



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Análisis proteómico comparativo de mutantes  
de *Arabidopsis thaliana* afectadas en la  
biogénesis del cloroplasto

Presenta: Lic. Luis Alberto de Luna Valdez

Director del proyecto:

Dr. Ángel Arturo Guevara García

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice.

<b>I. Introducción.</b>	1
1. El origen de los plástidos: La teoría endosimbiótica.	1
2. La fotosíntesis en las plantas.	3
<i>Figura 1. Esquema de la estructura típica de un cloroplasto.</i>	5
3. El genoma del cloroplasto.	7
<i>Figura 2. Modelo clásico de replicación del genoma cloroplástico.</i>	10
<i>Figura 3. Modelo modificado de replicación del genoma cloroplástico.</i>	11
4. La biogénesis de los cloroplastos (CLB).	13
<i>Tabla I. Resumen de los componentes necesarios para la biogénesis del cloroplasto.</i>	19
5. La proteómica como herramienta en el estudio de la CLB.	20
<b>II. Antecedentes.</b>	24
1. La mutante <i>cla-1</i> .	24
<i>Figura 4. Fenotipo de la mutante cla1-1.</i>	25
2. La mutante <i>clb5</i> .	26
<i>Figura 5. Fenotipo de la mutante clb5.</i>	27
3. La mutante <i>clb19</i> .	28
<i>Figura 6. Fenotipo de la mutante clb19.</i>	29
<b>III. Hipótesis.</b>	30
<b>IV. Objetivos.</b>	30
<b>V. Materiales y Métodos.</b>	31
<b>VI. Resultados y discusión.</b>	34
<i>Figura 7. Geles de 2-D de extractos proteicos de la mutante clb2.</i>	35
<i>Figura 8. Gel maestro con los puntos con abundancia contrastante detectados.</i>	36
<i>Figura 9. Perfiles de abundancia.</i>	37
<i>Tabla II. Lista de las proteínas identificadas por espectrometría de masas.</i>	38
<i>Tabla III. Grupos de términos ontológicos generados mediante el paquete DAVID.</i>	44
<i>Tabla IV. Genes posiblemente involucrados en la biogénesis del cloroplasto.</i>	45
<b>VII. Conclusión y perspectivas.</b>	47
<b>VIII. Bibliografía.</b>	48

<b>IX. Apéndice I: Material suplementario.</b>	<b>58</b>
<i>Figura S1. Esquema del grupo de proteínas plastídicas.</i>	59
<i>Figura S2. Esquema del grupo de proteínas del metabolismo de carbohidratos.</i>	60
<i>Figura S3. Esquema del grupo de proteínas relacionadas con la síntesis de ATP.</i>	61
<i>Figura S4. Grupo de proteínas sin clasificar.</i>	61
<i>Figura S5. Esquema del grupo de GOs relacionados con el cloroplasto.</i>	62
<i>Figura S6. Esquema del grupo de GOs relacionados con la respuesta a iones metálicos.</i>	63
<i>Figura S7. Esquema del grupo de GOs relacionados con la respuesta a estrés abiótico.</i>	64
<i>Figura S8. Esquema del grupo de GOs relacionados con la respuesta a estrés biótico.</i>	65
<i>Figura S9. Esquema del grupo de GOs relacionados con la fotosíntesis.</i>	66
<i>Figura S10. Esquema del grupo de GOs relacionados con el metabolismo de hexosas.</i>	67
<i>Figura S11. Esquema del grupo de GOs relacionados con el balance REDOX.</i>	68
<i>Figura S12. Esquema del grupo de GOs relacionados con la cadena cloroplástica de transporte de electrones.</i>	68
<i>Figura S13. Esquema del grupo de GOs relacionados con la respuesta a estrés oxidativo.</i>	69
<i>Figura S14. Esquema del grupo de GOs relacionados con la síntesis de ATP.</i>	70
<i>Figura S15. Esquema del grupo de GOs relacionados con el metabolismo de aminoácidos.</i>	71
<i>Figura S16. Esquema del grupo de GOs relacionados con la respuesta a azúcares.</i>	71
<i>Figura S17. Esquema del grupo de GOs relacionados con el metabolismo del azufre.</i>	72
<i>Figura S18. Esquema del grupo de GOs relacionados con la respuesta a fitohormonas.</i>	72
<i>Figura S19. Esquema del grupo de GOs relacionados con el transporte de proteínas.</i>	73
<i>Figura S20. Esquema del grupo de GOs relacionados con el desarrollo post-embriionario.</i>	73

## Resumen

Los organismos fotoautótrofos son los responsables de sostener la vida en la biosfera, gracias a su capacidad de integrar átomos de carbono inorgánico ( $\text{CO}_2$ ) en carbohidratos usando como fuente de energía la luz, este proceso se conoce como fotosíntesis. La fotosíntesis fue adoptada por los organismos eucariontes por medio de un proceso endosimbiótico, por el cual algunas bacterias fotoautótrofas se integraron a la maquinaria genética, bioquímica y celular de sus hospedadores, convirtiéndose en uno más de sus organelos (cloroplastos). Los cloroplastos tienen un proteoma muy diverso cuya composición está estimada en alrededor de 3000 proteínas; de manera contrastante el genoma cloroplástico codifica para apenas 100 proteínas, este hecho pone de manifiesto que gran parte de la maquinaria proteica necesaria para el desarrollo y función de los cloroplastos está codificada en el genoma nuclear de los organismos que los portan. Con la intención de dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la biogénesis de los cloroplastos, en el laboratorio se compiló una colección de mutantes llamada clb (por chloroplast biogenesis), a través de cuya caracterización se han identificado algunos genes involucrados en este proceso. Con la idea de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de biogénesis del cloroplasto, en este trabajo se abordó una estrategia proteómica comparativa bajo la que se analizaron los perfiles de expresión de proteínas de plantas tipo silvestre y cuatro mutantes de la colección clb (cla1, clb2, clb5 y clb19). Específicamente, extractos proteicos de tres replicas biológicamente independientes de plántulas mutantes y tipo silvestre, de 16 y 8 días de desarrollo, respectivamente, se resolvieron en geles de 2-D. Posteriormente, usando el software de análisis de imágenes PDQuest (Biorad, Hercules CA), se determinó la presencia de aproximadamente 1000 péptidos en cada una de las muestras, de los cuales 146 mostraron cambios de abundancia de al menos dos veces (36 inducidos y 43 reprimidos), con un nivel de confianza estadística (t-Student) del 98%. Un análisis por espectrometría de masas con el sistema MALDI-TOF de 146 de los péptidos que cambian su abundancia permitió, con la ayuda de los motores de búsqueda Mascot (<http://www.matrixscience.com>) y Profound (<http://prowl.rockefeller.edu/>), la

identificación de 79 proteínas distintas. Con la idea de identificar componentes novedosos de este importante programa de desarrollo, de aquellas proteínas identificadas con funciones o localizaciones subcelulares que sugieren su participación en la biogénesis de los cloroplastos, se solicitaron las mutantes correspondientes disponibles para, como una continuación de este proyecto, proceder a su caracterización molecular y funcional.

# **I. Introducción.**

La vida en la biosfera depende completamente de su capacidad para fijar carbono, es decir, que depende de la habilidad de algunos organismos conocidos como fotoautótrofos para integrar átomos de carbono inorgánico ( $\text{CO}_2$ ) en moléculas orgánicas (carbohidratos), usando como fuente de energía la luz, este proceso se conoce comúnmente como fotosíntesis. Entre los eucariontes, son las plantas los organismos que llevan a cabo la fotosíntesis y, por lo tanto, son las responsables de sustentar la vida de los organismos heterótrofos, todo esto gracias a un tipo especial de organelos que portan, los cloroplastos. Desde su aparición, los cloroplastos han sufrido cambios tanto morfológicos como moleculares que les permitieron integrarse y hacerse indispensables en el ciclo de vida de los eucariontes fotosintéticos, inclusive se han diversificado formando un grupo de organelos relacionados conocidos como plástidos, cuyo origen real aun es tema de debate.

## **1. El origen de los plástidos: La teoría endosimbiótica.**

El término “plástido” engloba un grupo de organelos fotosintéticos y no fotosintéticos, que se cree se originaron a partir de eventos de endosimbiosis, que sucedieron hace 1.5 billones de años, entre células eucariotas primitivas y cianobacterias ancestrales <Propuesta conocida como la teoría endosimbiótica> (1; 2). En la actualidad existen tres tipos principales de plástidos: plástidos primarios, secundarios y terciarios. Los primarios son organelos rodeados por dos membranas que representan un sólo evento de endosimbiosis entre una bacteria fotosintética y una célula eucarionte no fotosintética; estos plástidos se encuentran en cuatro tipos de organismos, las plantas, las algas verdes, las algas rojas y las algas glaucófitas. Los plástidos secundarios y terciarios son organelos rodeados por más de dos membranas que representan procesos endosimbióticos entre eucariontes fotosintéticos y eucariontes no fotosintéticos, estos plástidos han sufrido modificaciones como la pérdida del número de membranas que los rodean

y la pérdida del núcleo del eucarionte fotosintético simbiote, este tipo de plástidos se encuentran en organismos como los euglénidos y los dinoflagelados (3).

A pesar de la diversidad de plástidos que existen, en este trabajo usaremos el término “plástido” para referirnos a los plástidos primarios presentes en las plantas verdes, que son de hecho el objeto de este estudio.

En la actualidad existen muchas evidencias que apoyan el origen endosimbiótico de los plástidos, algunas de las evidencias más claras son:

- Los plástidos están rodeados por dos membranas, siendo la membrana interna más parecida a la membrana procarionte en su composición de lípidos, inclusive en el caso de las algas glaucofitas existe una capa de peptidoglicano entre las membranas de los plástidos, lo cual parece ser un vestigio de la pared celular de las bacterias endosimbiontes (4; 5).
- Los plástidos tienen genomas propios que son similares en estructura y tamaño a los genomas procariontes. Los genomas de los plástidos presentan comúnmente un contenido de entre el 62 y el 68% de pares de bases A-T, al igual que las cianobacterias como *Synechocystis* sp. que tiene hasta el 52% de contenido de estos dos nucleótidos (6).
- Los ribosomas de los plástidos son del tipo 70s, al igual que los ribosomas de los procariontes. Además, en estudios de RNAs mensajeros de cloroplastos de diversas especies de plantas, se encontró que los mensajeros analizados contienen secuencias tipo Shine-Dalgarno en sus regiones 5' UTR, similares a las secuencias presentes en los procariontes (7; 8; 9).

