pGADT7-Cpn60α1	Cpn60α1-AD		
p4BD-DXR	DXR-BD	pGADT7-Cpn60α2	Cpn60α2-AD		
pGBKT7-DXR	BD-DXR	pGADT7-Cpn60α2	Cpn60α2-AD		
p4BD-DXR	DXR-BD	pGADT7-Cpn60β1	Cpn60β1-AD		
pGBKT7-DXR	BD-DXR	pGADT7-Cpn60β1	Cpn60β1-AD		
p4BD-DXR	DXR-BD	pGADT7-Cpn60β2	Cpn60β2-AD		
pGBKT7-DXR	BD-DXR	pGADT7-Cpn60β2	Cpn60β2-AD		

Figura 36. Análisis de la interacción de DXR con isoformas plastídicas de Cpn60 por Y2H. Se presentan las combinaciones con el N terminal libre de DXR (DXR-BD) y C terminal libre (BD-DXR) de DXR en el Dominio de Unión (Binding Domain, BD) ; en el Dominio de Activación (Activation Domain, AD) se ensayaron las isoformas de las Cpn60s indicadas. En la columna de medio mínimo (SD) suplementado con aminoácidos excepto Leucina/Triptófano (LT-) se presentan las células de la cepa de *Saccharomyces* AH9 cotransformadas mientras que en la columna de medio mínimo (SD) suplementado con aminoácidos excepto Adenina/Histidina/Leucina/Triptófano (AHLT-) sólo se espera crecimiento cuando hay interacción de las proteínas.

Resultados

Como estrategia alternativa para estudiar la posible interacción de DXR con proteínas Cpn60 plásticas *in vivo* se realizaron estudios de Complementación Bimolecular Fluorescente (BiFC). Esta técnica está basada en la fusión de una proteína de interés a la mitad de la proteína fluorescente GFP o YFP y la posible proteína interactora a la otra mitad de la proteína fluorescente GFP o YFP; si las proteínas testadas interaccionan, la proteína fluorescente GFP o YFP se reconstruye de forma que puede observarse fluorescencia. En este experimento se utilizaron las dos posibles combinaciones de fusión con la proteína YFP que se muestran en la Figura 37 y Figura 38, esto es, la fusión de YFP en N-terminal o C-terminal libre para cada una de las proteínas DXR y Cpn60 que se ensayaron. Para las combinaciones DXR-YFP.N+Cpn60-YFP.C sólo se observó fluorescencia para las posibles interacciones DXR-Cpn60 α 1, DXR-Cpn60 β 1 y DXR-Cpn60 β 2, mientras que para las combinaciones DXR-YFP.C+Cpn60-YFP.N se observó fluorescencia en todas ellas (Figura 37). Se observó fluorescencia especialmente intensa por BiFC entre las proteínas DXR y Cpn60 α 1.

Puesto que la interacción Cpn60 α 1-DXR fue la más intensa observada, se intentó comprobarla también en extractos de proteína mediante técnicas de inmunoprecipitación. Se generaron líneas transgénicas de sobreexpresión constitutiva Cpn60 α 1-GFP. Extractos proteicos de estas líneas transgénicas se utilizaron para intentar recuperar proteínas unidas a Cpn60 α 1-GFP al inmunoprecipitar con un anticuerpo contra GFP. Tras la elución de las posibles proteínas unidas a Cpn60 α 1, la mezcla se separó en geles de acrilamida y se realizó un *western blot* contra la proteína DXR. Desafortunadamente, no se identificó DXR en estos experimentos de inmunoprecipitación.



B

Construcciones para BiFC	DXR-YFP.N	DXR-YFP.C
DXR-YFP.N	0	+
DXR-YFP.C	+	0
Cpn60 α 1-YFP.C	+	0
Cpn60 α 2-YFP.C	-	0
Cpn60 β 1-YFP.C	+	0
Cpn60 β 2-YFP.C	+	0
Cpn60 β 3-YFP.C	-	0
Cpn60 β 4-YFP.C	-	0
Cpn60 α 1-YFP.N	0	+
Cpn60 α 2-YFP.N	0	+
Cpn60 β 1-YFP.N	0	+
Cpn60 β 2-YFP.N	0	+
Cpn60 β 3-YFP.N	0	+
Cpn60 β 4-YFP.N	0	+

Figura 37. Análisis de la interacción de DXR con isoformas plásticas de Cpn60 por BiFC. (A) Construcciones utilizadas para el clonaje de los genes codificantes para DXR y las isoformas Cpn60. (B) Resumen de las combinaciones de las construcciones testadas y resultados; “+” indica interacción positiva (fluorescencia), “-” indica no interacción (no fluorescencia), “0” indica no ensayado. Imágenes representativas de las interacciones se exponen en la figura 38.

Resultados

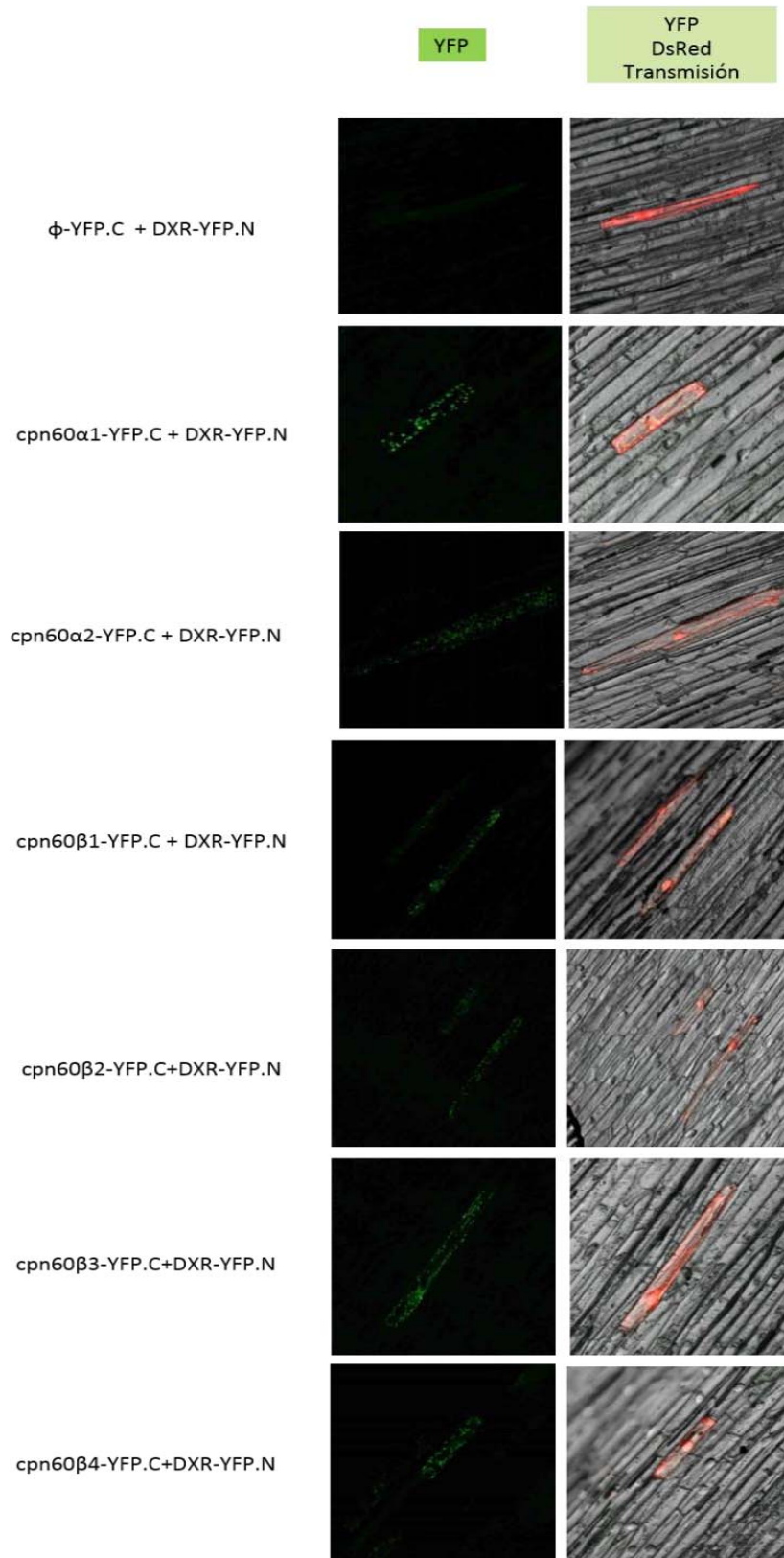


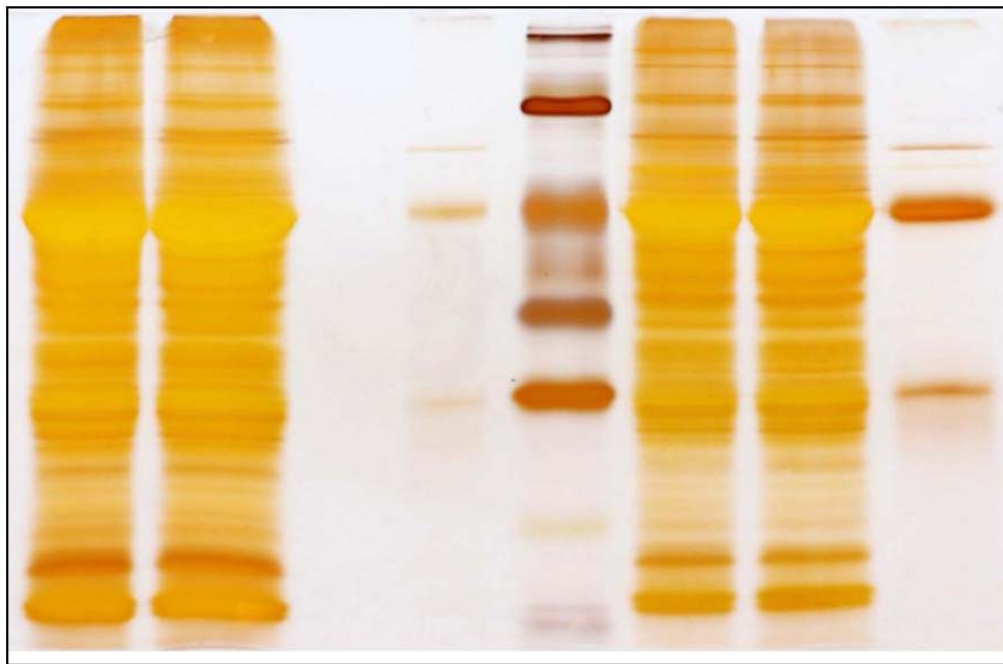
Figura 38. Imágenes representativas de las interacciones entre las isoformas Cpn60-YFP.C y DXR-YFP.N por BiFC. Se muestran las interacciones con las combinaciones de proteína Cpn60-YFP.C+DXR-YFP.N para las que, en todas ellas, se observó fluorescencia YFP.

Resultados

Por otro lado, a prósito de investigar si existía alguna proteína que se uniera diferencialmente a DXR en el fondo *toc1-1* con respecto al wt se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación con líneas hermanas sobreexpresoras de DXR-GFP en fondo wt (*DXR-GFP*) y en fondo *toc1-1* (*toc1-1/DXR-GFP*) obtenidas por cruzamiento a partir de una línea 35S: DXR-GFP y *toc1-1*. Estas líneas se utilizaron por dos razones: la primera de ellas fue la de sobreexpresar DXR-GFP con el fin de aumentar la probabilidad de recuperarla y la segunda de obtener una proteína marcada (DXR-GFP) que pudiera ser capturada fácilmente mediante un anticuerpo contra GFP unido a una resina. La captura de proteína DXR-GFP mediante el anticuerpo contra GFP unido a una resina y posterior elución de proteínas unidas a DXR-GFP permite identificar posibles proteínas unidas a DXR. Tras este protocolo de inmunoprecipitación se utilizaron varias técnicas para identificar posibles proteínas asociadas a DXR-GFP:

- 1) Por tinción con AgNO₃ sobre un gel de acrilamida se identificaron las proteínas del peso molecular aparente de DXR-GFP y DXR que fueron eluidas a partir de la recuperación de proteínas unidas a DXR-GFP (Figura 39). Estos resultados estaban indicando que probablemente DXR-GFP y DXR se unían a DXR-GFP, lo que indicaría la formación *in vivo* de dímeros de DXR.
- 2) Para confirmar que efectivamente las bandas identificadas por tinción de AgNO₃ eran DXR y DXR-GFP respectivamente se realizó un *western blot* contra DXR de las fracciones eluidas. Los resultados muestran que las bandas identificadas corresponden a DXR y DXR-GFP lo que apunta a que DXR dimeriza *in vivo*, que confirma los resultados obtenidos por Y2H y BiFC (Figura 39).

A

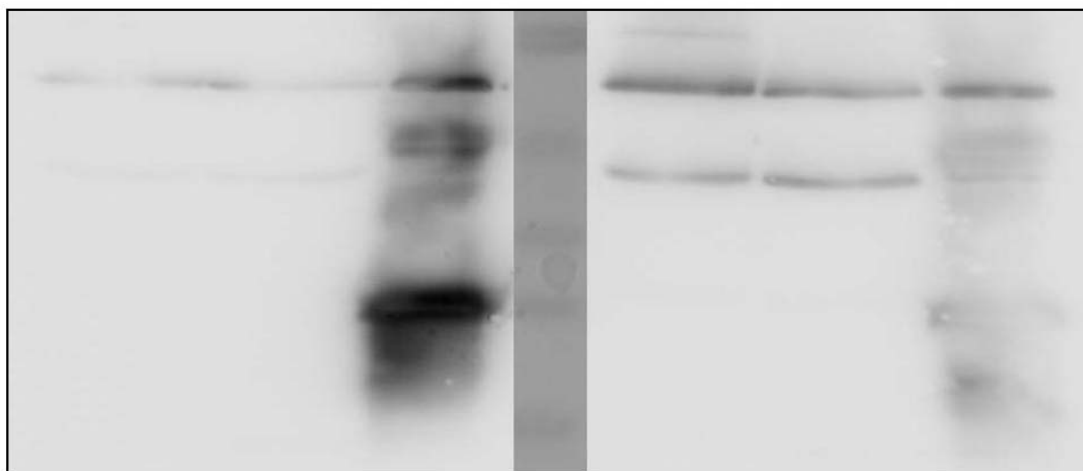


Input Unbound Elution Input Unbound Elution

B

toc1-1/DXR-GFP

DXR-GFP



Input Unbound Elution Input Unbound Elution

toc1-1/DXR-GFP

DXR-GFP

Figura 39. Inmunoprecipitación de la proteína DXR-GFP. (A) Gel de acrilamida teñido con AgNO_3 y (B) *western blot* contra DXR de extractos de proteína de las líneas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* inmunoprecipitados con un anticuerpo contra GFP. En los carriles de proteína se ha señalado el *input* de fracción proteica inicial, el *unbound* o fracción proteica no adherida al anticuerpo o resina y *elution* (E) o elución de proteínas adheridas a la resina con el anticuerpo.

2.3 Screening de mutantes de *A. thaliana* de subunidades Cpn60 con fenotipo a FSM.

Los resultados obtenidos en los ensayos de BiFC indicaron que todas las subunidades Cpn60 pueden interactuar *in vivo* con DXR. Para estudiar el posible papel de esta interacción para la actividad DXR, se buscaron los mutantes disponibles para los respectivos genes y se escogieron los que se muestran en la Tabla 31. En la Figura 40 se muestran los sitios de inserción del T-DNA de los mutantes o bien las mutaciones puntuales. Para establecer el efecto de la pérdida de función de estos genes sobre la actividad DXR se crecieron los mutantes en presencia de FSM.

Subunidad	AGI	Alelo	Línea mutante	Mutación	referencia	Viabilidad en homocigosis
Cpn60 α 1	At2g28000	<i>Cpn60α1-1</i>	<i>arc2 (Ler)</i>	Sustitución: GCT por GTT (cambio de aminoácido)	Suzuki et al 2009	Sí
		<i>Cpn60α1-2</i>	SALK_006606 (Col-0)	Inserción de T-DNA (intrón)		No
Cpn60 α 2	At5g18820	<i>Cpn60α2-1</i>	SALK_144574 (Col-0)	Inserción de T-DNA (intrón)		No
		<i>Cpn60α2-2</i>	SALK_014823 (Col-0)	Inserción de T-DNA (exón)		No
		<i>Cpn60α2-3</i>	SALK_061417 (Col-0)	Inserción de T-DNA (exón)		No
Cpn60 β 1	At1g55490	<i>Cpn60β1-1</i>	<i>br04 (Col-0)</i>	Inserción de A (codón stop prematuro)	Suzuki et al 2009	Sí
		<i>Cpn60β1-2</i>	SAIL_852_B03 (Col-0)	Inserción de T-DNA (5'-UTR)	Suzuki et al 2009	Sí
Cpn60 β 2	At3g13470	<i>Cpn60β2</i>	SALK_014547 (Col-0)	Inserción de T-DNA (exón)	Suzuki et al 2009	Sí
Cpn60 β 3	At5g56500	<i>Cpn60β3-1</i>	SALK_099972C (Col-0)	Inserción de T-DNA (exón)		Sí
		<i>Cpn60β3-2</i>	SALK_090531C (Col-0)	Inserción de T-DNA (exón)		Sí
Cpn60 β 4	At1g26230	<i>Cpn60β4-1</i>	SALK_064887C (Col-0)	Inserción de T-DNA (exón)		Sí
		<i>Cpn60β4-2</i>	SALK_136518C (Col-0)	Inserción de T-DNA (intrón)		Sí

Tabla 31. Mutantes de *A. thaliana* seleccionados para este estudio.

Resultados

El mutante escogido para el estudio de la función de At2g28000 (*Cpn60 α 1*) fue el mutante pálido *arc2*, que da lugar a un cambio del aminoácido A342 por V y en consecuencia una proteína con pérdida parcial de función (Suzuki *et al.* 2009). La pérdida total de función en el mutante SALK_006606 (*Cpn60 α 1-2*) resulta en un fenotipo letal (Tabla 31). Los mutantes *arc2* presentaron un fenotipo de clara sensibilidad a FSM en comparación con su parental silvestre Ler (Figura 41, 42).

Los tres mutantes homocigotos escogidos para el estudio de la función de At5g18820 (*cpn60 α 2*) presentaron un fenotipo letal por lo que no pudo estudiarse el fenotipo de estas líneas en FSM (Figura 40).

Para el estudio de la función de At1g55490 (*cpn60 β 1*) se escogieron el mutante *br04* con una inserción puntual de A en el segundo exón que causa un codón de stop prematuro y el de inserción de T-DNA SAIL_852_B03 (*cpn60 β 1-2*) (Suzuki *et al.* 2009). Sin embargo, ninguno de los dos presentó diferencias en cuanto a resistencia a FSM en comparación con el wt (Col-0) (Figura 41). El mutante de inserción de SALK_014547 *Cpn60 β 2* escogido para el estudio de la función de At3g13470 (Suzuki *et al.* 2009) tampoco presentó resistencia a FSM con respecto al wt (Col-0) (Figura 41, 42) y lo mismo ocurrió con los mutantes escogidos para el estudio de la función de At5g56500, SALK_099972 (*cpn60 β 3-1*) y SALK_090531 (*cpn60 β 3-2*), y de At1g26230 (*cpn60 β 4*), SALK_064887 (*cpn60 β 4-1*) y SALK_136518 (*cpn60 β 4-2*) que no presentaron resistencia significativa a FSM. Como conclusión, la pérdida de función total de las dos subunidades α genera un fenotipo letal, mientras que la pérdida parcial genera un fenotipo pálido y resistencia reducida a FSM (en el caso de *arc2*). Los mutantes de las subunidades β presentan mayor variabilidad en cuanto a resistencia a FSM por lo que los valores de resistencia a FSM no son significativos en estas líneas (Figura 42).

Resultados

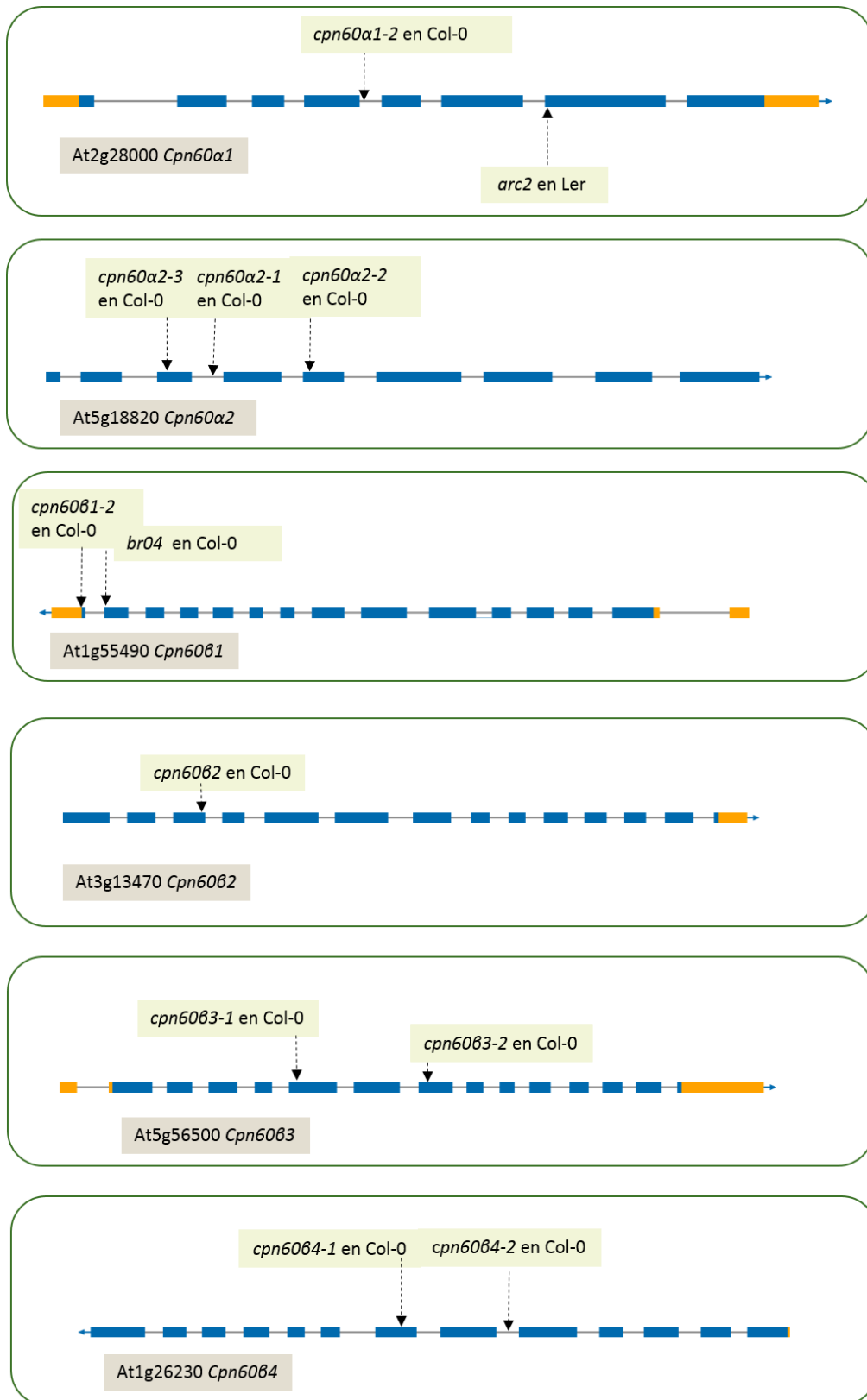


Figura 40. Inserciones de los mutantes escogidos para el estudio de los genes que codifican para las isoformas de Cpn60.

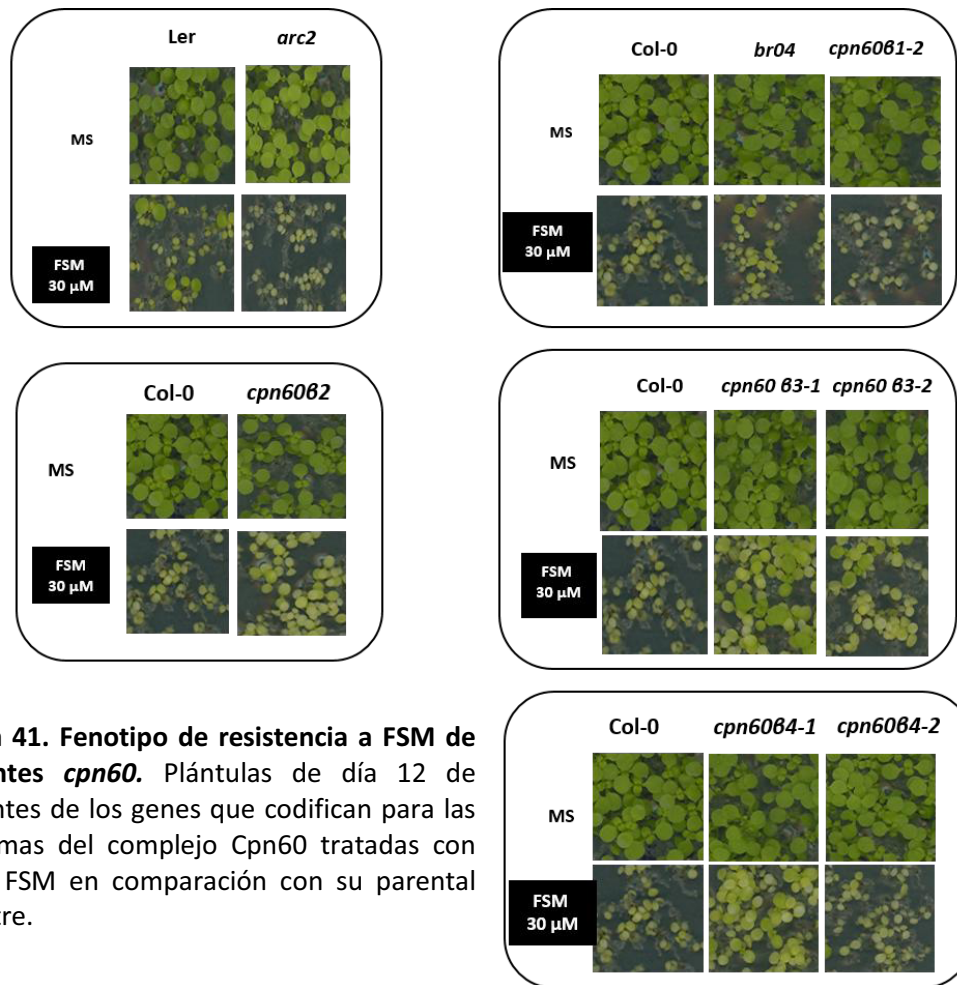


Figura 41. Fenotipo de resistencia a FSM de mutantes *cpn60*. Plántulas de día 12 de mutantes de los genes que codifican para las isoformas del complejo Cpn60 tratadas con MS y FSM en comparación con su parental silvestre.

