

## TESIS DE MÁSTER

“Obtención de plantas transplásticas  
de Tabaco con sobreexpresión de  
mutantes Redox de Tiorredoxina F o M”

Ana María Arróniz Clemente

Curso 2013-14

Director: Dr. JON VERAMENDI CHAROLA

El **Prof. Dr. JON VERAMENDI CHAROLA**, Titular del Área de Producción Vegetal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra, como directora de D<sup>a</sup>. Ana María Arróniz Clemente

## INFORMA

Que la presente memoria de Trabajo Fin de Master "Obtención de plantas transplastómicas de Tabaco con sobreexpresión de mutantes Redox de Tiorredoxina F o M" elaborada por D<sup>a</sup>. Ana María Arróniz Clemente, cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a nueve de septiembre de 2014.



Dr. JON VERAMENDI CHAROLA

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los miembros del departamento de Agrobiotecnología Vegetal por haberme permitido aprender junto a ellos durante un año. En especial me gustaría agradecer a Jon Veramendi por su apoyo y sus correcciones y a Alicia Fernández San Millán por su inestimable ayuda, sus consejos y por estar siempre dispuesta a responder a mis preguntas. Por último gracias a Nekane por sus revisiones, a Luisa por darme la fuerza para seguir adelante y a los que siempre están conmigo: mis padres. A todos vosotros muchas gracias por hacer este trabajo posible.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	3
<b>Introducción</b> .....	4
1. La transformación plastidial.....	4
1.1. Los plastidios.....	4
1.2. El sistema biolístico.....	5
1.3. Ventajas, inconvenientes y perspectivas futuras de la transformación plastidial..	6
2. Las tiorredoxinas.....	8
2.1. Estructura y modo de acción de las tiorredoxinas.....	8
2.2. Las tiorredoxinas en organismos fotosintéticos.....	9
2.2.1. La tiorredoxina m.....	11
2.2.2. La tiorredoxina f.....	11
2.2.3. Las funciones de las tiorredoxinas f y m.....	12
3. Efecto de la sobreexpresión de las Trxs f y m desde el genoma plastidial.....	13
<b>Objetivos</b> .....	15
<b>Material y métodos</b> .....	16
1. Sistemas de cultivo in vitro del material vegetal.....	16
2. Transformación plastidial.....	16
2.1. Vectores.....	16
2.2. Transformación por el sistema biolístico.....	18
3. Análisis moleculares.....	18
3.1. Extracción de ADN genómico. Método CTAB.....	18
3.2. Análisis de los regenerante por PCR.....	19
3.3. Análisis de los regenerantes por Southern Blot.....	19
3.4. Análisis de regenerantes y expresión en bacterias por Western Blot.....	20
4. Expresión y curvas de crecimiento bacteriano.....	20
<b>Resultados y discusión</b> .....	22
1. Generación de vectores que portaban mutaciones en el centro activo o en la Cys71 de la Trx f o en el centro activo de la Trx m.....	22
2. Obtención de plantas transplastómicas.....	23
3. Comprobación de la presencia del transgen de interés en el plastoma de los regenerantes mediante PCR.....	24
4. Comprobación de la integración de los transgenes de interés en el plastoma de los regenerantes mediante Southern Blot.....	26
5. ¿Por qué no se obtienen transformantes plastidiales con los mutantes <i>Trx f o Trx m</i> ?.....	30
6. Análisis de la expresión de la Trx f en los regenerantes PCR y Southern Blot positivos.....	33
7. Expresión en bacterias.....	34
<b>Conclusiones</b> .....	37
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	38

## RESUMEN

Las tiorredoxinas (Trxs) son tiol-disulfuro oxidoreductasas que ceden electrones a sus proteínas diana oxidadas reduciéndolas, ejerciendo así una regulación post-traducciona y modulando su actividad. Además, las Trxs f y m tienen actividad chaperona, fundamental para el correcto plegamiento de determinadas proteínas. La sobreexpresión de la *Trx f* desde el genoma plastidial de tabaco incrementó el contenido de almidón en sus hojas, mientras que la sobreexpresión de la *Trx m* supuso mayor tolerancia al metilviológico. El objetivo de este trabajo fue dilucidar si estos fenotipos eran debidos a la actividad reductasa o chaperona de dichas Trxs. Para ello, se generaron mutantes de la *Trx f* en el centro activo o en la Cys71 y de la *Trx m* en el centro activo (las mutaciones suponían el cambio de cisteínas por serinas) y se transformó plastidialmente tabaco con los genes correspondientes. Después se regeneraron plantas que, teóricamente, incluían el correspondiente gen mutado. Los análisis moleculares revelaron que todos los regenerantes eran escapes y no incluían el transgén.

También se transformaron plantas de tabaco con un vector específico de patata que contenía la *Trx f* para comprobar si las diferencias en las zonas de recombinación homóloga entre tabaco y patata no eran un obstáculo para que se diera dicha recombinación. Se obtuvo un regenerante positivo confirmado por Southern y Western Blot. Esto permitirá comprobar en tabaco que los vectores de transformación de patata están correctamente contruidos como paso previo a la transformación de patata que tiene una duración mucho mayor.

## ABSTRACT

Thioredoxins (Trxs) are thiol-disulfide oxidoreductases that donate electrons to their target by reducing oxidized proteins, thus exerting a post-translational regulation and modulating its activity. In addition, the Trxs f and m have chaperone activity, essential for the correct folding of certain proteins. Over expression of Trx f from the plastid genome of tobacco increased starch content in leaves, while overexpression of the Trx m increased tolerance to methyl viologen. The aim of this study was to elucidate whether these phenotypes were due to the reductase or chaperone activity of these Trxs. To do this, Trx f mutants were generated in the active center or in the Cys 71 and Trx m in the active center (mutations involve changing cysteine to serine) and the plastid genome of tobacco was transformed with the corresponding genes. After the transformation process regenerated shoots theoretically included the corresponding mutated genes. Molecular analyses revealed that all the regenerants were escapes and did not include the transgene.

Tobacco plants were also transformed with a specific vector of potato including Trx f gene, to test whether the differences in the regions for homologous recombination between tobacco and potato were an obstacle for the recombination to proceed. One positive regeneration confirmed by Southern and Western Blot was obtained. This will allow checking in tobacco that potato transformation vectors are correctly constructed as a previous step to the potato transformation, which has a much longer duration.

## LISTA DE ABREVIATURAS

5'-UTR: región 5' no traducida	MmutCC: mutantes en el centro activo de la tiorredoxina m
3'-UTR: región 3' no traducida	NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<i>aadA</i> : gen que codifica aminoglucosido-3''-adenil-transferasa	NADP-MDH: NADP dependiente de malato deshidrogenasa
ADN: ácido desoxirribonucleico	PH: variedad de tabaco Petite Havana genotipo silvestre
AGPasa: ADP glucosa pirofosforilasa	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
<i>Amp<sup>R</sup></i> : gen que confiere resistencia a ampicilina	<i>psbA</i> : promotor del gen <i>psbA</i>
ATP: adenosín trifosfato	PRK: fosforibuloquinasa
CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio	<i>Prrn</i> : promotor del operón 16S rRNA
Cys: cisteína	<i>PrrnG10L</i> : promotor del operón 16S rRNA más la región líder del gen <i>10</i> del bacteriófago T7
DTT: ditioneitol	RMOP: medio de regeneración
F: mutantes que sobreexpresan la tiorredoxina f	ROS: especies reactivas de oxígeno
FBPasa: fructosa-1,6-bisfosfatasa	SBPasa: sedheptulosa-1,7-bisfosfatasa
Fd: ferredoxina	SSC: región simple corta del genoma plastidial
Fmut71: mutantes en el aminoácido 71 de la tiorredoxina f	TpsbA: terminador del gen <i>psbA</i>
FmutCC: mutantes en el centro activo de la tiorredoxina f	Trps16: terminador del gen <i>rps16</i>
FNR: ferredoxina-NADP reductasa	Trx o Trxs: tiorredoxina o tiorredoxinas
FTR ferredoxina-tiorredoxina reductasa	<i>uidA</i> : gen que codifica la $\beta$ -glucuronidasa
G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	
Grxs: glutarredoxinas	
GS: glutamina sintetasa	
GSH: glutatión	
IR: regiones repetidas invertidad del genoma plastidial	
LSC: región simple larga del genoma plastidial	





En cada célula vegetal del mesófilo hay unos 100 plastidios, y en cada plastidio hay unas 100 moléculas de ADN. Por tanto, la poliploidía de un gen que esté presente en el plastoma de una célula vegetal, puede llegar a ser de hasta 10000 veces (Maliga, 2004).

## **1.2. El sistema biolístico**

Los plastidios tienen dos membranas (interna y externa) y cuentan con la protección de la pared de la célula vegetal y la membrana plasmática. Esto hace necesario que el sistema de transformación plastidial que se emplee, sea capaz de atravesar todas estas barreras. El sistema de transformación plastidial tiene que contar, además, con un gen marcador de selección, un mecanismo que permita la correcta integración del transgén en el plastoma y un sistema de cultivo in vitro para la regeneración de tejidos. Existen varios métodos de transformación plastidial, como el sistema biolístico y el tratamiento con polietilenglicol. Actualmente el método más usado es el sistema biolístico, debido a que permite la transformación plastidial en numerosas especies vegetales (Warzecha & Hennig, 2010).

El sistema biolístico consiste en bombardear el material vegetal con microproyectiles de oro o tungsteno a alta velocidad. Los microproyectiles están recubiertos con el casete de transformación plastidial que incluye el transgén de interés y el gen marcador de selección. Los genes marcadores de selección más frecuentes son los que confieren resistencia a antibióticos aminoglucosidos, por ejemplo el gen *aadA*, que confiere resistencia a espectinomicina y codifica la proteína aminoglucosido-3'-adenil-transferasa, que es capaz de detoxificar la espectinomicina (Svab & Maliga, 1993). Estos genes marcadores permiten seleccionar las células vegetales transformadas, es decir, aquellas células vegetales que han incorporado en su plastoma tanto el gen marcador como el transgén de interés. Esto se logra gracias a que el medio de cultivo in vitro de regeneración está suplementado con el antibiótico correspondiente, es decir, si el gen marcador es el *aadA*, el medio de cultivo in vitro se suplementará con espectinomicina. Los regenerantes se someten a sucesivas rondas de selección, en las cuales los medios de cultivo empleados están suplementados con el antibiótico correspondiente. Estas rondas de selección tienen como finalidad asegurar la homoplasma de los regenerantes. La homoplasma es el estado en el que todas las células vegetales del regenerante presentan el transgén de interés integrado en todos los plastidios y en todas las moléculas de ADN de cada plastidio. En el caso de que coexistan plastomas silvestres y transformados, se considera que el regenerante es

heteroplásmico (Warzecha & Hennig, 2010). Se ha estimado que unas 30 divisiones celulares son suficientes para alcanzar el estado de homoplasmia (Maliga, 2004; Verma *et al.*, 2008).

Además, las secuencias codificantes de los transgenes deben ir acompañadas de secuencias promotoras, terminadoras y reguladoras que aseguren la correcta transcripción y traducción del transgén de interés y del gen marcador. Algunos de los promotores más empleados son: promotor del operón de rRNA (*Prrn*) (Svab & Maliga, 1993) y el promotor del gen que codifica la proteína D1, el promotor *psbA* (Zoubenko *et al.*, 1994). Se ha demostrado que las secuencias 5'-UTR y 3'-UTR son indispensables para la estabilidad del ARN y un eficiente inicio de la traducción (Warzecha & Hennig, 2010). Por ejemplo, variaciones en las secuencias 5'-UTR, en el caso del gen marcador *uidA*, pueden mostrar diferencias de hasta 10.000 veces en la acumulación de la proteína (Eibl *et al.*, 1999).

El vector de transformación incluye dos regiones que flanquean el casete de inserción. Estas regiones tienen un tamaño de 1 a 2 kb y están constituidas por secuencias homólogas al ADN plastidial, que flanquea la región donde se quiere insertar el transgén de interés. La homología entre las secuencias permite la inserción dirigida del transgén en el plastoma, gracias a dos eventos de recombinación homóloga mediados por un sistema RecA similar al de bacterias (Cerutti *et al.*, 1992). Los cloroplastos comparten con las bacterias la capacidad de llevar a cabo procesos de recombinación homóloga mediados por un sistema RecA debido a que, estos orgánulos provienen de las cianobacterias. Según la teoría endosimbionte, los cloroplastos se originaron por la unión de un protista heterótrofo y una bacteria fotosintética oxigénica endosimbionte.

### **1.3. Ventajas, inconvenientes y perspectivas futuras de la transformación plastidial**

Existen ventajas de la transformación plastidial sobre la transformación nuclear.

- La integración del transgén en el plastoma se realiza de forma dirigida en un sitio específico del plastoma (Bock & Warzecha, 2010). Así se evitan efectos de posición o silenciamiento génico que suelen ser frecuentes en la transformación nuclear. Además, todos los transformantes obtenidos son clones, por lo que es suficiente con analizar y caracterizar una única planta transplastómica.
- Los plastidios, al tener una herencia bacteriana, tienen la capacidad de procesar policistrones, es decir, múltiples genes que están bajo el control de un único promotor. En ingeniería metabólica de plantas es de gran interés, ya que con

frecuencia es necesario la expresión conjunta de un grupo de genes que participan en la misma ruta metabólica (Bock, 2013). En biología sintética es de gran interés debido a que los plastidios tienen una estructura genómica procariota, su propia maquinaria de expresión, unos niveles de expresión elevados y bajo coste de producción de diferentes metabolitos. Además en los plastidios se pueden producir proteínas heterólogas que contengan puentes disulfuro, lo cual ayuda a su correcto plegamiento, y lipoproteínas (Koop *et al.*, 2007). Esto hace de los plastidios interesantes maquinarias biosintéticas (Scharff & Bock, 2014).

- La transformación plastidial permite obtener unos niveles de acumulación de proteína recombinante muy elevados, en algunos casos mayores al 70% de la proteína soluble total (Oey *et al.*, 2009). La mayor acumulación de proteína recombinante se debe al alto nivel de ploiploidía del genoma plastidial.
- El material genético de los plastidios sólo se transmite por vía materna en la mayoría de las especies cultivadas. Esto es una gran ventaja respecto a la transformación nuclear, ya que se evita la transmisión del transgén vía polen a otros cultivos, si las plantas transplástomicas se cultivan en campo (Azhagiri & Maliga, 2007). Por lo tanto, la transformación plastidial supone una ventaja a nivel medioambiental.