En las células vegetales los plástidos no solo existen como cloroplastos, sino que éstos se han diversificado para cubrir una amplia gama de funciones no necesariamente relacionadas con la fotosíntesis. Por ejemplo, existen plástidos especializados en el almacenamiento de pigmentos carotenoides (cromoplastos) responsables de la coloración de frutos y flores, otros plástidos, principalmente encontrados en semillas, son capaces de sintetizar y almacenar grandes

cantidades de almidón (amiloplastos), lípidos (oleinoplastos) o proteínas (proteinoplastos). Algunos otros están relacionados con fenómenos como la senescencia de las hojas (gerontoplastos) o el efecto gravitrópico de las raíces (estatólitos) (10; 11).

Dada la evidente importancia de estos singulares organelos, no es sorprendente que hayan sido objeto de numerosos estudios por diferentes grupos de investigación con diversos enfoques. De entre ellos, destacan los relacionados al proceso de fotosíntesis, al estudio del genoma y a la biogénesis del cloroplasto, los cuales se discuten brevemente en las siguientes secciones.

## **2. La fotosíntesis en las plantas.**

En las plantas, la fotosíntesis se lleva a cabo en dos fases conceptualmente distintas que ocurren todas dentro de organelos especializados conocidos como cloroplastos. Estos organelos están rodeados por dos membranas, además contienen membranas internas que delimitan unas estructuras conocidas como tilacoides, los cuales se organizan en complejas redes endomembranales conocidas como granum (plural grana) (Fig. 1). Los distintos compartimentos en los que está organizado el cloroplasto permiten la separación física de los diferentes componentes moleculares necesarios para la fotosíntesis. Por ejemplo, la membrana del tilacoide contiene los denominados fotosistemas I y II (PSI y PSII), los cuales son complejos macromoleculares que permiten la captación de energía luminosa y su transformación en energía química. Mientras que en el estroma se encuentran las enzimas encargadas de llevar a cabo las reacciones de fijación de carbono, en una serie de reacciones conocidas como el Ciclo de Calvin-Benson (12).

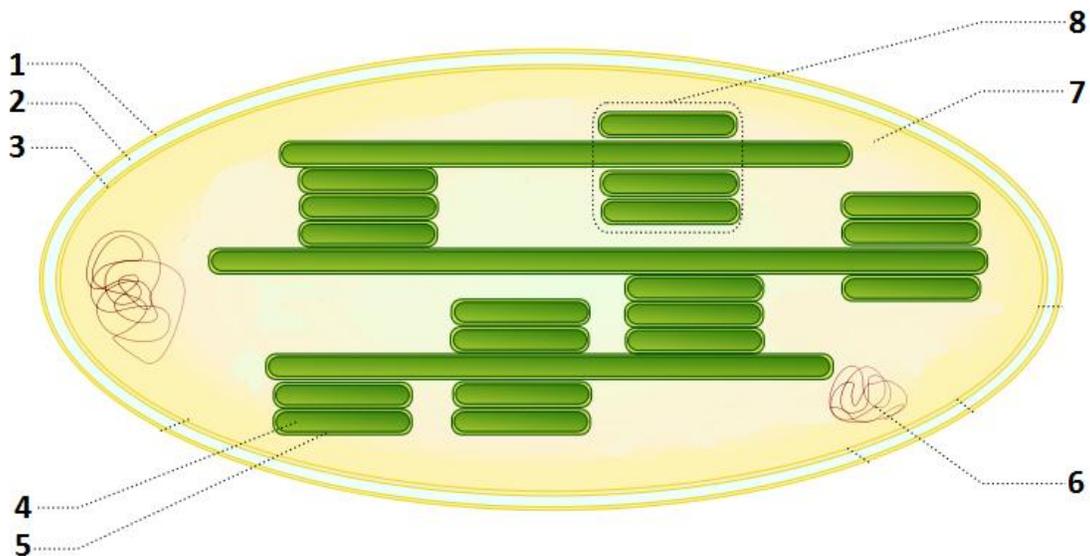
Tradicionalmente la fotosíntesis se conceptualiza como dos tipos diferentes de reacciones independientes, por un lado las reacciones dependientes de la luz, y por otra parte las reacciones de fijación de carbono o reacciones oscuras. Sin embargo, ambos tipos de reacciones son interdependientes ya que los

intermediarios generados en las reacciones luminosas son necesarios para que las reacciones oscuras se lleven a cabo y viceversa.

Las reacciones dependientes de la luz son aquellas reacciones que se llevan a cabo en la membrana de los tilacoides y que producen energía en forma de NADPH (poder reductor) y de ATP, que son utilizados durante las reacciones de fijación de carbono. El primer paso de las reacciones dependientes de la luz involucra la captación de un fotón por los complejos antena del PSII, estos complejos antena contienen los pigmentos necesarios para captar luz de distintas longitudes de onda, como clorofilas, carotenoides y xantofilas, además de algunas proteínas que organizan a las moléculas de pigmentos en las orientaciones específicas apropiadas para su función, estas proteínas se conocen como LHCs (Light-Harvesting complex) (13). Una vez excitados, estos pigmentos son capaces de transmitir la energía de un fotón hasta un par especial de moléculas de clorofila en el centro de reacción del fotosistema. El mecanismo por el cual la energía absorbida por una molécula de pigmento se transmite hasta el centro de reacción se conoce como Transferencia de Energía de Resonancia de Förster (FRET) y se basa principalmente en la transferencia de energía que se puede dar entre dos moléculas que se encuentran separadas por una distancia de entre 1 y 10 nm (14). Una vez que las moléculas de clorofila en el centro de reacción del PSII son excitadas con la energía transmitida desde los complejos antena, el centro de reacción es capaz de reducir al primer componente de una serie de moléculas asociadas a la membrana del tilacoide cuya función es transferir electrones desde el centro de reacción del PSII al centro de reacción del PSI (12).

Una vez que el PSI es reducido, los electrones aceptados son excitados por la energía transferida por FRET de un fotón absorbido en las moléculas antena del PSI, el centro de reacción del PSI reduce otras moléculas acarreadoras de electrones, las cuales finalmente son capaces de reducir una molécula de  $\text{NADP}^+$ . Cabe mencionar que una vez que el proceso de transferencia de electrones está completo, los centros de reacción de ambos fotosistemas se encuentran en un estado oxidado. En el caso del PSII, el donador de electrones es una molécula de

agua, lo cual produce oxígeno ( $1O_2$  por cada dos pares de electrones) y  $2H^+$  ( $1H^+$  por cada electrón) que son liberados al estroma. En el caso del PSI, el donador de electrones es el PSII previamente excitado por la energía de un fotón. Algunos componentes de la cadena de transporte de electrones que conecta a los fotosistemas I y II como las quinonas y el complejo del citocromo  $b_6f$ , están asociados al bombeo de protones hacia el lumen del tilacoide, este proceso está acoplado a la actividad de una ATP sintetasa de la membrana del tilacoide, resultando en la formación de ATP y NADPH como productos globales del fenómeno fotoquímico de los PSI y PSII (12).



**Figura 1.** Esquema de la estructura típica de un cloroplasto. Se muestran los componentes principales de un cloroplasto típico de las células vegetales, membrana externa (1), espacio intermembranal (2), membrana interna (3), lumen del tilacoide (4), membrana del tilacoide (5), genoma (6), estroma (7) y grana (8). Adaptado de <http://en.wikipedia.org/wiki/Chloroplast>.

Por otra parte, las reacciones de fijación de carbono se llevan a cabo en el estroma del cloroplasto y, como ya se mencionó, son conocidas como el Ciclo de Calvin-Benson. De manera global, las enzimas que catalizan las reacciones de este ciclo se encargan de integrar un átomo de carbono proveniente de una molécula de  $CO_2$ , a una molécula orgánica de tres carbonos. La enzima

encargada de catalizar la fijación de carbono es la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), la cual cataliza la carboxilación de una molécula de ribulosa-1,5-bifosfato, produciendo un estado de transición inestable (2-carboxy-3-cetoribitol-1,5-bifosfato) que se divide en dos moléculas de 3-fosfoglicerato (15). Con la inversión de ATP y de NADPH, el 3-fosfoglicerato se convierte en gliceraldehido-3-fosfato, un azúcar de tres carbonos que es exportada del cloroplasto y posteriormente utilizada para la generación de otros azúcares. Dado que solo un átomo de carbono se asimila en la biomasa en cada ciclo de Calvin-Benson, se requieren tres ciclos completos para generar una molécula de tres carbonos como ganancia neta, lo que implica una inversión de 6 moléculas de NADPH y 9 de ATP, derivados directamente de las reacciones dependientes de la luz (16).

Las reacciones del ciclo de Calvin-Benson, no sólo dependen de la luz en el sentido en que el NADPH y el ATP necesarios para su funcionamiento, son producto de las reacciones luminosas de la fotosíntesis, sino también es importante notar que varias de las enzimas clave en el ciclo están sujetas a regulación por luz. Por ejemplo, RuBisCO, NADPH:gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-bifosfatasa, pseudoheptulosa-1,7-bifosfatasa y ribulosa-5-fosfato cinasa (15). Particularmente, las últimas cuatro enzimas tienen en su estructura puentes disulfuro que son claves para su actividad y cuyo estado redox se regula por el sistema ferredoxina-tiorredoxina y por lo tanto, son reguladas por la luz captada en el PSI (17). En la oscuridad, los puentes disulfuro de estas enzimas están oxidados y las enzimas son inactivas, pero en presencia de luz la ferredoxina asociada al PSI es capaz de reducir a la tiorredoxina, la cual a su vez reduce los puentes disulfuro de las enzimas del ciclo de Calvin y de ese modo las activa.

Por otro lado, RuBisCO se regula por un mecanismo distinto al sistema ferredoxina-tiorredoxina. En respuesta a la luz, el pH del estroma aumenta de 7 a 8, al mismo tiempo se movilizan iones  $Mg^{2+}$  desde el lumen del tilacoide al estroma (15). El cambio de pH promueve la formación de un intermediario

carbamilado de RuBisCO por el removimiento (catalizado por la enzima RuBisCO activasa) de azúcares inhibidores del sitio activo de la enzima como Ribulosa-1,5-bifosfato (18). Una vez carbamilado en un residuo de Lisina, el sitio activo de RuBisCO es capaz de unir  $Mg^{2+}$  como cofactor, así produciendo la holoenzima de activa (19; 20).