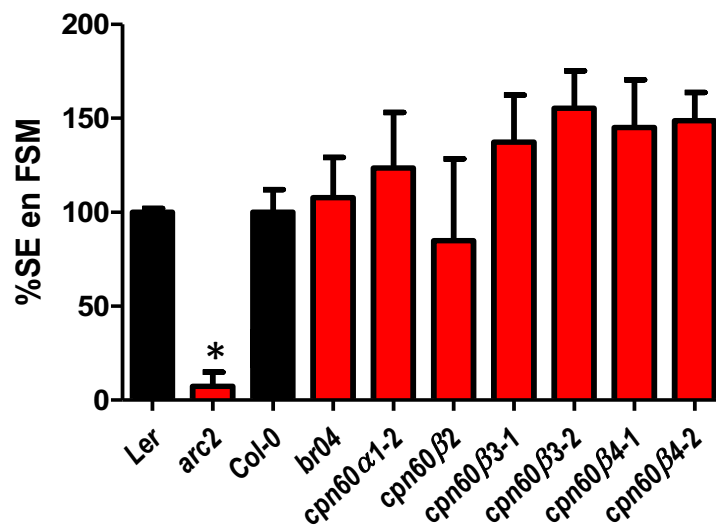


Figura 42. Resistencia a FSM de mutantes *cpn60*. Cuantificación de la resistencia a 30 μM de FSM por SE% de los mutantes de los genes de las isoformas de Cpn60 utilizados en este estudio (barras rojas) y sus respectivos wt (barras negras). **Test *t-Student* $p < 0.01$. Se representan la media y el error estándar de $n=3$ experimentos.

2.4 Posible efecto postranscripcional de Cpn60 α 1 sobre DXR.

Para estimar si las diferencias en cuanto a resistencia o sensibilidad a FSM de los mutantes de Cpn60 se debían a cambios en los niveles de proteína DXR, se midieron estos niveles por *western blot*. En fondo *arc2* los niveles de DXR resultaron ser significativamente menores que en su parental silvestre (Ler) y que en las otras líneas mutantes de Cpn60s (Figura 42). Los niveles bajos de DXR en *arc2* podrían explicar el fenotipo pálido de estos mutantes y su sensibilidad a (Figura 42, 43) mientras que también existía correlación entre la falta de resistencia FSM de los mutantes de las subunidades β ensayadas y los niveles silvestres de proteína DXR presente en los mismos (Figura 42, 43). Para investigar si los menores niveles de DXR detectados en el mutante *arc2* se debían a una menor expresión del gen DXR, se midieron los niveles de transcrito *DXR* en las líneas *arc2* con respecto al wt (Ler); sorprendentemente, los resultados mostraron que no sólo no hay una reducción de los niveles de *DXR* sino que hay un fuerte incremento de los niveles de transcrito *DXR* en fondo *arc2* con respecto al wt (Figura 44). Estos resultados sugieren un efecto postranscripcional de Cpn60 α 1 sobre la acumulación de DXR.

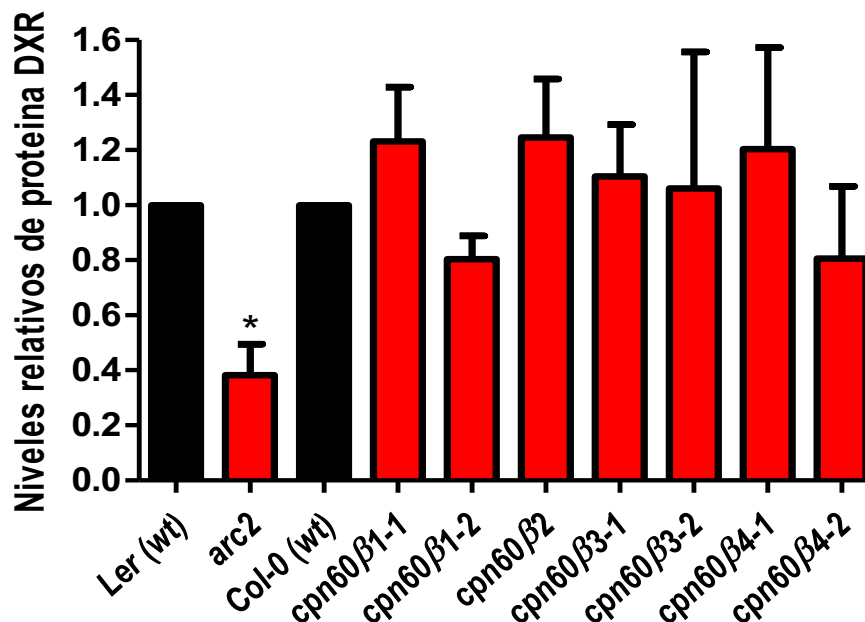


Figura 43. Proteína DXR en mutantes *cpn60*. Niveles relativos de proteína DXR en mutantes de los genes de la isoformas de Cpn60 utilizados en este estudio (barras rojas) y sus respectivos wt (barras negras). *Test *t-Student* $p < 0.05$. Se representa la media y el error estándar de $n = 2-4$ experimentos.

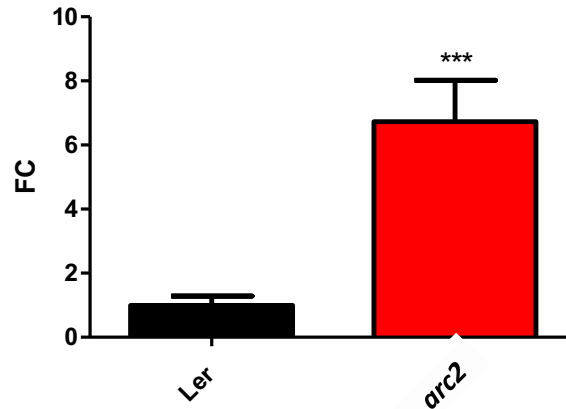


Figura 44. Tránsito *DXR* en el mutante *arc2* y wt. Niveles relativos de transcrito *DXR* en la línea *arc2* en comparación con el wt (Ler). Se representan los valores de *Fold Change* (FC) normalizados con los niveles de expresión de *UBC*. ***Test *t-Student* $p < 0.005$. Se representa la media y el error estándar de $n=3$ experimentos.

2.5. Screening de mutantes de *A. thaliana* de subunidades *Cpn10* y *Cpn20* con fenotipo a FSM.

Se sabe que el complejo *Cpn60* coopera con las subunidades *Cpn10* y *Cpn20* en el plegamiento de sustratos (Bonshtien *et al.* 2007) por lo que se razonó que si *Cpn60* era capaz de controlar los niveles de proteína *DXR*, las subunidades *Cpn20* y *Cpn10* podían tener también una influencia en la acumulación de *DXR*. Para investigar el efecto de las cochaperonas *Cpn10* y *Cpn20* sobre *DXR* se seleccionaron mutantes de *A. thaliana* con inserción de T-DNA de la colección SALK. Todos los mutantes fueron viables en homocigosis y no mostraron diferencias visuales en el wt en medio sin inhibidor (Figura 45).

Para el estudio de la función de At5g20720, *Cpn20*, se escogió el mutante de inserción SALK_083054 (Figura 45). Los mutantes mostraron un fenotipo de resistencia a FSM en comparación con el wt (Col-0) (Figura 46, 47). También el mutante estudiado para At3g60210, SALK_093761 (*cpn10.1-1*) presentó resistencia a FSM con respecto al parental silvestre Col-0 (Figura 46, 47) y los mutantes de la función de At2g44650 también presentaron resistencia a FSM, SALK_143422 (*cpn10.2-1*), SALK_023440 (*cpn10.2-2*) y SALK_051544 (*cpn10.2-3*) (Figura 46, 47).

Resultados

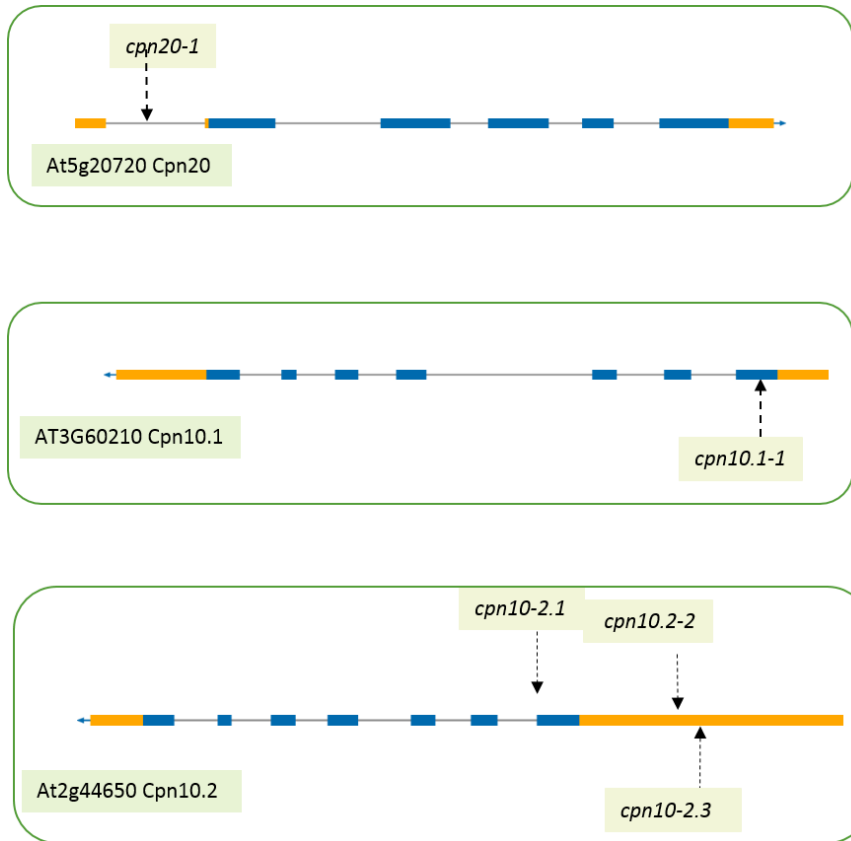


Figura 45. Inserciones de los mutantes escogidos para el estudio de los genes que codifican para las isoformas de Cpn10 y Cpn20.

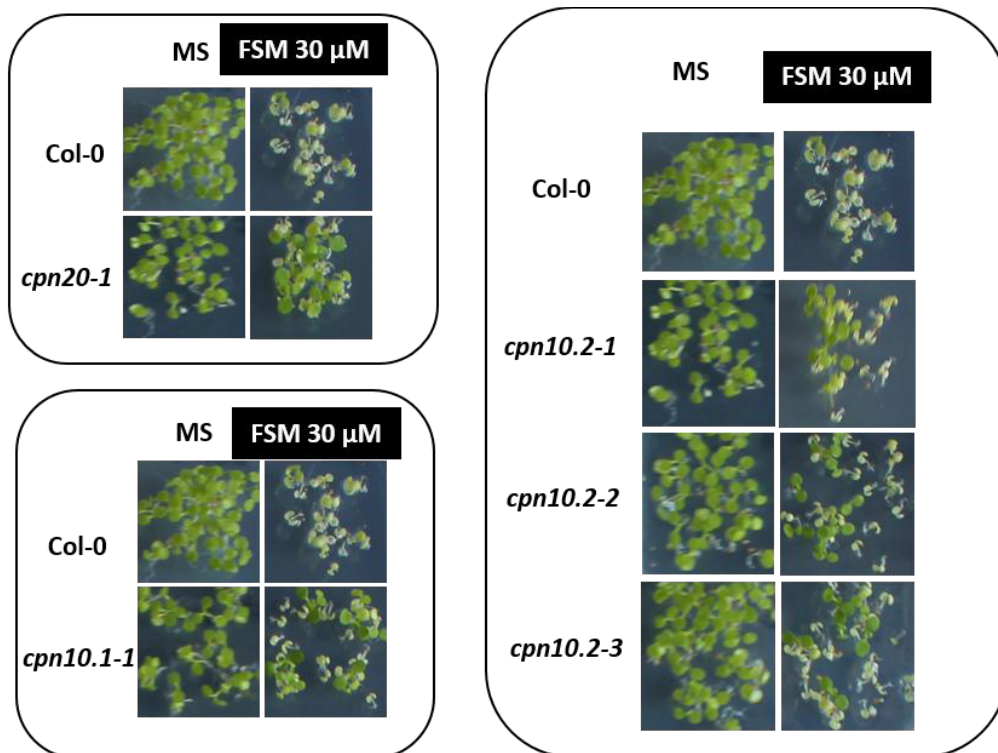


Figura 46. Fenotipo de resistencia a FSM de mutantes *cpn10-cpn20*. Plántulas mutantes de Cpn10 y Cpn20 de día 12 tratadas con MS y FSM en comparación con su parental silvestre.

Resultados

Para comprobar el efecto de Cpn10 y Cpn20 sobre la proteína DXR se llevaron a cabo ensayos *western blot* contra DXR para cuantificar los niveles de esta proteína (Figura 47B). Los niveles de proteína DXR más elevados se hallaron para el alelo *Cpn10.2-1*, aunque el mutante *cpn10.1-1* también mostró una mayor acumulación de DXR que las plantas wt. La buena correlación entre niveles de DXR y la resistencia a FSM de ambos mutantes sugieren que la pérdida de función de los correspondientes genes resulta en la acumulación de proteína DXR activa. En cambio, la mayor resistencia a FSM del mutante *cpn20-1* no se correlaciona con los niveles de proteína, que son casi iguales a los de las plantas wt. Estos resultados evidencian un papel complejo del sistema Cpn60-Cpn20-Cpn10 en la regulación de los niveles y quizás la actividad DXR en plantas de *A.thaliana*.

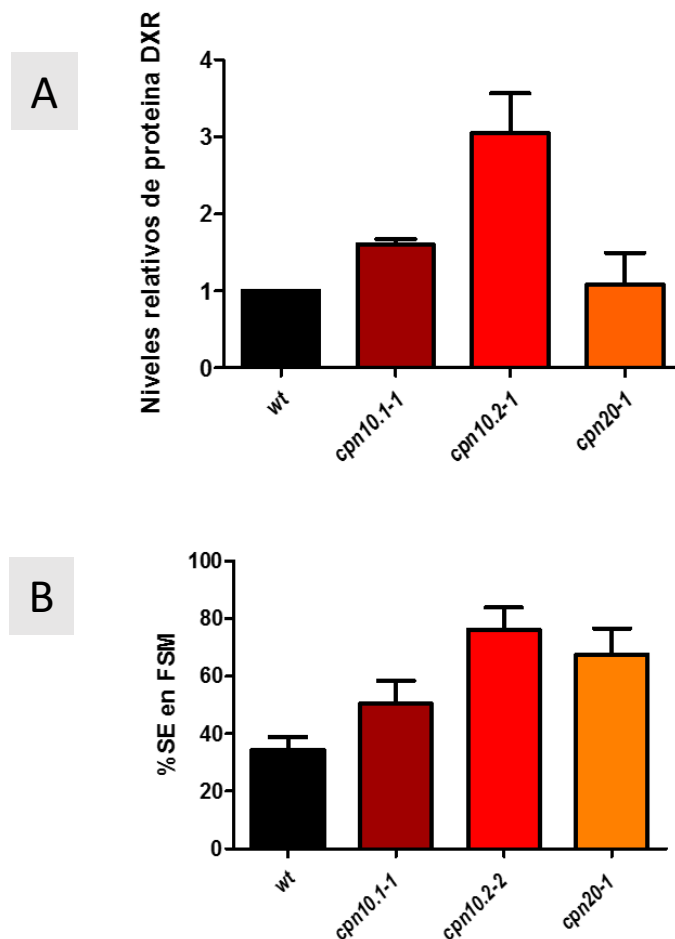


Figura 47. Proteína DXR y cuantificación de la resistencia a FSM de los mutantes de las chaperoninas *cpn10-cpn20*. (A) Niveles relativos de proteína DXR en las líneas *cpn10-1*, *cpn10-2*, *cpn20* y Col-0. (B) Cuantificación de la resistencia a FSM por %SE de las líneas *Cpn10-1.1*, *Cpn10-2.1*, *Cpn20-1* y el wt (Col-0). Se representan las medias y el error estándar de n=4 experimentos.

2.6 Cpn60 α 1 regula postranscripcionalmente a DXR.

Los resultados hasta ahora obtenidos apuntan a que la isoforma Cpn60 α 1 desempeña un papel importante en la regulación de DXR. El fenotipo de sensibilidad a FSM (Figura 41, 42) y los bajos niveles de DXR en el mutante *arc2* sin disminución de los niveles de transcrito *DXR* (Figura 44) sugieren la regulación postranscripcional de DXR a través del complejo Cpn60. Para confirmar que se trata de un efecto postranscripcional se razonó que si se sobreexpresaba la proteína quimérica DXR-GFP en fondo *arc2* ésta no sería capaz de acumularse a los mismos niveles que en fondo wt debido a la falta de Cpn60 α 1.

Para confirmarlo, se produjo la proteína recombinante DXR-GFP en fondo *arc2* (*arc2/DXR-GFP*) por cruzamiento entre el mutante *arc2* y la línea de sobreexpresión constitutiva *DXR-GFP*. La línea *arc2/DXR-GFP* mostró un fenotipo de sensibilidad a FSM con respecto a plantas hermanas *DXR-GFP* con genes silvestres de Cpn60 α 1 (Figura 48). La disminución del %SE con el tratamiento con FSM de la línea *arc2/DXR-GFP* con respecto a la línea *DXR-GFP* es análoga a *arc2* con respecto a su parental silvestre Ler. Estos resultados sugieren que Cpn60 α 1 tiene un efecto postranscripcional sobre la acumulación de DXR.

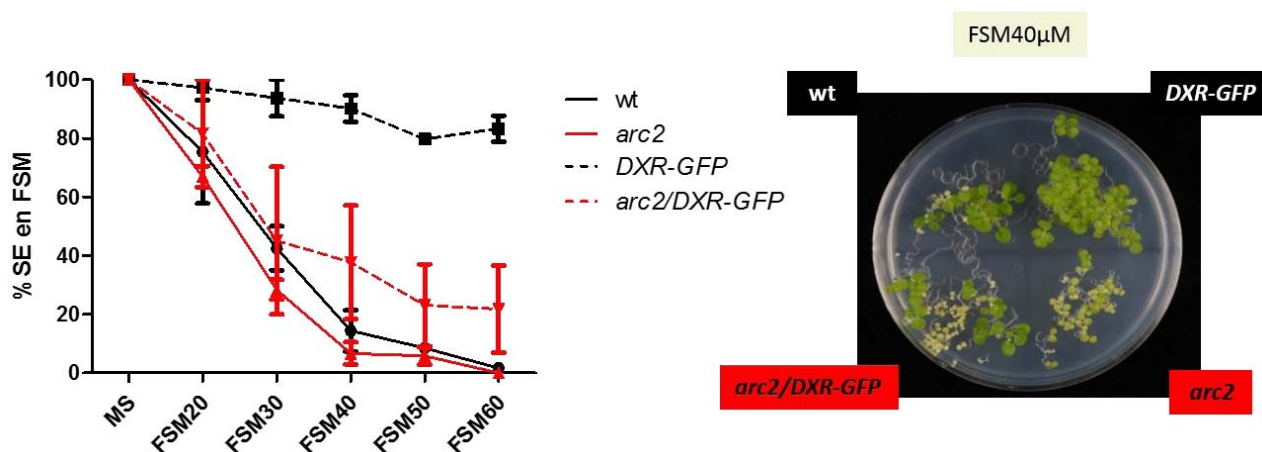


Figura 48. Fenotipo y resistencia a FSM de mutantes de las líneas wt (Ler), *arc2*, *DXR-GFP* y *arc2/DXR-GFP*. Fenotipo de las líneas wt (Ler), *arc2*, *DXR-GFP* y *arc2/DXR-GFP* en 40µM de FSM y cuantificación por %SE de la resistencia a FSM a diferentes concentraciones de FSM. Se representan las medias y el error estándar de n=3.

Resultados

Los resultados de la Figura 33 sugieren que la proteína DXR-GFP en las líneas *DXR-GFP* se acumula en vesículas suplastídicas. Para investigar si Cpn60 α 1 estaba implicada en la formación de estas vesículas se analizaron las líneas *arc2/DXR-GFP* y sus hermanas *DXR-GFP* por microscopía confocal para localizar DXR-GFP por fluorescencia. Las imágenes mostraron que DXR-GFP en la línea *arc2/DXR-GFP* localiza fundamentalmente en plastos pequeños del parénquima y en los cloroplastos estomáticos; sin embargo, DXR-GFP no se observa en acúmulos discretos en *arc2/DXR-GFP* sino que se observa en forma de agregados dispersos en el interior de los plastos (Figura 49). Estos resultados sugieren que Cpn60 α 1 podría estar también implicada en la formación de las vesículas subplastídicas que contienen DXR-GFP en las líneas *DXR-GFP*.

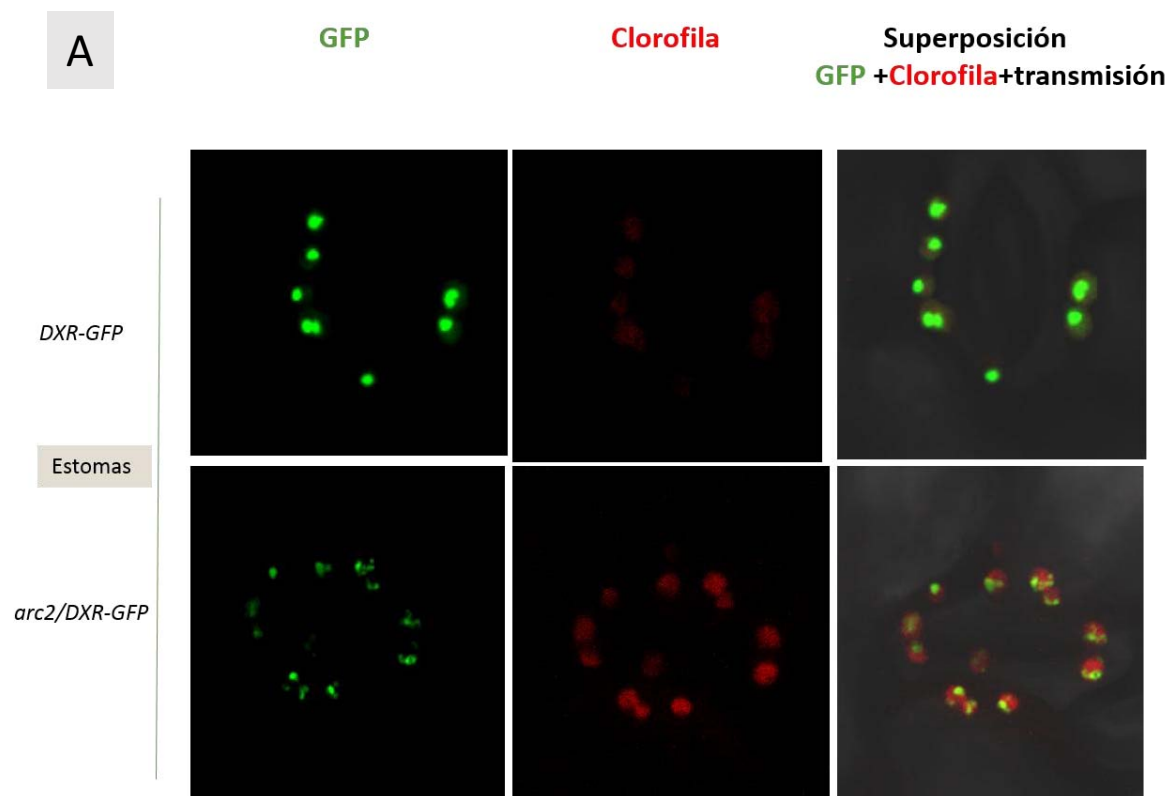


Figura 49A. Localización subcelular de la proteína DXR-GFP en las líneas hermanas *DXR-GFP* y *arc2 DXR-GFP*. Ampliación de las imágenes de los estomas de la figura 49B.

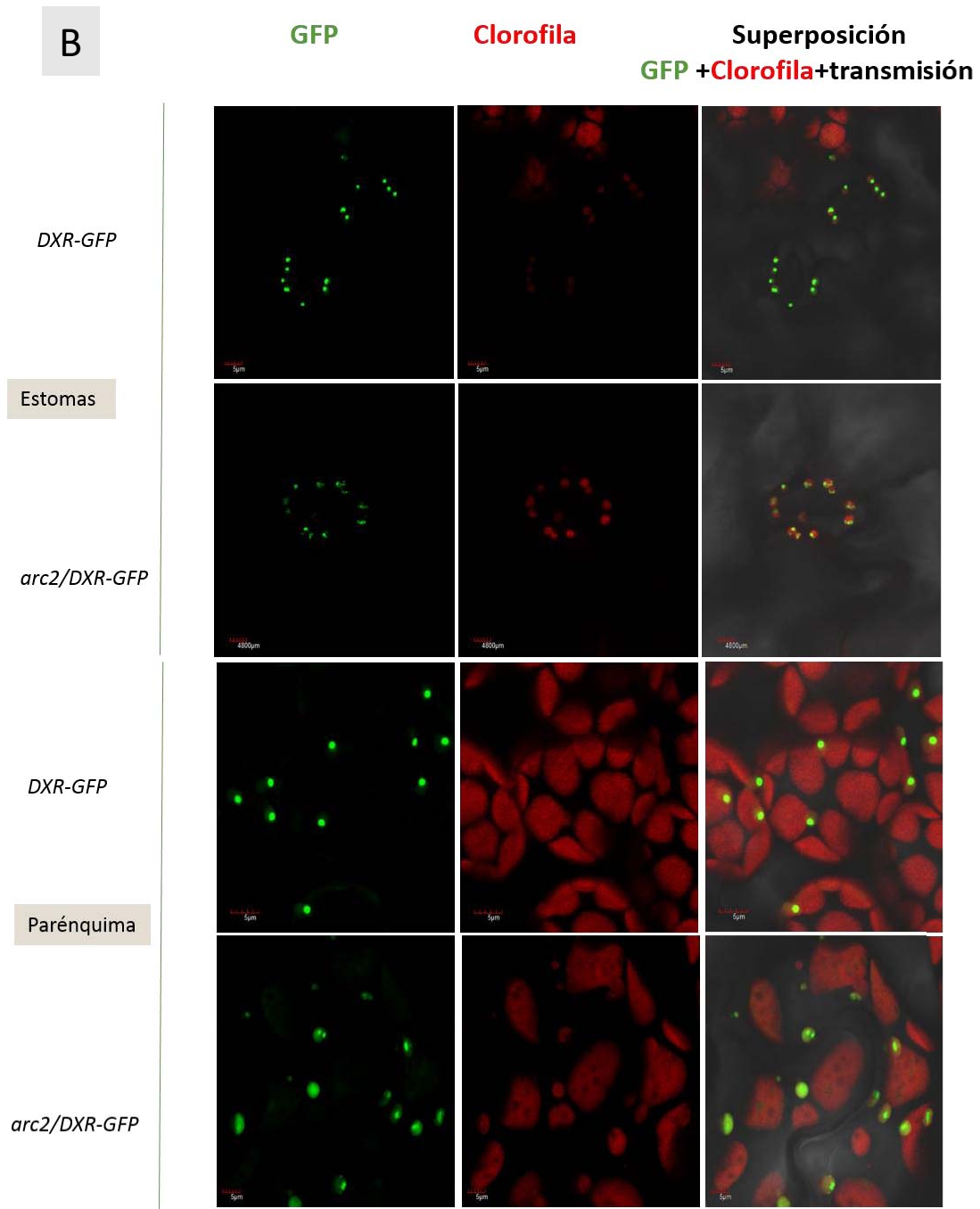


Figura 49B. Localización subcelular de la proteína DXR-GFP en las líneas hermanas *DXR-GFP* y *arc2 DXR-GFP*. Imágenes por microscopía confocal de plastos estomáticos y parénquima de las líneas hermanas *DXR-GFP* y *arc2 DXR-GFP*.