La transformación plastidial presenta algunos inconvenientes en relación con la transformación nuclear.

- La transformación plastidial no es una técnica de rutina en la mayoría de los cultivos, de hecho únicamente se aplica de manera rutinaria en *N. tabacum* y en *Chlamydomonas reinhardtii*. Dentro de las monocotiledóneas, se encuentra el grueso de especies que son recalcitrantes a la transformación plastidial. Esta resistencia a la transformación plastidial se debe a: la falta de protocolos eficientes de regeneración *in vitro* para estas especies, la inexistencia de vectores de transformación optimizados para los diferentes cultivos y la ausencia de marcadores de selección adecuados (Day & Goldschmidt-Clermont, 2011).
- Algunas proteínas necesitan ser glicosiladas para ser funcionales (Brooks, 2004). Sin embargo, no se da la glicosilación en los plastidios, lo cual supone una gran desventaja para la expresión de proteínas de uso terapéutico en los cloroplastos.

- Debido a la relación existente entre cianobacterias y plastidios (Cerutti *et al.*, 1992), pudiera ser que se diera transferencia horizontal de los transgenes entre los plastidios y algunas bacterias.
- También puede haber una transferencia de transgenes desde el plastoma hasta el núcleo. Esto ocurre con una frecuencia baja, aproximadamente de  $10^{-5}$  (Stegemann *et al.*, 2003), pero aún en el caso de que se diera, los genes resultarían no ser funcionales por la incompatibilidad de secuencias reguladoras (Huang *et al.*, 2003).

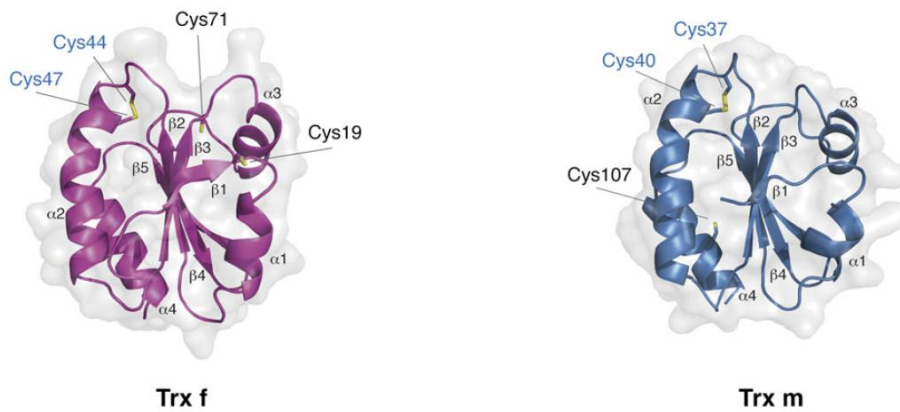
El reto más importante de la transformación plastidial es que se convierta en una técnica de rutina, implantada en la mayoría de los cultivos de interés agronómico para mejorar la producción agraria.

## **2. Las tiorredoxinas**

Las tiorredoxinas (Trxs) son tiol-disulfurooxidoreductasas que fueron descritas inicialmente en *E. coli*, pero han sido aisladas en la mayoría de organismos vivos, donde participan por ejemplo en el metabolismo del carbono, la asimilación de nitrógeno, traducción, plegamiento de proteínas, degradación de aminoácidos y síntesis de ácidos grasos (Michelet *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2012). En plantas fueron descubiertas durante el estudio de la fotosíntesis (Buchanan, 1980). Las Trxs son capaces de ceder electrones a proteínas, catalizando reacciones de intercambio ditiol/disulfuro (Holmgren, 1985; Lemaire *et al.*, 2007). Estas reacciones son un tipo de regulación post-traducciona, cuya finalidad es modular la actividad de determinadas enzimas.

### **2.1. Estructura y modo de acción de las tiorredoxinas**

Las Trxs son proteínas globulares de 12 kDa. Su núcleo está formado por cinco láminas  $\beta$ , rodeadas por cuatro hélices  $\alpha$  (Jeng *et al.*, 1994) y un puente ditiol/disulfuro extremadamente reactivo en el sitio activo (Arnér & Holmgren, 2000). Este grupo está formado por dos cisteínas reactivas separadas por dos aminoácidos, y se denomina motivo Trx. Este motivo hace que la cisteína N-terminal quede en la superficie de la molécula y próxima a la segunda cisteína. De esta manera el puente disulfuro es accesible fácilmente, desde la zona plana e hidrofóbica de la Trx, para las moléculas diana (Eklund *et al.*, 1984) (Figura 2).



**Figura 2: Estructura 3D de las Trx f y m. Elaborada con el software PyMOL. (Sanz-Barrio *et al.*, 2011)**

La función principal de las Trxs, consiste en reducir los puentes disulfuro expuestos de las proteínas dianas oxidadas (Holmgren, 1985). La reacción de reducción se lleva a cabo en varios pasos:

- El grupo tiol de la Cys N-terminal reactiva (Cys nucleofílica) ataca al puente disulfuro de la proteína oxidada.
- Se libera así un grupo tiol y se forma un puente disulfuro con la otra Cys de la proteína.
- El grupo tiol C-terminal del motivo CxxC (Cys resolutive) rompe el puente disulfuro entre la Trx y la proteína.
- A continuación se libera la proteína reducida y la Trx oxidada (Brandes *et al.*, 1993).

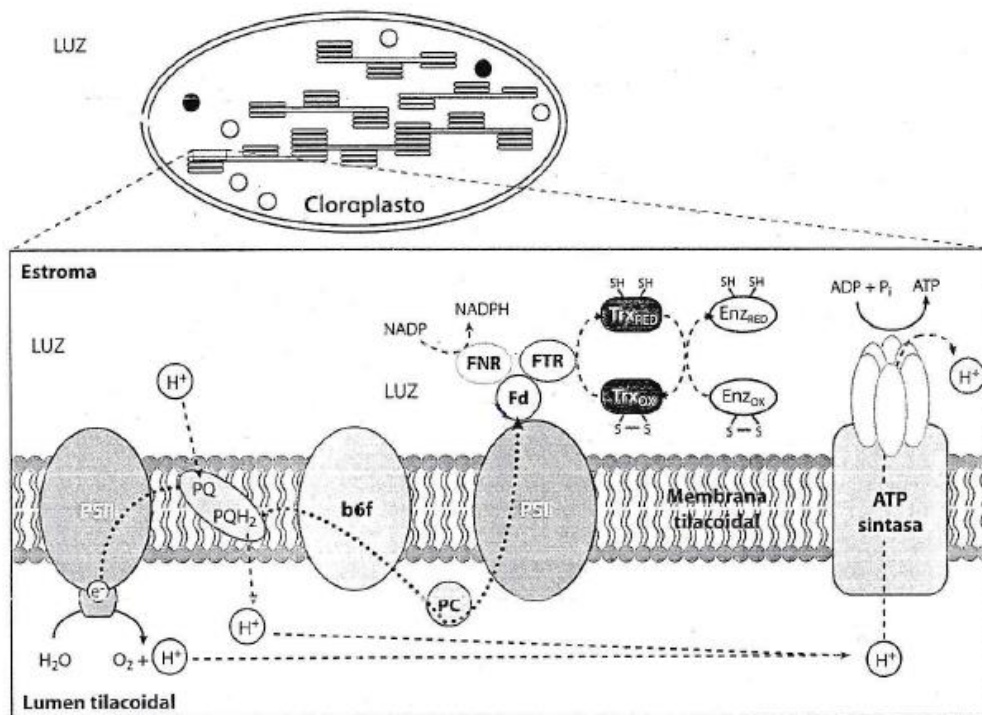
## **2.2. Las tioredoxinas en organismos fotosintéticos.**

Tradicionalmente, el proceso fotosintético se había dividido en dos fases: la fase luminosa y la fase oscura. Durante la primera fase, los fotones absorbidos por las antenas y los centros de reacción de los fotosistemas, daban lugar a una cascada de electrones a través de la membrana tilacoidal, lo cual producía un gradiente de pH transtilacoidal que permitía la síntesis de ATP y NADPH. Estas moléculas serían usadas posteriormente en la fase oscura por las enzimas del ciclo de Calvin para la fijación de CO<sub>2</sub>. Estudios posteriores demostraron que algunas de las enzimas del ciclo de Calvin, como la GAPDH, la FBPasa, la SBPasa, la PRK, la NADP-MDH y la G6PDH, eran inactivadas por inhibidores de la cadena transportadora de electrones y activadas mediante la adicción de un reductor fuerte (ditiotreitól, DTT), lo cual llevaba a pensar que tal vez la activación de dichas enzimas dependía de su reducción.

El mecanismo por el que estas enzimas se reducen es el siguiente (Figura 3):

- La Fd recibe los electrones procedentes de la cadena transportadora de electrones y se reduce.
- Parte de los electrones de la Fd pasan a la FNR. Esta enzima es capaz de reducir el NADP dando lugar al NADPH.
- El resto de los electrones de la Fd pasan a la FTR, que se reduce y es capaz de reducir a las Trx. Éstas, una vez que están reducidas, son capaces de interactuar con sus proteínas diana, entre las que se encuentran las arriba mencionadas y otras, y las reducen activándolas.

De manera que las Trx se convierten en los últimos miembros de la cascada de señalización dependiente de la luz.



**Figura 3: Esquema que explica la función de las Trx dentro de la cadena transportadora de electrones. (Meyer *et al.*, 2009)**

En plantas podemos encontrar Trxs en varios compartimentos subcelulares, incluyendo el citosol, las mitocondrias y los cloroplastos. Las Trxs citosólicas y mitocondriales oxidadas, son reducidas por NADPH reductasas, mientras que las cloroplásticas son reducidas generalmente por FTR, gracias a los electrones provenientes de la cadena transportadora de electrones durante la fotosíntesis (Lemarie *et al.*, 2007). En los cloroplastos existen cinco tipos diferentes de Trxs: f-m-x-y-z (Collin *et al.*, 2004; Arsova *et al.*, 2010). Mientras que las Trxs f y m funcionan como reguladores

dependientes de luz de enzimas clave en el metabolismo del carbono, incluyendo enzimas del ciclo de Calvin (Buchanan, 1980; Schürmann & Jacquot, 2000), las otras Trxs cloroplásticas están relacionadas con el sistema antioxidante (Lemarie *et al.*, 2003; Chibani *et al.*, 2010). Los estudios de las Trxs f y m han demostrado que difieren en su origen filogenético, estructura primaria y en la especificidad que muestran por sus proteínas diana (Hartman *et al.*, 1990; Schürmann & Buchanan, 2008).

### **2.2.1. La tiorredoxina m**

La Trx m tiene origen procariota y se encuentra en procariotas oxigénicos, algas y plantas terrestres. Mientras que en plantas terrestres y algas verdes se codifica nuclearmente y se encuentra almacenada en el cloroplasto, en algas rojas esta codificada en el genoma del cloroplasto, lo cual apoyaría su origen endosimbionte (Reynolds *et al.*, 1994). Existen varias isoformas de Trx m presentes en los organismos fotosintéticos. Diversos estudios demuestran que las diferentes isoformas tienen funciones y localizaciones diferentes. Así, por ejemplo, se ha demostrado que las isoformas m1, m2 y m4 de *Arabidopsis* no pueden activar la FBPasa in vitro, pero sí que activan la NADP-MDH (Collin *et al.*, 2003). Estas mismas isoformas se han aislado de las membranas tilacoidales, a pesar de que al principio, la Trx m fue descrita como una proteína estromática (Peltier *et al.*, 2002; Friso *et al.*, 2004). Algunos estudios recientes han mostrado que tanto la estructura tridimensional como la superficie que rodea el centro activo de la Trx m de los organismos fotosintéticos, son muy similares a la Trx1 de *E. coli* (Katti *et al.*, 1990). Estos resultados apoyarían las evidencias bioquímicas que muestran que la Trx m y la Trx1 de *E. coli* son funcionalmente intercambiables en determinados ensayos in vitro. Todo esto sugiere que la Trx m tiene origen bacteriano (Schürmann & Jacquot, 2000).

### **2.2.2. La tiorredoxina f**

La Trx f tiene un origen filogenético eucariota y sólo se encuentra en organismos eucariotas fotosintéticos. Comparando su estructura primaria, se observa que es un grupo bastante homogéneo entre especies y que presentan gran homología en las regiones del centro activo y carboxilo-terminal. La Trx f es capaz de reducir la FBPasa y la NADP-MDH. La topología de superficie de la Trx f es única y diferente, ya que tiene más cargas positivas que la Trx m, algunas de las cuales se disponen alrededor del

centro activo donde juegan un papel fundamental en la orientación de la proteína durante la interacción con las proteínas diana. El centro activo tiene algunos residuos hidrofóbicos que podrían desempeñar un papel fundamental en la interacción con FTR. El centro activo también se caracteriza por su flexibilidad, que representa un factor estructural que contribuye a la especificidad de la Trx f (Capitani *et al.*, 2000). Sin embargo, lo más característico de la Trx f es la presencia de una tercera Cys, muy conservada en la región C-terminal, conocida como Cys71 (en tabaco). Esta Cys se encuentra expuesta en la superficie, próxima al centro activo y a la zona de contacto. Se ha demostrado que esta Cys puede ser glutationilada (Casagrande *et al.*, 2002), lo cual disminuye la tasa de activación de las proteínas diana debido a un impedimento estérico en la interacción del sitio activo con la FTR. (Michelet *et al.*, 2005). Así pues, se piensa que la glutationización podría constituir un mecanismo por el cual se reduce la actividad de la Trx f en condiciones de alta producción de ROS, lo que provocaría una disminución de la velocidad del ciclo de Calvin y la liberación de poder reductor contra los agentes oxidantes (Michelet *et al.*, 2006).

### **2.2.3. Funciones de las tiorredoxinas f y m**

Las Trxs tienen diversas funciones y participan en complejos sistemas actuando sobre otras moléculas. Gracias a estudios proteómicos, se sabe que existen más de 450 dianas para las Trxs. Estos estudios proteómicos emplean técnicas de marcaje con sondas y diversas combinaciones de estrategias de purificación para identificar las diferentes dianas de las Trxs. Así, se ha descubierto que las dianas de las Trxs participan en la traducción, el plegamiento de proteínas, etc. Recientes estudios sugieren que las Trxs podrían interaccionar con las Grxs o el GSH (Montrichard, 2009; Balmer, 2006).