Aunque la función más característica de los cloroplastos es la fotosíntesis, estos organelos también son capaces de realizar otros procesos metabólicos importantes para las células que los portan, como son la biosíntesis de ácidos grasos y algunos aminoácidos (21)

Como ya se mencionó, los cloroplastos son los organelos de las células vegetales que están directamente encargados de realizar la fotosíntesis, un proceso crucial tanto para la vida vegetal como para la vida animal. Debido a la importancia de este fenómeno, se han hecho grandes esfuerzos por tratar de comprender tanto a nivel bioquímico como molecular, el proceso fotosintético *per se*, así como los pasos implicados en el desarrollo de estos organelos.

### **3. El genoma del cloroplasto.**

#### **3.1. Estructura y contenido.**

A pesar que los cloroplastos tienen un genoma propio, estos organelos no son genéticamente autónomos, mucha de la maquinaria enzimática necesaria para su desarrollo y función está codificada en el genoma nuclear vegetal. La visión clásica del genoma cloroplástico es la de una molécula circular de entre 85 y 200 kb que codifica para aproximadamente 100 genes. Esta molécula está separada en dos regiones, una de 25 kb y la segunda de 100 kb, por dos copias de un elemento invertido repetido de entre 20 y 30 kb, el cual codifica para los RNAs ribosomales (rRNAs) y algunos RNAs de transferencia cloroplásticos (tRNAs) (7).

Por ejemplo, el genoma cloroplástico de *Arabidopsis thaliana* codifica para 129 genes de los cuales hay: 7 rRNAs, 37 tRNAs, 25 proteínas ribosomales, 22 subunidades de los PSI y PSII, 4 subunidades de RNA polimerasa, una subunidad de RuBisCO, 6 subunidades de la ATP sintasa del tilacoide, una subunidad de la

proteasa cloroplástica *clpP*, 12 subunidades de la NADH deshidrogenasa, 7 proteínas relacionadas con el complejo del citocromo *b<sub>6</sub>f*, 4 proteínas hipotéticas, la proteína maturasa K, una subunidad de la enzima acetil-CoA carboxilasa y una proteína estructural de la membrana del tilacoide (22).

Estudios más recientes sobre la topología del DNA cloroplástico en maíz, tabaco y *Medicago truncatula*, indican que el genoma de los cloroplastos no es circular, sino que está compuesto de varios segmentos lineales capaces de formar concatámeros, lo que en el pasado guio a la conclusión que estos genomas tenían forma circular (23).

En la actualidad, varios estudios se han realizado para tratar de dilucidar la composición del proteoma de los cloroplastos de varias especies. Una de las observaciones más sorprendentes es que la cantidad de proteínas presentes en los cloroplastos no corresponde a la cantidad de proteínas esperadas en función de los datos conocidos de la secuenciación de los genomas cloroplásticos. Este fenómeno se debe principalmente a que a lo largo de la evolución, los genomas de los cloroplastos han sufrido una reducción gradual en su contenido génico mediante transferencia horizontal de genes hacia el genoma nuclear. Algunas estimaciones basadas en estudios filogenéticos y en algoritmos de predicción de péptidos de tránsito a cloroplasto, calculan que en *Arabidopsis* existen alrededor de 4,255 (14.9% del proteoma total de *Arabidopsis*) genes que codifican proteínas que pueden ser translocadas al plástido, es decir, que se han transferido del genoma cloroplásticos al genoma nuclear de *Arabidopsis* (24; 25; 26; 27).

En el año 2003 se desarrolló un sistema experimental que permite seguir el fenómeno de transferencia horizontal de genes *in vivo* en células de tabaco. En este sistema se inserta en el genoma cloroplástico un segmento de DNA que contiene dos genes de resistencia a antibióticos bajo la regulación de distintos promotores, el gen *aadA* (resistencia a espectinomicina), regulado por un promotor específico de cloroplasto, y el gen *nptII* (resistencia a kanamicina), regulado por un promotor específico del núcleo. Tras varias generaciones de selección en espectinomicina se lograron obtener líneas homoplásticas (líneas con la totalidad

del genoma cloroplástico transformante), de las cuales se usaron distintos segmentos de hojas para regenerar plantas completas en presencia de kanamicina, es decir, que en esas condiciones sólo sobrevivirían las células que hubiesen integrado a su genoma nuclear el gen *nptII*, pues sólo en el núcleo el promotor que regula su expresión es activo. En este estudio, se recuperaron 12 líneas independientes resistentes a kanamicina que se sometieron a ensayos genéticos para determinar el patrón de herencia del gen *nptII*. Plantas autopolinizadas mostraron una segregación mendeliana típica de 3:1 del fenotipo de resistencia a kanamicina, lo cual es un patrón de segregación común para transgenes codificados en el genoma nuclear. Además, cruza entre plantas tipo silvestre y las líneas de transferencia horizontal mostraron un patrón de herencia de 1:1, el cual no corresponde a un patrón de herencia materna como debería suceder si el transgen estuviese codificado en el genoma cloroplástico (28; 29).

El mecanismo exacto de transferencia de genes hacia el genoma nuclear y la delección de esos genes en el genoma cloroplásticos no se conoce con exactitud, sin embargo las observaciones antes descritas señalan que el proceso podría ser activo en todas las células y que sucede de manera independiente en cada una de ellas.

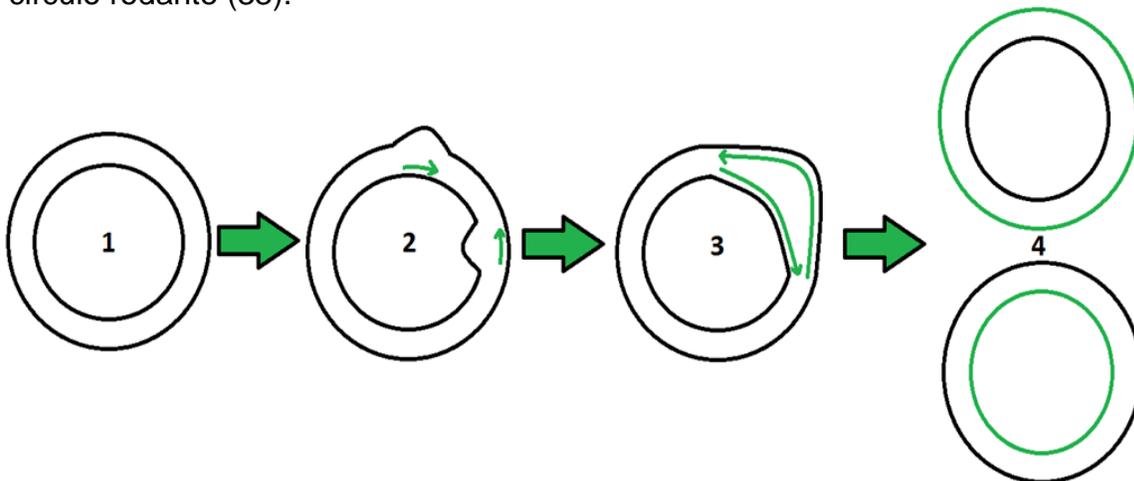
A pesar de que el mecanismo físico de transferencia horizontal entre el núcleo y los cloroplastos no es claro, algunos avances se han hecho al respecto. Existe evidencia que indica que el mecanismo podría involucrar el movimiento en masa de segmentos grandes de DNA, pues en los estudios descritos anteriormente se encontró que los genes *nptII* y *aadA* seguían ligados físicamente aun después de la transferencia hacia el genoma nuclear (28), inclusive es posible descartar que el proceso de transferencia requiera de intermediario de mRNA o cDNA, puesto que en los ensayos realizados por Huang *et al.* (29) se incluyó un intrón en el gen de *nptII*, intrón que también se logró identificar en la secuencia correspondiente después de la transferencia del transgen al núcleo. Este modelo también está apoyado por observaciones hechas sobre el genoma del arroz, el cual resultó contener múltiples inserciones de DNA cloroplástico, con longitudes de hasta 131

kb, lo que corresponde a casi la totalidad del genoma cloroplástico del arroz de 134.1 kb (30; 31; 32).

### 3.2. Replicación.

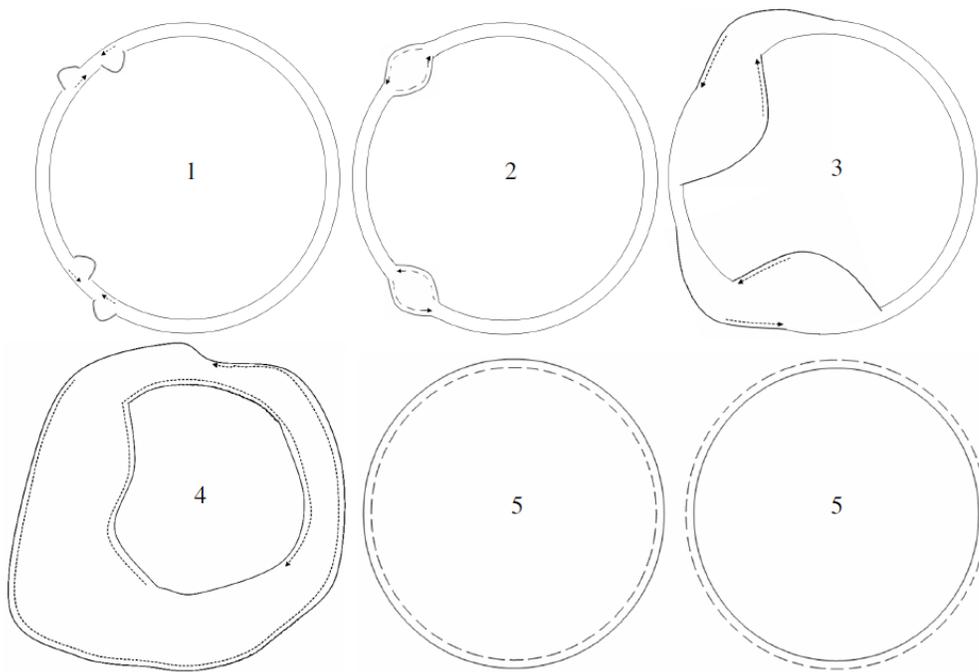
La replicación del DNA cloroplástico (ctDNA) es un proceso que ocurre de manera independiente del ciclo celular vegetal y, aunque existen dos teorías que lo describen, el mecanismo molecular exacto que opera es aún un tema controversial. A continuación se describe brevemente el modelo más aceptado de replicación del cromosoma cloroplástico.