2.6.1 La sobreexpresión de Cpn60 α 1 causa una disminución de los niveles de DXR.

Los resultados obtenidos hasta este punto sugerían que la actividad de Cpn60 α 1 era necesaria para mantener niveles normales de proteína DXR activa en vesículas subplastídicas. Para investigar mejor el papel de la isoforma de Cpn60 α 1 en la regulación de DXR se generaron líneas de sobreexpresión constitutiva (35S) de una proteína de fusión Cpn60 α 1-GFP y se analizaron los niveles de DXR en estas líneas. Sorprendentemente, los niveles de proteína DXR analizados por *western blot* en plantas transgénicas *Cpn60 α 1-GFP* resultaron menores a los observados en plantas no transformadas, es decir, la sobreexpresión de Cpn60 α 1 parecía causar un fenotipo parecido al de la pérdida parcial de función en el mutante *arc2* (Figura 50). Estos resultados sugieren que la proteína DXR que se acumula en las líneas sobreexpresoras de Cpn60 α 1 está más activa que los enzimas presentes en las plantas silvestres, lo que explicaría por qué niveles menores de enzima en líneas transgénicas no resultan en una menor resistencia a FSM (Figura 50).

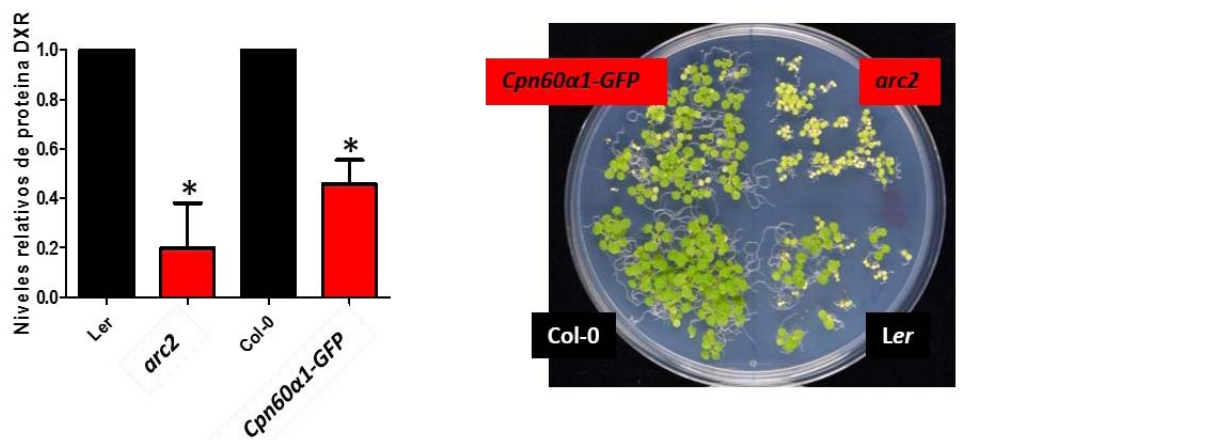


Figura 50. Niveles de DXR, fenotipo resistencia a FSM de la línea mutante *arc2* y su parental silvestre Ler y las líneas de sobreexpresión *Cpn60 α 1-GFP* y su parental silvestre Col-0. (A) Niveles relativos de proteína DXR en las línea *arc2* y su parental silvestre Ler y la línea de sobreexpresión *Cpn60 α 1-GFP#52* y su parental silvestre Col-0. (B) Fenotipo a FSM de las líneas *arc2*, Ler, *Cpn60 α 1-GFP#52* y Col-0 (C) Cuantificación de la resistencia a FSM de las líneas *arc2* y su parental silvestre Ler, y las líneas de sobreexpresión *Cpn60 α 1-GFP#52* y *Cpn60 α 1-GFP#54* y su parental silvestre Col-0.

Resultados

Para investigar cómo se distribuía la proteína Cpn60 α 1 en el plasto se identificó la proteína fluorescente Cpn60 α 1-GFP mediante microscopía confocal. En las líneas *Cpn60 α 1-GFP* la proteína sobreexpresada se localiza en plastos y con una distribución irregular en el estroma de plastos estomáticos; en el parénquima, *Cpn60 α 1-GFP* se expresa en plastos pequeños (Figura 51), como ocurría en el caso de DXR-GFP (Figura 30). Sin embargo, Cpn60 α 1-GFP no localiza en las vesículas suplastídicas características de DXR-GFP descritas en la Figura 30.

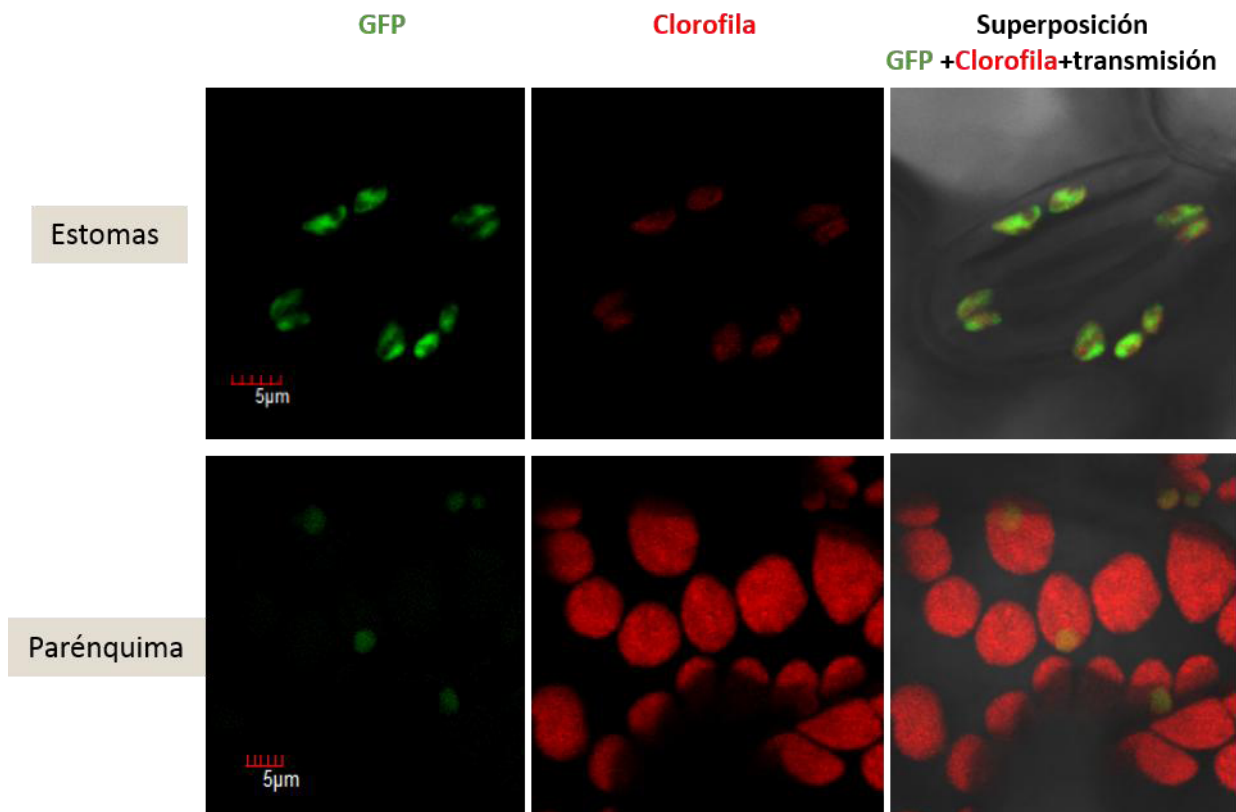


Figura 51. Localización subcelular de la proteína Cpn60 α 1-GFP en una línea *Cpn60 α 1-GFP*. Imágenes tomadas por microscopía láser confocal de un estoma y plastos del parénquima.

2.6.2 DXR se degrada con mayor celeridad en *arc2* y en las líneas *Cpn60 α 1-GFP* que en el wt.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían que Cpn60 α 1 podría promover de la conformación activa de DXR. Los menores niveles de proteína DXR en las líneas sobreexpresoras *Cpn60 α 1-GFP* o deficientes en Cpn60 α 1-GFP (*arc2*) con

Resultados

respecto al wt podían sugerir también un posible papel de Cpn60 α 1 sobre la degradación de DXR.

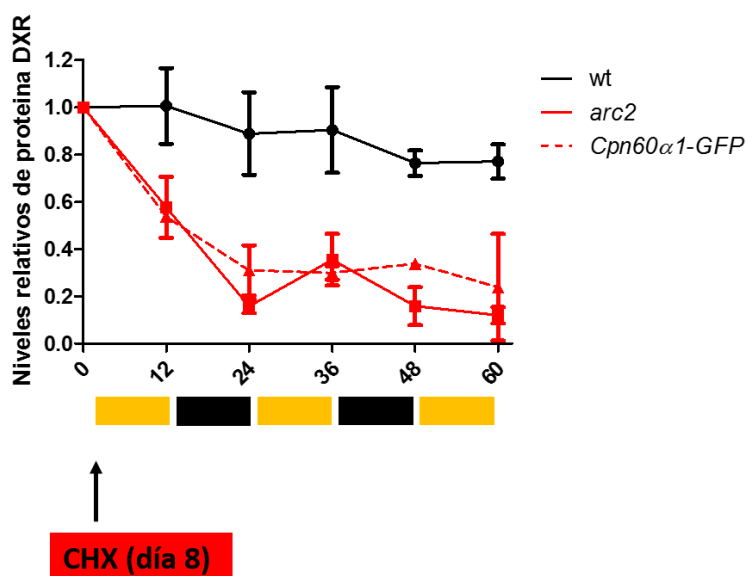


Figura 52. Cinética de degradación de DXR en las líneas wt, *arc2* y *Cpn60 α 1-GFP*. Cuantificación de los niveles relativos de proteína DXR en las líneas wt, *arc2* y *Cpn60 α 1-GFP* tratadas con 500 μ M de CHX, el día de tratamiento con CHX se indica con la flecha. En negro se presenta la degradación de DXR en el wt, en rojo se presenta en la línea *arc2* y en rojo con líneas discontinuas la proteína en fondo *Cpn60 α 1-GFP*

Para probar si Cpn60 α 1 intervenía en los mecanismos de degradación de DXR, se diseñó un experimento en que se bloqueó con cicloheximida (CHX) la síntesis de proteína *de novo* de forma que se pudiera observar en el tiempo la tasa de degradación de la proteína DXR. Las líneas wt (Ler), *arc2* y *Cpn60 α 1-GFP* se sembraron en placas de agar MS sobre un tejido de nylon en condiciones de día neutro (ND) y en el día 8 estas plantas fueron transferidas a placas suplementadas con 500 μ M de CHX. Se tomaron muestras cada 12 horas durante 3 días y posteriormente se analizaron dos muestras biológicas independientes por *western blot*. En la Figura R52 se muestra la cuantificación de los resultados de estos análisis. La tasa de degradación de DXR en las plantas silvestres fue sorprendentemente lenta. Al cabo de 60 horas DXR en *Ler* se degradó sólo en un 80%. Sin embargo, esta tasa de degradación se aceleró significativamente tanto en las plantas de la línea *Cpn60 α 1-GFP* como en el mutante *arc2*. Sólo 12 horas después del tratamiento con CHX los niveles de DXR en estas líneas con actividad Cpn60 α 1 alterada cayeron al 50%, mientras que a las 24 horas y hasta las 60 horas los niveles de DXR en *arc2* y la línea *Cpn60 α 1-GFP* fueron un 20% aproximadamente de los valores

iniciales. Este resultado sugiere que Cpn60 α tiene un papel protector de DXR frente a la degradación por proteasas plastídicas.

2.7 Posible papel de TOC1 en la regulación de DXR a través de las chaperonas plastídicas Cpn60.

Durante el transcurso de esta tesis doctoral se publicaron los resultados de experimentos tipo Chip-Seq cuyos datos sugerían la unión directa y represora de TOC1 en el promotor de *Cpn60 α 2* (Huang *et al.* 2012). Por este motivo se planteó un modelo en el que TOC1 podría estar ejerciendo una acción represora sobre genes del complejo Cpn60 que a su vez hemos visto que modula la actividad y los niveles de proteína DXR.

2.7.1 Los niveles de transcrito de los genes Cpn60 no presentan cambios en plantas con niveles alterados de TOC1.

Para comprobar si TOC1 podía tener un efecto represor sobre los genes codificantes para las isoformas plastídicas de Cpn60 en *A.thaliana*, se analizaron los niveles de transcritos en plántulas crecidas en condiciones de LD del mutante *toc1-1* y de líneas sobreexpresoras de TOC1 en muestras. En un primer experimento se recogieron muestras a lo largo del día 12 en líneas *toc1-1* y wt y se analizaron los niveles de transcritos de todas las isoformas de Cpn60 (Figura 53). pero no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de DXR en fondo *toc1-1* y wt. Con la posible excepción de los genes Cpn60 α 1 y Cpn60 α 2. Para verificar un posible efecto represor de TOC1 sobre la expresión de estos genes, se llevó a cabo un segundo experimento en el que se crecieron plantas wt y *toc1-1* en las mismas condiciones y se recogieron muestras a lo largo del día y de la noche para analizar los niveles de transcrito de los genes para las isoformas Cpn60 α 1 y Cpn60 α 2 (Figura 54).

Los resultados descartaron un efecto represor (o activador) de TOC1 sobre la expresión de estos genes. Como alternativa para confirmar esta conclusión se evaluó el efecto de la sobreexpresión de TOC1 sobre DXR, Cpn60 α 1 y Cpn60 α 2. Se analizaron los niveles de transcrito de los genes *TOC1*, *DXR*, *Cpn60 α 1* y *Cpn60 α 2* en muestras crecidas en LD Para investigar el efecto de la sobreexpresión de TOC1 sobre DXR, Cpn60 α 1 y Cpn60 α 2 se analizaron los niveles de transcrito de los genes *TOC1*, *DXR*, *Cpn60 α 1* y

Resultados

Cpn60α2 en muestras de plantas *TOC1-YFP*, *TOC1-MYC*, *toc1-2* y wt (C24) crecidas en LD a las 4h tras el encendido de luces al día 12. Si *TOC1* tuviera un efecto represor sobre *Cpn60α1* y *Cpn60α2* se esperarían niveles muy bajos de transcritos en las líneas sobreexpresoras y un aumento en la línea mutante *toc1-1*. Sin embargo, los resultados no mostraron cambios significativos en la expresión de los transcritos *Cpn60α1* y *Cpn60α2* (Figura 55). Tampoco se detectaron cambios en los niveles de expresión del gen *DXR* confirmando la anterior conclusión de que *TOC1* no regula la expresión de este gen (Figura 15).

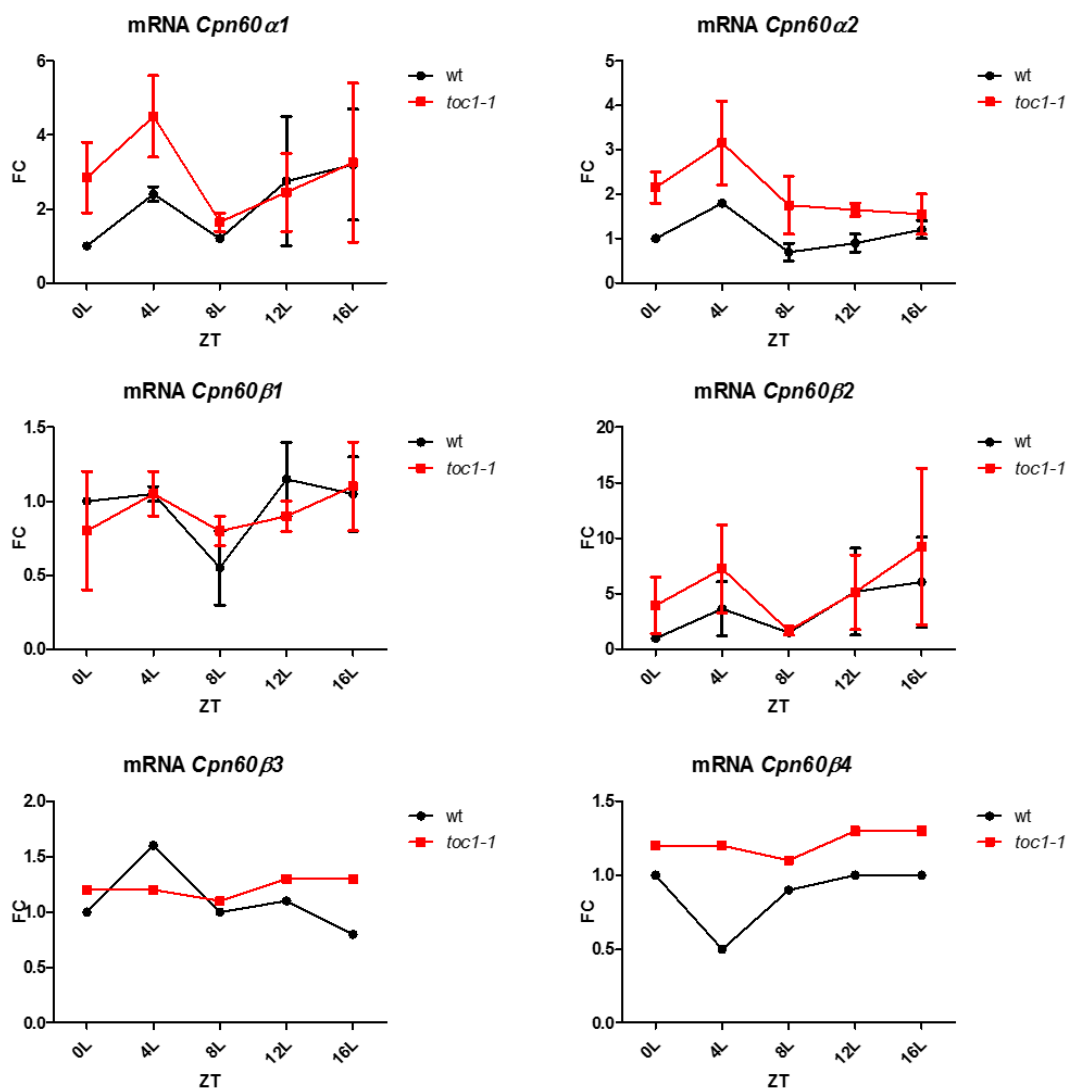


Figura 53. Niveles de transcritos *Cpn60* en las líneas *toc1-1* y wt. Niveles de transcritos de los genes que codifican para la familia de isoformas de *Cpn60* plastídicas en las líneas Col-0 y *toc1-1* normalizados con el gen *APT1*. Las líneas fueron crecidas en condiciones de LD y las muestras recogidas a lo largo del día 12.

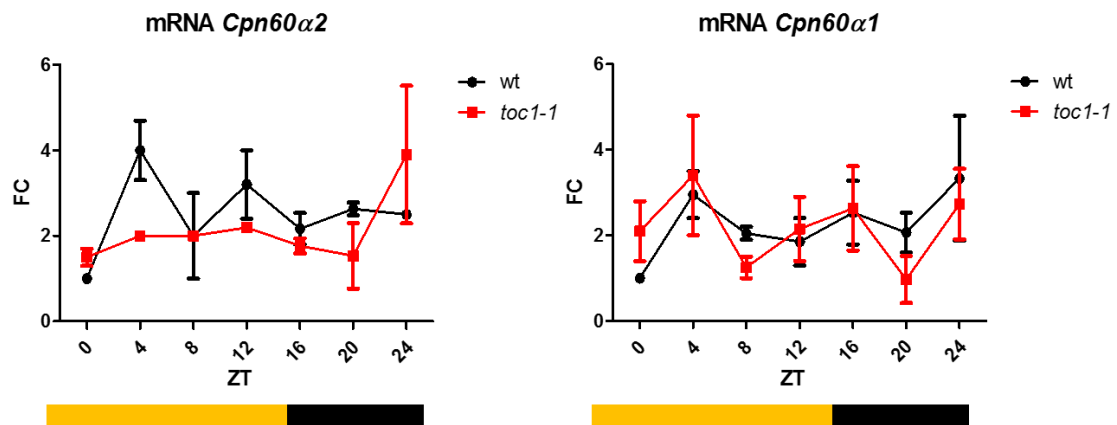


Figura 54. Niveles de transcritos *Cpn60α1* y *Cpn60α2* en las líneas *toc1-1* y wt. Niveles de transcritos de las isoformas de *Cpn60α1* y *Cpn60α2* en las líneas Col-0 y *toc1-1* normalizados con el gen UBC. Las líneas fueron crecidas en condiciones de LD y las muestras recogidas el día 12 a lo largo del día y noche.

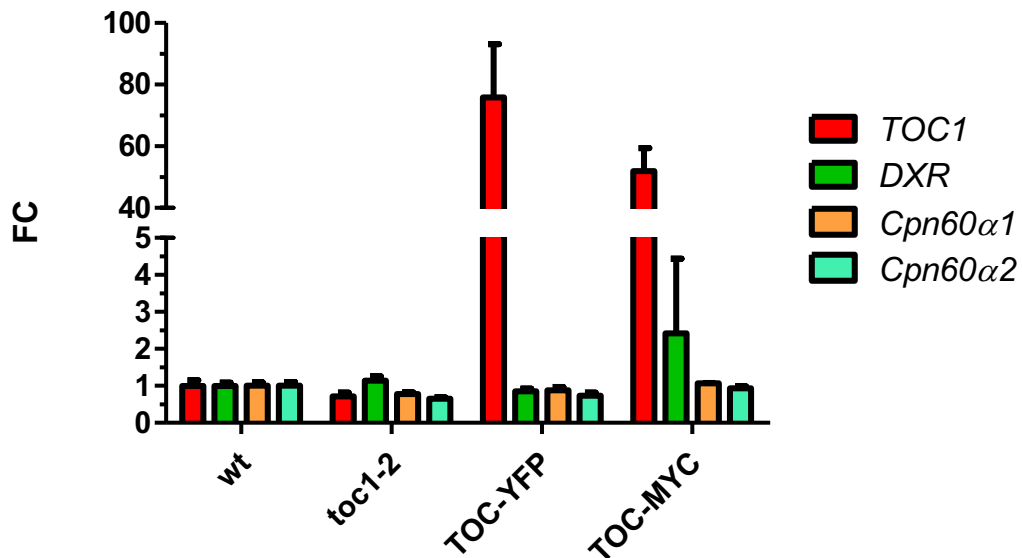


Figura 55. Niveles de transcritos *TOC1*, *DXR*, *Cpn60α1* y *Cpn60α2* de las líneas wt, *toc1-2*, *TOC-YFP* y *TOC-MYC*.

Aumentos prolongados de *TOC1* pueden modificar los efectos de este componente (Mas *et al.* 2003), lo que justificaba un estudio en que se pudieran aumentar puntualmente los niveles de *TOC1* y analizar sus efectos inmediatos sobre los niveles de *Cpn60α1* y *Cpn60α2*. Para ello se utilizaron líneas inducibles de *TOC1* por etanol *Alc:TOC1* (Knowles *et al.* 2008). En estas líneas, mediante la exposición al vapor de EtOH durante menos de 20 minutos se pueden inducir picos de expresión del gen

Resultados

TOC1 y por tanto de proteína *TOC1*. En un primer experimento se analizaron los niveles de *TOC1* y de *Cpn60α1* y *Cpn60α2* en plántulas *Alc: TOC1* comparando plántulas cuyas semillas de esta línea que habían sido previamente esterilizadas con hipoclorito sódico y otras que habían sido esterilizadas con etanol. Este experimento tenía como finalidad comprobar que *TOC1* se expresaba tras la exposición a etanol y si existía algún fenotipo en estas líneas, aunque no se esperaban cambios en los niveles de transcritos *Cpn60α1* y *Cpn60α2* puesto que se trataba de una inducción constitutiva de *TOC1* como en el uso de las líneas *35S:TOC1* ensayadas anteriormente (Figura 55). Las plántulas *Alc: TOC1* esterilizadas con etanol al día 7 son más pequeñas y oscuras con respecto a las tratadas con hipoclorito sódico, tienen un fenotipo similar a *TOC1-MYC* (Figura 54). Mediante estudios de q-RT-PCR se comprobó que las plántulas *Alc: TOC1* cuyas semillas fueron esterilizadas con etanol tienen una clara inducción de *TOC1*, pero no se observó efecto sobre *Cpn60α1* y *Cpn60α2* (Figura 56C).