La principal función de las Trxs f y m es reducir algunas de las enzimas que participan en el ciclo de Calvin, lo cual da lugar a su activación y así participan en la regulación del metabolismo del carbono. Algunas de estas enzimas como la NADP-MDH (Collin *et al.*, 2003) y la SBPasa (Wolosiuk *et al.*, 1982), son activadas preferentemente por la Trx f, incluso de forma exclusiva como ocurre con la FBPasa (Collin *et al.*, 2003; Collin *et al.*, 2004; Buchanan, 1980; Crawford *et al.*, 1986). Todos los estudios que se han realizado hasta el momento parecen indicar que la Trx f se encarga de la activación del metabolismo fotosintético de carbohidratos, aumentando la tasa biosintética en presencia de luz. Mientras que tanto la Trx f como la m serían igual de eficaces en la



desactivación de enzimas y facilitando el catabolismo de carbohidratos en la oscuridad (Schürmann & Buchanan, 2008).

Otras de las funciones de las Trxs cloroplásticas son menos conocidas. Por ejemplo, en el caso de la Trx m, aunque sus funciones principales son la eliminación de ROS y su implicación en el metabolismo del carbono, también participa en la traducción de ARN (Danon & Mayfield, 1994) o la activación de enzimas del metabolismo del nitrógeno como la GS (Tischner & Schmidt, 1982). Recientes estudios demuestran que las Trxs están implicadas en procesos de división celular y reproducción. De igual modo se ha demostrado que las Trxs aisladas de *E. coli* y de *Arabidopsis* y tabaco, pueden funcionar como chaperonas (Kern *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2009; Sanz-Barrio *et al.*, 2012). Sin embargo, la función chaperona en las Trxs plastidiales, que jugaría un papel fundamental en el correcto plegamiento de otras proteínas, todavía está bastante inexplorada.

Otros procesos metabólicos del cloroplasto en los que influyen las Trxs, ya que las enzimas que participan en estos procesos también se ven reguladas mediante cambios en su estado redox, son por ejemplo algunas de las enzimas implicadas en los procesos de síntesis y degradación del almidón: la AGPasa, que participa en el primer paso de la síntesis del almidón (Ballicora *et al.*, 2000), o la  $\alpha$ -glucano H<sub>2</sub>O diquinasa, que cataliza la fosforilación de gránulos de almidón y es fundamental para la degradación del almidón en hojas y tubérculos (Mikkelsen *et al.*, 2005).

### **3. Efectos de la sobreexpresión de Trxs f y m desde el genoma plastidial**

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones acerca de la sobreexpresión de las Trxs f y m. Por un lado, se observó que la sobreexpresión de Trx f aumentó la acumulación de almidón en las hojas de *N. tabacum*. Esta mayor acumulación fue acompañada de un aumento en los azúcares presentes en las hojas, en el peso específico de las hojas y en el rendimiento de la biomasa de las hojas. Estos resultados no se observaron con la sobreexpresión de la Trx m, de manera que se demostró que la Trx f es un regulador más eficiente en el metabolismo fotosintético de carbohidratos de la planta que la Trx m (Sanz-Barrio *et al.*, 2013). Por otro lado, la sobreexpresión de las Trxs f y m cloroplásticas, permitió comprobar que la línea que tenía sobreexpresada la Trx f se comportaba de manera diferente a la línea que sobreexpresaba la m en respuesta al estrés oxidativo, y la actividad fotosintética también se alteraba de manera diferente. Las plantas de tabaco que sobreexpresaban la Trx m

tenían menos clorofila, una morfología diferente que las que sobreexpresaban la Trx f. Sin embargo, las plantas que sobreexpresaban la m tenían más tolerancia que las f al metil-viológeno y a la combinación de bajas temperaturas y elevada intensidad luminosa (Rey *et al.*, 2013).

Además, se ha demostrado que estas Trxs funcionan como chaperonas en determinadas condiciones. Las Trxs tienen dos tipos de actividad chaperona: “*foldase chaperone activity*” y “*holdase chaperone activity*”. Mientras que la primera depende de que las Trxs estén en estado monomérico, la segunda depende de que las Trxs estén en estado oligomérico. Según los estudios realizados, este estado oligomérico en la Trxs plastidiales se alcanza frente a condiciones de estrés oxidativo (Sanz-Barrio *et al.*, 2011). La actividad chaperona de las Trxs es fundamental para el correcto plegamiento y acumulación de otras proteínas. Por ello se supone que cuando las Trxs pierden la actividad chaperona, las moléculas que se plegaban correctamente gracias a ellas, pierden su conformación funcional y dejan de acumularse. Para comprobar la certeza de esta hipótesis, se ha realizado este trabajo de fin de máster, en el cual se propone realizar una serie de mutaciones en los genes *Trx f* y *Trx m*. Dichas mutaciones afectarán:

- En el caso del gen *Trx f* pueden afectar a las Cys44 y 47, que forman el centro activo o a la Cys71. Las mutaciones supondrán que se transformen en Ser. Se han elegido estos aminoácidos debido a que la Cys44 y 47 forman parte del centro activo y la Cys71 es un residuo altamente conservado cerca del centro activo que esta expuesto en la superficie de la Trx f y esta rodeado por una región hidrofóbica.
- En el caso del gen *Trx m* afectan a las Cys40 y 37 que forman parte del centro activo.

Con estas mutaciones se pretende afectar de tal manera a las Trxs, que pierdan su capacidad de oxidoreducción. Observando el fenotipo de estas plantas de tabaco con sobreexpresión de una Trx mutada y comparándolo con el de las plantas que sobreexpresan la Trx silvestre, se podrá deducir cuál de las dos actividades de la Trx (reductasa o chaperona) es responsable del fenotipo observado (ejemplo mayor acumulación de almidón en hojas).

## OBJETIVOS

1. Transformación plastidial de tabaco con el gen *Trx m* mutado en el centro activo y con el gen *Trx f* mutado en el centro activo o en la cisteína 71.
2. Caracterización molecular de las plantas transplastómicas obtenidas.
3. Comprobar si la expresión de *Trx f* y *Trx m* mutadas tiene algún efecto deletéreo en el crecimiento en *E. coli*.
4. Transformación de tabaco con un vector de transformación plastidial, que incluye regiones de recombinación homóloga específicas de patata. El transgén a integrar es el *Trx f* no mutado. El proceso de transformación plastidial de patata es 2-3 veces más largo que el de tabaco. Este objetivo se plantea para comprobar de una forma relativamente rápida que los vectores de transformación de patata están correctamente contruidos, realizando la transformación de tabaco y comprobando la correcta inserción del transgén en el plastoma. Se realizaría como un control de calidad del vector como paso previo a la transformación de patata.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **1. Sistemas de cultivo in vitro del material vegetal**

Se emplearon plantas de *Nicotiana tabacum* (Petite Havana) cultivadas in vitro manipuladas en condiciones de esterilidad. Para preparar un litro de medio RMOP con espectinomomicina, se disuelven en agua miliQ: 4,3 g de sales *Murashige & Skoog*, 30 g de sacarosa, 100 mg de MyoInositol, 100 µg de ácido naftalenacético, 1 mg de bencilaminopurina, 1 mg de Tiamina HCl y 6 g de MicroAgar. Se ajusta el pH con KOH 0,1 M hasta 5,7 (121°C 15 minutos). Se añaden 500 mg/l de espectinomomicina y se dispensa. Para preparar un litro de medio de P<sub>3</sub> con espectinomomicina, se disuelven en agua miliQ: 4,41 g de sales *Murashige & Skoog* y 30 g de sacarosa y se procede igual que con el medio anterior.

### **2. Transformación plastidial**

#### **2.1. Vectores**

Las secuencias maduras de la *Trx f* y la *Trx m* de *N. tabacum* (GenBank *Accession Number* HQ338526 y HQ338525) fueron obtenidas mediante amplificación por PCR, utilizando como molde un cDNA de tabaco y los cebadores F1 (5'-CCATGGGTCACCATCACCATCACCATAGCTCCGATGCTACTG-3') y F2 (5'-GCGGCCGCTTAACTTGACCGCACATCCTCAATTG-3') para *NtTrxf* y M1 (5'-GAGGGGCTTTCATCTGTATTTCAG-3') y M2 (5'-CTGAATACAGATGAAAGCC CCTC-3') para *NtTrxm*. Estos cebadores incorporaron la diana *NcoI* en el *NtTrxf-5'* o *NtTrxm-5'*, seguida de una cola de histidinas y una diana *NotI* en el *NtTrxf-3'* o *NtTrxm-3'*. Ambas secuencias maduras de tabaco, *Trx f* y *Trx m*, se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) obteniéndose los vectores de partida pGEM-Trxf y pGEM-Trxm. Para introducir las mutaciones sobre las secuencias clonadas, se utilizaron cebadores internos solapantes que sustituyeron las dos cisteínas del centro catalítico (CC) o la cisteína 71 (C71) por serinas. Los cebadores fueron trxfmutCC-for (5'-CTCAGTGAGTGGTCCTAGCAAAGTG-3'), trxfmutCC-rev (5'-CACTTTGCTAGGACCACTCCACTGAG-3'), trxmmutCC-for (5'-CTCCGTGGAGTGGTCCAAGCCGAATG-3'), trxmmutCC-rev (5'-CATTCGGCTTGGACCACTCCA CGGAG-3'), trxfC71-for (5'-CTGAAGCTTGATAGCAACCAGG-3') y trxfC71-rev (5'-CCTGGTTGCTATCAAGCTTCAG-3'). Los moldes para la PCR fueron los vectores pGEM-Trxf y pGEM-Trxm. Las PCR para obtener las Trxs mutadas se realizaron en dos fases. En la primera, se amplificaron dos fragmentos para la *Trx f*, el primero con los cebadores F1 y trxfmutCC-rev y el segundo con trxfmutCC-for y F2. Los fragmentos



## **2.2. Transformación por el sistema biolístico**

El envés de las hojas de *N. tabacum*, variedad Petite Havana, cultivadas in vitro, fue bombardeado mediante el sistema Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio Rad, Hercules, CA, USA) según el método descrito por Daniell (1997). Como microproyectiles para el bombardeo se usaron partículas de oro de 0,6 micras de diámetro que estaban recubiertas por uno de los cuatro vectores de transformación (pL3PrnnG10LTrxfCC, pL3PrnnG10LTrxf71, pL3PrnnG10LTrxmCC y pSTPrnnG10LTrxf), a razón de 100 ng de oro y 300 ng de ADN por hoja bombardeada. La presión de helio durante el bombardeo es de 1.1000 psi. Tras el bombardeo, las hojas se incubaron en placas de Petri con medio RMOP, en oscuridad durante 2 días en la cámara de cultivo con las siguientes condiciones ambientales: temperatura constante de 28°C, fotoperiodo de 8 horas de oscuridad y 16 de luz, y la intensidad luminosa por estantería es de 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , mediante fluorescentes de luz blanca Philips (TDL 58W/79). Transcurrido ese tiempo se realizó la primera ronda de selección. Las hojas se cortaron en fragmentos de 5x5 mm. Éstos se cultivaron con el envés en contacto con el medio RMOP, suplementado con 500 mg/l de espectinomicina en la cámara de cultivo. Se realizaron tres controles: dos controles positivos de regeneración, uno con RMOP sin espectinomicina y un explanto de hoja no transformada; otro control positivo con RMOP, con espectinomicina y explantos de hoja transplastómica de un experimento anterior; y un control negativo con RMOP, con espectinomicina y explantos de hoja no transformada.

Transcurrido un mes aproximadamente, se llevó a cabo una segunda ronda de selección en idénticas condiciones que la primera, con los regenerantes verdes obtenidos. Transcurrido otro mes, las plántulas regeneradas de la segunda ronda fueron enraizadas en medio P<sub>3</sub> con 500 mg/l de espectinomicina. Cuando alcanzaron el porte adecuado, fueron aclimatadas en el fitotrón en contenedores tipo Jiffy, rellenos de una mezcla de 3 partes de sustrato Pindstrup y 1 parte de perlita. El fitotrón tiene una humedad relativa del 77%, una temperatura de 26,6°C, un fotoperiodo de 8 horas de oscuridad y 16 de luz, y una intensidad luminosa de 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , proporcionada por fluorescentes Sylvania GroLux T8 36W-G13 (F36W/GRO). Se tomaron muestras de hoja de las plantas trasplantadas para realizar los análisis moleculares.

## **3. Análisis moleculares**

### **3.1. Extracción de ADN genómico. Método CTAB**

Las muestras de hojas de tabaco, que se habían conservado en nitrógeno líquido a -80°C, se homogeneizaron con el *Mikro-Dismembrator U* (B Braun Biotech International, Melsungen, Alemania), manteniendo la cadena de frío. La extracción de ADN genómico de estas hojas se realizó por el método CTAB (bromuro hexadeciltrimetilamonio), descrito por Murray and Thompson (1980). Posteriormente el ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm (BioPhotometer; Eppendorf International, Hamburgo, Alemania).

### **3.2. Análisis de los regenerantes por PCR**

La PCR se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf (Hamburgo, Alemania) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 5 minutos a 95°C, seguido de 3 ciclos que se repiten 30 veces, uno de 45 segundos a 95°C, otro de 45 segundos a 60°C y otro de 45 segundos a 72°C, y para finalizar, un ciclo de 5 minutos a 72°C. Como había dos tipos de regenerantes, los que portaban el gen de la *Trx f* mutado o sin mutar y los que portaban el gen de la *Trx m*, se hicieron dos tipos de mezclas. Una mezcla que contenía los cebadores para amplificar un fragmento específico del gen de la *Trx f* mutada o sin mutar (Trxf-F5'CAATGGGTCACCATCACCATCACCATAGCTCCGATGCTACTG-3' y Trx f-R 5'GCGGCCGCTTAACTTGACCGCACATCCTCAATTG-3') y otra mezcla que contenía los cebadores para amplificar el fragmento del gen de la *Trx m* mutada o sin mutar (Trx m- F 5'-CCATGGGTCACCATCACCATCACCATGAAGCGCAAA-3' y Trx m-R 5'-GCGGCCGCTTACAAGAATTTCTCTATGCAGGTGG-3'). Para la visualización de los productos de la PCR, se elaboró un gel de agarosa al 1% (1,25 gr de agarosa D-1, 125 ml de TAE 1x y 12,5 µl de bromuro de etidio. A continuación se corre el gel a un voltaje constante de 100 V durante 30 minutos aproximadamente.