El modelo clásico que explica la replicación (Fig. 2) del ctDNA fue propuesto en 1975 basado en estudios de microscopía en maíz y chícharo, el modelo propone la existencia de dos orígenes de replicación en los que se forman burbujas de desplazamiento (D-loops) que están localizadas en cadenas opuestas de la molécula de DNA y separadas por aproximadamente 7 Kb. Estos D-loops se desplazan el uno hacia el otro formando dos estructuras conocidas como horquillas de Cairn, las cuales se mueven en direcciones opuestas una respecto a la otra hasta encontrarse y dar lugar a las dos moléculas de ctDNA hijas, luego de esta ronda de replicación, es posible que se den eventos de replicación mediante círculo rodante (33).



**Figura 2.** Modelo clásico de replicación del cromosoma cloroplástico. (1) Molécula circular de ctDNA. (2) Formación de D-loops en los orígenes de replicación. (3) Extensión de los D-loops y formación de dos horquillas de Cairn. (4) Formación de moléculas de ctDNA hijas. En color verde se muestran las cadenas de DNA hijas y en color negro las cadenas de DNA parentales. Adaptado de (34).

Recientemente este modelo ha sido validado y extendido. Mediante algoritmos de comparación de secuencias se analizaron 115 genomas cloroplásticos de diferentes especies y se identificaron múltiples orígenes de replicación homólogos a los presentes en el ctDNA de *Nicotiana tabacum*. Posteriormente, utilizando métodos de cuantificación de desaminaciones, se determinó que los niveles de desaminación presentes en ciertas regiones de las moléculas de ctDNA correlacionan con la formación de intermediarios de DNA de cadena sencilla durante la replicación del ctDNA, dichos intermediarios sólo pueden ser explicados mediante un mecanismo que implique la presencia de al menos cuatro orígenes de replicación del tipo D-loop (Fig. 3).



**Figura 3.** Modelo modificado de la replicación del cromosoma cloroplástico. (1) Formación de múltiples D-loops en los diversos orígenes de replicación. (2) Extensión de los D-loops y formación de las horquillas de Cairn. (3 y 4) Formación de los intermediarios de DNA de cadena sencilla susceptibles a desaminación. (5) Moléculas de ctDNA hijas. Extraído de (35).

Además de las evidencias que existen sobre la replicación por múltiples D-loops, también existen datos que apoyan teorías sobre eventos de replicación basados en recombinación (35; 36). A pesar de que las distintas teorías de la replicación del ctDNA son contrastantes, es importante resaltar que las inserciones en los sitios de replicación *oriA* y *oriB* del genoma cloroplástico de *Nicotiana tabacum* no son letales, lo que sugiere la existencia de mecanismos de replicación de ctDNA no dependientes de los D-loops (36).

En la actualidad, existe evidencia que justifica que los tres mecanismos mencionados anteriormente participan en la replicación y mantenimiento del ctDNA, se propone que la recombinación es importante en la reparación del ctDNA, mientras que el inicio de la replicación del ctDNA depende de D-loops y el mantenimiento de un alto número de copias del cromosoma cloroplástico, están mediados por el mecanismo de círculo rodante (36).

#### 4. La biogénesis de los cloroplastos (CLB).

##### 4.2. Fotomorfogénesis.

Para las plantas, la luz no sólo participa como fuente de energía durante la fotosíntesis, sino que también es capaz de afectar diversos procesos de su desarrollo, este fenómeno es conocido como fotomorfogénesis. De hecho, la luz también afecta el desarrollo de los cloroplastos, ya que, entre otras cosas, la presencia de luz es un requisito indispensable en la síntesis de clorofila, lo que a su vez es clave para el desarrollo apropiado de los cloroplastos (37).

A nivel molecular, la luz es percibida por dos familias de proteínas: los fitocromos, que son activados por luz roja, y los criptocromos, que se activan en respuesta a luz azul y luz UV. Estas dos clases de fotoreceptores son capaces de desencadenar eventos de señalización que finalmente regulan los eventos de fotomorfogénesis (38). Mediante escrutinios genéticos se lograron identificar un grupo de *loci* que cuando están afectados por alguna mutación confieren un fenotipo de fotomorfogénesis constitutiva (*cop*) o desetiación (*det*), en conjunto estas mutantes se conocen como *COP/DET/FUS* y su fenotipo característico se hace evidente en la oscuridad, donde presentan varias características particulares de las plantas expuestas a la luz, en lugar de los fenotipos normales de las plantas etioladas. Las mutantes *COP/DET/FUS* suelen presentar hipocotilos cortos, cotiledones abiertos y expandidos y niveles elevados de expresión de genes relacionados a la fotosíntesis. Aunque estas mutantes no presentan un desarrollo completo de los cloroplastos en la oscuridad, algunas de ellas, como *cop1* y *cop9*, si presentan ciertos grados de organización de las membranas de los tilacoides y algunas otras, como *cop1* y *det1*, son hipersensibles a la luz, presentando desarrollo ectópico de cloroplastos en las raíces (39; 40; 41).

Dado que las mutaciones *COP/DET/FUS* son de tipo recesivo, se propone que estos *loci* codifican para proteínas capaces de reprimir la fotomorfogénesis en la oscuridad y que suprimen el desarrollo de los cloroplastos en tejidos no fotosintéticos, que además son inactivos en presencia de luz.

En la actualidad se sabe que los *loci COP/DET/FUS* codifican para componentes de un complejo proteico encargado de regular la actividad de proteínas ubiquitina ligasas E3. De hecho, *COP1* codifica para una ligasa de este tipo que funciona en conjunto con *COP10*, *DET1*, y *DDB1* (que codifica para una proteína de unión a DNA dañado), para promover la degradación por el proteasoma de algunos reguladores positivos de la fotomorfogénesis, como es la proteína HY5 (42; 43). La proteína HY5 es un factor de transcripción que se une a un motivo específico en los promotores de muchos genes regulados por luz, además sus niveles de expresión aumentan en presencia de señalización por fitocromos y criptocromos (43; 44). Hoy en día se sabe que la participación de los criptocromos en el desarrollo de los cloroplastos depende de HY5, pues el criptocromo CRY1 inhibe la degradación mediada por COP1 de HY5, probablemente mediante la translocación de COP1 al citoplasma (45).

Por su parte, la señalización por fitocromos depende de un grupo de factores de transcripción llamados PIFs (factores de interacción con fitocromos), los cuales regulan negativamente la transcripción de genes relacionados con la fotomorfogénesis. Después de la exposición a la luz, el fitocromo phyB entra al núcleo y se une al factor PIF3 promoviendo su fosforilación y su degradación, permitiendo así la transcripción de los genes de fotomorfogénesis. Cabe resaltar que la degradación de PIF3 no depende de la presencia de COP1, al contrario, COP1 es necesaria para la acumulación de PIF3 en el núcleo de las plantas en oscuridad (46).

En la oscuridad PIF3 regula negativamente la expresión de genes involucrados en la vía de síntesis de clorofila y de componentes del PSI. De manera consistente, plantas mutantes *pif3* crecidas en la oscuridad acumulan niveles elevados de protoclorofila, el precursor directo de la clorofila. Por otro lado, PIF1 es capaz de controlar la biosíntesis de clorofila mediante interacción con el promotor del gen de la enzima protoclorofila oxidoreductasa, que está encargada de convertir la protoclorofila en clorofila. Además, mutantes cuadruples *pif1/pif3/pif4/pif5* presentan fenotipo de fotomorfogénesis constitutiva (47; 21).

Una vez que la fotoautotrofia se ha establecido en las plántulas, el meristemo apical del tallo (SAM) se activa para producir hojas verdaderas y en consecuencia cloroplastos, este proceso esta posiblemente regulado por fitohormonas como las giberelinas y los brasinoesteroides (48). Algunas mutantes deficientes en la biosíntesis de fitocromos y de criptocromos son incapaces de llevar a cabo esta activación del SAM, lo que indica que los fitocromos y los criptocromos están involucrados en la producción de hojas.

Algunos estudios indican que los genes involucrados en el proceso de CLB se expresan entre las primeras 6 y 24 horas de exposición a la luz. En los primordios foliares, los criptocromos y los fitocromos promueven cientos de eventos moleculares que inician la transformación de los proplástidos en cloroplastos; estos eventos moleculares incluyen el importe a los proplástidos de proteínas codificadas en el núcleo, acumulación de clorofila y el establecimiento de una red completa de membranas de tilacoides junto con los complejos encargados del transporte de electrones durante la fotosíntesis (21). La Tabla 1 muestra varios ejemplos de componentes necesarios para el proceso de biogénesis de los cloroplastos.

#### **4.2. Importe de proteínas al plástido.**

Como se mencionó en la sección anterior, la capacidad codificante del genoma del cloroplasto (alrededor de 85 proteínas) no corresponde a la diversidad de su proteoma (hasta 4500 proteínas), de donde se deduce que muchas de las proteínas presentes en los cloroplastos deben ser importadas desde el citoplasma. El importe de proteínas a los cloroplastos se da a través de las dos envolturas del organelo, por medio del complejo de translocones denominados translocones de la membrana externa (Toc) e interna (Tic) del cloroplasto (49).

Los componentes principales del sistema Toc/Tic están regulados de manera positiva por luz y algunos de ellos son capaces de dar cierta especificidad al transporte proteico que controlan. Por ejemplo, la subunidad Toc159, implicada en el reconocimiento de las proteínas translocadas, está codificada por cuatro genes en *Arabidopsis* *AtToc159*, *AtToc132*, *AtToc120* y *AtToc90*. La mutante de

*Arabidopsis* en uno de estos genes (*AtToc159*) es albina y no sobrevive para generar hojas verdaderas; esto indica que las otras proteínas Toc no pueden compensar la mutación en *AtToc159* (50). De manera similar, la sobreexpresión de *AtToc159* no es capaz de rescatar el fenotipo de coloración verde pálida mostrada por las mutaciones en otros factores Toc, como *AtToc132* y *AtToc120* (51). En conjunto, estas observaciones indican que existe cierto grado de selectividad hacia las proteínas que transportan las distintas isoformas de Toc159.