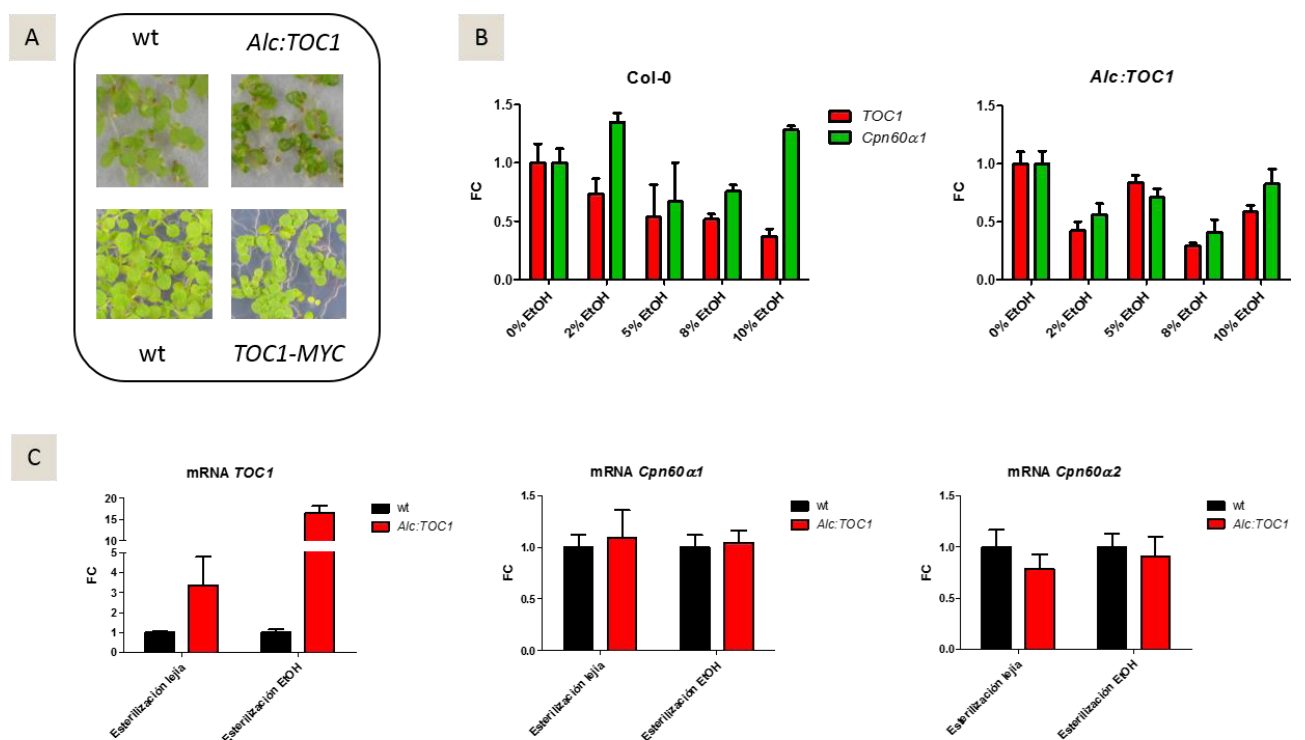


Figura 56. Fenotipo y niveles de transcritos *TOC1*, *Cpn60α1*, *Cpn60α2* en plántulas *Alc:TOC1*. (A) Plántulas wt y líneas *Alc:TOC1* y *TOC1-MYC* esterilizadas y crecidas en medio MS. (B) Niveles de *TOC1* y *Cpn60α1* en líneas wt (Col-0) y *Alc:TOC1* tratadas con diferentes concentraciones de vapor de EtOH. (C) Niveles de mRNA *TOC1*, *Cpn60α1* y *Cpn60α2* en las líneas wt y *Alc:TOC1* en líneas esterilizadas con EtOH pero sin tratar con vapores de EtOH.

A continuación, se realizaron experimentos de exposición puntual a determinadas concentraciones de etanol durante 15 minutos en plántulas Col-0 y Alc: TOC1 de 8 días no expuestas (esterilizadas) anteriormente al inductor (Figura 56B). Se recogió el tejido y se analizaron los niveles de transcrito *TOC1*, *Cpn60α1* y *Cpn60α2* mediante q-RT-PCR. La exposición a etanol indujo la expresión de TOC1 pero como en el caso de las líneas de sobreexpresión constitutiva de TOC1 no se detectó ningún efecto significativo en la expresión de *Cpn60α1* y *Cpn60α2*. En otros experimentos con inducciones a tiempos más largos (1h, 2h, 3h) se obtuvieron resultados contradictorios o no repetitivos que finalmente hicieron abandonar esta estrategia.

2.7.2 Los niveles disminuidos de proteína Cpn60β en *toc1-1* sugieren una regulación postranscripcional de DXR por TOC1 a través del complejo Cpn60.

Si bien ninguno de los genes que codifican para las isoformas de Cpn60 presentó aumentos significativos de transcrito en el mutante *toc1-1* con respecto al wt (C24) que pudiera explicar un mecanismo por el cual TOC1 pudiera regular los niveles de DXR a través de cambios en los niveles de isoformas Cpn60, se decidió investigar si TOC1 tendría un efecto postranscripcional sobre Cpn60 que provocara cambios en este complejo y como consecuencia la regulación de DXR. Si bien este trabajo apunta Cpn60α1 como la principal isoforma responsable de la regulación de DXR no se podía descartar que otras isoformas del complejo Cpn60 no tuvieran un efecto sobre DXR o que la expresión de Cpn60α1 afectara la estequiometría del complejo y en conjunto ello tuviera un efecto sobre este enzima.

Para estudiar el efecto de TOC1 sobre las isoformas Cpn60 se disponía de un anticuerpo capaz de reconocer todas las isoformas de tipo Cpn60β. El análisis de proteína en estas líneas en experimentos de *western blot* mostró que los niveles de Cpn60β son significativamente menores en *toc1-1* que en el wt (C24) (figura 56). Este resultado sugiere que TOC1 puede tener un efecto a nivel postranscripcional sobre el complejo Cpn60.

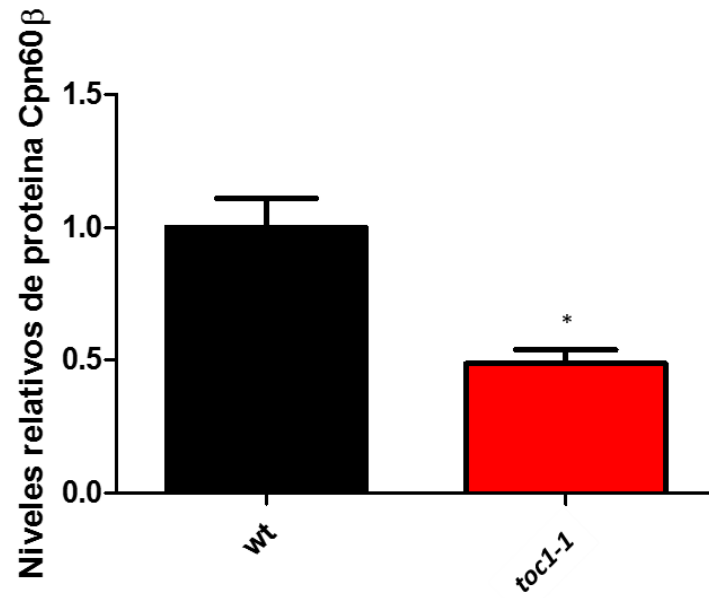


Figura 57. Proteína Cpn60β en *toc1-1* y el wt. Cuantificación los niveles de proteína Cpn60β analizada por *western blot* en el mutante wt (C24) y *toc1-1* (C24). *Test *t-Student* $p < 0.05$

Resultados

DISCUSIÓN

El primer propósito de esta tesis se centró en investigar el efecto del reloj circadiano sobre la regulación de la vía del MEP. Los resultados mostraron un claro efecto del reloj en el control de los niveles del enzima DXR, que cataliza la síntesis de DXR en el segundo paso de la vía. La existencia de una regulación postranscripcional de los enzimas de la vía del MEP (incluido DXR) se ha propuesto como clave para el control del flujo metabólico de esta ruta en varios estudios (Koon *et al.* 2008; Flores-Perez *et al.* 2008) (Pulido P. *et al.*, 2013) pero esta es la primera ocasión que se describe un papel del reloj circadiano (y concretamente de TOC1) en este proceso. La segunda parte de la tesis se enfocó en el estudio del papel de un grupo específico de chaperonas, Cpn60, en la regulación de los niveles y actividad de DXR. La participación de chaperonas plastídicas en la regulación postranscripcional de enzimas de la vía del MEP solo se conoce para DXS (Pulido P. *et al.*, 2013). Aunque no parece que TOC1 regule los niveles de expresión de los genes que codifican para isoformas de Cpn60, sí se observó una disminución de los niveles de proteína de las isoformas de Cpn60 β en el mutante *toc1-1* lo que sugiere una regulación del complejo Cpn60 por TOC1 mediante un mecanismo postranscripcional.

1. Reloj circadiano y regulación de la vía del MEP.

1.1 La alteración de la función de TOC1 y del reloj circadiano provoca una acumulación específica de DXR.

Las oscilaciones temporales de procesos genéticos, metabólicos o fisiológicos basados en ciclos de 24 horas y que se anticipan a los cambios ambientales provocados por la existencia del día y la noche terrestres reciben el nombre de ritmos circadianos (Bunning 1967; Pittendrigh 1993).

Para definir que un proceso biológico en un organismo está sujeto a un ritmo circadiano, este proceso debe persistir con una periodicidad de aproximadamente 24 horas después de que ese organismo sea transferido de un ambiente en condiciones variables (por ejemplo, con fluctuaciones día/noche) a un ambiente donde esas condiciones son constantes (por ejemplo, luz constante). Por otro lado, el momento de aparición de estos ritmos tiene que poder ser restablecido con estímulos ambientales

(en *A.thaliana* un proceso sujeto a ritmo biológico en condiciones constantes desaparece a las 48-72h y sería recuperado mediante un estímulo como la luz, o su ausencia, o la temperatura). Finalmente, los ritmos circadianos tienen la característica intrínseca de estar compensados por temperatura, esto es, se mantienen constantes en un rango amplio de temperaturas, al contrario que, por ejemplo, la mayoría de procesos bioquímicos (McClung 2001; Covington *et al.* 2008).

En *A.thaliana* se han descrito numerosos procesos biológicos que exhiben ritmos circadianos como el movimiento rítmico de las hojas (Bunning 1967; Millar *et al.* 1995), la apertura de pétalos (Bunning 1967), o la elongación de tallos, hipocotilos y raíces (Nozue *et al.* 2007; Dowson-Day y Millar 1999). Algunos ritmos circadianos de expresión de genes de la inmunidad en *A.thaliana* anticipa el sistema de defensa de la planta ante las posibles infecciones por patógenos (McClung 2011). El mecanismo a través del cual se generan estos ritmos es conocido como reloj circadiano para el cual se han descrito unos 25 genes asociados, algunos de los cuales se han presentado en la Tabla 5. Este mecanismo recibe *inputs* o estímulos externos como luz y temperatura, y en consecuencia genera una serie de *outputs* o ritmos de 24 horas sobre, por ejemplo, niveles de transcrito o metabolitos. El metabolismo del carbono está también bajo control circadiano, de forma que la degradación del almidón se produce durante la noche llegando a los niveles más bajos al final de la noche; el reloj circadiano evita que los niveles de almidón se extingan ya que anticipa la llegada de la mañana (Graf y Smith 2011).

La biosíntesis de isoprenoides también está regulada por ritmos circadianos. En *A.thaliana* varios genes de la vía del MEP (como *DXS* o *HDR* pero no *DXR*) y algunos genes de la vía de biosíntesis de carotenoides y tocoferoles presentan un patrón de oscilación circadiano (Covington *et al.* 2008). Se ha descrito que los genes de la vía del MEP se coexpresan con los genes del *morning-loop* (*PRR9*, *CCA1*, *LHY*) y los la vía del MVA con los genes del *evening-loop* (*TOC1*) (Vranova *et al.* 2012). En otras plantas como *Artemisia annua* se ha observado la expresión cíclica de la β -pineno sintasa (Lu *et al.* 2002) así como de una dioxigenasa implicada en la biosíntesis de carotenoides en *Petunia hybrida* (Simkin *et al.* 2004). Los terpenoides de la vía del MEP en *Antirrhinum majus* se emiten con un patrón circadiano (Dudareva *et al.* 2005). La emisión de isopreno también sigue

un patrón de expresión circadiano en *Populus spp* (Loivamaki *et al.* 2007). El mantenimiento de estos ritmos se cree que supone una ventaja adaptativa en plantas ya que incrementa la fotosíntesis y el vigor de las plantas (Dodd *et al.* 2005).

La elevada resistencia a FSM de los mutantes *toc1-1*, *cca1-11/lhy-21* y *elf3-9* (Figura 10) sugirió la posible implicación del reloj circadiano en la regulación de la vía del MEP. Ninguno de los mutantes del reloj circadiano presentaron fenotipo de resistencia a CLM, lo que sugiere que el efecto de los componentes del reloj circadiano podría ser específico sobre DXR. La cuantificación de los niveles de proteína DXR en estos mutantes mostró elevados niveles de este enzima en los mutantes de TOC1 y ELF3, lo que puede explicar la elevada resistencia de estos mutantes a FSM. Sin embargo en el mutante *cca1-11/lhy-21* se obtuvieron niveles de proteína DXR similares a los de su parental silvestre WS, lo que podría sugerir que la actividad DXR está regulada por CCA1 y LHY a través de un mecanismo distinto al de los otros dos componentes. El ecotipo silvestre WS presenta el alelo nulo *phyD-1* (Aukerman *et al.* 1997); y se ha visto que la ausencia de *phyD* incrementa la resistencia a FSM probablemente debido al aumento en la tasa de intercambio de IPP y DMAPP entre plasto y citosol (Rodriguez-Concepcion *et al.* 2004). Los datos generados en esta tesis también demuestran que WS es mucho mas resistente a FSM que otros ecotipos de *A. thaliana* como Columbia o Ler (Figura 10). Es posible por tanto que la mayor resistencia a FSM de *cca1-11/lhy-21* sin cambio en los niveles de DXR pueda deberse a un efecto amplificado por la ausencia de *phyD* en el fondo WS. Aunque se puede especular sobre el posible mecanismo de resistencia a FSM de este mutante como un aumento en el intercambio de precursores isoprenoides con el citoplasma o una activación postraduccional de la actividad DXR, no se dispone de datos para concluir la naturaleza del mismo.

El efecto de TOC1 sobre DXR, por otra parte, no es específico de este componente ni del mutante *toc1-1*, sino que resulta de la alteración en el funcionamiento del propio reloj circadiano. La proteína DXR se acumula también en otros mutantes del reloj circadiano como *toc1-2* y *elf3-9* (Figura 25 y 12). TOC1 es un importante componente del reloj circadiano que desempeña también funciones en la integración de señales lumínicas que controlan respuestas fotomorfogénicas (Mas *et al.* 2003); en el mutante *toc1-1* y *toc1-2* se observaron diferentes respuestas en cuanto a sensibilidad entre la

exposición a luz roja y elongación del hipocotilo (Mas *et al.* 2003) diferencia que podría deberse a que el alelo *toc1-1* resulta en una pérdida parcial de función de TOC1 mientras que *toc1-2* es una pérdida total de función (Strayer *et al.* 2000). El hecho que se haya visto una mayor resistencia a FSM en el mutante *toc1-2* con respecto al mutante *toc1-1* (Figura 17) podría deberse por una parte a la pérdida de función sobre el reloj circadiano de TOC1 (observado en el mutante *toc1-1*) y por otra parte a la pérdida total de función de TOC1 (observado en el mutante *toc1-2*), lo que querría decir que hay otros procesos regulados por TOC1 que influyen en la regulación de la vía del MEP. Puesto que el objetivo de este trabajo era conocer cómo el reloj circadiano regula la vía del MEP, el trabajo se centró en la caracterización del mutante *toc1-1*.

Por otro lado, los genes *CCA1* y *LHY* reprimen su propia expresión y la expresión de *TOC1* (Drake *et al.* 2001; Njeh *et al.* 2001; Alabadi *et al.* 2001); *cca1-11/lhy-21* presenta niveles de *TOC1* elevados en comparación a WS en ZT=4h (McClung 2011) y se ha descrito también que *TOC1* es capaz de autorreprimir su propia expresión (Strayer *et al.* 2000). También se ha propuesto *ELF3* como activador de los genes *CCA1* y *LHY*, y se ha visto que el mutante *elf3-1* presenta elevados niveles de *TOC1* (Alabadi *et al.* 2001). Estos resultados sugieren que cambios directos o indirectos en los niveles de TOC1 podrían ser el mecanismo desencadenante de la acumulación postranscripcional de DXR y, como consecuencia, de la resistencia a FSM. En este punto sugía la pregunta si el efecto de TOC1 sobre DXR era debido a su papel sobre el funcionamiento del reloj circadiano o a una función de TOC1 no relacionada con el reloj.

El reloj circadiano se ha propuesto como un mecanismo que ofrece a las plantas una ventaja adaptativa y aumenta la eficiencia fotosintética (Dodd *et al.* 2005). Cuando los mutantes del reloj circadiano son crecidos en condiciones de periodo externo que coinciden con el periodo propio del mutante, las plantas mutantes recuperan el fenotipo wt. En base a esta premisa, se llevó a cabo el experimento de cambio de periodo circadiano de la Figura 14, en el que mutantes deficientes en TOC1 eran crecidos en ciclos diarios de 20 horas para ajustar el periodo externo con el interno (circadiano) de estos mutantes. Las plántulas de la línea *toc1-1* recuperaron el fenotipo de sensibilidad a FSM y disminuyeron sus niveles de DXR cuando crecieron en su período interno, lo que sugiere que el efecto sobre DXR en estos mutantes se debía al desajuste entre periodo

externo e interno. En conjunto, los datos apuntaban a un papel crucial de TOC1 y del reloj circadiano en el control de los niveles de DXR.

1.2 La acumulación de DXR responde a la interrupción de mecanismos de regulación postranscripcional posiblemente encaminados a conseguir niveles estables de enzima.

La vía del MEP está regulada a nivel transcripcional por el reloj circadiano, aunque este mecanismo no regula los niveles de transcritos *DXR* (Covington *et al.* 2008; Hsieh y Goodman 2006). Los datos reunidos en esta tesis también mostraron niveles de transcritos *DXR* en el mutante *toc1-1* sin cambios con respecto al wt, sugiriendo que el incremento de enzima DXR en el mutante *toc1-1* se deben a una regulación postranscripcional Figura 15. Pero quizás el descubrimiento más interesante fue que la alteración de los niveles de TOC1 no solo generaba un aumento en los niveles de proteína DXR sino una oscilación cíclica de los niveles de proteína. Dicha oscilación era fuertemente dependiente de fotoperiodo (mayor a medida que aumentaba la longitud del día) y causaba la acumulación de niveles máximos de proteína al final de la noche y mínimos al final del día, lo que podría sugerir que TOC1 está regulando procesos cíclicos de síntesis, importe a plastos, o degradación de DXR. La existencia de dichos procesos cíclicos podrían explicar por qué los niveles del enzima anterior a DXR en la vía, DXS, permanecen constantes durante el día (datos no publicados del laboratorio) a pesar de que los niveles de transcritos DXS oscilan ampliamente, disminuyendo a lo largo del periodo de día (Covington *et al.* 2008; Hsieh y Goodman 2006).

Los resultados descritos sugieren que el reloj circadiano podría actuar para mantener los niveles de enzimas de la vía del MEP constantes a lo largo del día, independientemente del fotoperiodo. Cuando esta función desaparece, como en los mutantes deficientes en TOC1, los niveles de proteína DXR comienzan a oscilar (Figura 16). Si bien hemos visto que el fotoperiodo afecta los niveles de DXR en los mutantes, TOC1 podría ser responsable de mantener constantes esos niveles a pesar de las distintas longitudes del día (Figura 16). El experimento de la (Figura 18) demuestra también que TOC1 regula las condiciones de fotoperiodo que podrían afectar DXR y no la cantidad total de luz recibida en la fase lumínica; por tanto, la longitud del día es determinante para los niveles de proteína DXR. El mantenimiento constante de los

niveles de proteína DXR (y de otras enzimas de la vía del MEP) aseguraría un aporte continuo y constante de precursores para la síntesis de metabolitos isoprenoides esenciales para la supervivencia y el crecimiento vegetal.

1.3 El mayor tamaño aparente de DXR en el mutante *toc1-1* no influye en su estabilidad o actividad.

El cambio de peso molecular aparente de DXR en fondo *toc1-1* sugirió en un principio que este enzima podría sufrir algún tipo de modificación que podría afectar a su estabilidad y actividad, siendo dicha modificación responsable en último término de su mayor acumulación en el mutante. La secuencia génica y el transcrito *DXR* resultaron ser idénticos tanto en el mutante como en el wt, por lo que se descartaron mecanismos de tipo transcripcional (como por ejemplo un *splicing alternativo* de RNA) o traduccional (como cambios en codones de inicio o final de la traducción) y se buscaron posibles mecanismos postraduccionales como fosforilaciones, modificaciones redox, o procesamiento diferencial de la proteína.

En la Figura 21 los *spots* diferenciales podrían sugerir que DXR en *toc1-1* presenta una distribución distinta de isoformas de DXR con distinto punto isoeléctrico con respecto al wt. La presencia de distintos *spots* en un gel bidimensional puede deberse a modificaciones postranscripcionales como la fosforilación o la oxidación de residuos aminoacídicos. Para investigar si TOC1 podía estar afectando a algún mecanismo de fosforilación que afectara al cambio de movilidad observado en el mutante *toc1-1* (Figura 22) se trataron extractos de proteína de las líneas *toc1-1* y wt con fosfatasa alcalina y se estudiaron los experimentos de separación de DXR por isoelectroenfoque (Figura 21) pero no pudo confirmarse que el cambio de peso molecular aparente de DXR en *toc1-1* se debiera a una modificación por fosforilación (Figura 22).

En cuanto a las posibles isoformas de DXR en distintos estados de oxidación, los resultados obtenidos a partir de los geles bidimensionales (Figura 21) pueden sugerir posibles modificaciones postraduccionales tipo redox, pero necesitarían estudios en mayor profundidad. En el alga unicelular *Ostreococcus tauri*, se ha visto que existen ritmos circadianos postraduccionales basados en la oxidación de peroxiredoxinas (O'Neill *et al.* 2011); estos mecanismos pueden cooperar con el reloj transcripcional de

O. tauri aunque también se propone la existencia de un reloj postranslacional independiente del reloj transcripcional. La teoría endosimbiótica considera las algas unicelulares o cianobacterias como precursores de los plastos en la célula vegetal por lo que podría considerarse que en los plastos exista un reloj postraducciona que regule procesos metabólicos plastídicos mediante oxireducción, sin perjuicio del reloj transcripcional.

También se exploró la posibilidad que el N-terminal de la proteína DXR estuviera modificada de forma diferencial en *toc1-1* con respecto al wt. Para ello, se analizó el N-terminal de la proteína DXR-GFP en los fondos *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* mediante inmunoprecipitación. Los resultados presentados en las (Figura 39, 23) muestran que DXR-GFP no presenta cambios en el N-terminal entre estos fondos genéticos. Para la inmunoprecipitación se requieren anticuerpos adheridos a una resina cuyas cadenas pesadas de IgG (inmunoglobulinas G) son recuperadas en la elución de la resina; estas cadenas pesan aproximadamente 50 KDa, por lo que se superponen a las bandas de DXR eluidas lo que dificulta –si no hace imposible- realizar una correcta identificación de péptidos por degradación de Edman. La proteína DXR-GFP puede capturarse con el anticuerpo anti-GFP unido a la resina, lo que reduce los costes de la técnica al no tener que utilizar un anticuerpo específico contra DXR. Por estas razones, y puesto que se trataba de identificar una modificación postraducciona en DXR que en caso de ser así muy probablemente se encontraría en la proteína recombinante DXR-GFP, se realizó el análisis de DXR-GFP y no de DXR.

El análisis del extremo N-terminal de DXR-GFP reveló la presencia de dos puntos de procesamiento del péptido de tránsito N-terminal diferentes para DXR (Figura 23). Uno de ellos, que genera la secuencia PPPAWPGR en el inicio de la proteína madura, ya había sido propuesta anteriormente (Devin *et al.* 2008) y proponía la localización subplastídica de la correspondiente proteína en el estroma del cloroplasto. Sin embargo, el análisis computacional utilizando herramientas bioinformáticas (CloroP y LumenP) sugiere que la existencia de una secuencia N-terminal más corta podría supuestamente dirigir a DXR al lumen tilacoidal (Fung *et al.* 2010). Si bien no coinciden exactamente los residuos propuestos con el análisis bioinformático y los obtenidos por degradación de Edman (Figura 23), la conclusión es que sí existen dos N-terminales para DXR en el plasto y que

nuevos experimentos deberían planearse para investigar la localización subplastídica de estas dos isoformas y la posible función diferencial de DXR dentro del plasto.

Aunque no se ha tenido éxito en establecer la naturaleza de dichos mecanismos, sí se pudo concluir que cualquiera que sea la naturaleza de la alteración que provoca el cambio de tamaño aparente entre el mutante *toc1-1* y su parental silvestre, esta no provoca cambios de actividad en DXR (Figura 25).

Para verificar que la acumulación de niveles aumentados de DXR en mutantes deficientes en TOC1 y la oscilación de los mismos a lo largo del día obedecía a un tipo de regulación postranscripcional, se analizaron los niveles de enzima DXR y de su actividad (estimado en base a la resistencia a FSM) en plantas hermanas de fondo silvestre o *toc1-1* que expresaban la misma construcción para la sobreexpresión de la proteína de fusión DXR-GFP bajo el control del promotor constitutivo *35S* (que no está regulado circadianamente). Como se observa en la Figura 27, las líneas *toc1-1/DXR-GFP* presentaron mayores niveles de DXR y DXR-GFP y mayor resistencia a FSM en comparación con las líneas hermanas *DXR-GFP*. Además, los niveles de proteína DXR-GFP oscilaron de forma similar a DXR a lo largo del día en las plantas de fondo mutante. El comportamiento análogo en la acumulación de la proteína DXR, codificada por el gen endógeno *DXR*, y de la proteína recombinante DXR-GFP, codificada por el transgen (y por tanto no sometida a regulación transcripcional por el reloj o por TOC1) en los fondos genéticos *toc1-1* y silvestre confirmó que un mecanismo postranscripcional dependiente de TOC1 era el responsable de la acumulación diferencial observada. Curiosamente, los niveles de proteína DXR y DXR-GFP a principio del día en las líneas *toc1-1/DXR-GFP* son el doble que los de la línea hermana *DXR-GFP* (Figura 26), mientras que la diferencia para la proteína endógena (DXR) fue mucho más acusada en líneas no transgénicas, alcanzando niveles 9 veces superiores en *toc1-1* con respecto al wt (C24) a la misma hora del día y en igual fotoperiodo (Figura 16 y 26). Se ha visto que la fusión de GFP podría disminuir la actividad de DXR cuando esta se fusiona a DXR (Figura 29) y que la proteína DXR-GFP contenida en las vesículas de las líneas sobreexpresoras podría también no ser activa (Figura 29), lo que podría explicar la menor diferencia en cuanto a niveles de proteína sobreexpresada en las líneas hermanas transgénicas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* y las líneas *toc1-1* y C24 (wt). Podrían existir también mecanismos reguladores que

equilibren la disponibilidad de DXR y DXR-GFP activa a través de algún tipo de *feedback* de manera que la sobreexpresión de DXR-GFP podría hacer disminuir la síntesis de DXR endógena.

TOC1 forma parte del *evening-loop* del reloj y sus niveles aumentan a lo largo del periodo de luz, mientras que los genes de la vía del MEP se coexpresan con los genes del *morning-loop* (*PRR9*, *CCA1*, *LHY*) y sus transcritos son más abundantes durante la mañana (Vranova *et al.* 2012; Meier *et al.* 2011; Covington *et al.* 2008). No se conoce prácticamente nada a nivel de regulación postranscripcional, aunque los datos aportados en esta tesis apoyan un papel clave de este tipo de regulación en el caso de DXR. En cuanto al mecanismo implicado, en el trabajo de tesis se han explorado varias posibilidades no mutuamente excluyentes que se discutirán a continuación: la subcompartimentalización plastídica y el plegamiento y degradación de polipéptidos DXR que han perdido parte de su actividad.