### **3.3. Análisis de los regenerantes por Southern Blot**

Se digirieron 20 µg de ADN genómico de muestras de hoja con la enzima *BglII* (Biolabs). Los productos de la digestión se resolvieron en un gel de agarosa 0,7% (p/v), que se corrió a 100 V durante 4 horas. Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de nylon (Nytran; Whatman, Springfield Mill, UK) y ésta fue hibridada con una sonda de 0,8 kb, (*FS*), homologa a las secuencias flanqueantes cuando los regenerantes fueron bombardeados con el vector de patata y con otra sonda de 0,78 kb (*HS*), que flanquea la zona de inserción cuando los regenerantes fueron bombardeados

con el vector de tabaco. Tanto la preparación de la sonda como la hibridación de la membrana, se llevaron a cabo con el sistema de marcaje y detección directa de quimioluminiscencia *DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

### **3.4. Análisis de regenerantes y de expresión en bacterias por Western Blot**

Los regenerantes que en el Southern Blot se confirmaron como transgénicos, así como las bacterias transformadas con los respectivos vectores, fueron sometidos a un análisis mediante Western Blot para comprobar la expresión de la Trx f mutada o sin mutar, y la de la Trx m mutada. Las muestras para los Western Blot de plantas se obtuvieron a partir de hojas que fueron congeladas en nitrógeno líquido y, posteriormente, homogeneizadas con *Mikro-Dismembrator U* (B Braun Biotech International, Melsungen, Alemania) a 2000 rpm 2 minutos. Mientras que las muestras procedentes de bacterias se fueron tomando durante la realización de una curva de crecimiento, se centrifugaron a 4000 rpm 3 minutos y se les quitó el sobrenadante. A partir de aquí, ambos tipos de muestras se resuspendieron en tampón Laemmli o Laemmli Buffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,5, 4% SDS, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,1% azul de bromofenol). Las muestras vegetales en 4 volúmenes y las muestras bacterianas en 50 o en 100  $\mu$ l, en función del sedimento. Una vez añadido el tampón Laemmli, se extrajo la proteína total hirviendo a 99°C durante 5 minutos. Los extractos fueron resueltos por SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 13%, y transferido a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL; GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) o a una membrana PVDF (Fluoruro de polivinilideno) que previamente se trató con metanol. Como anticuerpo primario se usaron anti-Trx m o anti-Trx f (Sanz-Barrío *et al.*, 2012) a una dilución 1:5000, y como anticuerpo secundario se usó anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:5000. Ambos diluidos en PBS-T ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM,  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 100 mM, Tween-20 0,1%) con leche descremada en polvo al 5%. La detección de las proteínas se llevó gracias al kit *ECL Western blotting detection reagents and analysis system* (GE Healthcare).

## **4. Expresión y curvas de crecimiento bacteriano**

Con la finalidad de ver la expresión de las Trx f y m mutadas y sin mutar en bacterias, se hizo crecer *E. coli* de la estirpe TOP 10 en medio de cultivo LB (Luria Bertani) suplementado con ampicilina. Se preparó un litro de LB líquido, disolviendo 20 g de



LB en 1 litro de agua miliQ y se autoclava a 121°C 15 minutos. Para hacer medio sólido habría que añadirle 14 g de BactoAgar antes de autoclavar. Después de autoclavar, se suplementa con 100 mg/l de ampicilina. También se preparó 1 litro de LB sin ampicilina. Las *E. coli* que se crecieron, se caracterizaban porque presentaban en su interior un vector que podía ser:

- El pL3: vacío
- El pL3prrnG10LTrxf: porta el gen de la Trx f sin mutar.
- El pL3PrrnG10LTrxf71: porta el gen de la Trx f mutado en el aminoácido 71.
- El pL3PrrnG10LTrxfCC: porta el gen de la Trx f mutado en el centro activo.
- El pL3prrnG10LTrxm: porta el gen de la Trx m sin mutar.
- El pL3PrrnG10LTrxmCC: porta el gen de la Trx m mutado en el centro activo.

Todos estos vectores incluían el gen de resistencia a la ampicilina que permitió únicamente el crecimiento, en el medio LB suplementado con ampicilina, de las *E. coli* que presentaban alguno de los vectores. En primer lugar se sembraron 3 µl, a partir del stock que correspondiera, en placas de Petri con medio LB sólido suplementado con ampicilina, y se dejó crecer durante la noche a 37°C. Al día siguiente se pusieron a 4°C, y por la tarde se picó una colonia y se inoculó en 8 ml de medio LB líquido con ampicilina, dejándose en agitación a 200 rpm a 37°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se dispensaron 49 ml de medio LB líquido con ampicilina en un matraz en el que se inoculó posteriormente 1 ml del inóculo, que había estado creciendo durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. A partir de ese momento se fueron tomando muestras, que fueron analizadas con espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a 600nm (BioPhotometer; Eppendorf International, Hamburgo, Alemania), para ver la densidad óptica y así elaborar una curva de crecimiento bacteriano. Al principio, la medida de la densidad óptica se hace cada hora, pero cuando entra en la fase exponencial de crecimiento, se hace cada 15-20 minutos. Cuando la densidad óptica alcanzó 0,4, se empezaron a tomar muestras de 1 ml para los Western Blot, al mismo tiempo que se cogían las muestras para la densidad óptica. La toma de muestras incluyó, de forma adicional, una toma por la tarde y otra por la mañana siguiente. Las muestras bacterianas recogidas que finalmente se usaron para los Western Blot fueron cuatro: la de densidad próxima a 0,8, la de 1,4, la que se tomó por la tarde y la que se tomó a la mañana siguiente. Gracias a los datos de densidad óptica se pudieron realizar las curvas de crecimiento bacteriano.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Generación de vectores que portaban mutaciones en el centro activo o en la Cys 71 de la Trx f o en el centro activo de la Trx m

Para realizar la transformación plasmidial, fue necesario generar tres vectores de tabaco que portaran las mutaciones correspondientes, ya fuera en el centro activo o en la Cys71 de la Trx f o en el centro activo de la Trx m. Estos vectores se denominaron respectivamente: pL3PrrnG10LTrxfCC, pL3PrrnG10LTrxf71 y pL3PrrnG10LTrxmCC, y fueron realizados según lo expuesto en Material y Métodos por Alicia Fernández San Millán. El vector pL3PrrnG10LTrxfCC portaba la secuencia del gen de la Trx f, con mutaciones que afectaban a los dos tripletes que codifican las cisteínas del centro activo. El pL3PrrnG10LTrxf71, contenía una mutación en la secuencia del gen de la Trx f, que afectaba al triplete que codificaba la cisteína en posición 71. El pL3PrrnG10LTrxmCC contenía la secuencia del gen Trx m, el cual portaba una mutación que afectaba a los tripletes que codificaban las cisteínas del centro activo. En la secuencia de aminoácidos de la Trx f, las cisteínas afectadas son: Cys44 y Cys47 (centro activo) o la Cys71 que sustituyeron por serinas. Mientras que en la secuencia de aminoácidos de la Trx m, las cisteínas afectadas son: Cys37 y Cys40, que forman parte del centro activo y también se sustituyeron por serinas (Figura 5). Se seleccionaron estas cisteínas debido a que, además de formar parte del centro activo o estar muy próximas a él (como es el caso de la Cys71 de la Trx f), las cisteínas presentan grupos tiol que participan activamente en la reducción de las proteínas diana oxidadas. Así pues, si estas cisteínas son sustituidas por serinas, los grupos tiol ya no estarán presentes, con lo cual las Trxs perderán su actividad oxidoreductasa.

<b>Trx f</b>	MALQV	QVNGVSLKPS	TVPSSSAWRS	SKQSVVCVAG	DYGFSPRVFN	NRGLSLKVKC	<sup>1</sup> SSDATATTSV	
<sup>11</sup> TVGQVTEVCK	<sup>21</sup> DTFWPIVEAA	<sup>31</sup> GDKTVVVDYMY	<sup>41</sup> TQW <u>CGPC</u> KVI	<sup>51</sup> APKFQELSKN	<sup>61</sup> YNDVVFLKLD	<sup>71</sup> GNQDNRPLAK	<sup>81</sup> ELGIKVVPTF	
<sup>91</sup> KILKNNKVVK	<sup>101</sup> EVTGAKLDNL	<sup>111</sup> IAAIEDVRSS						
<b>Trx m</b>	MAGVLEMISV	PRASALPSSS	LAPVAGSSFSS	SPRSSVRFSQ	FRGLKIQSTR	SSVSTTSSCSK	IIPGRARIVC	<sup>1</sup> EAQNTALEVG
<sup>11</sup> AVNDKTWKS	<sup>21</sup> VVESDIPVLV	<sup>31</sup> EFWAPW <u>CGPC</u>	<sup>41</sup> RMIHPVIDEL	<sup>51</sup> AKEYAGKLF	<sup>61</sup> FKLNTDESPS	<sup>71</sup> TATELGIRSI	<sup>81</sup> PTVMIFKNGE	
<sup>91</sup> KKDAVIGAVP	<sup>101</sup> KSTLTTCIEK	<sup>111</sup> FL						

**Figura 5: Secuencias de aminoácidos de la Trx f y m. Subrayados con una línea están los centros activos. En rojo, las cisteínas mutadas en los centros activos de ambas secuencias. En verde, en la secuencia de la Trx f aparece la cisteína 71. Modificada a partir de Sanz-Barrio *et al.*, 2012.**

## 2. Obtención de plantas transplastómicas

Empleando el sistema biolístico, se transformaron plastidialmente plantas de tabaco de la variedad Petite Havana. Se obtuvieron así, plantas transplastómicas que sobreexpresaran la Trx f sin mutar o mutada en el centro activo o en la Cys71 o la Trx m mutada en el centro activo. Para ello, se utilizaron los 3 vectores descritos en Material y Métodos. Estos vectores contenían los siguientes elementos: (1) el gen marcador de selección *aadA* (Svab & Maliga, 1993), que permitió la selección de plantas transplastómicas gracias a su fenotipo verde, creciendo en medio supelmentado con espectinomicina, (2) el promotor del gen marcador de selección es *Prrn* (del operón de rRNA (*Prrn*) (Svab & Maliga, 1993)) y su terminador es el *TpsbA* de tabaco. El promotor del gen de interés el *Prrn* se encuentra fusionado con la región líder del gen *10* del bacteriófago T7 (*GL10*). La región líder *GL10* es complementaria al mRNA antisentido del *Prrn* y proporciona señales de traducción muy eficientes, independientes de la luz, además de aumentar la capacidad de traducción de genes exógenos en plastidios (Staub *et al.*, 2000). El terminador del gen de interés es el *Trps16*, que se ha visto que favorece la estabilidad del ARN y una eficiente traducción, además de aumentar la acumulación de la proteína de interés. El vector de patata pST*Prrn*G10Ltrxf cuenta con un casete de transformación que presenta el mismo gen marcador de selección, el *aadA*, bajo el control del promotor *Prrn*. Mientras que el gen de interés, en este caso el *Trx f* no mutado, está bajo el control del promotor *Prrn* fusionado con la región líder del gen *10* del bacteriófago T7 (*GL10*) y su terminador es *TpsbA* de petunia. El proceso completo de transformación plastidial dura unas veinte semanas (Figura 6). En este proyecto de fin de máster, se ha llevado a cabo en dos ocasiones. El primero comenzó la tercera semana de septiembre de 2013. En esta transformación plastidial, se bombardearon diez hojas de *N. tabacum* con el vector pL3*Prrn*G10LTrxf71.

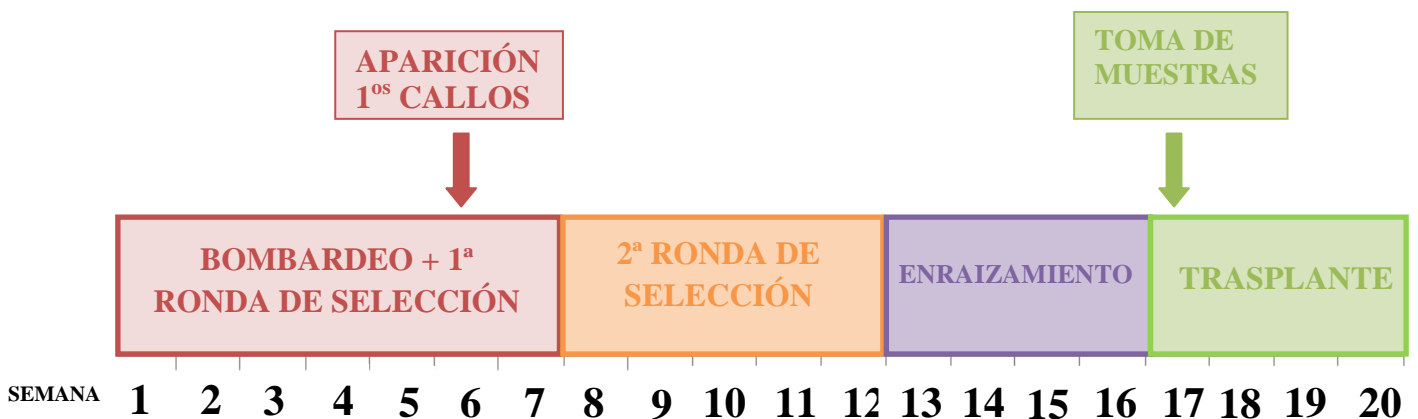


Figura 6: Esquema temporal del proceso de transformación plastidial.

5

5

5

De este primer bombardeo se obtuvo un único supuesto regenerante, denominado Fmut71. El segundo proceso de transformación plastidial, comenzó la tercera semana de febrero de 2014 y concluyó la segunda semana de agosto 2014. En esta ocasión se bombardearon cuarenta hojas de *N. tabacum* con los siguientes vectores: pL3PrnnG10LTrxfCC, pL3PrnnG10LTrxf71, pL3PrnnG10LTrxmCC y pSTPrnnG10Ltrxf; a razón de diez hojas por vector. Se obtuvieron dieciséis callos, es decir, dieciséis posibles regenerantes. En la segunda ronda de selección, tras desarrollar brotes, cuatro de ellos fueron descartados debido a que presentaban una morfología blanquecina e hiperhídrica. Se enraizaron un total de doce regenerantes y, cuando alcanzaron el tamaño adecuado, se pasaron al fitotrón y se tomaron muestras de hoja para los posteriores análisis moleculares.