De igual importancia en el importe de proteínas a los plástidos, son los péptidos de tránsito. Estos elementos que controlan el importe de proteínas a los plástidos, son secuencias N-terminales que contienen los motivos necesarios para interactuar con el sistema de translocación o con otras proteínas, para asegurar la entrada de la proteína que los porta al organelo o inclusive, a compartimentos específicos del plástido. A pesar de los esfuerzos que se han enfocado hacia la identificación de secuencias consenso que permitan definir a los péptidos de tránsito a cloroplasto, poco avance se ha logrado a este respecto, debido principalmente a que las secuencias N-terminales identificadas experimentalmente como péptidos de tránsito, comparten muy poca identidad. A pesar de estas limitaciones, se han desarrollado algoritmos como ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>), que permiten una buena predicción de la existencia de péptidos de tránsito en las regiones N-terminales de las proteínas. Hoy en día se reconocen algunas características importantes que comparten los péptidos de tránsito a cloroplasto, por ejemplo un alto contenido de aminoácidos hidroxilados, carencia de aminoácidos ácidos y carencia de estructuras secundarias (52; 53).

Adicionalmente, estudios detallados usando los péptidos de tránsito de 7 proteínas con los niveles más bajos de identidad encontrados en un grupo de 208 proteínas cloroplásticas, dio como resultado la identificación de varios motivos indispensables para la translocación al cloroplasto de las proteínas que los portan. A partir de estos resultados, se verificó la presencia de los motivos identificados en el grupo de 208 proteínas cloroplásticas, encontrándose que hasta el 51% de las

proteínas analizadas tienen los motivos característicos de al menos uno de los 7 péptidos de tránsito incluidos en la primera etapa del estudio (54).

Con base en los resultados de los experimentos descritos anteriormente, parece claro que, enfocándose a la presencia de algunos motivos importantes en su función, los péptidos de tránsito a cloroplasto pueden clasificarse en diferentes grupos. Sin embargo, el hecho que sólo una fracción de los péptidos de tránsito analizados resultara perteneciente a alguno de estos 7 grupos, indica que aun existen motivos sin identificar o que existen péptidos de tránsito que no dependen de este tipo de motivos para ser translocados al plástido.

### **4.3. Formación de tilacoides.**

Un evento importante del proceso en el que los proplástidos se convierten en cloroplastos, es la generación y organización de las membranas de los tilacoides. Estas membranas son ricas en galactolípidos que se sintetizan en las envolturas del cloroplasto. Los proplástidos contienen una red simple de membranas internas llamadas protilacoides, los cuales son el punto de partida para la generación de los tilacoides cloroplásticos. Existe evidencia importante que sugiere que algunos de los componentes de la membrana del tilacoide, como las proteínas LHCs, moléculas de clorofila y enzimas encargadas de la síntesis de pigmentos, se mueven en vesículas que viajan a través del estroma desde la membrana interna del cloroplasto hasta los protilacoides, donde se fusionan con sus membranas (55; 56). Algunos componentes moleculares de este sistema de tráfico vesicular se han comenzado a identificar en los últimos años, por ejemplo las proteínas VIPP1 y THF1, cuyas mutantes presentan fenotipos de desarrollo deficiente o ausencia de los tilacoides, respectivamente (57; 58).

Otro factor importante en la formación de tilacoides es una GTPasa llamada FZL, que se localiza en la membrana interna del cloroplasto y en las membranas de los tilacoides; aunque las plantas mutantes *fz1* no son deficientes en la generación de tilacoides, los cloroplastos contienen porciones inusuales de tilacoides apilados (grana) y no apilados, además acumulan vesículas pequeñas en su estroma, lo

que indica que FZL es importante en el mantenimiento y remodelación de la red de membranas de los tilacoides (59).

#### **4.4. Señalización retrograda y anterógrada.**

Quizás el evento más importante durante la CLB es la regulación de las vías de señalización que suceden entre el núcleo y el plástido. En general se reconocen dos tipos principales de señalización que suceden entre los cloroplastos y el núcleo: señalización anterógrada (señales derivadas del núcleo que afectan la expresión de genes y eventos del desarrollo del plástido) y la señalización retrograda (señales derivadas del plástido que afectan la transcripción de ciertos genes codificados en el núcleo). La existencia de la señalización anterógrada es evidente especialmente durante las primeras etapas del desarrollo morfogénico de los cloroplastos, donde la presencia de luz inicia eventos de señalización en el núcleo, que son mediados por fitocromos y criptocromos y que finalmente impactan el desarrollo de los cloroplastos

Por su parte, la señalización retrograda no es tan clara, aunque su existencia está bien documentada. Por ejemplo, cuando plántulas son tratadas con compuestos inhibidores de la formación de cloroplastos, los niveles de expresión de genes cloroplásticos codificados en el núcleo disminuyen, esto implica la existencia de señales derivadas del cloroplasto capaces de impactar la expresión de genes nucleares (21). En un análisis realizado en busca de mutantes afectadas en la señalización retrograda, se aislaron cinco *loci* nucleares llamados *gun* (genomes uncoupled) (60). Estos *loci* están caracterizados en la actualidad y cuatro de ellos (*gun2-gun5*), codifican para proteínas localizadas en los plástidos que están involucradas en la síntesis de tetrapirroles que conforman el grupo hemo de la clorofila. Sin embargo, la participación exacta que tienen los *loci gun* en la señalización retrograda no es claro, pero se cree que la destrucción de cloroplastos podría liberar ciertas cantidades de especies reactivas de oxígeno a partir de algunos intermediarios tetrapirrólicos fototóxicos, pues afectan la transcripción de genes cloroplásticos codificados en el núcleo (61; 62).

**Tabla 1.** Ejemplos de los componentes necesarios durante el desarrollo de los cloroplastos, organizados según su función (Adaptado de Waters *et al.* 2009).

<b>Proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Fenotipo mutante</b>
<i>Importe de proteínas</i>		
<b>TOC33 (Translocon at the outer membrane of chloroplast)</b>	Translocación de proteínas a través de la membrana externa	Coloración verde pálido
<b>cpSRP43 (Signal Recognition Particle)</b>	Inserción de proteínas en la membrana tilacoide	Coloración verde pálido, niveles reducidos de proteínas de membrana de tilacoide
<i>Procesamiento de RNA</i>		
<b>PPR4 (Pentatricopeptide Repeat 4)</b>	Procesamiento de transcritos cloroplásticos involucrados en la biogénesis de ribosomas plastídicos	Embrión letal
<b>SVR1 (Suppressor of Variegation 1)</b>	Codifica a la pseudouridina sintasa; edición de RNAs	Coloración amarillenta, plantas enanas
<i>Maduración y degradación de proteínas</i>		
<b>BSD2 (Bundle Sheat Defective 2)</b>	Chaperona molecular; plegamiento de proteínas	Coloración verde pálido
<b>FtsH2</b>	Metaloproteasa	Hojas variegadas verde/amarillas
<b>ClpP6 (Caseinolytic Protease P6)</b>	Proteasa estromal, dependiente de ATP	Clorosis en las hojas jóvenes
<i>Expresión de genes plastídicos</i>		
<b>SIG6 (Sigma6)</b>	Factor sigma de la RNA polimerasa plastídica	Retraso en el reverdecimiento de los cotiledones
<b>FUG1 (Fu-gaeri1)</b>	Factor de inicio de la traducción	Embrión letal
<i>Biogénesis de tilacoides</i>		
<b>AtTerC (Tellurite Resistance C)</b>	Función desconocida; requerida en la biogénesis temprana de tilacoides	Letal en la semilla
<b>MGDG (Monogalactosildiacilglicerol) sintasa.</b>	Síntesis de MGDG	Albina; invaginaciones de la membrana interna.
<i>Síntesis de clorofila</i>		
<b>GUN4 (Genomes uncoupled 4)</b>	Activación de la Mg-quelatasa	Coloración verde pálido y amarillentas
<b>CHLM</b>	Mg-protoporfirina metiltransferasa	Albina; ausencia de complejos proteicos de tilacoides

Análisis genéticos usando las dobles mutantes *gun1/gun2-5* han logrado determinar que GUN1, por una parte, y las GUN2-GUN5, por otra, establecen dos módulos de señalización parcialmente redundantes, que regulan distintos (aunque algunos compartidos) grupos de genes nucleares (63). GUN1 es una proteína del tipo PPR (por pentatricopeptide repeat) que se localiza en los cloroplastos y se asocia a los nucleoides de éstos. En la actualidad existe un modelo que sitúa a GUN1 como un interruptor molecular capaz de integrar varios tipos de señales en el plástido, las cuales de algún modo desconocido transmite a factores de transcripción en el núcleo, como la proteína ABI4 que regula negativamente la expresión de genes fotosintéticos y cuyas mutantes presentan fenotipo *gun* (64).

A pesar de los avances que existen en el entendimiento de todo el fenómeno fotosintético, desde el origen de los plástidos hasta el funcionamiento de la maquinaria fotosintética, aun existen muchas preguntas sin responder, como la naturaleza real de la activación de la señalización retrograda durante el desarrollo de los cloroplastos o el mecanismo físico exacto de transferencia horizontal de genes entre en núcleo eucarionte y los plástidos.

## **5. La proteómica como herramienta en el estudio de la CLB.**

El término “proteoma” fue acuñado a mediados de los años 90 por Wilkins y Williams (65) para hacer referencia al conjunto completo de proteínas expresado por el genoma de una célula, un tejido o un organismo completo. A diferencia de los genomas, que son relativamente finitos y estáticos a lo largo del tiempo de vida de un organismo, los proteomas son altamente dinámicos y cambian constantemente durante el desarrollo del organismo y en respuesta a estímulos externos. Especialmente en los eucariontes, la cantidad de proteomas independientes posibles es esencialmente infinita. Por lo tanto, el término “proteómica” se refiere a cualquier tipo de análisis de proteínas a gran escala que explore el proteoma completo o algún sub-proteoma de un tipo celular, tejido u organismo, en un momento determinado y bajo una condición específica.