2. Niveles elevados de DXR-GFP generan la aparición de vesículas subplastídicas.

La compartimentación subcelular se considera una característica intrínseca de la célula eucariota. Muchos procesos en la célula vegetal tiene lugar de forma compartimentalizada en el núcleo celular, las mitocondrias, los cloroplastos, los peroxisomas, los lisosomas, el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi. La compartimentación subcelular aporta a los organismos ventajas y complejidad. Por ejemplo, diferentes reacciones metabólicas necesitan de un pH específico y condiciones de oxirreducción determinadas, que se pueden conseguir separando los espacios en que tienen lugar.

Se ha propuesto que las mitocondrias y los cloroplastos tienen en la célula eucariota un origen endosimbiótico (Cavalier-Smith 2000). En cianobacterias, que se consideran los precursores de los cloroplastos, se han descrito orgánulos como los denominados carboxisomas que contienen algunos enzimas del ciclo de Calvin (Badger y Price 2003), además de las extensiones membranosas de la membrana plasmática denominadas tilacoides. También en el interior del plastido existen diferentes compartimentos que albergan reacciones diversas (Figura 58). Mediante aproximaciones proteómicas y bioinformáticas se ha propuesto la localización de los enzimas de la vía del MEP en el

estroma de los plastos y el citosol de las cianobacterias (Joyard *et al.* 2009, 2010). En algunos casos, los enzimas de algunas vías metabólicas se encuentran distribuidos en diferentes tipos celulares; es el caso por ejemplo de HDS en *Catharanthus roseus*. Las células del denominado parénquima del floema interno son especialmente ricas en la enzima HDS mientras que apenas se detecta en las células de la epidermis (Oudin *et al.* 2007).

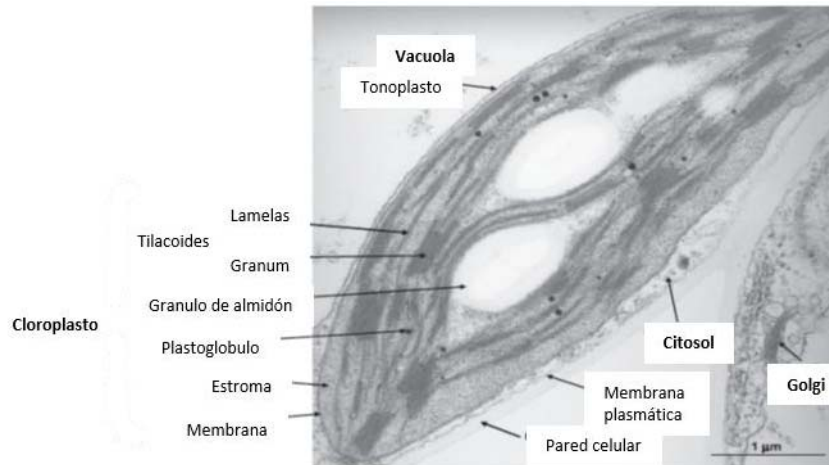


Figura 58. Imagen de un cloroplasto tomada por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM). Los plastos están formados por una doble membrana, tilacoides, estroma, gránulos de almidón y plastoglobulos. Los diferentes compartimentos de la célula vegetal están indicados en la figura. Adaptado de Brehelin y Kessler, 2008.

Se observó también que la sobreexpresión de DXR-GFP causa la formación de vesículas subplastídicas que no se detectan en plantas silvestres, sugiriendo que o bien la acumulación de niveles elevados de una proteína con actividad DXR o bien la presencia de la propia proteína recombinante DXR-GFP resulta en su almacenamiento en una localización intraplastídica alternativa al estroma. La formación de vesículas subplastídicas como cuerpos proteicos generadas como consecuencia de la sobreexpresión de enzimas en el plastido ha sido previamente descrita para proteínas tipo tiorredoxina unida a la albúmina sérica humana (Trx-HSA) (Sanz-Barrio *et al.* 2011). En general, se considera que la compartimentación de proteínas en cuerpos de inclusión tiene lugar inactivando su conformación nativa (Mitraki *et al.* 1991). La acumulación de proteína DXR-GFP en forma semi-activa o incluso inactiva en estas vesículas subplastídicas podría explicar por qué las líneas *DXR-GFP* poseen unos niveles de resistencia a FSM por unidad de proteína menores a los de líneas que sobreexpresan la

proteína DXR silvestre (Figura 29). En las líneas sobreexpresoras se identificó también la presencia de DXR-GFP o DXR en el estroma plastídico mediante inmunolocalización y microscopía electrónica de transmisión, pero la misma tecnología no permitió detectar la presencia de la proteína DXR endógena en cortes de plantas silvestres. Es posible que o bien la técnica o bien las limitaciones del anticuerpo primario contra DXR requieran elevados niveles de DXR para ser detectada. En cualquier caso, es esperable que la proteína localizada en el estroma corresponda con polipéptidos enzimáticamente activos de DXR.

En el plasto existen tres tipos de membranas que podrían generar potencialmente vesículas subplastídicas: la membrana externa, la membrana interna y la membrana tilacoidal; hay por tanto tres tipos de espacios intermembranosos, que son el espacio intermembrana entre la membrana externa y la interna, el estroma y el lumen tilacoidal en el interior de los tilacoides. Predicciones bioinformáticas proponen que la formación de este tipo de vesículas en los plastos seguirían un tipo de mecanismo similar a la formación de vesículas de otros compartimentos celulares como el aparato de Golgi (Khan *et al.* 2013). Por ejemplo, se ha propuesto que algunas proteínas del tilacoide son transportadas en vesículas desde la membrana plastídica hasta el tilacoide (Khan *et al.* 2013). Por otra parte, se ha propuesto que algunos orgánulos subplastidiales como los plastoglóbulos tienen un origen tilacoidal (Austin *et al.* 2006). Los datos mostrados en esta tesis indican, sin embargo, que DXR-GFP no se localiza en plastoglóbulos (Figura 32). Es posible por tanto que las vesículas subplastídicas que contienen DXR-GFP tengan un origen en la misma membrana plastídica. Su tamaño, de 500 nm de promedio y su aspecto electrodensos sugiere que no son acúmulos lipídicos procedentes directamente del tilacoide sino que se trata de acúmulos proteicos. Existen por otra parte extensiones de la doble membrana plastídica conocidos como estrómulos que se encuentran en todos los tipos de plastos, aunque menos presentes en cloroplastos (Holzinger *et al.* 2008). Los estrómulos presentan una morfología de túbulo y son muy dinámicos como formación plastídica; pueden establecer conexiones entre los plastos favoreciendo el intercambio de materiales o incrementando la superficie de intercambio de importe y exportación de proteínas plastídicas. Los estrómulos se originan a partir de la membrana

plastídica lo que podría sugerir una relación en cuanto a su formación con las vesículas de DXR-GFP observadas.

Las imágenes de la Figura 33,34 muestran que las vesículas electrondensas que contienen DXR-GFP podrían ser liberadas al citosol y podrían tener un destino hacia la vacuola en un proceso autofágico. Se ha descrito que la sobreexpresión de algunas proteínas plastídicas y la RuBisCo son destinadas a la vacuola mediante la formación de vesículas electrondensas similares a las detectadas para DXR-GFP (Ishida *et al.* 2008). Sin embargo, deberían realizarse sucesivos estudios para afirmar que las vesículas DXR-GFP tienen un destino autofágico.

Los plastos de las líneas *toc1-1/DXR-GFP* y *DXR-GFP* presentaban además otras alteraciones morfológicas evidentes además de la aparición de vesículas. Imágenes de gran aumento (Figura 34) mostraron los tilacoides alterados en ambas líneas de sobreexpresión en comparación con el wt. Además, los plastos de las líneas sobreexpresoras presentaban zonas abultadas y carecían de gránulos de almidón definidos como los observados en el wt. Este efecto sobre los plastos se ha observado también en plastos de células de maíz sometidas a condiciones de estrés (Omoto *et al.* 2012); en este estudio, las plantas con estrés salino presentaban unos niveles de actividad enzimática RuBPCasa (Rubisco, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) disminuida, así como menores niveles de almidón y metabolitos fotosintéticos. Ello podría sugerir que la aplicación de un estrés bien salino o por sobreexpresión de un enzima podría provocar alteraciones metabólicas que afectaran a la disponibilidad de almidón y a la morfología plastídica.

En cuanto a diferencias entre los plastos de hermanas silvestres y mutantes (deficientes en TOC1) que acumulan DXR-GFP, las plantas *toc1-1/DXR-GFP* mostraban un mayor número de plastos más pequeños (Figura 30), lo que sugiere una mayor tasa de división plastídica. Se sabe que señales lumínicas positivas y negativas son integradas por los fotorreceptores y éstas regulan la fotomorfogénesis y promueven las señales para la división plastídica. Los resultados de esta tesis sugieren que TOC1 en particular y el reloj circadiano en general podrían estar implicados en el control de la división de los plastos. Poco se sabe acerca de la regulación de la biogénesis plastídica por el reloj

circadiano (Waters y Langdale 2009), aunque se ha descrito que en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, organismo modelo para el estudio del reloj circadiano, el reloj circadiano participa en el control del ciclo celular (Matsuo y Ishiura 2010). La proteína del citoesqueleto FtsZ es un componente de la maquinaria de la división plástica presente en cianobacterias y plastos que forma un anillo en el lugar de la división plástica {TerBush, 2013 #2}. Se ha visto que para la formación del anillo FtsZ son necesarias las chaperoninas del complejo Cpn60; reducciones moderadas de niveles de las chaperoninas Cpn60 dañan la formación del anillo FtsZ pero no el importe de esta proteína, lo que sugiere que el complejo Cpn60 es necesario para el plegamiento de de FtsZ (Suzuki *et al.*, 2009).

3 Regulación postranscripcional de DXR.

Muchas de las proteínas plásticas están reguladas a nivel postranscripcional o postraduccional, principalmente mediante modificaciones de la proteína, mediante la formación de complejos multiproteicos, y mediante la proteólisis (Koop 2007). Las proteínas plásticas o recombinantes con péptidos de tránsito son reconocidas e importadas al plasto mediante transportadores específicos TOC/TIC (Flores Pérez y Jarvis, 2013). Durante el proceso de importe las proteasas específicas SPP, cortan el péptido de tránsito produciendo la proteína madura (Jarvis y Robinson 2004). Una vez en el interior del plasto, las proteínas maduras son plegadas correctamente con la ayuda de chaperonas moleculares para poder ser funcionales (Inoue *et al.* 2013; Shi y Theg 2010; Su y Li 2010; Soll y Schleiff 2004). Las proteínas mal plegadas o dañadas por procesos de estrés son también reconocidas por chaperonas que o bien las repliegan a su forma activa o bien las despliegan para ser posteriormente degradadas por alguno de los sistemas de proteasas existentes en los plastos (Clp, Deg, FtsH, Lon, etc). En el caso de la vía del MEP, se ha propuesto que las primeras enzimas (DXS y DXR) podrían ser degradadas por el complejo de la Clp proteasa presente en el estroma plástico (Flores-Perez *et al.* 2008; Gas *et al.* 2009 Plant Cell). Entre las chaperonas plásticas descritas para los procesos control de calidad de proteínas como plegamiento, estabilización o reparación de proteínas dañadas o degradación se encuentran las familias de chaperonas plásticas Hsp70 y Cpn60. Resultados en el laboratorio habían mostrado la

participación del sistema de Hsp70 en el plegamiento y degradación de DXS (Pulido P et al., 2013). Por otra parte, existían varios indicios que apuntaban a un papel similar de las chaperonas Cpn60 plastídicas en el caso de DXR. En primer lugar, DXR es capaz de interactuar con varios tipos de isoformas Cpn60 tanto en ensayos de doble híbrido (interacción detectada en la base de datos *Arabidopsis Interaction Viewer*) como de BiFC (Tabla 30, Figura 37). En segundo lugar, entre los mutantes resistentes a FSM (mutantes *rif*) identificados en una colección de *activation tagging* (Weigel et al. 2000) se encontró una línea de ganancia de función de Cpn60 α 2, una de las isoformas Cpn60 plastídicas (Cairo Calzada, 2009). El trabajo descrito en esta tesis demostró que cambios en los niveles de la isoforma Cpn60 α 1 (Figura 43, 50) o de cochaperoninas auxiliares de las familias Cpn10 y Cpn20 (Figura 47) también generan cambios en la resistencia a FSM debido a alteraciones en los niveles de las isoformas del complejo Cpn60. Por último, los niveles de subunidades Cpn60 β están reducidos significativamente en el mutante *toc1-1* (Figura 57), lo que sugiere una posible conexión entre el reloj y la regulación postranscripcional de DXR (así como de la división plastídica) a través de las chaperonas Cpn60 plastídicas (Figura 59).

Las chaperonas Cpn60, junto con las Cpn10 y Cpn20, se denominan chaperoninas de tipo I (Vitlin Gruber 2013) y forman parte de una clase de chaperonas moleculares presentes en procariontes y en mitocondrias o plastos de eucariotes que funcionan facilitando el plegamiento, ensamblaje y translocación de proteínas (Hartl 1996). En estudios realizados en bacterias, las chaperoninas GroEL (Cpn60) y GroES (Cpn10) protegen sustratos y previenen su degradación; las formas GroEL en *Escherichia coli* forman homotetradecámeros que consisten en dos anillos toroides de siete subunidades idénticas cada uno. Sin embargo, las chaperoninas plastídicas en plantas se diferencian de las GroEL en que existen dos tipos de subunidades Cpn60, las Cpn60 α y las Cpn60 β (Figura 59), que conforman el tetradecámero de las Cpn60 (Hemmingsen y Ellis 1986; Musgrove et al. 1987). En *A.thaliana* las secuencias aminoacídicas de las isoformas de Cpn60 sólo coinciden en un 50% de identidad; se han identificado seis posibles secuencias genómicas que podrían codificar para proteínas plastídicas Cpn60; dos de ellas codifican para las Cpn60 α (Cpn60 α 1 y Cpn60 α 2) y cuatro para las Cpn60 β (Cpn60 β 1, Cpn60 β 2, Cpn60 β 3 y Cpn60 β 4) (Hill y Hemmingsen 2001). Los mutantes

knock down para Cpn60 α 1, *arc2* (*accumulation and replication of chloroplasts*), y el de Cpn60 β 2, *br04*, presentan además un mayor tamaño de cloroplastos en comparación con el wt (Suzuki *et al.* 2009); ello se debe a la participación de estas chaperoninas en la división plastídica (Suzuki *et al.* 2009). El mutante *slp* (*shlepperless*) defectivo en una de las Cpn60 α mostró defectos en el desarrollo de los plastos y del embrión (Apuya *et al.* 2001); también el mutante *len1* (*lesion initiation 1*) defectivo en una isoforma de Cpn60 β presentó alteraciones en el tamaño de las plántulas (Ishikawa *et al.* 2003). Se cree que *in vivo* no se forman complejos sólo con subunidades Cpn60 α (α 14) sino que estos están compuestos o bien de dos anillos de 7 subunidades Cpn60 β (β 14) o bien de cantidades equivalentes de subunidades Cpn60 α y Cpn60 β (α 7 β 7) formando anillos homo o heteroméricos a los que pueden asociarse co-chaperoninas para modular la actividad del complejo (Figura 59). En cloroplastos existen dos genes para las co-chaperoninas Cpn10; uno de los genes codifica para las Cpn10, que forman un anillo heptamérico de siete subunidades de 10 kDa. El otro gen es único para este orgánulo y consiste en dos secuencias tipo *Cpn10* en una unión cabeza-cola formando una subunidad de 20 kDa (Cpn20); estas subunidades forman estructuras en anillo en forma de tetrámeros (Hill y Hemmingsen, 2001; Vitlin Gruber *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos por BiFC sugieren que DXR puede interactuar *in vivo* con todas las isoformas Cpn60. Es posible, sin embargo, que la interacción propiamente dicha únicamente tenga lugar con las subunidades Cpn60 α (en particular con Cpn60 α 1, con la que se observó una reconstrucción de la fluorescencia especialmente robusta por BiFC; Figura 37, 38) aunque no pudo confirmarse en experimentos de inmunoprecipitación (Figura 39), quizás debido a los bajos niveles de expresión de esta proteína (Vitlin Gruber *et al.* 2013). La aparición de fluorescencia por BiFC al utilizar los pares de DXR con cada una de las cuatro subunidades Cpn60 β podrían deberse a la cercanía entre estas proteínas al formarse el complejo (Figura 59).

La pérdida de función de Cpn60 α 1 generó niveles reducidos de enzima DXR con respecto al wt y una menor resistencia a FSM (Figura 42, 43, 50) lo que sugiere que Cpn60 α 1 afecta a la estabilidad de DXR. Por otro lado, la sobreexpresión de Cpn60 α 1-GFP también causó una reducción en los niveles de DXR (Figura 50). Los resultados sugieren que una desestabilización de la estequiometría de los complejos Cpn60 α 7 β 7,

bien por defecto o bien por exceso de subunidades α , podría dar como resultado una pérdida de actividad del complejo que a su vez causase una menor acumulación de DXR. Esta conclusión implica una correlación positiva entre actividad Cpn60 ($\alpha7\beta7$) y estabilidad de DXR, posiblemente porque este complejo reconoce y reactiva (repliega) formas dañadas (mal plegadas) de DXR que de otra manera serían degradadas (Figura 59). Por el contrario, los mutantes deficientes en co-chaperoninas tipo Cpn10 (Cpn10.1, Cpn10.2 y Cpn20) mostraron una mayor resistencia a FSM que, en algunos casos, iba ligada a la acumulación de mayores niveles de DXR (Figura 47). Una posible interpretación es que el complejo Cpn60 $\alpha7\beta7$ asociado al subcomplejo Cpn10 podría perder la afinidad por DXR (Figura 59). De esta forma, los mutantes deficientes en subunidades Cpn10 tendrían una mayor proporción de Cpn60 $\alpha7\beta7$ y por tanto una mayor capacidad de activar y proteger de la degradación a los polipéptidos de DXR que pudieran ser dañados por procesos de estrés ordinario o extraordinarios.

Aunque el resto de mutantes analizados, deficientes en cada una de las subunidades Cpn60 β , no presentan grandes diferencias en niveles de DXR y resistencia a FSM con respecto a las plantas silvestres, es posible que esto se deba a un efecto de redundancia génica (Suzuki *et al.* 2009). Se ha sugerido que cada una de estas subunidades podría tener un papel específico sobre determinados sustratos aunque algunas de sus funciones sean redundantes. Por ejemplo el doble mutante *cpn60 β 2/cpn60 β 3* es viable sugiriendo que las subunidades Cpn60 β restantes (Cpn60 β 1 y Cpn60 β 4) son capaces de compensar la pérdida de función de las ausentes (Cpn60 β 2 y Cpn60 β 3). En el caso de Cpn60 β 4, la isoforma de Cpn60 más alejada filogenéticamente (Hill y Hemmingsen 2001), es capaz de plegar e incorporar la subunidad NdhH en el complejo NADH deshidrogenasa-*like* (Peng *et al.* 2011). El posible efecto de la redundancia sobre los niveles y actividad de DXR habrá que verificarlo mediante el uso de mutantes múltiples que disminuyan progresivamente los niveles de estas subunidades. En cualquier caso, es posible que las subunidades Cpn60 β tengan un papel secundario en la regulación postranscripcional de DXR y que los complejos Cpn60 β 14 no sean capaces de replegar (Figura 59). La importante disminución en los niveles de subunidades Cpn60 β observadas en el mutante *toc1-1* (Figura 57) podría generar un desplazamiento del equilibrio hacia los complejos Cpn60 $\alpha7\beta7$ (Figura 59). Como ocurría en el caso de los

mutantes en subunidades Cpn10, esto podría generar mayores niveles y/o actividad DXR, explicando el fenotipo de los mutantes. Con este modelo se esperaría por tanto que mutantes múltiples de Cpn60 β (con niveles sustancialmente reducidos de estas subunidades) también tuviesen un fenotipo similar de resistencia a FSM por una mayor acumulación de enzima DXR activa.

Las diferentes proporciones entre proteína activa e inactiva esperada según este modelo en mutantes de subunidades Cpn60 como *arc2* podría también explicar la distribución diferencial de DXR-GFP en los plastos de plantas *arc2/DXR-GFP* y *DXR-GFP*. Por tanto, la chaperona Cpn60 podría estar también implicada en la localización subplastídica de DXR-GFP por un mecanismo postranscripcional. El modelo también explicaría el efecto de la pérdida de función de TOC1 sobre el tamaño y el número de plastos (Figura 59).

Aunque este modelo explica razonablemente gran parte de las observaciones realizadas durante la tesis, las discrepancias en algunos casos pueden venir determinadas por la alta variabilidad en cuanto a resistencia a FSM dentro de una misma línea (Figura 41). A pesar que la cuantificación de la resistencia a FSM es un método excelente para la detección de mutantes con una regulación de la vía del MEP alterada y para la estimación de la actividad DXR, hay numerosos que pueden influir en la resistencia a FSM (ver *Artículo 2*).

Un estudio en mayor profundidad acerca de la formación de los complejos Cpn60 y su estequiometría en *A.thaliana* ayudaría a comprender la regulación de la conformación nativa de DXR o de su posible implicación en protegerla frente a la degradación. El aumento de los niveles de DXR en el mutante *toc1-1* y la oscilación diurna de DXR en estos mutantes sugería que TOC1 regulara rítmicamente un mecanismo de regulación postraduccional que afectara DXR. Tanto los niveles de transcrito de Cpn60 α como de Cpn60 β oscilan diurnamente, pero no circadianamente (Pilgrim y McClung 1993). Por tanto, parece razonable construir un modelo en el TOC1 regula DXR a través de un mecanismo postraduccional que implique el complejo Cpn60.

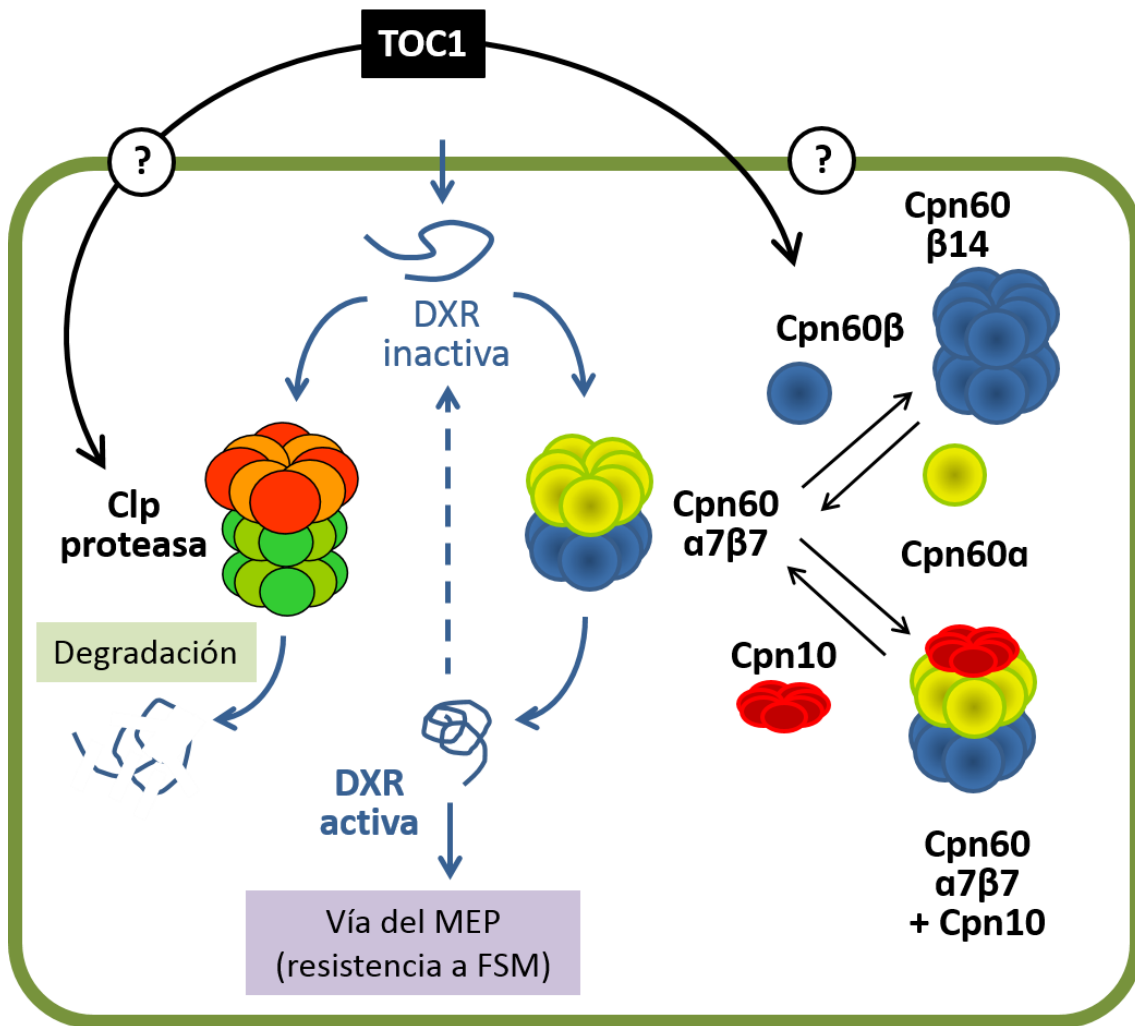


Figura 59. Modelo para explicar posibles mecanismos de regulación postranscripcional de DXR. La proteína DXR es importada al plasto donde adquiere su conformación activa mediante el complejo de chaperonas Cpn60α7β7. Por otro lado, TOC1 activa las subunidades Cpn60β y favorece la formación de complejos Cpn60β14 en detrimento de los complejos Cpn60α7β7, lo que explicaría el efecto represor de TOC1 sobre DXR; los complejos Cpn60α7β7+Cpn10 podrían secuestrar a los Cpn60α7β7 lo que explicaría el aumento de la resistencia a FSM en los mutantes *cpn10*. En el modelo también se presenta un posible mecanismo alternativo por el que TOC1 podría activando la degradación de DXR

CONCLUSIONES

Conclusiones

Conclusiones

1. La alteración en la función del reloj circadiano y particularmente de TOC1 puede generar una acumulación de DXR y un aumento en la resistencia a FSM.
2. Plantas deficientes en TOC1 presentan niveles elevados de proteína DXR pero no de transcritos comparado con plantas silvestres, lo que sugiere un tipo de regulación postranscripcional.
3. Mientras que los niveles de proteína DXR permanecen estables en plantas silvestres, la pérdida de función de TOC1 provoca una oscilación de los mismos. La máxima diferencia entre el mutante y las plantas silvestres se observa a principio del día.
4. La oscilación de DXR en las plantas mutantes es dependiente de fotoperiodo siendo máxima en día largo.
5. Se han identificado al menos cuatro isoformas de DXR en plantas silvestres y deficientes en TOC1. En el mutante se acumulan las dos isoformas más ácidas. No se ha podido determinar si diferencias en fosforilación, modificaciones redox o procesamiento de la secuencia N-terminal de DXR son las responsables de los cambios detectados en las isoformas del mutante.
6. La línea *toc1-1* presenta plastos más pequeños y en mayor abundancia que el parental silvestre lo que puede sugerir un efecto represor sobre la división plastídica de TOC1.
7. La sobreexpresión de DXR-GFP provoca cambios estructurales y morfológicos en los plastos entre ellos la formación de vesículas subplastídicas que contienen la proteína recombinante. Estas vesículas podrían transportar proteína inactiva fuera del plasto.
8. Experimentos de Complementación Fluorescente Bimolecular demostraron que DXR interacciona *in vivo* con las dos isoformas de tipo α y las cuatro de tipo β que componen los dos tipos de complejos Cpn60 descritos ($\alpha7\beta7$ y $\beta14$). Estos resultados sugieren que Cpn60 podría tener un papel en el plegamiento de DXR.
9. Mutantes individuales de las isoformas Cpn60 no muestran una resistencia a FSM significativamente alterada, con la única excepción del mutante *arc2* (deficiente en Cpn60 $\alpha1$), que es más sensible al inhibidor.
10. El mutante *arc2* presenta una reducción en los niveles de DXR activa a pesar de un aumento de los niveles de transcrito con respecto a las plantas silvestres.
11. La sobreexpresión de Cpn60 $\alpha1$ -GFP genera también una disminución en los niveles de DXR y en la resistencia a FSM. Es posible que tanto un aumento como una disminución en los niveles de Cpn60 $\alpha1$ desestabilice los complejos Cpn60 $\alpha7\beta7$ por alterar la estequiometría de los mismos.
12. La desestabilización de estos complejos Cpn60 aumenta la tasa de degradación de DXR. Estos datos y la información disponible en la bibliografía sugieren que el complejo

Conclusiones

Cpn60 $\alpha 7\beta 7$ podría replegar y por tanto recuperar formas inactivas de DXR que, de lo contrario, serían degradadas.