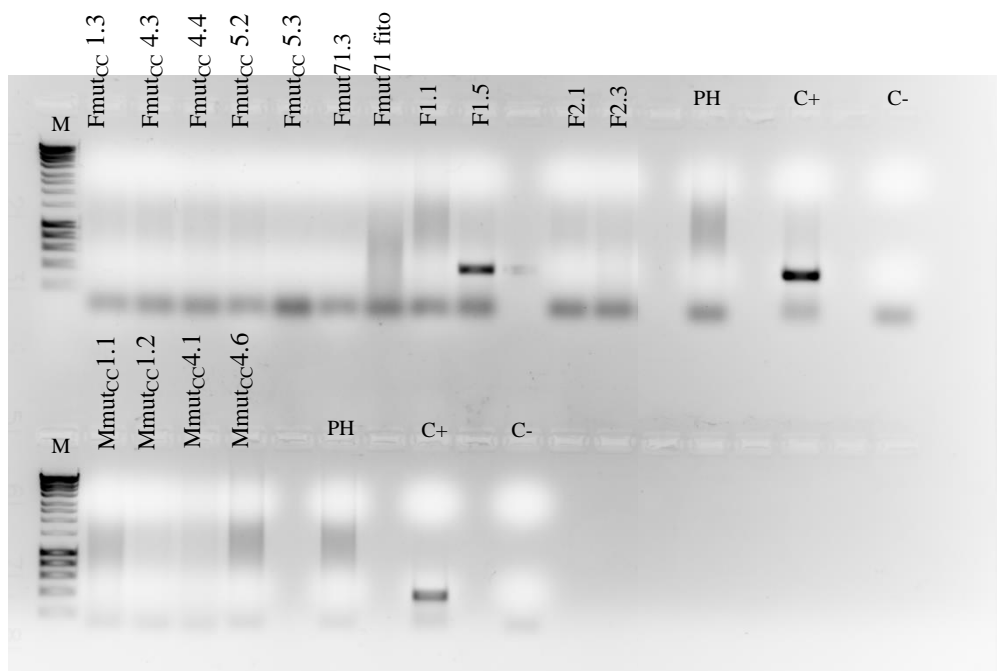
El resultado final, después de los dos procesos de transformación plastidial (50 hojas bombardeadas en total), fue la obtención de un único regenerante transgénico con el vector pSTPrnnG10Ltrxf del segundo bombardeo. Esta eficiencia de transformación es muy baja si lo comparamos con el número de transformantes obtenidos habitualmente en transformación plastidial de tabaco, que es entre 1-5 transformantes por hoja bombardeada (Molina *et al*, 2004).

### **3. Comprobación de la presencia del gen de interés en el plastoma de los regenerantes mediante PCR**

La regeneración de plantas transplastómicas, a partir de los explantos de hoja de tabaco bombardeados, necesita ser comprobada por diferentes técnicas. Una de ellas es la PCR. Esta técnica se usa de forma rutinaria para chequear la presencia o ausencia del gen de interés.

Se realizaron dos PCR y en ambas se utilizaron los cebadores Trx f-F, Trx f-R, Trx m-F y Trx m-R. En la primera, se analizaron dos clones (Fmut71) de la primera transformación y parte de los regenerantes (FmutCC, MmutCC y F) de la segunda transformación plastidial. En la segunda, se analizaron el resto de los regenerantes (FmutCC, MmutCC y F) de la segunda transformación y dos clones (Fmut71) de la primera transformación plastidial. Las dos PCR fueron realizadas bajo las condiciones expuestas en el apartado de Material y Métodos.

En la Figura 7 se observa el resultado de la primera PCR, en ella se analizaron quince regenerantes. Dos de ellos eran clones Fmut71 de la primera transformación plastidial, y el resto eran regenerantes procedentes de la segunda transformación plastidial (5

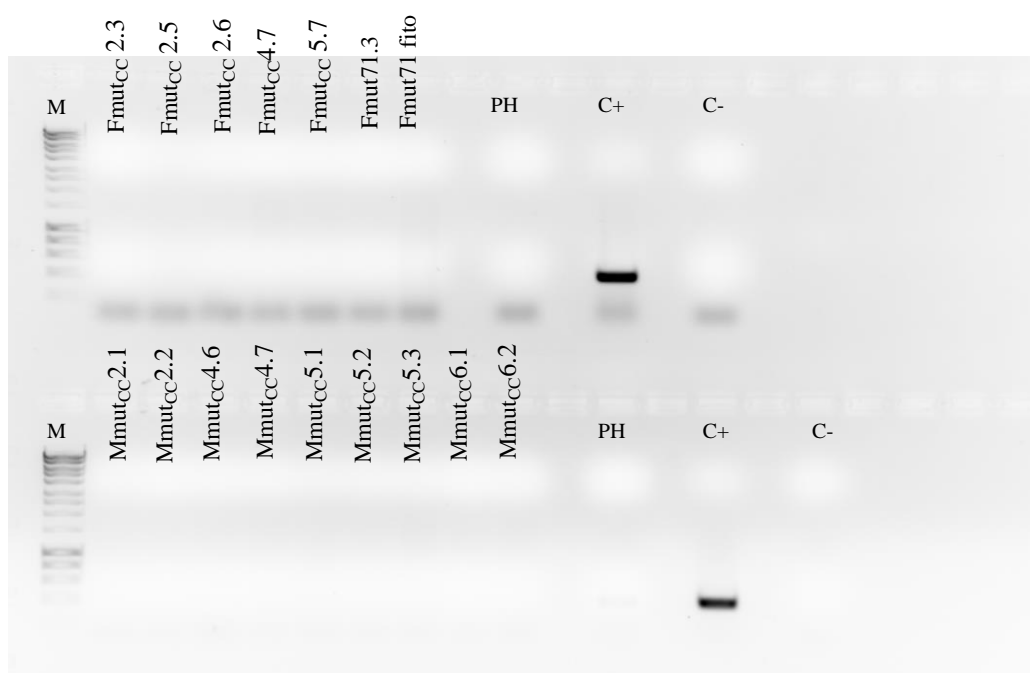


**Figura 7: Primer análisis de los transformantes mediante PCR.** Los Fmut<sub>CC</sub> (mutantes en el centro activo de la Trx f):1.3, 4.3, 4.4, 5.2 y 5.3. Los Fmut71 (mutantes en la cisteína 71 de la Trx f): 71.3 y 71fito. Los F (sobrexpresan la Trx f con el vector de patata):1.1, 1.5, 2.1 y 2.3. Los Mmut<sub>CC</sub> (mutantes en el centro activo de la Trx m): 1.1, 1.2, 4.1 y 4.6. PH es el genotipo silvestre, C+ en la parte superior es una muestra de planta que sobreexpresa la Trx f y en la parte inferior es una muestra de planta que sobreexpresa la Trx m. Los C- contienen todos los elementos de la PCR salvo los cebadores Trx f-F, Trx f-R (parte superior) y los cebadores Trx m-F, Trx m-R (parte inferior).  
M es el marcador.

FmutCC, 4 F y 4 MmutCC). Los dos clones Fmut71 son PCR negativos, con lo cual, en principio, parece que del primer proceso de transformación no se obtuvo ningún regenerante transgénico. El único resultado positivo en esta PCR corresponde al regenerante F<sub>1.5</sub>. Éste es el único regenerante transgénico, ya que se ha detectado la presencia del gen *Trx f* no mutado (banda de 384 pb) contenido en el vector de patata pSTPrmG10Ltrxf. En esta primera PCR se incluyó también un clon del regenerante F<sub>1.5</sub>, el regenerante F<sub>1.1</sub>. La lógica hace pensar que al ser clones y proceder ambos del mismo evento de transformación, ambos deberían ser PCR positivos. Sin embargo, el regenerante F<sub>1.1</sub> es PCR negativo, lo cual puede deberse a que cuando se tomaron las muestras de hoja para la PCR en el caso del regenerante F<sub>1.1</sub>, la planta presentaba un estado de heteroplasma muy elevado. Por lo tanto, del segundo proceso de transformación, en principio hay un único regenerante transgénico.

En la Figura 8 se puede observar la segunda PCR que se realizó a partir del resto de regenerantes (FmutCC, MmutCC y F) de la segunda transformación plastidial, incluyendo además dos clones Fmut71 de la primera transformación plastidial. Todos los regenerantes analizados fueron PCR negativos. Por lo tanto, de los dos procesos de

transformación realizados, el único regenerante que presenta el gen de interés es el F<sub>1.5</sub>, según los resultados de las PCR.



**Figura 8: Segundo análisis de los transformantes mediante PCR. Los Fmut<sub>CC</sub> (mutantes en el centro activo de la Trx f): 2.3, 2.5, 2.6, 4.7 y 5.7. Los Fmut71 (mutantes en la cisteína 71 de la Trx f): 71.3 y 71 fito. Los Mmut<sub>CC</sub> (mutantes en el centro activo de la Trx m): 2.1, 2.2, 4.6, 4.7, 5.1, 5.2, 5.3, 6.1 y 6.2. PH es el genotipo silvestre, C+ (parte superior) es una muestra de planta que sobreexpresa la Trx f y (parte inferior) es una muestra de planta que sobreexpresa la Trx m. Los C- contienen todos los elementos para la PCR salvo los cebadores Trx f-F, Trx f-R (parte superior) y los cebadores Trx m-F, Trx m-R (parte inferior). M es el marcador.**

En las PCR realizadas, se incluyeron muestras de plantas de tabaco Petite Havana sin transformar como control negativo. Otro control negativo que se empleó fue añadir todos los componentes de la PCR, salvo los cebadores. Como controles positivos, se emplearon muestras procedentes de plantas que sobreexpresaban o bien la Trx f o bien la Trx m.

#### **4. Comprobación de la integración de los transgenes de interés en el plasmoma de tabaco mediante Southern Blot**

Para poder diferenciar entre el estado homoplásmico y heteroplásmico de las plantas transplásticas, podemos recurrir a analizar polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción o RFLP (del inglés “*Restriction Fragment Length Polymorphism*”). Para ello, se ha recurrido a la técnica del Southern Blot. Se digirieron 20 µg de ADN de cada

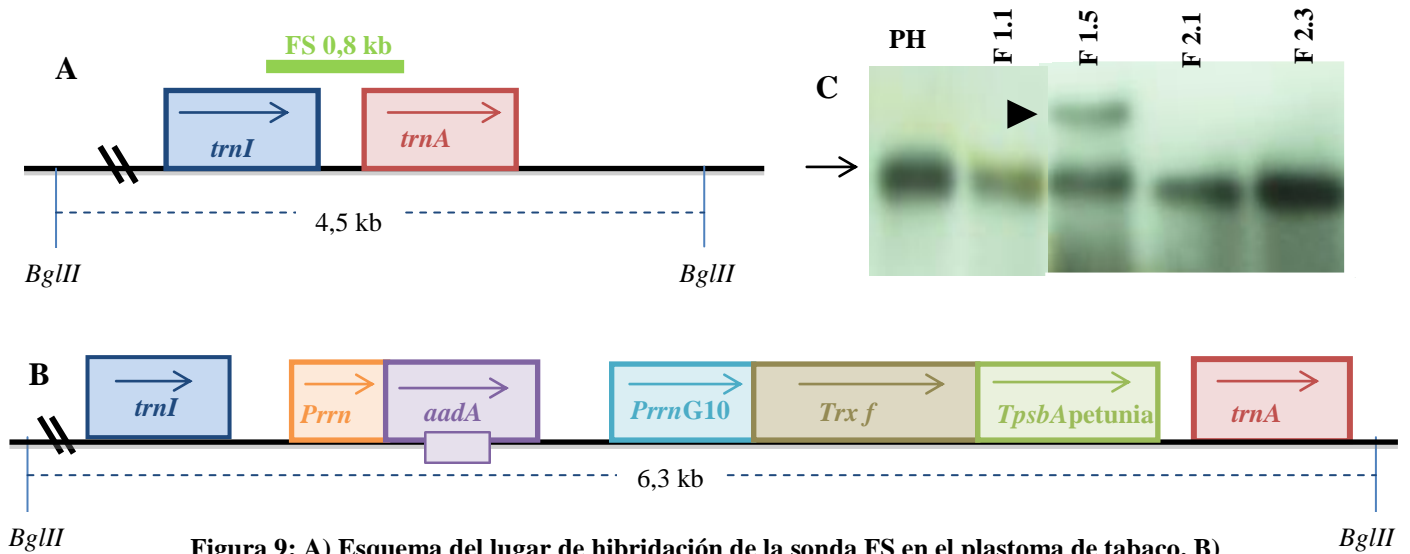
muestra de hoja con la enzima *BglIII*, los fragmentos se separaron en un gel de agarosa y se transfirieron a una membrana. A continuación, la membrana fue hibridada con una sonda que reconoce específicamente la secuencia de ADN que queremos identificar, en este caso las zonas de recombinación homóloga. Gracias a esta técnica se comprueba la integración del gen *Trx f* mutado o sin mutar, o del gen *Trx m* mutado en el plastoma, y en función del patrón de bandas obtenido, se puede determinar si es un genotipo homoplásmico, heteroplásmico o silvestre.

Se realizaron tres Southern Blot: dos con los regenerantes del bombardeo con los vectores de tabaco, y uno con los regenerantes producidos por el vector de patata. Al emplearse dos tipos de vectores, de tabaco y de patata, se usaron dos tipos de sondas.

Para los regenerantes generados a partir del vector de patata (pSTPrrnG10Ltrxf), la sonda que se empleó fue la *FS*, que es una secuencia de 0,80 kb homóloga de las secuencias flanqueantes del sitio de inserción dentro del plastoma del tabaco. Estas secuencias flaqueantes son los genes *trnI* y *trnA* (Figura 9A), que se encuentran en la zona duplicada invertida. Cuando el plastoma silvestre de tabaco es digerido por la enzima de restricción *BglIII*, genera un fragmento de aproximadamente 4,5 kb. Sin embargo, si el plastoma de tabaco digerido por *BglIII* ha sido previamente transformado con el vector pSTPrrnG10Ltrxf, genera un fragmento de 6,3 kb (Figura 9B). Esto es debido a la integración del casete de transformación en el plastoma de tabaco. Sin embargo, no siempre se va a producir la integración del casete de transformación en el plastoma de tabaco. Es más, es posible que en caso de darse, no afecte a todo el ADN de todos los plastidios. De manera que los regenerantes se identifican como silvestres si sólo presentan la banda de 4,5 kb, homoplásmicos si tiene únicamente la banda de 6,3 kb y heteroplásmicos en caso de que presenten ambas bandas.