Las estrategias experimentales clásicas para el análisis de proteomas consisten en el fraccionamiento de mezclas complejas de proteínas que se analizan por espectrometría de masas (MS). El método más común de fraccionamiento consiste en someter las muestras proteicas a electroforesis en geles de dos dimensiones (2DE), en los que las proteínas son separadas en una primer dimensión en base a diferencias en sus puntos isoeléctricos (pI) en condiciones reductoras y desnaturizantes, para posteriormente separarse en base a diferencias en sus masas moleculares en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (66). Las proteínas separadas por 2DE son visualizadas con colorantes como el azul de Coomasie, plata y compuestos fluorescentes o por medio de detección inmunoquímica o marcaje con isotopos radioactivos (67). Otros métodos de fraccionamiento de muestras consisten típicamente en dos o más pasos de separación por cromatografía o un paso preparativo de isoelectroenfoque, seguido por pasos de separación por cromatografía (68).

En el caso de los métodos de fraccionamiento basados en 2DE, una vez visualizadas los puntos en los geles que corresponden a diferentes péptidos, es posible usar programas computacionales para estimar la abundancia de cada una de las proteínas presentes en los puntos del gel y seleccionar aquellas que resulten de interés, por ejemplo, aquellos puntos que muestren mayor o menor intensidad en comparación con los controles experimentales adecuados. Dichas proteínas son posteriormente sometidas a digestión enzimática, generalmente por medio de tripsina, para que mediante el uso de algún método de espectrometría de masas como “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight” (MALDI-TOF) o “ElectroSpray Ionisation Mass Spectrometry” (ESI-MS), se determine la secuencia o la huella de masas de los diferentes péptidos que se generan de cada punto. Finalmente, a los puntos seleccionados les son asignadas identidades mediante la comparación de los diferentes espectros de masa/carga (m/z) generados, contra aquellos depositados en bases de datos, esta estrategia se conoce comúnmente como “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) (69).

En la actualidad las herramientas de la proteómica han sido aplicadas con éxito en una gran variedad de estudios, lográndose determinar los proteomas de diversas especies de eucariontes (70). Inclusive se han determinado los sub-proteomas de organelos particulares de *Arabidopsis*, como vacuola, mitocondria, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, cloroplastos y hasta de componentes cloroplásticos como el estroma (241 proteínas), el tilacoide (235 proteínas) y grana (40 proteínas) (71; 72; 73; 74; 75; 76).

De mayor relevancia para los propósitos de este proyecto es que existen estudios proteómicos de plantas mutantes que están claramente afectadas en el proceso de CLB en *Arabidopsis*, estos estudios han servido para esclarecer la función de proteínas previamente relacionadas con el proceso y para proponer nuevas proteínas posiblemente involucradas en la CLB. Por ejemplo, estudios a nivel proteómico de mutantes en componentes del sistema Toc/Tic, como *atToc33* (mutante *ppi1*: fenotipo albino) mostraron que esta proteína está involucrada en la translocación al plástido de proteínas fotosintéticas, como las subunidades grande y pequeña de RUBISCO, las subunidades Y y D de los fotosistemas I y II respectivamente, además de componentes de los complejos de acopio de luz de la membrana del tilacoide y la subunidad  $\gamma$  de la ATPasa cloroplástica. Por otro lado, también en las mutantes *ppi1* se identificaron un grupo de proteínas (principalmente chaperonas moleculares) cuya abundancia en los ensayos de 2DE está inusualmente elevada, en comparación con sus niveles en plantas tipo silvestre, y que son posibles reguladores de la CLB (77).

Otro ejemplo de las aportaciones de los estudios de proteómica al entendimiento de la CLB, es el análisis del proteoma de la mutante *clpr4* (fenotipo de coloración verde pálido) que está afectada en una de las subunidades no catalíticas de la proteasa cloroplástica ClpPR, mediante el cual se identificaron 62 proteínas con abundancia diferencial entre las mutantes *clpr4* y plantas tipo silvestre (36 proteínas aumentaron y 26 disminuyeron su abundancia en las plantas mutantes). En ese grupo de datos se encontraron con baja abundancia a proteínas con funciones relacionadas a la fotosíntesis, mientras que aumentaron en abundancia

proteínas involucradas en la síntesis, plegamiento y translocación de proteínas. Además, se identificaron como abundantes, proteínas indicativas de estrés plastídico como las peroxidasas. De manera similar, mediante el estudio de la mutante *ffc1-2* (fenotipo de coloración verde pálido) se logró la identificación de la proteína ClpC (una chaperona molecular), como un regulador de la translocación de proteínas mediada por el sistema Toc/Tic, así logrando determinar la participación de esta proteína en el desarrollo y función de los cloroplastos (78; 79).

En conjunto, estos resultados indican que las herramientas de la proteómica constituyen una buena estrategia para la identificación de proteínas reguladoras de la biogénesis del cloroplasto, particularmente mediante diseños experimentales que implican la comparación de los proteomas de plantas mutantes afectadas en la CLB y de plantas tipo silvestre. Además, confirman la existencia de mecanismos de regulación de la CLB que están íntimamente relacionados con el plegamiento y translocación correcto de proteínas codificadas en el genoma nuclear.

## II. Antecedentes.

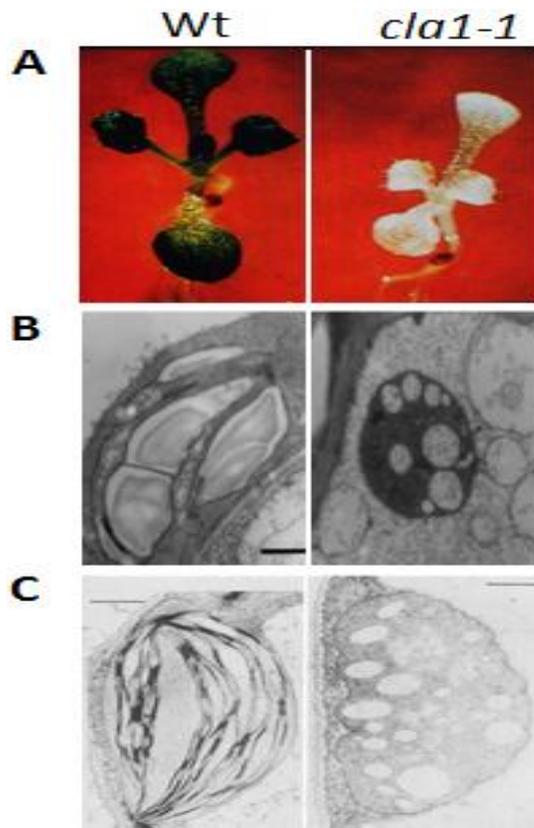
En nuestro grupo de investigación estamos interesados en esclarecer los mecanismos moleculares que regulan la biogénesis del cloroplasto. Con ese objetivo en mente, en el año 2004 se compiló una colección de mutantes afectadas en pigmentación, denominada *clb* (por chloroplast biogenesis) que incluye plantas de color verde pálido, amarillas y albinas, que muestran diferentes niveles de afectación en el desarrollo del cloroplasto, a través de cuya caracterización molecular y funcional, se ha logrado la identificación de genes implicados en este importante proceso de diferenciación (80; 81; 82).

Cabe mencionar que la caracterización de las mutantes de la colección *clb* está aún en curso, en algunos casos las estrategias genéticas han resultado en la identificación de los genes afectados (*clb4*, *clb5*, *clb6* y *clb19*), pero en otros, los esfuerzos han sido infructuosos (*clb1*, *clb2* y *clb3*). En este escenario, resulta válido suponer que cualquiera de las mutantes referidas, puede ser considerada un buen candidato para un análisis proteómico como el que se propone en este trabajo. A continuación se describen brevemente las líneas *clb* en las que se enfocó este trabajo.

### 1. Mutante *cla-1*.

En el año 1996 Mandel *et al.* (83) reportaron la identificación de un gen necesario para el desarrollo adecuado de los cloroplastos de *Arabidopsis*, ya que cuando este gen se encontraba interrumpido por una inserción de T-DNA generaba plantas que con un fenotipo albino (Fig. 4A), el cual se demostró que se debía a alteraciones en el desarrollo de los proplástidos y por ende de los cloroplastos, los que particularmente se encontraban arrestados en etapas tempranas del desarrollo, presentando niveles bajos de organización de las membranas internas, que se encontraban en ambos casos asociadas a vesículas y sin acumulación de cuerpos prolamelares en los proplástidos, ni tilacoides en los cloroplastos (Fig. 4B y 4C) (83; 84). Análisis más detallados de la mutante *cla1-1* revelaron que está severamente afectada en la producción de pigmentos carotenoides y clorofilas a y

b, con valores de sólo 0.2% y 2.6% respectivamente, de los reportados para plantas tipo silvestre, datos que correlacionan con la función que se encontró para la proteína codificada por el gen *CLA1*. Se demostró que *CLA1* codifica para la enzima deoxixilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), que cataliza la conversión de gliceraldehido-3-fosfato y piruvato en 1-deoxixilulosa-5-fosfato en la vía cloroplástica de síntesis de isoprenoides. También se demostró, mediante ensayos de northern-blot que la expresión de este gen está regulada positivamente por luz y que se expresa principalmente en brotes y plántulas de 5 días de edad. Además, en ensayos tipo western-blot se encontró que la proteína DXS se acumula en tejidos jóvenes, como hojas de roseta, brotes florales y silicuas inmaduras, mientras que en plántulas completas, su acumulación está en relación a la edad de la planta, alcanzando un máximo a los 15 días de crecimiento (83; 84; 85).



**Figura 4.** Fenotipo de la mutante *cla1-1*. Se muestra el fenotipo de coloración de plantas de 14 días de edad tipo silvestre y mutantes *cla1-1* (A). Micrografías de los plástidos encontrados en las plantas *cla1-1*, Etioplastos (B) y Cloroplastos (C). Adaptado de Mandel *et al.* 1996 y Estévez *et al.* 2000.