13. La pérdida de función de TOC1 no afecta la expresión de ninguno de los genes codificantes para isoformas Cpn60 pero resulta en una disminución en los niveles proteicos de las isoformas Cpn60 β .

14. La disminución de subunidades Cpn60 β en el mutante *toc1-1* podría causar un enriquecimiento de los complejos $\alpha 7\beta 7$ en detrimento de los $\beta 14$, favoreciendo así el plegamiento y la acumulación de DXR activa.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Bibliografía

- Abel C, Clauss M, Schaub A, Gershenzon J, Tholl D (2009) Floral and insect-induced volatile formation in *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*, a perennial, outcrossing relative of *A. thaliana*. *Planta* 230 (1):1-11. doi:10.1007/s00425-009-0921-7
- Alabadi D, Oyama T, Yanovsky MJ, Harmon FG, Mas P, Kay SA (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293 (5531):880-883. doi:10.1126/science.1061320
- Apuya NR, Yadegari R, Fischer RL, Harada JJ, Zimmerman JL, Goldberg RB (2001) The *Arabidopsis* embryo mutant *schlepperless* has a defect in the chaperonin-60 α gene. *Plant physiology* 126 (2):717-730
- Arabidopsis* Genome I (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (6814):796-815. doi:10.1038/35048692
- Arimura G, Garms S, Maffei M, Bossi S, Schulze B, Leitner M, Mithofer A, Boland W (2008) Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. *Planta* 227 (2):453-464. doi:10.1007/s00425-007-0631-y
- Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA (1997) A deletion in the PHYD gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *The Plant cell* 9 (8):1317-1326. doi:10.1105/tpc.9.8.1317
- Austin JR, 2nd, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant cell* 18 (7):1693-1703. doi:10.1105/tpc.105.039859
- Bachmair A, Finley D, Varshavsky A (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234 (4773):179-186
- Badger MR, Price GD (2003) CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of experimental botany* 54 (383):609-622
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schurmann P, Buchanan BB (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (1):370-375. doi:10.1073/pnas.232703799
- Barta C, Loreto F (2006) The relationship between the methyl-erythritol phosphate pathway leading to emission of volatile isoprenoids and abscisic acid content in leaves. *Plant physiology* 141 (4):1676-1683. doi:10.1104/pp.106.083063
- Bonshtien AL, Parnas A, Sharkia R, Niv A, Mizrahi I, Azem A, Weiss C (2009) Differential effects of co-chaperonin homologs on cpn60 oligomers. *Cell stress & chaperones* 14 (5):509-519. doi:10.1007/s12192-009-0104-2
- Bonshtien AL, Weiss C, Vitlin A, Niv A, Lorimer GH, Azem A (2007) Significance of the N-terminal domain for the function of chloroplast cpn20 chaperonin. *The Journal of biological chemistry* 282 (7):4463-4469. doi:10.1074/jbc.M606433200
- Boston RS, Viitanen PV, Vierling E (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant molecular biology* 32 (1-2):191-222
- Botella-Pavia P, Besumbes O, Phillips MA, Carretero-Paulet L, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2004) Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the

Bibliografia

- supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40 (2):188-199. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02198.x
- Brammer LA, Smith JM, Wade H, Meyers CF (2011) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase catalyzes a novel random sequential mechanism. *The Journal of biological chemistry* 286 (42):36522-36531. doi:10.1074/jbc.M111.259747
- Budziszewski GJ, Lewis SP, Glover LW, Reineke J, Jones G, Ziemnik LS, Lonowski J, Nyfeler B, Aux G, Zhou Q, McElver J, Patton DA, Martienssen R, Grossniklaus U, Ma H, Law M, Levin JZ (2001) Arabidopsis genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics* 159 (4):1765-1778
- Bunning E (1967) [Regularity of chronobiology]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin* 73:887-895
- Burlat V, Oudin A, Courtois M, Rideau M, St-Pierre B (2004) Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38 (1):131-141. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02030.x
- Cairó Calzada A (2009) Anàlisi Molecular de la Biosíntesi d'Isoprenoides a Arabidopsis. Universitat de Barcelona,
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodríguez-Concepción M, Ferrer A, Boronat A, Campos N (2002) Expression and molecular analysis of the Arabidopsis DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant physiology* 129 (4):1581-1591. doi:10.1104/pp.003798
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A, Rodríguez-Concepción M (2006) Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant molecular biology* 62 (4-5):683-695. doi:10.1007/s11103-006-9051-9
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Talavera D, Saura A, Imperial S, Rodríguez-Concepción M, Campos N, Boronat A (2013) Functional and evolutionary analysis of DXL1, a non-essential gene encoding a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase like protein in Arabidopsis thaliana. *Gene* 524 (1):40-53. doi:10.1016/j.gene.2012.10.071
- Castillon A, Shen H, Huq E (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in plant science* 12 (11):514-521. doi:10.1016/j.tplants.2007.10.001
- Cavalier-Smith T (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in plant science* 5 (4):174-182
- Chou ML, Yang CH (1999) Late-flowering genes interact with early-flowering genes to regulate flowering time in Arabidopsis thaliana. *Plant & cell physiology* 40 (7):702-708
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16 (6):735-743
- Córdoba E, Salmi M, Leon P (2009) Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *Journal of experimental botany* 60 (10):2933-2943. doi:10.1093/jxb/erp190

- Covington MA, Riedel WJ, Brown C, He C, Morris E, Weinstein S, Semple J, Brown J (2009) Ketamine and schizophrenic speech: more difference than originally reported. *Journal of psychopharmacology* 23 (1):111-112. doi:10.1177/0269881108091590
- Covington MF, Maloof JN, Straume M, Kay SA, Harmer SL (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome biology* 9 (8):R130. doi:10.1186/gb-2008-9-8-r130
- Crowell DN (2000) Functional implications of protein isoprenylation in plants. *Progress in lipid research* 39 (5):393-408
- Crowell DN, Packard CE, Pierson CA, Giner JL, Downes BP, Chary SN (2003) Identification of an allele of CLA1 associated with variegation in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia plantarum* 118 (1):29-37
- D'Auria JC, Gershenzon J (2005) The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current opinion in plant biology* 8 (3):308-316. doi:10.1016/j.pbi.2005.03.012
- Dairi T (2005) Studies on biosynthetic genes and enzymes of isoprenoids produced by actinomycetes. *The Journal of antibiotics* 58 (4):227-243. doi:10.1038/ja.2005.27
- Devin JK, Vaughan DE, Blevins LS, Jr., Chen Q, Covington J, Verity DK, Young PP (2008) Low-dose growth hormone administration mobilizes endothelial progenitor cells in healthy adults. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 18 (3):253-263. doi:10.1016/j.ghir.2007.11.001
- Disch A, Rohmer M (1998) On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS microbiology letters* 168 (2):201-208
- Disch A, Schwender J, Muller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *The Biochemical journal* 333 (Pt 2):381-388
- Dixon LE, Knox K, Kozma-Bognar L, Southern MM, Pokhilko A, Millar AJ (2011) Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in *Arabidopsis*. *Current biology : CB* 21 (2):120-125. doi:10.1016/j.cub.2010.12.013
- Dodd AN, Salathia N, Hall A, Kevei E, Toth R, Nagy F, Hibberd JM, Millar AJ, Webb AA (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309 (5734):630-633. doi:10.1126/science.1115581
- Dowson-Day MJ, Millar AJ (1999) Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 17 (1):63-71
- Doyle MR, Davis SJ, Bastow RM, McWatters HG, Kozma-Bognar L, Nagy F, Millar AJ, Amasino RM (2002) The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 419 (6902):74-77. doi:10.1038/nature00954
- Drake WM, McClung M, Njeh CF, Genant HK, Rosen C, Watts N, Kendler DL (2001) Multisite bone ultrasound measurement on North American female reference population. *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry* 4 (3):239-248

Bibliografía

- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W, Gershenzon J (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3):933-938. doi:10.1073/pnas.0407360102
- Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J (2004) Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology* 135 (4):1893-1902. doi:10.1104/pp.104.049981
- Enfissi EM, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schuch W, Bramley PM (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant biotechnology journal* 3 (1):17-27. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00091.x
- Estevez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *The Journal of biological chemistry* 276 (25):22901-22909. doi:10.1074/jbc.M100854200
- Facchini PJ, Bird DA, St-Pierre B (2004) Can Arabidopsis make complex alkaloids? *Trends in plant science* 9 (3):116-122. doi:10.1016/j.tplants.2004.01.004
- Farre EM, Harmer SL, Harmon FG, Yanovsky MJ, Kay SA (2005) Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the Arabidopsis circadian clock. *Current biology : CB* 15 (1):47-54. doi:10.1016/j.cub.2004.12.067
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 (6230):245-246. doi:10.1038/340245a0
- Flores-Perez U, Jarvis P (2013) Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. *Biochimica et biophysica acta* 1833 (2):332-340. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.03.019
- Flores-Perez U, Perez-Gil J, Closa M, Wright LP, Botella-Pavia P, Phillips MA, Ferrer A, Gershenzon J, Rodriguez-Concepcion M (2010) Pleiotropic regulatory locus 1 (PRL1) integrates the regulation of sugar responses with isoprenoid metabolism in Arabidopsis. *Molecular plant* 3 (1):101-112. doi:10.1093/mp/ssp100
- Flores-Perez U, Perez-Gil J, Rodriguez-Villalon A, Gil MJ, Vera P, Rodriguez-Concepcion M (2008a) Contribution of hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase to carotenoid biosynthesis in bacteria and plants. *Biochemical and biophysical research communications* 371 (3):510-514. doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.115
- Flores-Perez U, Sauret-Gueto S, Gas E, Jarvis P, Rodriguez-Concepcion M (2008b) A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids. *The Plant cell* 20 (5):1303-1315. doi:10.1105/tpc.108.058768
- Fowler S, Lee K, Onouchi H, Samach A, Richardson K, Morris B, Coupland G, Putterill J (1999) GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *The EMBO journal* 18 (17):4679-4688. doi:10.1093/emboj/18.17.4679
- Fraser PD, Pinto ME, Holloway DE, Bramley PM (2000) Technical advance: application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 24 (4):551-558

Bibliografía

- Fukushima A, Kusano M, Nakamichi N, Kobayashi M, Hayashi N, Sakakibara H, Mizuno T, Saito K (2009) Impact of clock-associated Arabidopsis pseudo-response regulators in metabolic coordination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (17):7251-7256. doi:10.1073/pnas.0900952106
- Fung PK, Krushkal J, Weathers PJ (2010) Computational analysis of the evolution of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase, an important enzyme in plant terpene biosynthesis. *Chemistry & biodiversity* 7 (5):1098-1110. doi:10.1002/cbdv.200900313
- Gendron JM, Pruneda-Paz JL, Doherty CJ, Gross AM, Kang SE, Kay SA (2012) Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (8):3167-3172. doi:10.1073/pnas.1200355109
- Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343 (6257):425-430. doi:10.1038/343425a0
- Graf A, Smith AM (2011) Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Trends in plant science* 16 (3):169-175. doi:10.1016/j.tplants.2010.12.003
- Guevara-Garcia A, San Roman C, Arroyo A, Cortes ME, de la Luz Gutierrez-Nava M, Leon P (2005) Characterization of the Arabidopsis clb6 mutant illustrates the importance of posttranscriptional regulation of the methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *The Plant cell* 17 (2):628-643. doi:10.1105/tpc.104.028860
- Gutierrez-Nava Mde L, Gillmor CS, Jimenez LF, Guevara-Garcia A, Leon P (2004) CHLOROPLAST BIOGENESIS genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant physiology* 135 (1):471-482. doi:10.1104/pp.103.036996
- Hans J, Hause B, Strack D, Walter MH (2004) Cloning, characterization, and immunolocalization of a mycorrhiza-inducible 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in arbuscule-containing cells of maize. *Plant physiology* 134 (2):614-624. doi:10.1104/pp.103.032342
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381 (6583):571-579. doi:10.1038/381571a0
- Hazen SP, Schultz TF, Pruneda-Paz JL, Borevitz JO, Ecker JR, Kay SA (2005) LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29):10387-10392. doi:10.1073/pnas.0503029102
- Hedden P, Kamiya Y (1997) GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 48:431-460. doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.431
- Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ (2012) A raison d'etre for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Progress in lipid research* 51 (2):95-148. doi:10.1016/j.plipres.2011.12.001
- Hemmingsen SM, Ellis RJ (1986) Purification and properties of ribulosebisphosphate carboxylase large subunit binding protein. *Plant physiology* 80 (1):269-276
- Hill JE, Hemmingsen SM (2001) Arabidopsis thaliana type I and II chaperonins. *Cell stress & chaperones* 6 (3):190-200
- Holzinger A, Kwok EY, Hanson MR (2008) Effects of arc3, arc5 and arc6 mutations on plastid morphology and stromule formation in green and nongreen tissues of

Bibliografía

- Arabidopsis thaliana*. Photochemistry and photobiology 84 (6):1324-1335. doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00437.x
- Hsieh MH, Goodman HM (2005) The *Arabidopsis* IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant physiology* 138 (2):641-653. doi:10.1104/pp.104.058735
- Hsieh MH, Goodman HM (2006) Functional evidence for the involvement of *Arabidopsis* IspF homolog in the nonmevalonate pathway of plastid isoprenoid biosynthesis. *Planta* 223 (4):779-784. doi:10.1007/s00425-005-0140-9
- Huang W, Perez-Garcia P, Pokhilko A, Millar AJ, Antoshechkin I, Riechmann JL, Mas P (2012) Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science* 336 (6077):75-79. doi:10.1126/science.1219075
- Hunter WN (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 282 (30):21573-21577. doi:10.1074/jbc.R700005200
- Inoue H, Li M, Schnell DJ (2013) An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (8):3173-3178. doi:10.1073/pnas.1219229110
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T (2008) Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant physiology* 148 (1):142-155. doi:10.1104/pp.108.122770
- Ishikawa A, Tanaka H, Nakai M, Asahi T (2003) Deletion of a chaperonin 60 beta gene leads to cell death in the *Arabidopsis* lesion initiation 1 mutant. *Plant & cell physiology* 44 (3):255-261
- Jarvis P, Robinson C (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Current biology : CB* 14 (24):R1064-1077. doi:10.1016/j.cub.2004.11.049
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N (2010) Chloroplast proteomics highlights the subcellular compartmentation of lipid metabolism. *Progress in lipid research* 49 (2):128-158. doi:10.1016/j.plipres.2009.10.003
- Joyard J, Ferro M, Masselon C, Seigneurin-Berny D, Salvi D, Garin J, Rolland N (2009) Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular plant* 2 (6):1154-1180. doi:10.1093/mp/ssp088
- Julliard JH, Douce R (1991) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (6):2042-2045
- Kemp LE, Alpey MS, Bond CS, Ferguson MA, Hecht S, Bacher A, Eisenreich W, Rohdich F, Hunter WN (2005) The identification of isoprenoids that bind in the intersubunit cavity of *Escherichia coli* 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase by complementary biophysical methods. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 61 (Pt 1):45-52. doi:10.1107/S0907444904025971

Bibliografía

- Kessler A, Baldwin IT (2001) Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291 (5511):2141-2144. doi:10.1126/science.291.5511.2141
- Khan NZ, Lindquist E, Aronsson H (2013) New putative chloroplast vesicle transport components and cargo proteins revealed using a bioinformatics approach: an Arabidopsis model. *PloS one* 8 (4):e59898. doi:10.1371/journal.pone.0059898
- Kiba T, Henriques R, Sakakibara H, Chua NH (2007) Targeted degradation of PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 by an SCFZTL complex regulates clock function and photomorphogenesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell* 19 (8):2516-2530. doi:10.1105/tpc.107.053033
- Kim WY, Fujiwara S, Suh SS, Kim J, Kim Y, Han L, David K, Putterill J, Nam HG, Somers DE (2007) ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449 (7160):356-360. doi:10.1038/nature06132
- Knowles SM, Lu SX, Tobin EM (2008) Testing time: can ethanol-induced pulses of proposed oscillator components phase shift rhythms in Arabidopsis? *Journal of biological rhythms* 23 (6):463-471. doi:10.1177/0748730408326749
- Koon HE, Loreille OM, Covington AD, Christensen AF, Parsons TJ, Collins MJ (2008) Diagnosing post-mortem treatments which inhibit DNA amplification from US MIAs buried at the Punchbowl. *Forensic science international* 178 (2-3):171-177. doi:10.1016/j.forsciint.2008.03.015
- Koop HU, Herz S., Golds, T.J. and Nickelsen, J (2007) The genetic transformation of plastids. In: Bock R (ed) *Cell and Molecular Biology of Plastids*, vol 19. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag., pp 457–510
- Kovacs WJ, Olivier LM, Krisans SK (2002) Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Progress in lipid research* 41 (5):369-391
- Krushkal J, Pistilli M, Ferrell KM, Souret FF, Weathers PJ (2003) Computational analysis of the evolution of the structure and function of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a key regulator of the mevalonate-independent pathway in plants. *Gene* 313:127-138
- Kuo WY, Huang CH, Liu AC, Cheng CP, Li SH, Chang WC, Weiss C, Azem A, Jinn TL (2013) CHAPERONIN 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in Arabidopsis chloroplasts. *The New phytologist* 197 (1):99-110. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04369.x
- Kuzuyama T, Takahashi S, Takagi M, Seto H (2000) Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino acid residues. *The Journal of biological chemistry* 275 (26):19928-19932. doi:10.1074/jbc.M001820200
- Lange BM, Croteau R (1999) Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24):13714-13719
- Lange BM, Wildung MR, McCaskill D, Croteau R (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5):2100-2104

Bibliografía

- Laule O, Furholz A, Chang HS, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Gruissem W, Lange M (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (11):6866-6871. doi:10.1073/pnas.1031755100
- Leivar P, Antolin-Llovera M, Ferrero S, Closa M, Arro M, Ferrer A, Boronat A, Campos N (2011) Multilevel control of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A. *The Plant cell* 23 (4):1494-1511. doi:10.1105/tpc.110.074278
- Lemaire SD, Miginiac-Maslow M (2004) The thioredoxin superfamily in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis research* 82 (3):203-220. doi:10.1007/s11120-004-1091-x
- Lichtenthaler HK (1999) The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 50:47-65. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.47
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS letters* 400 (3):271-274
- Lois LM, Campos N, Putra SR, Danielsen K, Rohmer M, Boronat A (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5):2105-2110
- Lois LM, Rodriguez-Concepcion M, Gallego F, Campos N, Boronat A (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 22 (6):503-513
- Loivamaki M, Louis S, Cinege G, Zimmer I, Fischbach RJ, Schnitzler JP (2007) Circadian rhythms of isoprene biosynthesis in grey poplar leaves. *Plant physiology* 143 (1):540-551. doi:10.1104/pp.106.092759
- Lu S, Xu R, Jia JW, Pang J, Matsuda SP, Chen XY (2002) Cloning and functional characterization of a beta-pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. *Plant physiology* 130 (1):477-486. doi:10.1104/pp.006544
- Lunn JE (2007) Compartmentation in plant metabolism. *Journal of experimental botany* 58 (1):35-47. doi:10.1093/jxb/erl134
- Mahmoud SS, Croteau RB (2001) Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15):8915-8920. doi:10.1073/pnas.141237298
- Makino S, Matsushika A, Kojima M, Yamashino T, Mizuno T (2002) The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant & cell physiology* 43 (1):58-69

Bibliografía

- Mas P, Alabadi D, Yanovsky MJ, Oyama T, Kay SA (2003) Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in Arabidopsis. *The Plant cell* 15 (1):223-236
- Matsuo T, Ishiura M (2010) New insights into the circadian clock in Chlamydomonas. *International review of cell and molecular biology* 280:281-314. doi:10.1016/S1937-6448(10)80006-1
- Matsue Y, Mizuno H, Tomita T, Asami T, Nishiyama M, Kuzuyama T (2010) The herbicide ketoclozazole inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against Haemophilus influenzae. *The Journal of antibiotics* 63 (10):583-588. doi:10.1038/ja.2010.100
- McCarty LS, Landrum PF, Luoma SN, Meador JP, Merten AA, Shephard BK, van Wezel AP (2011) Advancing environmental toxicology through chemical dosimetry: external exposures versus tissue residues. *Integrated environmental assessment and management* 7 (1):7-27. doi:10.1002/ieam.98
- McClung CR (2001) Circadian Rhythms in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 52:139-162. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.139
- McClung CR (2011) The genetics of plant clocks. *Advances in genetics* 74:105-139. doi:10.1016/B978-0-12-387690-4.00004-0
- McGarvey DJ, Croteau R (1995) Terpenoid metabolism. *The Plant cell* 7 (7):1015-1026. doi:10.1105/tpc.7.7.1015
- McWatters HG, Bastow RM, Hall A, Millar AJ (2000) The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408 (6813):716-720. doi:10.1038/35047079
- Meier S, Tzfadia O, Vallabhaneni R, Gehring C, Wurtzel ET (2011) A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in Arabidopsis thaliana. *BMC systems biology* 5:77. doi:10.1186/1752-0509-5-77
- Millar AJ, Carre IA, Strayer CA, Chua NH, Kay SA (1995) Circadian clock mutants in Arabidopsis identified by luciferase imaging. *Science* 267 (5201):1161-1163
- Mitraki A, Fane B, Haase-Pettingell C, Sturtevant J, King J (1991) Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science* 253 (5015):54-58
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AG, Worm B (2011) How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS biology* 9 (8):e1001127. doi:10.1371/journal.pbio.1001127
- Munoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Ros R, Segura J (2006) Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant physiology* 142 (3):890-900. doi:10.1104/pp.106.086355
- Musgrove JE, Johnson RA, Ellis RJ (1987) Dissociation of the ribulosebisphosphate-carboxylase large-subunit binding protein into dissimilar subunits. *European journal of biochemistry / FEBS* 163 (3):529-534
- Nacir H, Brehelin C (2013) When proteomics reveals unsuspected roles: the plastoglobule example. *Frontiers in plant science* 4:114. doi:10.3389/fpls.2013.00114
- Nakamichi N, Kita M, Ito S, Yamashino T, Mizuno T (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the

- circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* 46 (5):686-698. doi:10.1093/pcp/pci086
- Ni S, Robinson H, Marsing GC, Bussiere DE, Kennedy MA (2004) Structure of 2C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase from *Shewanella oneidensis* at 1.6 Å: identification of farnesyl pyrophosphate trapped in a hydrophobic cavity. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 60 (Pt 11):1949-1957. doi:10.1107/S0907444904021791
- Njeh CF, Saeed I, Grigorian M, Kendler DL, Fan B, Shepherd J, McClung M, Drake WM, Genant HK (2001) Assessment of bone status using speed of sound at multiple anatomical sites. *Ultrasound in medicine & biology* 27 (10):1337-1345
- Novakova M, Motyka V, Dobrev PI, Malbeck J, Gaudinova A, Vankova R (2005) Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of experimental botany* 56 (421):2877-2883. doi:10.1093/jxb/eri282
- Nozue K, Covington MF, Duek PD, Lorrain S, Fankhauser C, Harmer SL, Maloof JN (2007) Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448 (7151):358-361. doi:10.1038/nature05946
- Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farre EM, Kay SA (2011) The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475 (7356):398-402. doi:10.1038/nature10182
- O'Neill JS, van Ooijen G, Dixon LE, Troein C, Corellou F, Bouget FY, Reddy AB, Millar AJ (2011) Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469 (7331):554-558. doi:10.1038/nature09654
- Omoto E, Taniguchi M, Miyake H (2012) Adaptation responses in C4 photosynthesis of maize under salinity. *Journal of plant physiology* 169 (5):469-477. doi:10.1016/j.jplph.2011.11.009
- Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, Hervouet N, Zelwer C, Rodriguez-Concepcion M, St-Pierre B, Burlat V (2007) Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant molecular biology* 65 (1-2):13-30. doi:10.1007/s11103-007-9190-7
- Park DH, Somers DE, Kim YS, Choy YH, Lim HK, Soh MS, Kim HJ, Kay SA, Nam HG (1999) Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis* GIGANTEA gene. *Science* 285 (5433):1579-1582
- Peltier JB, Ripoll DR, Friso G, Rudella A, Cai Y, Ytterberg J, Giacomelli L, Pillardy J, van Wijk KJ (2004) Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *The Journal of biological chemistry* 279 (6):4768-4781. doi:10.1074/jbc.M309212200
- Peng L, Fukao Y, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Shikanai T (2011) A chaperonin subunit with unique structures is essential for folding of a specific substrate. *PLoS biology* 9 (4):e1001040. doi:10.1371/journal.pbio.1001040
- Perez-Gil J, Rodriguez-Concepcion M (2013) Metabolic plasticity for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *The Biochemical journal* 452 (1):19-25. doi:10.1042/BJ20121899
- Phillips MA, D'Auria JC, Gershenzon J, Pichersky E (2008a) The *Arabidopsis thaliana* type I Isopentenyl Diphosphate Isomerases are targeted to multiple subcellular

- compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *The Plant cell* 20 (3):677-696. doi:10.1105/tpc.107.053926
- Phillips MA, Leon P, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2008b) The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends in plant science* 13 (12):619-623. doi:10.1016/j.tplants.2008.09.003
- Phillips MA, Walter MH, Ralph SG, Dabrowska P, Luck K, Uros EM, Boland W, Strack D, Rodriguez-Concepcion M, Bohlmann J, Gershenzon J (2007) Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant molecular biology* 65 (3):243-257. doi:10.1007/s11103-007-9212-5
- Pilgrim ML, McClung CR (1993) Differential Involvement of the Circadian Clock in the Expression of Genes Required for Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Synthesis, Assembly, and Activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology* 103 (2):553-564
- Pittendrigh CS (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual review of physiology* 55:16-54. doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.000313
- Pokhilko A, Fernandez AP, Edwards KD, Southern MM, Halliday KJ, Millar AJ (2012) The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. *Molecular systems biology* 8:574. doi:10.1038/msb.2012.6
- Pokhilko A, Mas P, Millar AJ (2013) Modelling the widespread effects of TOC1 signalling on the plant circadian clock and its outputs. *BMC systems biology* 7:23. doi:10.1186/1752-0509-7-23
- Popescu SC, Popescu GV, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2009) Integrated analysis of co-expressed MAP kinase substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & behavior* 4 (6):524-527
- Popescu SC, Snyder M, Dinesh-Kumar S (2007) *Arabidopsis* protein microarrays for the high-throughput identification of protein-protein interactions. *Plant signaling & behavior* 2 (5):416-420
- Possell M, Ryan A, Vickers CE, Mullineaux PM, Hewitt CN (2010) Effects of fosmidomycin on plant photosynthesis as measured by gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis research* 104 (1):49-59. doi:10.1007/s11120-009-9504-5
- Proteau PJ (1998) Biosynthesis of phytol in the cyanobacterium *synechocystis* sp. UTEX 2470: utilization of the non-mevalonate pathway. *Journal of natural products* 61 (6):841-843. doi:10.1021/np980006q
- Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M (2012) New insights into plant isoprenoid metabolism. *Molecular plant* 5 (5):964-967. doi:10.1093/mp/sss088
- Pulido P, Toledo-Ortiz, G., Phillips, M.A., Wright, L.P., Rodríguez-Concepción, M. (2013) *Arabidopsis* J-protein AtJ20 Delivers the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway to Protein Quality Control. *Plant Cell (in press)*
- Quail PH (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature reviews Molecular cell biology* 3 (2):85-93. doi:10.1038/nrm728
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010) ABA perception and signalling. *Trends in plant science* 15 (7):395-401. doi:10.1016/j.tplants.2010.04.006

Bibliografía

- Rodriguez-Concepcion M (2010) Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. *Archives of biochemistry and biophysics* 504 (1):118-122. doi:10.1016/j.abb.2010.06.016
- Rodriguez-Concepcion M, Ahumada I, Diez-Juez E, Sauret-Gueto S, Lois LM, Gallego F, Carretero-Paulet L, Campos N, Boronat A (2001) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 27 (3):213-222
- Rodriguez-Concepcion M, Boronat A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant physiology* 130 (3):1079-1089. doi:10.1104/pp.007138
- Rodriguez-Concepcion M, Fores O, Martinez-Garcia JF, Gonzalez V, Phillips MA, Ferrer A, Boronat A (2004) Distinct light-mediated pathways regulate the biosynthesis and exchange of isoprenoid precursors during Arabidopsis seedling development. *The Plant cell* 16 (1):144-156. doi:10.1105/tpc.016204
- Rohmer M (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Natural product reports* 16 (5):565-574
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *The Biochemical journal* 295 (Pt 2):517-524
- Roy H (1989) Rubisco assembly: a model system for studying the mechanism of chaperonin action. *The Plant cell* 1 (11):1035-1042. doi:10.1105/tpc.1.11.1035
- Salome PA, McClung CR (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock. *The Plant cell* 17 (3):791-803. doi:10.1105/tpc.104.029504
- Salvucci ME (2008) Association of Rubisco activase with chaperonin-60beta: a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. *Journal of experimental botany* 59 (7):1923-1933. doi:10.1093/jxb/erm343
- Sangari FJ, Perez-Gil J, Carretero-Paulet L, Garcia-Lobo JM, Rodriguez-Concepcion M (2010) A new family of enzymes catalyzing the first committed step of the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32):14081-14086. doi:10.1073/pnas.1001962107
- Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology* 94 (3):441-448
- Sanz-Barrio R, Millan AF, Corral-Martinez P, Segui-Simarro JM, Farran I (2011) Tobacco plastidial thioredoxins as modulators of recombinant protein production in transgenic chloroplasts. *Plant biotechnology journal* 9 (6):639-650. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00608.x
- Sauret-Gueto S, Botella-Pavia P, Flores-Perez U, Martinez-Garcia JF, San Roman C, Leon P, Boronat A, Rodriguez-Concepcion M (2006) Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant physiology* 141 (1):75-84. doi:10.1104/pp.106.079855

Bibliografía

- Schaffer R, Ramsay N, Samach A, Corden S, Putterill J, Carre IA, Coupland G (1998) The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93 (7):1219-1229
- Shi LX, Theg SM (2010) A stromal heat shock protein 70 system functions in protein import into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant cell* 22 (1):205-220. doi:10.1105/tpc.109.071464
- Shin N, Baribaud F, Wang K, Yang G, Wynn R, Covington MB, Feldman P, Gallagher KB, Leffet LM, Lo YY, Wang A, Xue CB, Newton RC, Scherle PA (2009) Pharmacological characterization of INCB3344, a small molecule antagonist of human CCR2. *Biochemical and biophysical research communications* 387 (2):251-255. doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.135
- Simkin AJ, Guirimand G, Papon N, Courdavault V, Thabet I, Ginis O, Bouzid S, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M (2011) Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta* 234 (5):903-914. doi:10.1007/s00425-011-1444-6
- Simkin AJ, Underwood BA, Auldridge M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E, Clark DG, Klee HJ (2004) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant physiology* 136 (3):3504-3514. doi:10.1104/pp.104.049718
- Sjogren LL, Stanne TM, Zheng B, Sutinen S, Clarke AK (2006) Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 18 (10):2635-2649. doi:10.1105/tpc.106.044594
- Smit A, Mushegian A (2000) Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in Archaea: the lost pathway. *Genome research* 10 (10):1468-1484
- Soll J, Schleiff E (2004) Protein import into chloroplasts. *Nature reviews Molecular cell biology* 5 (3):198-208. doi:10.1038/nrm1333
- Steinbacher S, Kaiser J, Eisenreich W, Huber R, Bacher A, Rohdich F (2003) Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *The Journal of biological chemistry* 278 (20):18401-18407. doi:10.1074/jbc.M300993200
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Mas P, Panda S, Kreps JA, Kay SA (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289 (5480):768-771
- Su PH, Li HM (2010) Stromal Hsp70 is important for protein translocation into pea and *Arabidopsis* chloroplasts. *The Plant cell* 22 (5):1516-1531. doi:10.1105/tpc.109.071415
- Suzuki K, Nakanishi H, Bower J, Yoder DW, Osteryoung KW, Miyagishima SY (2009) Plastid chaperonin proteins Cpn60 alpha and Cpn60 beta are required for plastid division in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* 9:38. doi:10.1186/1471-2229-9-38
- Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, Seto H (1998) A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (17):9879-9884

Bibliografia

- Thulasiram HV, Erickson HK, Poulter CD (2007) Chimeras of two isoprenoid synthases catalyze all four coupling reactions in isoprenoid biosynthesis. *Science* 316 (5821):73-76. doi:10.1126/science.1137786
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodriguez-Concepcion M (2010) Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (25):11626-11631. doi:10.1073/pnas.0914428107
- Veau B, Courtois M, Oudin A, Chenieux JC, Rideau M, Clastre M (2000) Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochimica et biophysica acta* 1517 (1):159-163
- Vidi PA, Kanwischer M, Baginsky S, Austin JR, Csucs G, Dormann P, Kessler F, Brehelin C (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *The Journal of biological chemistry* 281 (16):11225-11234. doi:10.1074/jbc.M511939200
- Vidi PA, Kessler F, Brehelin C (2007) Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC biotechnology* 7:4. doi:10.1186/1472-6750-7-4
- Viitanen PV, Bacot K, Dickson R, Webb T (1998) Purification of recombinant plant and animal GroES homologs: chloroplast and mitochondrial chaperonin 10. *Methods in enzymology* 290:218-230
- Vitlin A, Weiss C, Demishtein-Zohary K, Rasouly A, Levin D, Pisanty-Farchi O, Breiman A, Azem A (2011) Chloroplast beta chaperonins from *A. thaliana* function with endogenous cpn10 homologs in vitro. *Plant molecular biology* 77 (1-2):105-115. doi:10.1007/s11103-011-9797-6
- Vitlin Gruber A, Nisemblat S, Azem A, Weiss C (2013) The complexity of chloroplast chaperonins. *Trends in plant science*. doi:10.1016/j.tplants.2013.08.001
- von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 12 (3):625-634
- Vranova E, Coman D, Gruissem W (2012) Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Molecular plant* 5 (2):318-333. doi:10.1093/mp/sss015
- Vranova E, Coman D, Gruissem W (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology* 64:665-700. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120116
- Walter MH, Fester T, Strack D (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 21 (6):571-578
- Wang ZY, Tobin EM (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93 (7):1207-1217
- Waters MT, Langdale JA (2009) The making of a chloroplast. *The EMBO journal* 28 (19):2861-2873. doi:10.1038/emboj.2009.264
- Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, Iordanescu S, So CY, Rosenberg M, Gwynn MN (2000) Identification, evolution, and essentiality of

Bibliografía

- the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *Journal of bacteriology* 182 (15):4319-4327
- Wilkinson MJ, Owen SM, Possell M, Hartwell J, Gould P, Hall A, Vickers C, Nicholas Hewitt C (2006) Circadian control of isoprene emissions from oil palm (*Elaeis guineensis*). *The Plant journal : for cell and molecular biology* 47 (6):960-968. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02847.x
- Xing S, Miao J, Li S, Qin G, Tang S, Li H, Gu H, Qu LJ (2010) Disruption of the 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis*. *Cell research* 20 (6):688-700. doi:10.1038/cr.2010.54
- Zeidler J, Schwender J, Mueller C, Lichtenthaler HK (2000) The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. *Biochemical Society transactions* 28 (6):796-798

Bibliografía

APÉNDICES

ARTÍCULO 1

New Insights into Plant Isoprenoid Metabolism

Pablo Pulido, Catalina Perello and Manuel Rodriguez-Concepcion¹

Department of Molecular Genetics, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

Isoprenoids are a hugely diverse family of compounds derived from the C5 precursors isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). Although all free-living organisms synthesize isoprenoids, they are particularly abundant and diverse in plants, with tens of thousands structures known to date. The highest variety of plant isoprenoids are specialized (secondary) metabolites that participate in the interaction of plants with their environment. These include pigments, volatiles, and defense compounds, some of which have applications in industry and agriculture. For example, isoprenoid drugs are used against cancer (taxol) or malaria (artemisinin). But plants also synthesize isoprenoids with essential (primary) functions in respiration (ubiquinone), photosynthesis (carotenoids, chlorophylls, tocopherols, phyloquinones, plastoquinone), membrane architecture (sterols), and growth regulation (brassinosteroids, cytokinins, gibberellins, abscisic acid, strigolactones). Despite their economic importance and biological relevance, our knowledge of the core pathways for the production of the universal isoprenoid precursors IPP and DMAPP in plant cells remained incomplete until the mid-1990s. Impressive progress in the last decade has resulted in the complete elucidation of several isoprenoid pathways, the identification of regulatory mechanisms, the discovery of new functions and properties of specific isoprenoids, and the successful manipulation of isoprenoid biosynthesis in a number of metabolic engineering approaches. In this update article, we will discuss some of the most recent advances in the plant isoprenoid field, focusing on the pathways supplying the C5 precursors in plant cells and the novel insights into regulatory matters.

BIOSYNTHESIS OF THE UNIVERSAL ISOPRENOID PRECURSORS

Unlike most organisms, plants use two unrelated pathways for the production of IPP and DMAPP in different cell compartments (Vranova et al., 2012). The methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway simultaneously produces both IPP and DMAPP from pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate, whereas the mevalonic acid (MVA) pathway synthesizes IPP from acetyl-CoA. IPP is then converted into DMAPP by the activity of IPP isomerases (Figure 1). The subcellular localization of the MEP and MVA pathway enzymes in *Arabidopsis thaliana* is summarized in Table 1 and schematically represented in Figure 1.

It is now well established that all the MEP pathway enzymes are encoded by the nuclear genome and imported into plastids. Recent proteomics approaches have detected all the Arabidopsis MEP pathway enzymes in the stroma and have provided much-needed evidence on the subplastidial localization of enzymes involved in the production of specific types of isoprenoids, including chlorophylls, carotenoids, and prenylquinones such as plastoquinone, phyloquinone, and tocopherol (Joyard et al., 2009). By contrast, the MVA pathway enzymes are distributed in different subcellular compartments (Table 1). The main rate-determining enzyme of the pathway, hydroxymethylglutaryl CoA reductase (HMGR), is anchored to the endoplasmic reticulum exposing the catalytic domain of protein towards the cytosol, whereas other enzymes of the pathway have been found in the cytosol and peroxisomes (Sapir-Mir et al., 2008; Simkin et al., 2011). Despite the compartmentalization of IPP and DMAPP synthesis in plant cells, multiple studies using inhibitors, mutants, and labeled precursors in feeding experiments have shown that an exchange of isoprenoid precursors takes place among different subcellular locations (Flores-Perez et al., 2010; Paetzold et al., 2010). However, the genetic block of either the MVA pathway or the MEP pathway in null mutants or the complete inhibition of single pathway enzymes in wild-type plants treated with specific inhibitors results in a developmental block and a seedling-lethal phenotype, indicating that the loss of one of the two pathways cannot be compensated by the remaining pathway. The characterization of Arabidopsis mutants able to develop in the presence of pathway-specific isoprenoid inhibitors has led to a better understanding of the regulatory pathways that impact isoprenoid metabolism. For example, this approach has shown that light and sugar signaling down-regulate the MVA pathway but up-regulate the MEP pathway (Flores-Perez et al., 2010; Vranova et al., 2012). Recent results have also advanced our knowledge of how the

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail manuel.rodriguez@cragenomica.es, tel. +34 935636600, ext. 3222.

© The Author 2012. Published by the Molecular Plant Shanghai Editorial Office in association with Oxford University Press on behalf of CSPB and IPPE, SIBS, CAS.

doi:10.1093/mp/sss088

Received 25 June 2012; accepted 30 July 2012

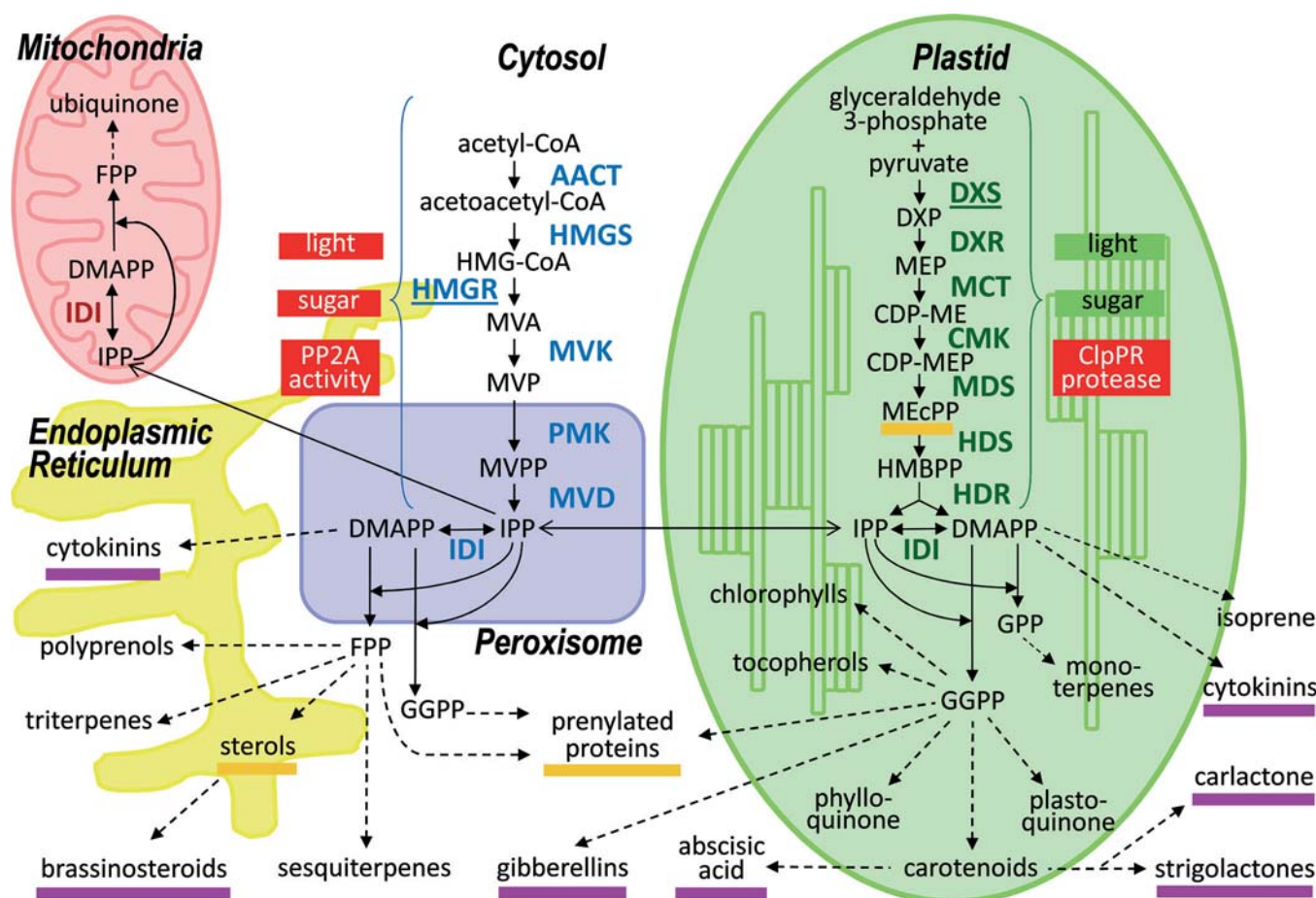


Figure 1. Isoprenoid biosynthetic pathways in the plant cell. The MVA pathway enzymes are shown in blue and the MEP pathway enzymes in green (acronyms correspond to those in Table 1). The enzymes suggested to have the highest degree of control over the metabolic flux through the MEP pathway (DXS) or the MVA pathway (HMGR) are underlined. Recently reported positive and negative regulators of both pathways at the post-transcriptional level are boxed in green and red, respectively. Dashed arrows mark multiple steps and open arrows represent transport of metabolites between cell compartments. Isoprenoids with regulatory roles are underlined in purple (hormone-like compounds) and orange. CDP-ME, 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; CDP-MEP, CDP-ME 2-phosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; FPP, farnesyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; GPP, geranyl diphosphate; HMBPP, 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA; IPP, isopentenyl diphosphate; MEcPP, 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate; MEP, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate; MVA, mevalonic acid; MVP, 5-phosphomevalonate; MVPP, 5-diphosphomevalonate.

activity of rate-determining enzymes of both pathways are controlled by different posttranslational mechanisms involving the PP2A phosphatase (for HMGR) and, in the case of MEP pathway enzymes, the stromal ClpPR proteolytic complex (Flores-Perez et al., 2008, 2010; Leivar et al., 2011; Vranova et al., 2012). All these mechanisms (Figure 1) are likely to provide a fine control of isoprenoid biosynthesis, allowing an appropriate supply of the products needed for essential processes such as respiration or photosynthesis but also for regulatory processes.

REGULATORY ROLES OF ISOPRENOIDS

As described above, some isoprenoid metabolites are used by plants as hormones to regulate multiple aspects of

their physiology. In addition to the well-known isoprenoid hormones (brassinosteroids, cytokinins, gibberellins, and abscisic acid), it was recently discovered that strigolactones (a group of carotenoids-derived metabolites known to be exuded from roots) and strigolactone-like compounds such as carlactone can also regulate plant development (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008; Alder et al., 2012). Most interestingly, other isoprenoid metabolites have been found to modulate plant responses in new, unsuspected ways. Recent work has confirmed that methylerythritol cyclodiphosphate (MEcPP), an intermediate of the MEP pathway (Figure 1), acts as a signal released from the plastids to modulate the expression of stress-related genes (Xiao et al., 2012). Some isoprenoids can regulate protein function by direct binding. Proteins can be modified by the

Table 1. Subcellular localization of the Arabidopsis enzymes involved in the production of isoprenoid precursors. Cyt, cytosol; ER-Cyt, anchored to the endoplasmic reticulum; Perox, peroxisomes; Plast, plastids; Mit, mitochondria. Data from Arabidopsis Isoprenoid Pathway Database (www.atipd.ethz.ch/index.php), MASCP Gator Database (<http://gator.masc-proteomics.org/>), and the indicated references: ¹ Simkin et al., 2011; ² Joyard et al., 2009; ³ Sapir-Mir et al., 2008.

	Enzyme	Accession	Acronym	Localization
MVAPathway	acetoacetyl-CoA thiolase 1	At5g47720	AACT1	Cyt
	acetoacetyl-CoA thiolase 2	At5g48230	AACT2	Cyt/Perox
	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase	At4g11820	HMGS	Cyt
	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 1	At1g76490	HMGR1	ER-Cyt
	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 2	At2g17370	HMGR2	ER-Cyt
	mevalonate kinase	At5g27450	MVK	Cyt ¹
	5-phosphomevalonate kinase	At1g31910	PMK	Perox ¹
	5-diphosphomevalonate decarboxylase 1	At2g38700	MVD1	Perox ¹
	5-diphosphomevalonate decarboxylase 2	At3g54250	MVD2	Perox ¹
MEPPathway	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase	At4g15560	DXS	Plast ²
	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	At5g62790	DXR	Plast ²
	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	At2g02500	MCT	Plast ²
	4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase	At2g26930	CMK	Plast ²
	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase	At1g63970	MDS	Plast ²
	1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate synthase	At5g60600	HDS	Plast ²
	1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate reductase	At4g34350	HDR	Plast ²
IPP isomerise	isopentenyl diphosphate isomerase 1	At5g16440	IDI1	Perox / Plast / (Mit) ³
	isopentenyl diphosphate isomerase 2	At3g02780	IDI2	Perox / Mit / (Plast) ³

covalent attachment of C15 (farnesyl diphosphate, FPP) or C20 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) isoprenyl groups to C-terminal cysteine residues, in a process known as protein prenylation. It was well established that prenylation modulates the interaction of proteins with membranes or other proteins and hence influences their biological role. Moreover, recent results have shown that the accumulation of farnesylcysteine residues released after degradation of farnesylated proteins can also impact plant responses such as abscisic acid sensitivity (Huizinga et al., 2010). Besides prenylation, a large-scale analysis of the protein–metabolite interactome in yeast reported the binding of different sterols to many proteins, including regulatory kinases (Li et al., 2012). Although the interaction between sterols and plant proteins remains to be fully explored, it is becoming clearer that it might have important regulatory consequences. For example, sterols appear to facilitate membrane association and hence activity of ARGONAUTE 1, an Arabidopsis protein required for microRNA function (Brodersen et al., 2012). These results together suggest that isoprenoids may play a more general

role as regulators of plant growth and development than previously thought.

UNDERSTANDING THE COMPLEXITY OF ISOPRENOID METABOLISM

The picture arising from the above described data shows an extremely complex, highly networked system linking isoprenoid metabolism with a variety of other processes. Understanding how plants regulate the production of their isoprenoids as a whole (i.e., as a system) remains a major challenge during the coming years. The topology of the plant isoprenoid pathway network and its dynamics at the gene expression level in response to diverse stimuli have been recently reviewed (Vranova et al., 2012). However, it is becoming more and more evident that post-transcriptional mechanisms are also essential to precisely control isoprenoid metabolism in plant cells (Figure 1) (Flores-Perez et al., 2008, 2010; Huizinga et al., 2010; Paetzold et al., 2010; Leivar et al., 2011; Brodersen et al., 2012). A recent proteomics study

focusing on isoprenoid biosynthesis in plastids has shown a diverse, sometimes puzzling, distribution of biosynthetic enzymes in a variety of subplastidial compartments, including envelopes, thylakoids, stroma, and plastoglobuli (Joyard et al., 2009). The wide array of Arabidopsis proteomic data and resources available in public databases should also allow determination of the localization of all the pathways that produce isoprenoids in the cytosol, endoplasmic reticulum, peroxisomes, or mitochondria (Vranova et al., 2012). This information will help in understanding the connections between the MEP and MVA pathways with the downstream routes that lead to the variety of isoprenoids produced in plant cells, including those that have a regulatory role (Figure 1). But understanding these dynamic connections is a major challenge that would require additional quantitative technologies and systems biology approaches. Promising attempts in this direction have been recently reported, including the reconstruction of Arabidopsis genome-wide metabolic network models that take into account the distribution of enzymes and metabolites in different tissues and subcellular compartments (Mintz-Oron et al., 2012). In particular, these models were successfully applied to computationally predict target enzymes for genetic manipulations aimed to increase the production of tocopherols, which are potent antioxidants and the main source of vitamin E in the human diet. It is expected that similar new, systems-oriented approaches will serve to better understand isoprenoid metabolism in the context of the whole plant, eventually allowing a more rational design of metabolic engineering approaches for an improved production of isoprenoids of interest as drugs, phytonutrients, or biofuels in plant biofactories.

FUNDING

Work in our lab is supported by grants from the Spanish Dirección General de Investigación (BIO2011-23680 and PIM2010IPO-00660), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (2010CL0039), Generalitat de Catalunya (2009SGR-26), Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (IBERCAROT), and European Union FP7 (TiMet, contract 245143).