Se llevó a cabo un Southern Blot con los 4 regenerantes del bombardeo con el vector pSTPrrnG10Ltrxf. Tres regenerantes dieron un patrón de bandas con una única banda entorno a 4,5 kb, y presentaban un genotipo silvestre puesto que no habían integrado el casete de transformación en su genoma. Sin embargo, uno de ellos dio un patrón de bandas en el que aparecía una banda entorno a 6,3 kb y otra a 4,5 kb. Por lo tanto, tenía un genotipo heteroplásmico en el que parte de los plastomas de sus plastidios habían incorporado el casete de transformación. El regenerante era el F<sub>1.5</sub> que había sido PCR positivo. Sin embargo, su clon F<sub>1.1</sub> da un patrón de bandas propio del genotipo silvestre (Figura 9C). La explicación es que, cuando se cogió la muestra de hoja de este regenerante, la planta todavía era muy heteroplásmica. Por lo tanto el número de

plastomas que habían incorporado el gen *Trx f* no mutado, era tan bajo que se encontraba por debajo del límite de detección de la técnica del Southern Blot.

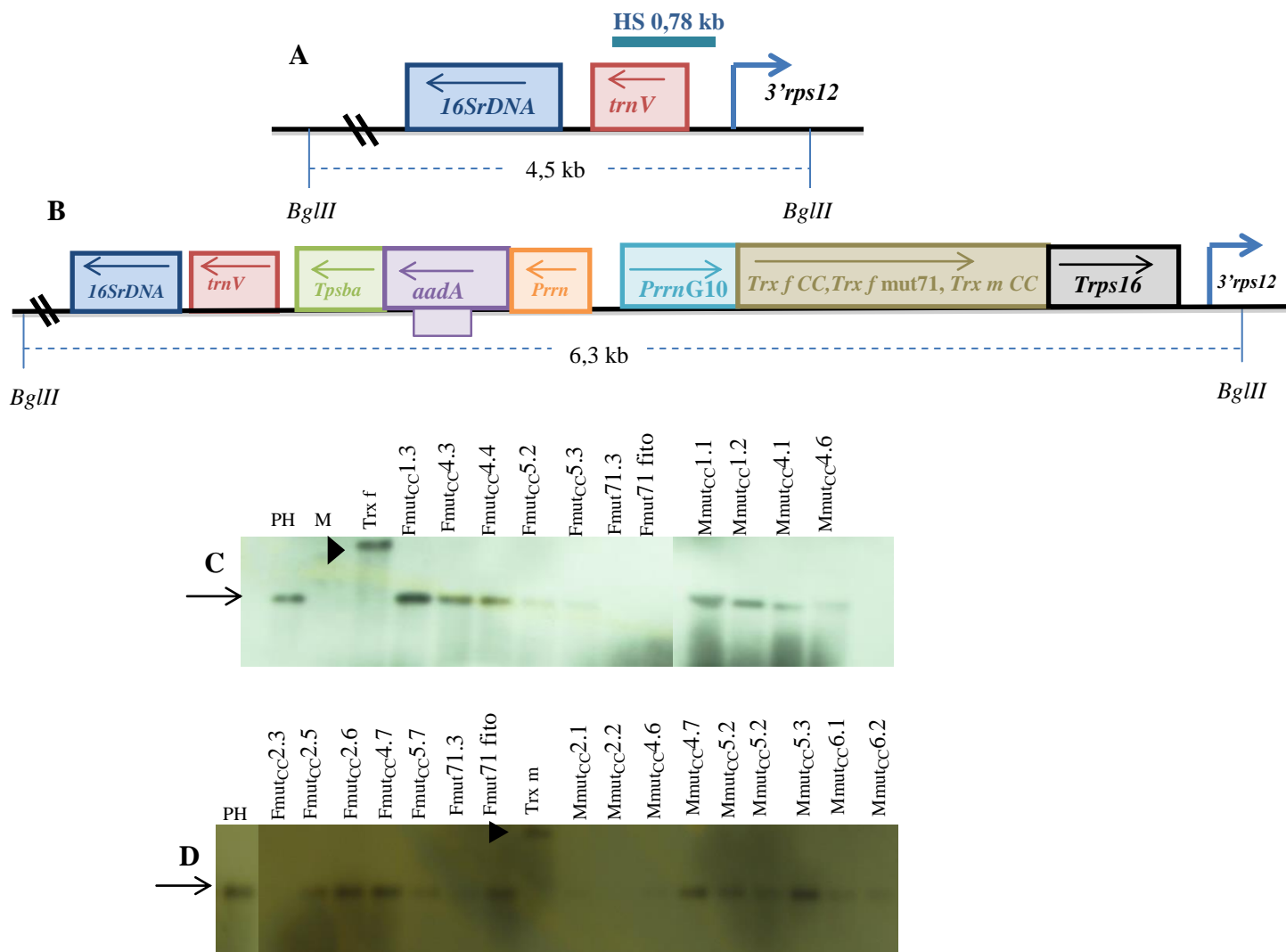


**Figura 9:** A) Esquema del lugar de hibridación de la sonda FS en el plastoma de tabaco. B) Inserción del casete de transformación del vector pSTPrnnG10Ltrxf en el plastoma de tabaco entre los genes *trnI* y *trnA*. C) Resultado del Southern Blot. La flecha indica la banda de 4,5 kb y la punta de flecha la banda de 6,3 kb. Los regenerantes F que sobreexpresan la *Trx f*: 1.1, 1.5, 2.1 y 2.3. PH es el genotipo silvestre y se usa como control negativo.

Los regenerantes del bombardeo con los vectores pL3PrnnG10LTrxfCC, pL3PrnnG10LTrxf71 y pL3PrnnG10LTrxmCC, fueron analizados con la sonda *HS*, que es una secuencia de 0,78 kb homóloga a las secuencias flanqueantes del sitio de inserción en el plastoma de tabaco en el vector tipo pL3. En este caso, las secuencias flanqueantes son los genes *trnV* y *rps12* (Figura 10A), y se encuentran en la región invertida repetida del genoma plastidial. Cuando la enzima de restricción *BglIII* digiere el plastoma de tabaco sin transformar, genera un fragmento de 4,5 kb. Sin embargo, cuando la enzima *BglIII* digiere un plastoma de tabaco que ha sido previamente transformado por alguno de los siguientes vectores pL3PrnnG10LTrxfCC, pL3PrnnG10LTrxf71 o pL3PrnnG10LTrxmCC, puede generar un fragmento de 6,3 kb (Figura 10B).

Se realizó un Southern Blot con parte de los regenerantes fruto del bombardeo, con los vectores pL3PrnnG10LTrxfCC, pL3PrnnG10LTrxf71 o pL3PrnnG10LTrxmCC. Todos los regenerantes (11 en total) tuvieron un patrón de bandas en el que aparecía una banda en torno a 4,5 kb. Por lo tanto, todos ellos tenían un genotipo silvestre (Figura 10C), ya que no había integrado el casete de transformación en el plastoma.





**Figura 10:** A) Esquema del lugar de hibridación de la sonda FS en el plastoma de tabaco. B) Inserción del casete de transformación de los vectores pL3PrrnG10LTrxfCC, pL3PrrnG10LTrxf71 o pL3PrrnG10LTrxmCC en el plastoma de tabaco entre los genes *trnI* y *trnA*. C) Resultado del primer SouthernBlot. Los Fmut<sub>CC</sub> (mutantes en el centro activo de la Trx f): 1.3, 4.3, 4.4, 5.2 y 5.3. Los Fmut71 (mutantes en la cisteína 71 de la Trx f): 71.3 y 71fito. Los Mmut<sub>CC</sub> (mutantes en el centro activo de la Trx m): 1.1, 1.2, 4.1 y 4.6. Trx f muestra de una planta que sobreexpresa la Trx f como control positivo de la homoplasma. M es el marcador de peso molecular. PH es muestra de una planta sin transformar. D) Resultado del segundo Southern Blot. Los Fmut<sub>CC</sub> (mutantes en el centro activo de la Trx f): 2.3, 2.5, 2.6, 4.7 y 5.7. Los Fmut71 (mutantes en la cisteína 71 de la Trx f): 71.3 y 71fito. Los Mmut<sub>CC</sub> (mutantes en el centro activo de la Trx m): 2.1, 2.2, 4.6, 4.7, 5.1, 5.2, 5.3, 6.1 y 6.2. Trx m muestra de una planta que sobreexpresa la Trx m como control positivo de la homoplasma. También se incluyó una muestra de Trx f pero no hubo una correcta transferencia a la membrana. Las flechas indican la banda de 4,5 kb y la punta de flecha la banda de 6,3 kb. Se realizó un tercer Southern Blot con el resto de regenerantes (en total dieciséis) fruto del bombardeo con los vectores de tabaco. Todos ellos dieron un patrón de bandas propio del genotipo silvestre con una única banda en 4,5 kb (Figura 10D). Por tanto, se confirman los resultados de la PCR, que adelantaban que sólo el regenerante F<sub>1.5</sub> era

transgénico. Destacar que el volumen de regenerantes analizado mediante esta técnica fue elevado, debido a que en la mayoría de los casos se analizaban varios clones procedentes del mismo evento de transformación. En todos los Southern Blot que se realizaron, se incluyeron muestras de una planta de tabaco perteneciente a la variedad Petite Havana no transformada como control negativo, de una planta de tabaco transformada que sobreexpresaba la *Trx f* como control positivo y una planta de tabaco transformada que sobreexpresaba la *Trx m* también como control positivo.

##### **5. ¿Por qué no se obtienen transformantes plastidiales con los mutantes de *Trx f* o *Trx m*?**

Tras realizar las pruebas moleculares (Southern Blot y PCR) a los regenerantes, se comprobó la baja eficiencia de los dos procesos de transformación plastidial en relación con otros anteriores, llevados a cabo en el laboratorio y la ausencia de regenerantes transgénicos mutantes en los genes *Trx f* y *Trx m*. Estos dos hechos hacen que sea necesario analizar los puntos más importantes del proceso de transformación plastidial en busca de una explicación a los resultados obtenidos.

Un problema en el sistema de bombardeo podría haber sido la causa de la ausencia de regenerantes transgénicos mutantes en los genes *Trx f* y *Trx m*. Esto es bastante improbable, ya que antes de llevar a cabo los bombardeos, el equipamiento acababa de pasar una revisión técnica. Además, el propio cañón de genes, cuenta con una serie de manómetros que permiten controlar tanto la presión a la que se rompe el disco de ruptura como la presión de vacío dentro de la pistola de genes. El proceso de transformación plastidial en tabaco, es una técnica que se hace de forma rutinaria en el laboratorio, con lo cual existe un dominio sobre ella. Además, en uno de los procesos de transformación plastidial, se ha obtenido el regenerante transgénico F<sub>1.5</sub>, con lo cual el proceso de transformación funciona, a pesar de la baja eficiencia. Por lo tanto, la técnica en sí tampoco parece ser la responsable.

El medio de regeneración suplementado con el agente marcador de selección, RMOP más espectinomicina, es otro punto crítico. Para comprobar que no hubiese fallos en el medio de regeneración, se incluyeron una serie de controles. Un control positivo de RMOP sin espectinomicina en el que se cultivaron explantos de hoja de tabaco sin bombardear, los cuales regeneraron correctamente. Otro control positivo en el que se cultivaron explantos de hoja transformada en RMOP con espectinomicina, que produjeron el fenotipo verde esperado. Y un control negativo en el que se cultivaron

explantos de hoja sin transformar en RMOP con espectinomicina, explantos que no regeneraron. Por lo tanto, el medio de regeneración funcionaba correctamente.

El material vegetal a bombardear es importante. Se recomienda que el tejido tenga una división celular activa, de manera que se facilite la inserción del casete de transformación en el plastoma. Podría ser que las hojas de tabaco seleccionadas no estuvieran en este estado, lo cual parece poco probable, ya que las hojas de tabaco seleccionadas estaban próximas a la zona apical de la planta y tenían un color verde oscuro, propio de plantas creciendo en condiciones óptimas. Esto debería asegurar que son hojas relativamente jóvenes y que tienen una división celular activa.

El sistema RecA, similar a bacterias (Cerutti *et al.*, 1992) presente en plastidios y que participa en el proceso de recombinación homóloga, podría fallar. La ausencia de regenerantes mutantes en los genes de *Trx f* o *Trx m* es improbable que se deba a esta razón, ya que este mismo vector (pL3PrrnG10L) con otros genes de interés, se ha empleado en proceso de transformación plastidial anteriores y ha dado buenos resultados. Sin embargo, con vector de transformación pSTPrrnG10L de patata, se esperarían más problemas que con el anterior, ya que las zonas que han de recombinarse no son totalmente homólogas con las zonas que flanquean el sitio de inserción en el plastoma de tabaco. Por ello, con este vector sí que se esperaría una menor eficiencia de transformación en comparación con el vector anterior. Por el contrario, es con el vector pSTPrrnG10Ltrxf con el único que obtenemos un regenerante transgénico.

Para la transcripción y la traducción de los genes de interés, son de suma importancia las regiones reguladoras 3'-UTR y 5'-UTR, que favorecen mayor estabilidad de los transcritos y mayor acumulación del producto del gen de interés (Warzecha & Hennig, 2010). Por este motivo, errores en el clonaje del gen marcador de selección *aadA* o en sus secuencias reguladoras (*PrrnG10L* y *Trps16*) podrían ser responsables de los resultados obtenidos. Sin embargo esta explicación es poco probable, ya que tras la construcción del vector, se comprobó su integración en bacterias y la resistencia de las mismas al antibiótico espectinomicina. Por lo tanto, los errores en el clonaje tampoco han sido la causa.