## 2. La mutante *clb5*.

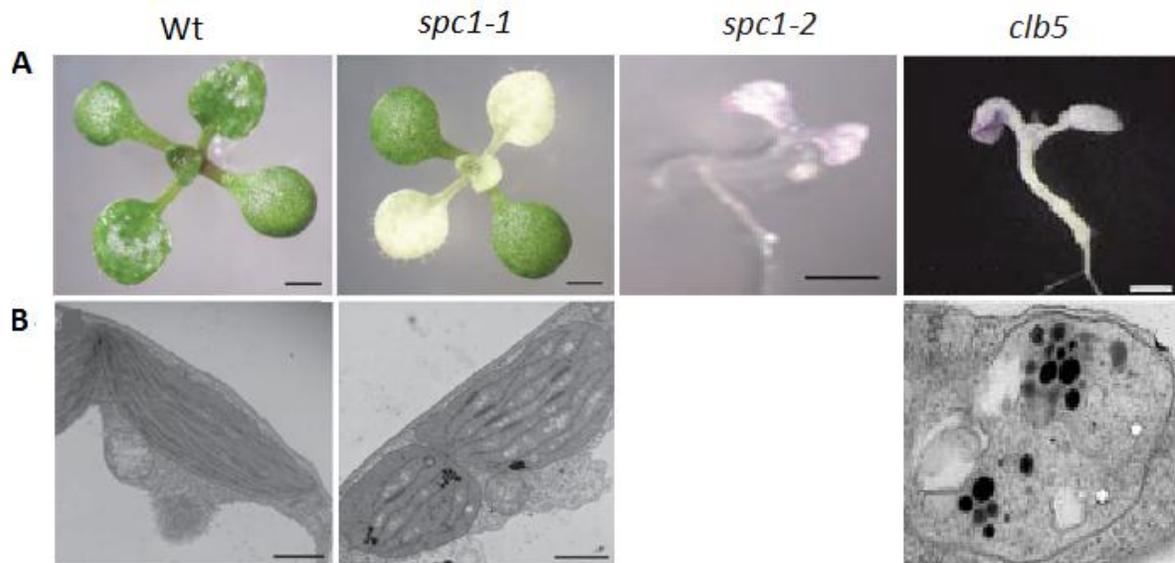
La mutante *clb5* se identificó en el año 2004 como parte de la colección de mutantes deficientes en la pigmentación y se determinó que esta mutación afecta la CLB en etapas muy tempranas del desarrollo, puesto que sus plástidos muestran morfologías y niveles de organización de las membranas internas más típicamente observados en proplástidos (82). Posteriormente, se encontró que la mutación *clb5* es alélica a las mutaciones de inserción de T-DNA *spc1-1* y *spc1-2* (Spontaneous Cell Death1 y 2), que afectan el gen que codifica para la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa (ZDS), que cataliza la conversión de  $\zeta$ -caroteno en neurosporeno, que es uno de los pasos clave de la vía de síntesis de carotenoides. Bajo condiciones de crecimiento normales las mutantes *spc1-1* muestran un fenotipo deficiente en la pigmentación con las hojas verdaderas, silicuas y órganos florales de color amarillo y desarrollo de puntos cloróticos (Fig. 5A). Este fenotipo correlaciona con los defectos en el desarrollo de los cloroplastos que presentan las plantas *spc1-1*, las cuales presentan cloroplastos con formas aberrantes y membranas tilacoides reducidas con organización irregular, en comparación con los plástidos de tipo silvestre (Fig. 5B) (86).

De manera contrastante, las mutantes *spc1-1* no presentan el mismo grado de severidad en el fenotipo de pigmentación y desarrollo de los plástidos observado en la mutante *clb5*, sin embargo, las mutantes *spc1-2* copian con mayor fidelidad el fenotipo presentado por las mutantes *clb5* (Fig. 5A). Aunque no hay disponibles micrografías de plástidos extraídos de *spc1-2*, la literatura menciona que estas mutantes carecen completamente de ellos (86).

De acuerdo con la función predeterminada de la ZDS, extractos de carotenos totales de plantas *spc1-1* contienen niveles elevados de  $\zeta$ -caroteno y de su precursor el fitoeno, mientras que los niveles de carotenoides derivados del  $\zeta$ -caroteno, como luteína y  $\beta$ -caroteno, son más bajos que en las plantas tipo

silvestre, sugiriendo que la vía de síntesis de carotenoides es bloqueada por la mutación de ZDS (86). En relación al bloqueo de la vía de síntesis de isoprenoides, se encontró que las mutantes *spc1-1* contienen hasta 50% menos clorofila que las plantas tipo silvestre, ésto debido a que los niveles de expresión de las enzimas protoclorofilide oxidoreductasa B (PORB) y clorofilide oxigenasa (CAO), que catalizan reacciones clave en la síntesis de clorofilas a y b, están severamente afectadas (87; 88; 89). Además, mediante ensayos de northern-blot se detectó que el alelo mutante más fuerte (*spc1-2*) no expresa genes relacionados con la señalización retrograda como *Lhcb1.1*, *Lhcb1.4* y *RbcS* (90; 86).

En conjunto, estas observaciones indican que la enzima ZDS está involucrada en la regulación de varios aspectos del desarrollo de los cloroplastos, como la biogénesis de las membranas de los tilacoides, posiblemente mediante la generación de señales retrogradas.



**Figura 5.** Fenotipo de mutantes *spc1*. Se muestra el fenotipo de coloración de plantas tipo silvestre, y mutantes *spc1-1*, *spc1-2* y *clb5*(A). Micrografías de los plástidos encontrados en las plantas tipo silvestre, *spc1-1* y *clb5* (B). Adaptado de Dong *et al.* 2007 y Gutiérrez-Nava *et al.* 2004. Edades: Wt y *spc1-1*, 2 semanas; *spc1-2*, 7 días; *clb5*, 10 días.

### 3. La mutante *clb19*.

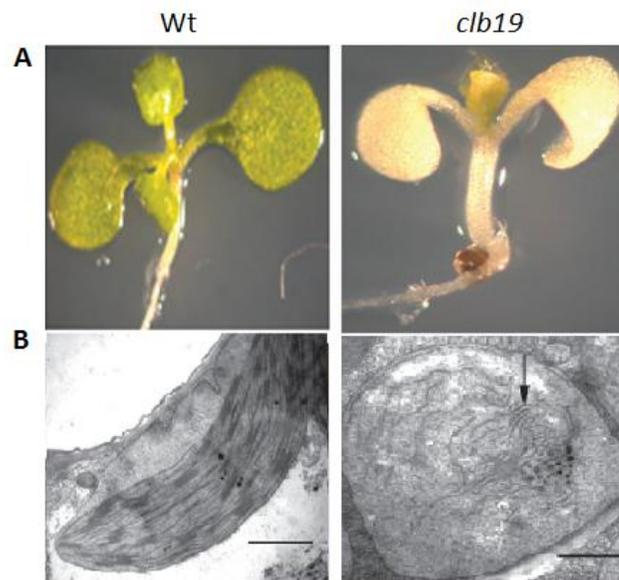
Otra mutante de la colección *clb*, denominada *clb19*, corresponde a una mutante de inserción de T-DNA que presenta cotiledones con coloración amarillo pálido (Fig. 6A), fenotipo que no puede ser rescatado aún en condiciones de crecimiento en baja luz. Los plástidos de la mutante son más pequeños que los de plantas tipo silvestre y presentan formas irregulares. Además, sus cloroplastos presentan algunas estructuras endomembranales dispersas que no forman grana, lo cual indica que los plástidos de la mutante *clb19* están arrestados en una etapa intermedia de su desarrollo (Fig. 6B).

Mediante análisis moleculares se logró identificar el *locus* afectado por la inserción de T-DNA en las mutantes *clb19*, el cual contiene un ORF que codifica para una proteína de 500 aminoácidos que presenta 10 motivos PPR (pentatricopeptide repeat) en tándem, los cuales son característicos de una familia de proteínas de unión a RNA de la que varios de sus miembros han sido asociados a la regulación de la CLB. Además, la proteína CLB19 contiene dos motivos en su dominio carboxilo terminal conocidos como E y E+, por lo que pertenece a la sub-clase de PPRs denominada E/E+. Utilizando una estrategia basada en fusiones proteicas con la proteína verde fluorescente, se logró demostrar que una región de aproximadamente 54 aminoácidos en el dominio amino terminal de CLB19 contiene un péptido de tránsito que la dirige exclusivamente a los cloroplastos (91; 92; 93; 94; 95).

Durante su caracterización molecular, se determinó que los niveles de expresión de varios genes cloroplásticos están afectados en las mutantes *clb19*, se encontraron genes cuyo nivel de expresión disminuyó (*psbA* y *rrn16*), otros en los que aumentó (*atpB*, *atpD* y *accD*) y algunos otros que, además de estar afectados en sus niveles de expresión estaban afectados en su procesamiento (*psbB*, *rrn23* y *rbcl*) (81).

Mediante la técnica “high-resolution melting screen” se determinó que en la mutante *clb19* está afectada la edición de los transcritos de los genes *rpoA* y *clpP*, que codifican para la subunidad alfa de la RNA polimerasa plastídica (PEP) y para la subunidad catalítica de la proteasa cloroplástica ClpP, respectivamente (96).

Resulta interesante el hecho que los niveles de transcrito de *rpoA* y de las otras subunidades de PEP no estén alterados en la mutante *clb19*, sin embargo si es posible detectar una menor acumulación de la proteína RpoA, lo cual indica que la edición del transcrito de *rpoA* puede afectar su traducción o la estabilidad de la proteína sintetizada. Esta baja en la acumulación de RpoA correlaciona con la disminución de los niveles de varios transcritos cloroplásticos que son blancos de PEP, como *psbA* y *rrn16* (81).



**Figura 6.** Fenotipo de la mutante *clb19*. Se muestra el fenotipo de coloración de plantas tipo silvestre y mutante *clb19* de 15 días de edad (A). Micrografías de los plástidos encontrados en las plantas tipo silvestre y *clb19* (B). Extraído de Chateigner-Boutin *et al.* 2008.

Dado el potencial que representan las aproximaciones proteómicas para el estudio de diferentes procesos biológicos, con la idea de identificar proteínas no previamente asociadas a la biogénesis del cloroplasto se decidió realizar un estudio proteómico comparativo de diferentes mutantes de la colección *clb*, a través de cuya posterior caracterización molecular y funcional pensamos que será posible profundizar en el conocimiento de este interesante programa de desarrollo. Este estudio fue iniciado en el año 2009 con el establecimiento de los patrones de expresión de proteínas en geles de acrilamida de 2-D, de plantas tipo silvestre y las mutantes *cla1*, *clb5* y *clb19*, por lo tanto este trabajo de tesis representa una continuación de un proyecto cuyos resultados no publicados.

### III. Hipótesis.

Algunas proteínas cuyo nivel de expresión es alterado por las mutaciones *clb*, deben estar involucradas en la biogénesis del cloroplasto.