REFERENCES

- Alder, A., et al. (2012). The path from beta-carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*. **335**,1348–1351.
- Brodersen, P., et al. (2012). Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **109**,1778–1783.
- Flores-Perez, F., et al. (2010). PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (PRL1) Integrates the Regulation of Sugar Responses with Isoprenoid Metabolism in Arabidopsis. *Mol. Plant*. **3**,101–112.
- Flores-Perez, U., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P., and Rodríguez-Concepción, M. (2008). A Mutant Impaired in the Production of Plastome-Encoded Proteins Uncovers a Mechanism for the Homeostasis of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes in Arabidopsis Plastids. *Plant. Cell*. **20**,1303–1315.
- Gomez-Roldan, V., et al. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*. **455**,189–194.
- Huizinga, D.H., et al. (2010). Farnesylcysteine lyase is involved in negative regulation of abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Mol. Plant*. **3**,143–155.
- Joyard, J., et al. (2009). Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Mol. Plant*. **2**,1154–1180.
- Leivar, P., et al. (2011). Multilevel control of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A. *Plant. Cell*. **23**,1494–1511.
- Li, X., Gianoulis, T.A., Yip, K.Y., Gerstein, M., and Snyder, M. (2012). Extensive in vivo metabolite-protein interactions revealed by large-scale systematic analyses. *Cell*. **143**,639–650.
- Mintz-Oron, S., Meir, S., Malitsky, S., Ruppin, E., Aharoni, A., and Shlomi, T. (2012). Reconstruction of Arabidopsis metabolic network models accounting for subcellular compartmentalization and tissue-specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **109**,339–344.
- Paetzold, H., et al. (2010). The isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 controls isoprenoid profiles, precursor pathway allocation, and density of tomato trichomes. *Mol. Plant*. **3**,904–916.
- Sapir-Mir, M., et al. (2008). Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant. Physiol*. **148**,1219–1228.
- Simkin, A.J., et al. (2011). Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta*. **234**,903–914.
- Umehara, M., et al. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*. **455**,195–200.
- Vranova, E., Coman, D., and Gruissem, W. (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol. Plant*. **5**,318–333.
- Xiao, Y., et al. (2012) Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell*. **149**,1525–1535.

ARTÍCULO 2

Quantification of plant resistance to isoprenoid biosynthesis inhibitors.

Catalina Perello, Pablo Pulido, and Manuel Rodriguez-Concepcion

Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain.

Summary

Plants use two pathways for the production of the same universal isoprenoid precursors: the mevalonic acid (MVA) pathway and the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway. Inhibitors of the MVA pathway prevent the activity of the shoot apical meristem and the development of true leaves in seedlings, whereas those inhibiting the MEP pathway show an additional bleaching phenotype. Here, we describe two methods to quantify plant resistance to inhibitors of the MVA pathway or the MEP pathway based on seedling establishment and photosynthetic pigment measurements. Although the methods are presented for *Arabidopsis*, they are valid for other plant species. These methods can be used as inexpensive and high-throughput alternatives to *in vitro* assays to estimate the activity of the corresponding target enzymes and to screen for mutants with altered levels or activities of these enzymes.

1- Introduction.

All free-living organisms synthesize their isoprenoids from the same building units, isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). But unlike most organisms, plants have two unrelated pathways for the biosynthesis of these universal isoprenoid precursors: the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway produces IPP and DMAPP for monoterpenes, photosynthesis-related isoprenoids (chlorophylls, carotenoids, and prenylquinones such as plastoquinone, phylloquinone, and tocopherol), and hormones (gibberellins, abscisic acid, strigolactones), and the mevalonic acid (MVA) pathway provides precursors for the production of ubiquinone, sterols and derived hormones (brassinosteroids), triterpenes, sesquiterpenes, and polyterpenes ([Fig. 1](#)) (Pulido et al., 2012; Vranova et al., 2013). All the MEP pathway enzymes are encoded by the nuclear genome and imported into plastids, whereas the MVA pathway enzymes have been found in different subcellular compartments, including peroxisomes, the endoplasmic reticulum, and the cytosol (Pulido et al., 2012). In particular, the proposed main rate-determining enzyme of the MVA pathway, hydroxymethylglutaryl CoA reductase (HMGR; EC 1.1.1.34), is anchored to the endoplasmic reticulum exposing the catalytic domain of protein towards the cytosol (Campos and Boronat, 1995). The production of MEP by the sequential activity of the stromal enzymes deoxyxylulose 5-phosphate (DXP) synthase (DXS; EC 4.1.3.37) and DXP

reductoisomerase (DXR; EC 1.1.1.267) has also been proposed as rate-determining in the MEP pathway (Rodríguez-Concepción, 2006). Although methods for the determination of HMGR, DXS and DXR activities are available (see Chapters 1 and 2), they are time-consuming, require specialized equipment, and cannot be used for genetic screens. An alternative, inexpensive, and high-throughput alternative to enzymatic assays that has the added advantage of estimating HMGR, DXS or DXR activities in vivo is to quantify the resistance to competitive inhibitors specifically targeting these enzymes (Fig. 1) (Rodríguez-Concepción et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006; Pulido et al., (in press)).

A limited exchange of isoprenoid precursors takes place among different subcellular location. However, the complete genetic or pharmacological block of either the MVA pathway or the MEP pathway in null mutants or inhibitor-treated wild type plants prevents development and eventually causes lethality, indicating that the loss of one of the two pathways cannot be compensated by the remaining pathway. For example, growth of *Arabidopsis thaliana* plants in medium supplemented with mevinnolin (MEV) (Fig. 2) or other statins that inhibit HMGR activity (Alberts et al., 1980; Istvan and Deisenhofer, 2001) causes inhibition of root growth, formation of adventitious roots, and, at higher concentrations of the inhibitor, an arrest of seedling establishment (SE, defined as the production of true leaves that can support further plant development) due to a blockage of shoot apical meristem development (Re et al., 1995; Kasahara et al., 2002; Rodríguez-Concepción et al., 2004). Inhibition of the MEP pathway in plants germinated and grown in the presence of the DXS inhibitor clomazone (CLM) (Zeidler et al., 2000; Matsue et al., 2010), or the DXR inhibitor fosmidomycin (FSM) (Kuzuyama et al., 1998; Steinbacher et al., 2003) also causes a concentration-dependent inhibition of SE (Rodríguez-Concepción et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006; Flores-Pérez et al., 2008; Pulido et al., (in press)). Therefore, a quantification of SE rates can be used as a common estimator of resistance to inhibition of the MVA pathway or the MEP pathway. In the case of the MEP pathway, a bleached phenotype caused by a blockage in the production of photosynthetic pigments is also obvious in inhibitor-treated plants (Fig. 2) and can be easily quantified by measuring chlorophyll and carotenoid levels (Laule et al., 2003; Rodríguez-Concepción et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006; Flores-Pérez et al., 2008; Pulido et al., (in press)). A difference between the phenotype of plants grown in media supplemented with CLM or FSM is that CLM only causes bleaching of true leaves (but not cotyledons) at low concentrations of the inhibitor, whereas the reduction in the levels of photosynthetic pigments is similar in cotyledons and true leaves from FSM-treated plants (Fig. 2). The reason behind this differential phenotype might be that CLM is not the actual molecule that inhibits DXS but it needs to be converted in the plant tissues to keto-CLM, the biologically active inhibitor (Zeidler et al., 2000; Matsue et al., 2010).

Based on the competitive nature of MEV, CLM and FSM mode of action, resistance to these inhibitors (i.e. increased SE rates or, in the case of the MEP pathway inhibitors, reduced bleaching) can be accomplished by increasing the levels or activity of HMGR, DXS or DXR, respectively (Rodríguez-Concepción et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006). Thus, transgenic lines with higher HMGR levels show resistance to MEV (but not to MEP pathway inhibitors), whereas lines overexpressing DXS show resistance to both CLM and FSM (due to a higher production of DXP, which competes with FSM for the active site of DXR) and those overexpressing DXR are resistant to FSM but not to CLM or

MEV (Rodríguez-Concepción et al., 2004; Carretero-Paulet et al., 2006). Screening for Arabidopsis mutants with increased resistance to these isoprenoid inhibitors has led to identify post-transcriptional mechanisms that control the levels or/and activity of the target enzymes but also other regulatory pathways modulating isoprenoid biosynthesis (Crowell et al., 2003; Rodríguez-Concepción et al., 2004; Sauret-Güeto et al., 2006; Kobayashi et al., 2007; Flores-Pérez et al., 2008; Flores-Perez et al., 2010). Other works have used inhibitor resistance assays to estimate the in vivo activities of the target enzymes (Leivar et al., 2011; Pulido et al., (in press)). Here we will present two simple methods to quantify plant resistance to MEV, CLM, and FSM based on SE and photosynthetic pigment measurements. Although the methods are presented for Arabidopsis, they are valid for other plant species. However, concentrations of inhibitors should be adapted to the particular species under study since it is known that the SE block and bleaching phenotypes require different concentrations in different plant species (Rodríguez-Concepción and Boronat, 2002; Sauret-Güeto et al., 2006).

2-Materials

2.1 Plant Germination and Growth.

1. Equipment: balance, autoclave, laminar air flow hood, water bath, plant growth chamber.
2. Containers for in vitro plant growth (Petri dishes for Arabidopsis).
3. Absolute ethanol.
4. Mevinolin (MEV) (Sigma). Prepare a 1 mM stock solution in ethanol (*see Note 1*).
5. Clomazone (CLM) (Sigma). Prepare a 5 mM stock solution in methanol (*see Note 1*).
6. Fosmidomycin (FSM) (Sigma). Prepare a 100 mM stock solution in Tris-HCl 10mM pH 8.5 and sterilize by filtration with a 20 µm microfilter (*see Note 1*).
7. Murashigue and Skoog (MS) medium (*see Note 2*) and plates. For 1 L, mix 4.4 g of MS salts without vitamins (Duchefa) and 0.5 g of 2-(*N-morpholino*) ethanesulphonic acid (MES), and stir until the solution becomes clear. Adjust to pH 5.7 with 1M KOH, take to 1L with deionized water, and add 8 g of plant agar (Duchefa). Sterilize in autoclave at 121°C for 20min, and then cool in a water bath at 50-60°C. Add the inhibitors (*see Note 3*) before pouring the medium into the appropriate plates (Petri dishes for Arabidopsis) under a laminar air flow hood (*see Note 4*).

2.2 Pigment Extraction.

1. Equipment: balance, vortex, multi-tube shaker, microcentrifuge and spectrophotometer.
2. Liquid nitrogen.
3. Mortar and pestle.
4. Organic solvents: methanol, chloroform, ethyl acetate, acetone (*see Note 5*).
5. TB solution: 50mM Tris-HCl pH7.5, 1M NaCl).
6. Nitrogen stream.

3-Methods

3.1. Seedling establishment (SE).

SE rate is defined as the percentage of seedlings producing green true leaves that are photosynthetically active and therefore able to support full plant development. In this method, seedlings are germinated and grown on MS plates supplemented with a range of concentrations of MEV, CLM, or FSM and visually inspected to monitor the presence of true leaves.

1. Prepare MS plates with and without inhibitors at the appropriate concentrations.
2. Surface-sterilize seeds (see **Note 6**) and plate them on the solid medium (see **Note 7**). Wrap the plates in aluminium foil and transfer to 4°C.
3. After the appropriate stratification period at 4°C (from 2 to 4 days for Arabidopsis), place plates in a growth chamber (see **Note 8**).
4. Incubate the plates until the second set of true leaves are clearly visible in plants grown on plates without inhibitors (about 2 weeks for Arabidopsis).
5. Count the total number of germinated seedlings (t) and the number of seedlings with a green first set of true leaves (n) in each plate (see **Note 9**).
6. Calculate the proportion of seedlings with true leaves (a) in mock plates ($a_0=n_0/t_0$) and in each of the plates supplemented with inhibitor ($a_i=n_i/t_i$). Then, calculate the mean of the a_0 values obtained from all replicates (\bar{a}_0) and recalculate each of the a_i values relative to \bar{a}_0 . The percentage of SE for each concentration of inhibitor (i) is calculated with the formula $SE = 100 * a_i / \bar{a}_0$ (see **Note 10**).
7. Plot the generated values (means and errors) to construct dose-response curves for each genotype (Fig. 3).

3.2 Pigment levels.

This method is only valid to quantify resistance to inhibitors of the MEP pathway (CLM and FSM), since inhibition of the MVA pathway with MEV does not significantly interfere with the biosynthesis of chlorophylls and carotenoids. Although this method is more time-consuming and requires more seedlings than the SE method, it is a valid alternative to quantify more subtle differences in resistance. In particular, determination of pigment levels appears to be more robust than SE calculation to quantify CLM resistance.

1. Follow steps 1 to 3 in section 3.1.
2. Incubate the plates until growth of albino seedlings is completely blocked on plates with the highest concentration of inhibitors (about 10 days for Arabidopsis). (see **Note 11**).
3. Collect samples of whole seedlings (between 25 and 50 mg of fresh weight) in ice-cold 2 mL microcentrifuge tubes, carefully note the exact weight of the tissue (w), and immediately freeze in liquid nitrogen.
4. Grind individual samples in liquid nitrogen to a fine powder in a pre-cooled mortar and pestle.
5. Transfer the powder to a 2 mL microcentrifuge tube pre-cooled in liquid nitrogen. It is important to work quickly so the plant material does not thaw.
6. Immediately add 400 μ L of methanol to each powdered sample, vortex, and transfer the samples to an ice bucket covered with aluminium foil (see **Note 12**).

7. When enough samples have been processed, briefly vortex the tubes with the methanol extract and transfer them to a multi-tube shaker in a 4°C chamber. Shake for 30 min in darkness (e.g. covered with aluminium foil).
8. Add 400 µL of TN solution to each sample and shake for 10 min at 4°C in the dark.
9. Add 400 µL of chloroform to the mixture, and shake for 3 min at 4°C in the dark.
10. Remove the tubes from the multi-tube shaker and centrifuge them at 15000 xg for 5 min at 4°C.
11. Recover the organic (upper) phase containing the pigments and transfer it to a clean tube.
12. Dry under a stream of nitrogen or by centrifugal evaporation (see **Note 13**).
13. Add 50 µL of ethyl acetate to each dried sample, resuspend, and centrifuge at 15000 xg for 1 min.
14. Transfer 25 µL of the supernatant to a microcentrifuge tube containing 775 µL of acetone. Mix by inverting the tube several times until all the solution is uniformly colored. Keep protected from light on ice. Prepare a blank sample with 25 µL of ethyl acetate in 775 µL of acetone.
15. Transfer to a quartz cuvette to measure absorbance at 470.0 nm, 644.8 nm and 661.6 nm in a spectrophotometer.
16. Calculate chlorophyll and carotenoid contents (µg / mL) in the solution using the following equations (Lichtenthaler, 1987):
 - Chlorophyll *a*: $Ca = 11.24*[A661.6] - 2.04*[A644.8]$
 - Chlorophyll *b*: $Cb = 20.13*[A644.8] - 4.19*[A661.6]$
 - Total Chlorophylls: $Ca+b = 7.05*[A661.6] - 18.09*[A644.8]$
 - Total Carotenoids: $Cc = (1\ 000*[A470.0] - 1.90*Ca - 63.14*Cb) / 214$
17. Calculate the concentration of chlorophylls and carotenoids in the tissue samples as follows (w = weight of seedlings collected in step 3):
 - µg chlorophylls / mg of fresh weight = $1.6*Ca+b / w$
 - µg carotenoids / mg of fresh weight = $1.6*Cc / w$
18. Make the values for inhibitor-treated samples relative to those measured in mock plates (see **Note 14**).
19. Plot the generated values (means and errors) to construct dose-response curves ([Fig. 3](#)).

4-Notes

1. Store aliquots of stock solutions of inhibitors in sealed vials at -20°C (they should be stable for at least 1 month). Before use, let the solutions to thaw in ice.
2. Vitamins and sucrose are not required. Adding sucrose to the growth media actually results in a strong increase in plant resistance to isoprenoid inhibitors (Flores-Perez et al., 2010). The amount of MS salts can be reduced to half, but this will also affect resistance to inhibitors.
3. The recommended final concentrations of inhibitor for Arabidopsis (Columbia ecotype) are:
 - a. MEV: 0.1, 0.5, 1, 2, and 5 µM
 - b. CLM: 0.5, 1, 2, 5 and 10 µM
 - c. FSM: 10, 20, 40, 60, and 80 µM

Concentrations should be experimentally determined for other plant species and even *Arabidopsis* accessions (e.g. Landsberg *erecta* and Wassilewskija are more resistant to MEV and FSM than Columbia). A set of concentrations ranging from low (only a few individuals show symptoms) to high (all individuals are affected) impact on the quantified phenotype (SE or pigment levels) should be established to generate dose-response curves. Mock plates are prepared by adding the same amount of inhibitor solvent used to prepare the plates with highest concentration of the corresponding inhibitor.

4. Once the medium temperature decreases to 50-60°C, it is safe to add the inhibitors without the risk of inactivating them. At this temperature, however, the medium tends to become solid relatively fast when removed from the water bath to room temperature. It is recommended to pour the medium into the plates as fast as possible under sterile conditions (hood). The plates should be left open in the hood for 30 min (or until the medium becomes solid) and then sealed and stored at 4°C until used.
5. Follow appropriate regulations (fume hood, protective clothing) when handling and disposing organic solvents.
6. For *Arabidopsis*, place the seeds in a sterile microfuge tube and add 3 volumes of absolute ethanol. Shake for 5 min, remove the ethanol, and let the seeds dry leaving the tube open in a laminar air flow sterile hood.
7. For meaningful statistical analysis, triplicate plates with at least 50 individuals each should be prepared for every concentration to be tested. It is very useful to distribute the seeds on the medium like a grid because it facilitates counting and prevents shade avoidance responses and other neighbour-related effects. When comparing two genotypes (e.g. wild type vs. mutant or transgenic lines), they should be grown in the same plate.
8. Use the same growth (light, temperature, humidity) conditions for all the experiments and replicates. In particular, differences in light intensity or photoperiod result in dramatic changes in resistance to CLM and FSM.
9. Since the counting is by visual inspection, different experimenters might have different criteria to count positive hits (i.e. to define when a seedling has established). To reduce this possible bias, it is important to establish clear objective criteria beforehand.
10. Different genetic backgrounds or seed stocks show defects in germination or seedling development that need to be taken into account to estimate the real influence of isoprenoid inhibitors on SE. Therefore, the proportion of seedlings producing green true leaves in media with inhibitor should be represented relative to that in mock plates.
11. Depending on the genotype or plant species used and the incubation time, the number of individuals needed for each replicate will need to be calculated to produce between 25 and 50 mg of fresh tissue for pigment extraction. Take into account that higher concentrations of inhibitor typically result in lower amounts of tissue per seedling.
12. Chlorophylls and carotenoids are highly sensitive to light and heat. To avoid degradation, the tubes containing methanol extracts should be maintained in darkness at low temperature while processing other samples.

13. Dried residues should have a green-brownish color, corresponding to the chlorophyll and carotenoid pigments. They can be stored for a few days protected from light at -80°C until used for pigment analysis.
14. Different genetic backgrounds or seed stocks might produce different levels of photosynthetic pigments in the absence of inhibitors. To compare resistance to CLM or FSM of lines with different pigment contents, it is recommended that chlorophyll and carotenoid contents are presented relative to those measured in samples grown without the inhibitors.

Acknowledgements

Our work is funded by grants from the Catalan AGAUR (2009SGR-26 and XRB), Spanish DGI (BIO2011-23680 and PIM2010IPO-00660), and European Union FP7 (TiMet, contract 245143). We are members of the IBERCAROT network funded by Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED, code 112RT0445). CP received a predoctoral fellowship of the JAE-PRE program (CSIC).

References

- Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., and Springer, J. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 3957-3961.
- Campos, N., and Boronat, A. (1995). Targeting and topology in the membrane of plant 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Cell* **7**, 2163-2174.
- Carretero-Paulet, L., Cairo, A., Botella-Pavia, P., Besumbes, O., Campos, N., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M. (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in Arabidopsis plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Mol Biol* **62**, 683-695.
- Crowell, D.N., Packard, C.E., Pierson, C.A., Giner, J.L., Downes, B.P., and Chary, S.N. (2003). Identification of an allele of CLA1 associated with variegation in Arabidopsis thaliana. *Physiol Plant* **118**, 29-37.
- Flores-Perez, U., Perez-Gil, J., Closa, M., Wright, L.P., Botella-Pavia, P., Phillips, M.A., Ferrer, A., Gershenzon, J., and Rodríguez-Concepción, M. (2010). PLEIOTROPIC REGULATORY LOCUS 1 (PRL1) integrates the regulation of sugar responses with isoprenoid metabolism in Arabidopsis. *Mol Plant* **3**, 101-112.
- Flores-Pérez, U., Sauret-Güeto, S., Gas, E., Jarvis, P., and Rodríguez-Concepción, M. (2008). A Mutant Impaired in the Production of Plastome-Encoded Proteins Uncovers a Mechanism for the Homeostasis of Isoprenoid Biosynthetic Enzymes in Arabidopsis Plastids. *Plant Cell* **20**, 1303-1315.
- Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* **292**, 1160-1164.
- Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2002). Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**, 45188-45194.
- Kobayashi, K., Suzuki, M., Tang, J., Nagata, N., Ohyama, K., Seki, H., Kiuchi, R., Kaneko, Y., Nakazawa, M., Matsui, M., Matsumoto, S., Yoshida, S., and Muranaka, T. (2007). Lovastatin

- insensitive 1, a Novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **48**, 322-331.
- Kuzuyama, T., Shimizu, T., Takahashi, S., and Seto, H.** (1998). Fosmidomycin, a Specific Inhibitor of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Reductoisomerase in the Nonmevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **39**, 7913-7916.
- Laule, O., Furholz, A., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Heifetz, P.B., Grisse, W., and Lange, M.** (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6866-6871.
- Leivar, P., Antolin-Llovera, M., Ferrero, S., Closa, M., Arro, M., Ferrer, A., Boronat, A., and Campos, N.** (2011). Multilevel control of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A. *Plant Cell* **23**, 1494-1511.
- Lichtenthaler, H.K.** (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* **148**, 351-382.
- Matsue, Y., Mizuno, H., Tomita, T., Asami, T., Nishiyama, M., and Kuzuyama, T.** (2010). The herbicide ketoclozazole inhibits 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway and shows antibacterial activity against Haemophilus influenzae. *J Antibiot (Tokyo)* **63**, 583-588.
- Pulido, P., Perello, C., and Rodríguez-Concepción, M.** (2012). New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol Plant* **5**, 964-967.
- Pulido, P., Toledo-Ortiz, G., Phillips, M.A., Wright, L.P., and Rodríguez-Concepción, M.** ((in press)). Arabidopsis J-protein J20 Delivers the First Enzyme of the Plastidial Isoprenoid Pathway to Protein Quality Control. *Plant Cell*.
- Re, E.B., Jones, D., and Learned, R.M.** (1995). Co-expression of native and introduced genes reveals cryptic regulation of HMG CoA reductase expression in Arabidopsis. *Plant J* **7**, 771-784.
- Rodríguez-Concepción, M.** (2006). Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem Rev* **5**, 1-15.
- Rodríguez-Concepción, M., and Boronat, A.** (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* **130**, 1079-1089.
- Rodríguez-Concepción, M., Forés, O., Martínez-García, J.F., González, V., Phillips, M.A., Ferrer, A., and Boronat, A.** (2004). Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during Arabidopsis Seedling Development. *Plant Cell* **16**, 144-156.
- Sauret-Güeto, S., Botella-Pavia, P., Flores-Perez, U., Martínez-García, J.F., San Roman, C., Leon, P., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M.** (2006). Plastid cues posttranscriptionally regulate the accumulation of key enzymes of the methylerythritol phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**, 75-84.
- Steinbacher, S., Kaiser, J., Eisenreich, W., Huber, R., Bacher, A., and Rohdich, F.** (2003). Structural basis of fosmidomycin action revealed by the complex with 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase (IspC). Implications for the catalytic mechanism and anti-malaria drug development. *J Biol Chem* **278**, 18401-18407.
- Vranova, E., Coman, D., and Grisse, W.** (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 665-700.
- Zeidler, J., Schwender, J., Mueller, C., and Lichtenthaler, H.K.** (2000). The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria. *Biochem Soc Trans* **28**, 796-798.

Figures.

Figure 1. Schematic representation of the MVA and MEP pathways. The steps inhibited by mevinolin (MEV), clomazone (CLM) and fosmidomycin (FSM) and the corresponding target enzymes are indicated. DMAPP, dimethylallyl diphosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate; DXR, DXP reductoisomerase; DXS, DXP synthase; GAP, glyceraldehydes 3-phosphate; HMBPP, 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA; HMGR, HMG-CoA reductase; IPP, isopentenyl diphosphate; MEP, methylerythritol 4-phosphate; MVA, mevalonic acid.

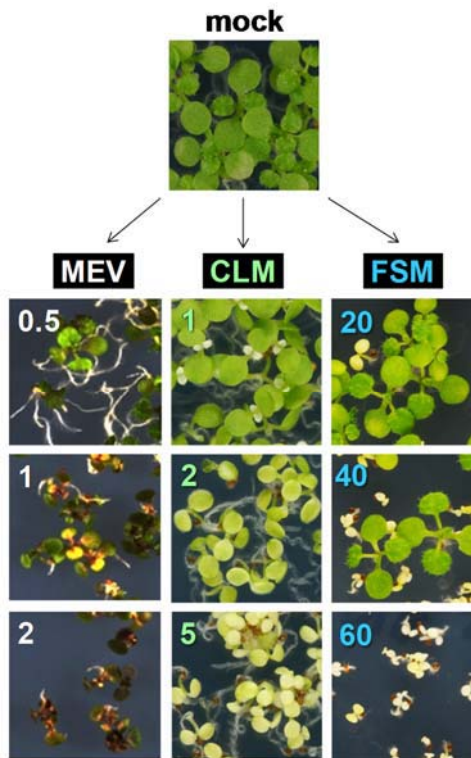
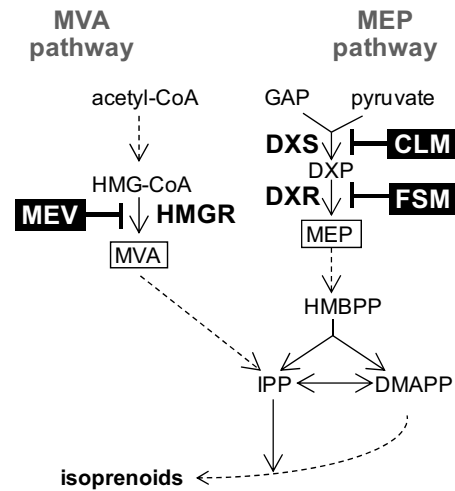


Figure 2. Phenotype of Arabidopsis seedlings grown in the presence of isoprenoid inhibitors. Wild type plants (Columbia) were grown on MS plates either supplemented or not (mock) with mevinolin (MEV), clomazone (CLM) or fosmidomycin (FSM) for 2 weeks under long-day conditions. Numbers indicate the concentration (μM) of inhibitor in the corresponding plate.

Figure 3. Plots comparing the results from the two methods for quantification of FSM resistance. Wild type (WT) and transgenic Arabidopsis lines overexpressing DXR (35S:DXR) were grown on MS plates either supplemented or not with the indicated concentrations of FSM for 2 weeks under long-day conditions. Resistance to the inhibitor was quantified as the percentage of seedling establishment (% SE, panel A) or chlorophyll levels (B) relative to those measured for each genotype on mock plates (0 μ M FSM). Data represent mean and standard deviation of triplicates.