Tras revisar los puntos más relevantes para la obtención de los regenerantes mutantes en *Trx f* o *Trx m*, se pensó que quizás las mutaciones de las *Trx f* o *m* tenían efectos deletéreos en los plastidios. Las Trxs son oxidoreductasas con múltiples dianas en la células vegetal (Montrichard, 2009; Balmer, 2006) y están implicadas en muchos procesos vitales. Al mutar las Trxs, estas podrían interactuar de manera diferente con

alguna de sus dianas y acabarían por producir cambios metabólicos en la planta incompatibles con la vida. Para comprobar esta hipótesis, y teniendo en cuenta que los plastidios son descendientes de las cianobacterias según la teoría endosimbionte (Cerutti *et al.*, 1992), se recurrió al análisis de *E. coli*, pertenecientes a la cepa TOP10, que portaban los genes mutados. Para ello se llevó a cabo el experimento del punto 7. El resultado reveló que en bacterias, los genes mutados se producían correctamente. Por lo tanto, y según apunta el resultado global, parece ser que las mutaciones en los genes *Trx f* y *Trx m* no tienen un efecto deletéreo en bacterias, resultado que posiblemente se puede hacer extensible a los plastidios de células vegetales. Sin embargo, esto no se puede asegurar al 100%, ya que hay transgenes que se han podido expresar correctamente en bacterias pero no en plastidios, por ejemplo la hemoglobina. En este caso, se detectaron altos niveles de transcritos en las plantas transgénicas, pero no se pudo detectar la presencia de la proteína en los cloroplastos de las plantas transformadas. Tanto la transcripción como la expresión en *E. coli*, eran correctas, de manera que se descartó la posibilidad de que los transcritos no fueran traducidos por la maquinaria del plastidio. Los estudios apuntaban a que la ausencia de hemoglobina en los cloroplastos podía deberse al efecto proteolítico de una enzima. (Magee, 2004). Hay casos en los que la expresión continuada de uno o varios genes, resulta tóxico para la planta transgénica. Por ejemplo la expresión del operón *phB*, que contiene los genes necesarios para la producción de polihidroxitirato. El resultado es que no se han podido expresar en plastidios o han dado fenotipos aberrantes (Lossl, 2005).

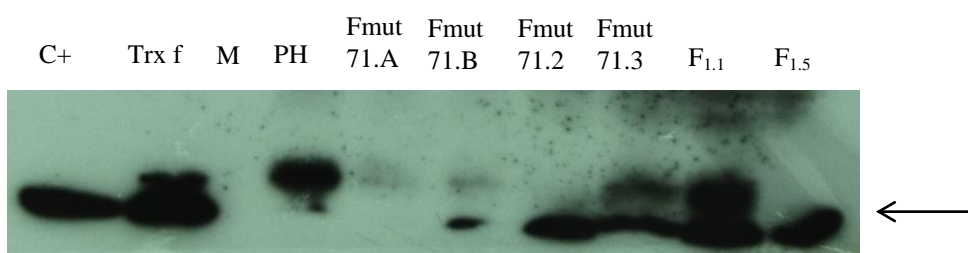
Sin embargo, se han obtenido 12 regenerantes verdes, procedentes de eventos de transformación diferentes, y sólo uno de ellos es realmente transgénico, el resto son escapes. Estos escapes son verdes en presencia de espectinomicina, pero realmente no son transgénicos, ya que no presentan en su plastoma el transgén de interés. Para explicarlo, hay que tener en cuenta que la resistencia a antibióticos en procariotas está determinada por cambios en la estructura del complejo ribosomal (Davies *et al.*, 1998). De hecho, en el caso de la espectinomicina, se ha demostrado que mutaciones en determinados nucleótidos en el gen *16S rRNA*, dan lugar a sustituciones de aminoácidos en la proteína ribosomal S5, locual interfiere en la unión de la espectinomicina con el ribosoma. (Ramakrishnan & White, 1992). Por lo tanto, es probable que los escapes se deban a mutaciones espontáneas en el gen *16S rRNA*, que se ponen de manifiesto al usar como agente marcador de selección la espectinomicina. Las primeras transformaciones plastidiales de tabaco, realizadas por Maliga, usaban el gen *16S RNA*

como marcador de selección, previamente mutado para que confiriera resistencia a la espectinomicina. Pero debido a que este gen es susceptible de sufrir mutaciones espontáneas, permitiéndole conferir resistencia a la espectinomicina espontáneamente (Svab *et al.*, 1990), se dejó de utilizar en favor del gen *aadA*, que resultó ser un marcador de selección más eficiente.

## 6. Análisis de la expresión de la Trx f en los regenerantes PCR y Southern Blot positivos

La expresión de la Trx f y de la Trx f mutada en el aminoácido 71 se comprobó con un Western Blot. En él se incluyeron dos clones F<sub>1</sub>, F<sub>1.1</sub> y F<sub>1.5</sub>, y dos clones Fmut71 de la primera transformación plastidial (Fmut71.A y Fmut71.B) y dos clones más de estos Fmut71.2 y Fmut71.3. Los clones Fmut71.A y Fmut71.B se analizaron, a pesar de sus resultados negativos en la PCR y en el Southern Blot, debido a su fenotipo. Presentaban una morfología de hojas alargadas e intensamente verdes.

Este Western se llevó a cabo por duplicado, es decir, se prepararon dos geles que se cargaron de igual forma y cada uno de los geles se transfirió a un tipo de membrana. La primera membrana es de nitrocelulosa y se emplea comúnmente para la transferencia de proteínas. La segunda membrana es de PVDF (Fluoruro de polivinilideno). Esta membrana es más sensible, tiene naturaleza hidrofóbica y alta capacidad de retención de proteína. El anticuerpo primario del Western Blot fue un anticuerpo policlonal anti-Trx f.



**Figura 11: Western Blot con la membrana PVDF (exposición 75 minutos). Se incluyeron muestras de: Trx f aislada de *E. coli*, Trx f aislada de una planta que la sobreexpresaba, el marcador, PetiteHavana, Fmut71.A, Fmut71.B, Fmut71.2, Fmut71.3, F<sub>1.1</sub> y F<sub>1.5</sub>. La flecha indica los 12 kDa.**

En la figura 11 aparecen bandas de 12 kDa, que es el tamaño esperado para la Trx f en diversas muestras, pero no en Petite Havana. En varias muestras, incluida Petite Havana, se puede ver una banda inespecífica de unos 14 kDa. En los regenerantes F<sub>1.5</sub> y F<sub>1.1</sub> se comprobó la sobreexpresión de la Trx f, lo cual va en concordancia con los resultados obtenidos. También se comprobó la sobreexpresión de la Trx f mutada en el aminoácido 71 en los clones Fmut71 más tardíos. Los clones Fmut71.A y Fmut71.B

procedían del primer bombardeo, mientras que los clones Fmut71.2 y Fmut71.3, aunque procedían del mismo bombardeo, fueron sometidos a una 3ª ronda de selección adicional en RMOP más espectinomycin. Por ello, Fmut71.2 y Fmut71.3 se denominan tardíos. Con este dato podemos avanzar que quizás si se sometieran a los regenerantes transformados con los vectores pL3PrnnG10LTrxfCC, pL3PrnnG10LTrxf71 o pL3PrnnG10LTrxmCC a una 3ª e incluso a una 4ª ronda de selección en RMOP, se conseguirían mejores resultados, con lo que el nivel de expresión de la proteína deseada aumentaría de igual modo que el nivel de homoplasma. Los resultados del Western obtenidos con la membrana de nitrocelulosa no se muestran, ya que con esa membrana no se detectó la proteína Trx f.

## 7. Expresión en bacterias

Dado el origen endosimbionte de los plastidios, las secuencias reguladoras de la expresión génica son también reconocidas por la maquinaria de expresión en bacterias. Para comprobar un posible efecto deletéreo de las Trxs mutantes, se analizó su expresión en *E. coli*, así como un posible efecto sobre el crecimiento de cultivos bacterianos.

Para ello, en medio LB líquido suplementado con ampicilina (que actúa como agente marcador de selección, ya que el gen marcador de resistencia de los vectores es *amp<sup>R</sup>*), se crecieron *E. coli* transformadas con uno de los siguientes vectores: pL3, pL3prnnG10LTrxf, pL3PrnnG10LTrxf71, pL3PrnnG10LTrxfCC, pL3prnnG10LTrxm o pL3PrnnG10LTrxmCC. Durante el crecimiento se fueron tomando muestras cada 20

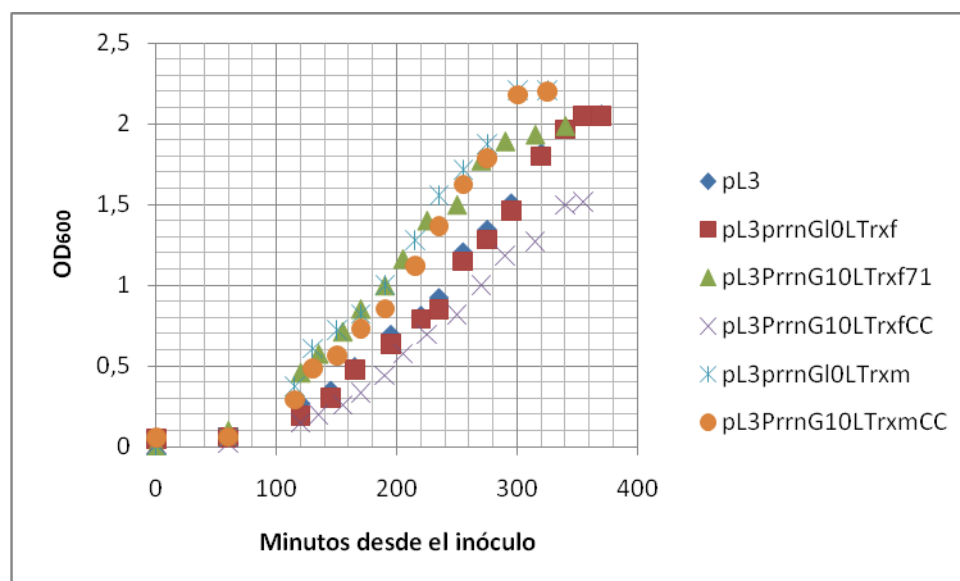
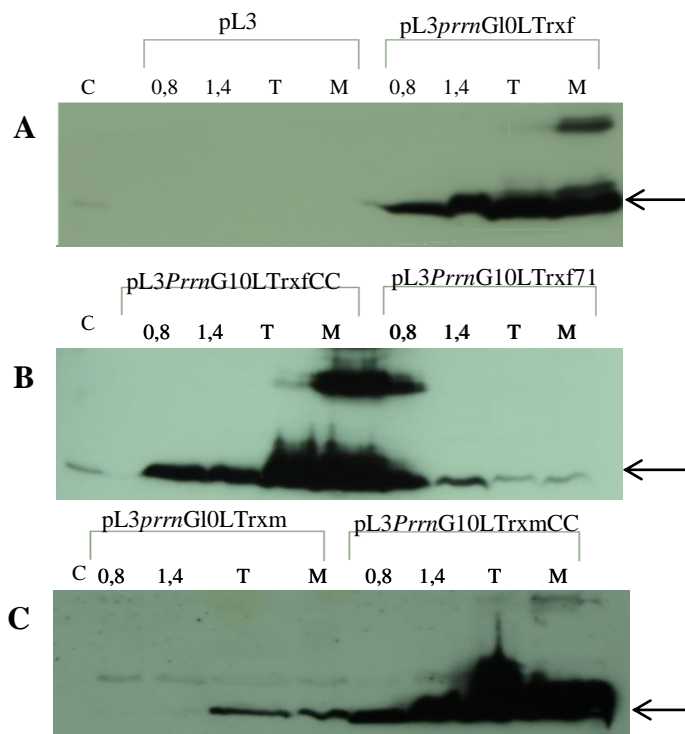


Figura 12: Curvas de crecimiento bacteriano de *E. coli* con los diferentes vectores.

minutos aproximadamente. Por un lado, para medir la densidad óptica y elaborar las curvas de crecimiento de la Figura 12. En esta figura podemos ver que los distintos clones de *E. coli* presentaban un patrón de crecimiento que se ajusta más o menos a la típica curva de crecimiento bacteriano. Y por otro lado, se tomaron muestras para ver la expresión en bacterias (Figura 13).

La Figura 13 muestra los Western Blot que se realizaron con las muestras procedentes de bacterias. Como se aprecia en la imagen, tanto la Trx f como la Trx m mutadas, se expresan en bacterias llegando a acumularse en algunas ocasiones en grandes cantidades. Por lo tanto, la hipótesis de que quizás las mutaciones en las Trx f y m tenían un efecto deletéreo en cloroplastos, parece no confirmarse con esta aproximación hecha en bacterias.



**Figura 13: Western Blot con las muestras procedentes de bacterias. Los controles (C) son muestras de Trx f purificadas de *E. coli* 0,8 y 1,4 son las densidades ópticas y T (tarde) y M (mañana siguiente) son los momentos en los que se tomaron las muestras. A) Los vectores pL3 y pL3prnG10LTrxf. B) Los vectores pL3PrnG10LTrxfCC y pL3PrnG10LTrxf71. C) Los vectores pL3PrnG10LTrxm y pL3PrnG10LTrxmCC. Las flechas indican los 12 kDa.**

Con el vector pL3, que no contenía el gen de ninguna de las Trxs, no se detectó la proteína mediante el Western Blot. Con el resto de vectores sí que se pudo detectar la presencia bien de la Trx f o de la Trx m mutadas o sin mutar. A medida que pasaba el tiempo, la cantidad de proteína acumulada aumentaba, salvo en un caso. Con el vector pL3PrnG10LTrxf71, conforme transcurre el tiempo, se detecta menos cantidad de

proteína. En estudios anteriores se ha comprobado que la cisteína 71 es clave para la interacción de la Trx f con sus proteínas diana. Por tanto, podría ser que en bacterias, la mutación del aminoácido 71 de la Trx f diera lugar a una alteración en la proteína que afectará su estabilidad, ya que no podría interactuar con sus proteínas diana.



## CONCLUSIONES

- 1- Se ha obtenido un número inusualmente bajo de transformantes tras la transformación plastidial de tabaco con los genes de tiorredoxinas mutados.
- 2- Después de haber revisado los puntos más relevante del proceso, se concluye que la técnica de transformación plastidial, el equipo empleado, el medio de regeneración, el material vegetal, el sistema de recombinación homóloga y la construcción de los vectores, no son responsables de los resultados obtenidos.
- 3- El análisis de la expresión de las *Trx f* y *m* en *E. coli*, demuestra que las mutaciones de estas proteínas no tienen efectos deletéreos en bacterias, lo cual nos sirve como aproximación para suponer lo que ocurre en plastidios.
- 4- Se ha detectado la expresión de la *Trx f* mutada en el aminoácido 71 en regenerantes *Fmut71*, sometidos a una 3ª ronda de selección. Esto sugiere que el empleo de rondas de selección adicionales a las dos normalmente usadas, puede favorecer la obtención de transformantes.
- 5- La obtención del regenerante transgénico *F<sub>1,5</sub>* con el vector *pSTPrnG10Ltrxf*, sirve como prueba de concepto para demostrar que la transformación de tabaco con vectores específicos de patata es posible.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arner, E.S.J. & A. Holmgren, (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry***267**: 6102-6109.
- Arsova, B., U. Hoja, M. Wimmelbacher, E. Greiner, S. Ustun, M. Melzer, K. Petersen, W. Lein & F. Bornke, (2010) Plastidial Thioredoxin z Interacts with Two Fructokinase-Like Proteins in a Thiol-Dependent Manner: Evidence for an Essential Role in Chloroplast Development in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *Plant Cell***22**: 1498-1515.
- Azhagiri, A.K. & P. Maliga, (2007) Exceptional paternal inheritance of plastids in Arabidopsis suggests that low-frequency leakage of plastids via pollen may be universal in plants. *Plant Journal***52**: 817-823.
- Ballicora, M.A., J.B. Frueauf, Y.B. Fu, P. Schurmann & J. Preiss, (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry***275**: 1315-1320.
- Balmer, Y., W.H. Vensel, W.J. Hurkman & B.B. Buchanan, (2006) Thioredoxin target proteins in chloroplast thylakoid membranes. *Antioxidants & Redox Signaling***8**: 1829-1834.
- Bock, R., (2013) Strategies for metabolic pathway engineering with multiple transgenes. *Plant Molecular Biology***83**: 21-31.
- Bock, R. & H. Warzecha, (2010) Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics. *Trends in Biotechnology***28**: 246-252.
- Boynton, J.E., N.W. Gillham, E.H. Harris, J.P. Hosler, A.M. Johnson, A.R. Jones, B.L. Randolpherson, D. Robertson, T.M. Klein, K.B. Shark & J.C. Sanford, (1988) Chloroplast transformation in chlamydomonas with high-velocity microprojectiles. *Science***240**: 1534-1538.
- Brandes, H.K., F.W. Larimer, M.K. Geck, C.D. Stringer, P. Schurmann & F.C. Hartman, (1993) Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin-f. *Journal of Biological Chemistry***268**: 18411-18414.
- Brooks, S.A., (2004) Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use - Implications of choice of expression system. *Molecular Biotechnology***28**: 241-255.
- Buchanan, B.B., (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology***31**: 341-374.
- Capitani, G., Z. Markovic-Housley, G. DeVal, M. Morris, J.N. Jansonius & P. Schurmann, (2000) Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *Journal of Molecular Biology***302**: 135-154.
- Casagrande, S., V. Bonetto, M. Fratelli, E. Gianazza, I. Eberini, T. Massignan, M. Salmona, G. Chang, A. Holmgren & P. Ghezzi, (2002) Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***99**: 9745-9749.
- Cerutti, H., M. Osman, P. Grandoni & A.T. Jagendorf, (1992) A homolog of *Escherichia-coli* RecA protein in plastids of higher-plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***89**: 8068-8072.
- Chibani, K., J. Couturier, B. Selles, J.P. Jacquot & N. Rouhier, (2010) The chloroplastic thiol reducing systems: dual functions in the regulation of carbohydrate metabolism and regeneration of antioxidant enzymes, emphasis on the poplar redoxin equipment. *Photosynthesis Research***104**: 75-99.
- Collin, V., E. Issakidis-Bourguet, C. Marchand, M. Hirasawa, J.M. Lancelin, D.B. Knaff & M. Miginiac-Maslow, (2003) The Arabidopsis plastidial thioredoxins - New functions and new insights into specificity. *Journal of Biological Chemistry***278**: 23747-23752.
- Collin, V., P. Lamkemeyer, M. Miginiac-Maslow, M. Hirasawa, D.B. Knaff, K.J. Dietz & E. Issakidis-Bourguet, (2004) Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new y-type. *Plant Physiology***136**: 4088-4095.
- Crawford, N.A., B.C. Yee, S.W. Hutcheson, R.A. Wolosiuk & B.B. Buchanan, (1986) Enzyme regulation in C-4 photosynthesis .6.purification, properties, and activities of thioredoxins from C-4 and C-3 plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics***244**: 1-15.
- Daniell, H., (1997) Transformation and foreign gene expression in plants by microprojectile bombardement. *Methods Mol Biol* **62**: 463-489.
- Danon, A. & S.P. Mayfield, (1994) Light-regulated translation of chloroplast messenger-RNAS through redox potential. *Science***266**: 1717-1719.
- Davies, C., D.E. Bussiere, B.L. Golden, S.J. Porter, V. Ramakrishnan & S.W. White, (1998) Ribosomal proteins S5 and L6: High-resolution crystal structures and roles in protein synthesis and antibiotic resistance. *Journal of Molecular Biology***279**: 873-888.
- Day, A. & M. Goldschmidt-Clermont, (2011) The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnology Journal***9**: 540-553.

- Eibl, C., Z.R. Zou, A. Beck, M. Kim, J. Mullet & H.U. Koop, (1999) In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant Journal***19**: 333-345.
- Eklund, H., C. Cambillau, B.M. Sjoberg, A. Holmgren, H. Jornvall, J.O. Hoog & C.I. Branden, (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *Embo Journal***3**: 1443-1449.
- Friso, G., L. Giacomelli, A.J. Ytterberg, J.B. Peltier, A. Rudella, Q. Sun & K.J. van Wijk, (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana chloroplasts: New proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell***16**: 478-499.
- Hartman, H., M. Syvanen & B.B. Buchanan, (1990) Contrasting evolutionary histories of chloroplast-1 thioredoxin-f and thioredoxin-m. *Molecular Biology and Evolution***7**: 247-254.
- Holmgren, A., (1985) Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry***54**: 237-271.
- Huang, C.Y., M.A. Ayliffe & J.N. Timmis, (2003) Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature***422**: 72-76.
- Jeng, M.F., A.P. Campbell, T. Begley, A. Holmgren, D.A. Case, P.E. Wright & H.J. Dyson, (1994) High-resolution structures of oxidized and reduced *Escherichia-coli* thioredoxin. *Structure***2**: 853-868.
- Katti, S.K., D.M. Lemaster & H. Eklund, (1990) Crystal-structure of thioredoxin from *Escherichia-coli* at 1.68Å resolution. *Journal of Molecular Biology***212**: 167-184.
- Kern, R., A. Malki, A. Holmgren & G. Richarme, (2003) Chaperone properties of Escherichia coli thioredoxin and thioredoxin reductase. *Biochemical Journal***371**: 965-972.
- Koop, H.U., S. Hertz, T.J. Golds & J. Nickelsen, (2007) The genetic transformation of plastids. In: Topics in Currents Genetics. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp
- Lemaire, S.D., V. Collin, E. Keryer, A. Quesada & M. Miginiac-Maslow, (2003) Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of Chlamydomonas reinhardtii. *Febs Letters***543**: 87-92.
- Lemaire, S.D., L. Michelet, M. Zaffagnini, V. Massot & E. Issakidis-Bourguet, (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genetics***51**: 343-365.
- Lossl, A., K. Bohmert, H. Harloff, C. Eibl, S. Muhlbauer & H.U. Koop, (2005) Inducible trans-activation of plastid transgenes: Expression of the R. eutropha phb operon in transplastomic tobacco. *Plant and Cell Physiology***46**: 1462-1471.
- Magee, A.M., E.M. Horvath & T.A. Kavanagh, (2004) Pre-screening plastid transgene expression cassettes in Escherichia coli may be unreliable as a predictor of expression levels in chloroplast-transformed plants. *Plant Science***166**: 1605-1611.
- Maliga, P., (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology***55**: 289-313.
- Meyer, Y., C. Belin, V. Delorme-Hinoux, J.P. Reichheld & C. Riondet, (2012) Thioredoxin and Glutaredoxin Systems in Plants: Molecular Mechanisms, Crosstalks, and Functional Significance. *Antioxidants & Redox Signaling***17**: 1124-1160.
- Meyer, Y., B.B. Buchanan, F. Vignols & J.P. Reichheld, (2009) Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. *Annual Review of Genetics***43**: 335-367.
- Michelet, L., M. Zaffagnini, C. Marchand, V. Collin, P. Decottignies, P. Tsan, J.M. Lancelin, P. Trost, M. Miginiac-Maslow, G. Noctor & S.D. Lemaire, (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***102**: 16478-16483.
- Michelet, L., M. Zaffagnini, V. Massot, E. Keryer, H. Vanacker, M. Miginiac-Maslow, E. Issakidis-Bourguet & S.D. Lemaire, (2006) Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynthesis Research***89**: 225-245.
- Mikkelsen, R., K.E. Mutenda, A. Mant, P. Schurmann & A. Blennow, (2005) alpha-Glucan, water dikinase (GWD): A plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***102**: 1785-1790.
- Molina, A., S. Hervas-Stubbs, H. Daniell, A.M. Mingo-Castel & J. Veramendi, (2004) High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. *Plant Biotechnology Journal***2**: 141-153.
- Montrichard, F., F. Alkhalifioui, H. Yano, W.H. Vensel, W.J. Hurkman & B.B. Buchanan, (2009) Thioredoxin targets in plants: The first 30 years. *Journal of Proteomics***72**: 452-474.
- Murray, M.G. & W.F. Thompson, (1980) Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Research***8**: 4321-4325.
- Oey, M., M. Lohse, B. Kreikemeyer & R. Bock, (2009) Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant Journal***57**: 436-445.

- Park, S.K., Y.J. Jung, J.R. Lee, Y.M. Lee, H.H. Jang, S.S. Lee, J.H. Park, S.Y. Kim, J.C. Moon, S.Y. Lee, H.B. Chae, M.R. Shin, J.H. Jung, M.G. Kim, W.Y. Kim, D.J. Yun & K.O. Lee, (2009) Heat-Shock and Redox-Dependent Functional Switching of an h-Type Arabidopsis Thioredoxin from a Disulfide Reductase to a Molecular Chaperone. *Plant Physiology***150**: 552-561.
- Peltier, J.B., O. Emanuelsson, D.E. Kalume, J. Ytterberg, G. Friso, A. Rudella, D.A. Liberles, L. Soderberg, P. Roepstorff, G. von Heijne & K.J. van Wijk, (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell***14**: 211-236.
- Ramakrishnan, V. & S.W. White, (1992) The structure of ribosomal protein-S5 reveals sites of interaction with 16S ribosomal-RNA. *Nature***358**: 768-771.
- Rey, P., R. Sanz-Barrio, G. Innocenti, B. Ksas, A. Courteille, D. Rumeau, E. Issakidis-Bourguet & I. Farran, (2013) Overexpression of plastidial thioredoxins f and m differentially alters photosynthetic activity and response to oxidative stress in tobacco plants. *Frontiers in Plant Science***4**.
- Reynolds, A.E., J.M. Chesnick, J. Woolford & R.A. Cattolico, (1994) Chloroplast-encoded thioredoxin genes in the red algae *Porphyra-yezoensis* and *Griffithsia-pacifica* – evolutionary implications. *Plant Molecular Biology***25**: 13-21.
- Sanz-Barrio, R., P. Corral-Martinez, M. Ancin, J.M. Segui-Simarro & I. Farran, (2013) Overexpression of plastidial thioredoxin f leads to enhanced starch accumulation in tobacco leaves. *Plant Biotechnology Journal***11**: 618-627.
- Sanz-Barrio, R., A. Fernandez-San Millan, J. Carballeda, P. Corral-Martinez, J.M. Segui-Simarro & I. Farran, (2012) Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins f and m. *Journal of Experimental Botany***63**: 365-379.
- Sanz-Barrio, R., A. Fernandez-San Millan, P. Corral-Martinez, J.M. Segui-Simarro & I. Farran, (2011) Tobacco plastidial thioredoxins as modulators of recombinant protein production in transgenic chloroplasts. *Plant Biotechnology Journal***9**: 639-650.
- Scharff, L.B. & R. Bock, (2014) Synthetic biology in plastids. *Plant Journal***78**: 783-798.
- Schurmann, P. & B.B. Buchanan, (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxidants & Redox Signaling***10**: 1235-1273.
- Schurmann, P. & J.P. Jacquot, (2000) Plant thioredoxin systems revisited. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology***51**: 371-400.
- Staub, J.M., B. Garcia, J. Graves, P.T.J. Hajdukiewicz, P. Hunter, N. Nehra, V. Paradkar, M. Schlittler, J.A. Carroll, L. Spatola, D. Ward, G.N. Ye & D.A. Russell, (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology***18**: 333-338.
- Stegemann, S., S. Hartmann, S. Ruf & R. Bock, (2003) High-frequency gene transfer from the chloroplast genome to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***100**: 8828-8833.
- Svab, Z., P. Hajdukiewicz & P. Maliga, (1990) Stable transformation of plastids in higher-plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***87**: 8526-8530.
- Svab, Z. & P. Maliga, (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***90**: 913-917.
- Tischner, R. & A. Schmidt, (1982) A thioredoxin-mediated activation of glutamine-synthetase and glutamate synthase in *Synchronous chlorella-sorokiniana*. *Plant Physiology***70**: 113-116.
- Verma, D., N.P. Samson, V. Koya & H. Daniell, (2008) A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts. *Nature Protocols***3**: 739-758.
- Warzecha, H & A. Henning, (2010) Plastid transformation. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 23-37.
- Wolosiuk, R.A., C.M. Hertig, A.N. Nishizawa & B.B. Buchanan, (1982) Enzyme regulation in C-4 photosynthesis.3. Role of Ca<sup>2+</sup> in thioredoxin-linked activation of sedoheptulose bisphosphatase from corn leaves. *Febs Letters***140**:31-35.
- Zoubenko, O.V., L.A. Allison, Z. Svab & P. Maliga, (1994) Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. *Nucleic Acids Research***22**: 3819-3824.