### IV. Objetivos.

- **Objetivo general.**  
Identificación de proteínas asociadas a las mutaciones *cla1*, *clb2*, *clb5* y *clb19*, con patrones de acumulación contrastantes.
- **Objetivos particulares.**
  - a) Establecimiento de los perfiles proteicos bidimensionales de la mutante *clb2*.
  - b) Comparación de los perfiles proteicos bidimensionales de las plantas tipo silvestre y de las cuatro mutantes referidas.
  - c) Detección de proteínas con niveles de abundancia contrastantes (PAC) entre las mutantes analizadas.
  - d) Identificación de PAC por espectrometría de masas.
  - e) Análisis *in silico* de las PAC identificadas por espectrometría de masas.

## **V. Materiales y Métodos.**

### **1. Crecimiento y colecta de material vegetal.**

Se realizaron siembras en condiciones asépticas de semillas de una línea heteróciga para la mutación *clb2*, previamente esterilizadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% y etanol absoluto. Las semillas estériles se sembraron en medio MS 0.1X pH 5.7 (Sales de Murashige & Skoog 0.431 g/l, ácido 2-N-morfolino etanosulfónico 0.05 g/l, Sacarosa 0.5 g/l, myo-inositol 100 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina-HCl 1 mg/l, tiamina-HCl 10 mg/l, fito agar 8 g/l). A los 8 días de crecimiento se removieron/colectaron manualmente las plántulas con fenotipo tipo silvestre (verdes), mientras que las plantas con fenotipo mutante (albinas) se colectaron a los 16 días de crecimiento. Esto con la intención de evitar que el factor de atraso en desarrollo que manifiestan todas las mutantes bajo estudio altere la interpretación de resultados, es decir, que se identifiquen proteínas con patrones de expresión alterados asociados al estado de desarrollo y no a la mutación *per se*.

### **2. Extracción y cuantificación de proteínas totales.**

Se prepararon extractos de proteínas totales de acuerdo al protocolo de Hurkman y Tanaka (102). La cuantificación de proteínas en los extractos se hizo mediante el método de Bradford como se detalla en la sección de protocolos de Encarnación *et. al.* 2005 (97)

### **3. Electroforesis en dos dimensiones.**

Con los extractos proteicos de la mutante *clb2*, se realizaron separaciones de proteínas por punto isoeléctrico (1ª dimensión) y peso molecular (2ª dimensión) en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 12%, con un intervalo de pH de 3 a 10, enriquecido de pH 4 a 8, siguiendo el protocolo descrito en (97; 98). Para cada electroforesis bidimensional se emplearon 500 µg de proteínas totales y cada muestra fue procesada por triplicado.

#### **4. Visualización de proteínas, captura de imágenes y detección de proteínas con niveles de abundancia contrastantes.**

Los geles de dos dimensiones de los extractos proteicos de las mutantes *clb2* fueron teñidos con el colorante Coomassie coloidal como ésta descrito en (97), posteriormente digitalizados en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad Hercules, CA) y las imágenes generadas a partir de ellos fueron analizadas con el software PDQuest 8.0.1. (Bio-Rad Hercules, CA) y comparadas con las imágenes digitales de los geles de 2-D de los extractos proteicos de las plantas tipo silvestre y las mutantes *cla1*, *clb5* y *clb19*. La detección de las PAC se hizo en base a criterios recurrentes en la investigación proteómica actual, como son el cambio de abundancia del punto de al menos dos veces entre los geles comparados y la prueba estadística T-student, con un intervalo de confianza del 98%.

#### **5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.**

Las entidades electroforéticas seleccionadas para identificación fueron cortadas, alquiladas, reducidas y digeridas con el sistema DP Chemicals 96 gel digestión. Los productos de digestión fueron transferidos automáticamente a un MALDI TOF utilizando los sistemas robotizados Proteineer SPII y SP con ayuda del programa SPcontrol 3.1.48.0v (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), para obtener los espectros de masas. El análisis de MALDI TOF se realizó en el equipo Autoflex de Bruker Daltonics, operado en el modo de extracción retardada y reflectron, utilizando 100 disparos satisfactorios de 20 pasos. El umbral de resolución fue fijado a una razón señal/ruido de 1,500 con una tolerancia de 6 y sin exclusión de contaminantes. Los espectros de masas fueron anotados con el programa flexAnalysis 1.2 v SD1 Patch 2 (Bruker Daltonics). Posteriormente los espectros de masa fueron comparados con los espectros de m/z teóricos del proteoma de *Arabidopsis*, que se encuentran depositados en las bases de datos NCBI ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/> ) y SwissProt ( <http://www.isb-sib.ch/> ), usando los algoritmos disponibles en los motores de búsqueda Mascot ( <http://www.matrixscience.com/> ) y Proteome Discoverer ( <http://proteomelab.rockefeller.edu/> ). En el caso del motor Mascot, se utilizó un umbral de mínima significancia de  $p < 0.05$ , el motor Proteome Discoverer no permite actualmente la modificación de este parámetro. En

ambos motores de búsqueda se utilizaron valores de tolerancia en la identificación de 200 ppm, además de la carbamidometilación de los residuos de cisteína como modificación constante y la oxidación de los residuos de metionina como modificación variable. Además, en la identificación se tomo en cuenta la protonación de los iones generados.

#### **6. Análisis *in silico* de las proteínas identificadas por espectrometría de masas.**

La lista completa de proteínas obtenida a partir de la identificación de proteínas por espectrometría de masas fue sometida a dos distintos tipos de análisis de enriquecimiento, mediante el uso de las herramientas de clasificación funcional y análisis de enriquecimiento de ontologías (GOs) disponibles en la base de datos DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>), ambos análisis fueron realizados con el nivel medio de astringencia para la evaluación de la correlación entre los distintos términos presentes en la lista de proteínas. Para los análisis se utilizaron una base de datos de anotación de categorías funcionales (<http://www.uniprot.org/uniprot/?query=&by=keyword>) y una base de datos de GOs (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>).

De manera independiente, se determinó la localización subcelular de las proteínas identificadas mediante la base de datos SUBA (<http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>), la cual compila información de diversas fuentes, como experimentos de localización con Green Fluorescent Protein, espectrometría de masas, microarreglos, predicción en base a algoritmos informáticos o descripción en la literatura.

Las búsquedas de mutantes de inserción de T-DNA y de fenotipos de esas mutantes fueron realizadas con las herramientas disponibles en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>).

## **VI. Resultados y discusión.**

### **1. Establecimiento de los perfiles proteicos bidimensionales de la mutante *clb2*.**

500 µg de proteínas totales de plántulas mutantes *clb2* de 16 días de crecimiento se resolvieron en geles de acrilamida al 12%, las imágenes digitalizadas de los geles de 2-D de tres replicas biológicamente independientes se usaron para los análisis descritos a continuación (Fig. 7).

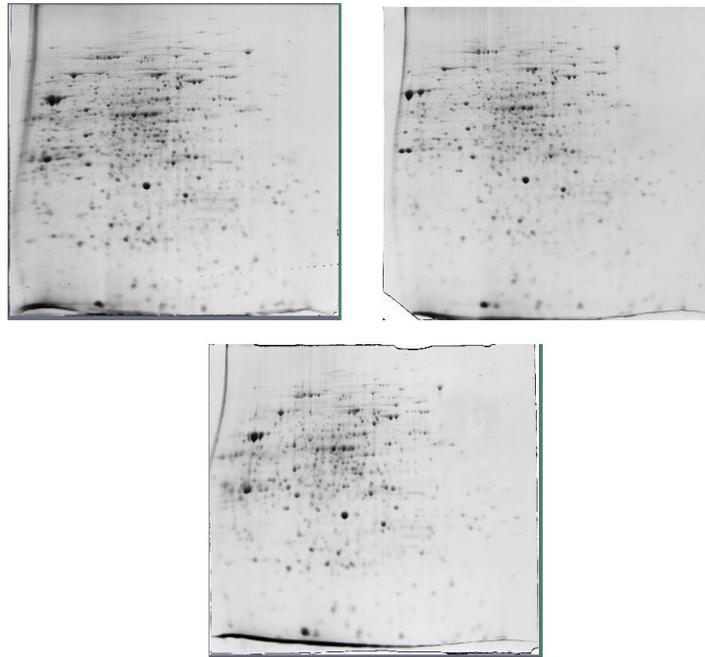
### **2. Comparación de los perfiles proteicos bidimensionales de plantas tipo silvestre y las cuatro mutantes bajo estudio.**

Se editaron y analizaron las imágenes con el software PDQuest, de las tres replicas independientes de los geles de 2-D hechos a partir de extractos proteicos de plantas tipo silvestre, *cla1*, *clb2*, *clb5*, y *clb19*. Esto corresponde a la edición de las imágenes de 15 geles distintos, los cuales fueron posteriormente comparados para la selección de proteínas (puntos) con patrones de expresión contrastantes. En cada una de las superimágenes generadas por la sobreposición y edición (eliminación de puntos falsos) de las tres réplicas para cada muestra experimental, se lograron identificar aproximadamente 1000 puntos.

### **3. Detección de proteínas con abundancia contrastante (PAC) entre las mutantes analizadas.**

En la comparación de las imágenes de los geles de las plantas *cla1*, *clb5*, *clb19* y tipo silvestre, se detectaron un total de 131 puntos que presentan un patrón de expresión claramente contrastante entre las imágenes analizadas. La detección se hizo en base a los parámetros descritos en la sección de métodos y obteniéndose 1,137 puntos con cambios de abundancia de al menos dos veces, y 591 puntos cuya presencia en las replicas satisface la prueba de T-student con una confianza del 98%. En base a dicha estrategia, se hizo una comparación entre los grupos formados por los puntos que cumplen con cada uno de los criterios establecidos y se determinaron los puntos que representan la intersección entre los dos conjuntos de datos, para finalmente obtener un total de 131 puntos que cumplen con ambos criterios de

restricción a la vez (Fig. 8). Además, a manera de control para el análisis por espectrometría de masas se agregaron 15 puntos más, que corresponden a repeticiones de 15 puntos escogidos aleatoriamente de entre los 131 puntos detectados, pero con la particularidad que éstos serían procesados a partir de muestras proteicas independientes. De los 131 puntos seleccionados 52 aumentaron su abundancia, y 79 la disminuyeron.

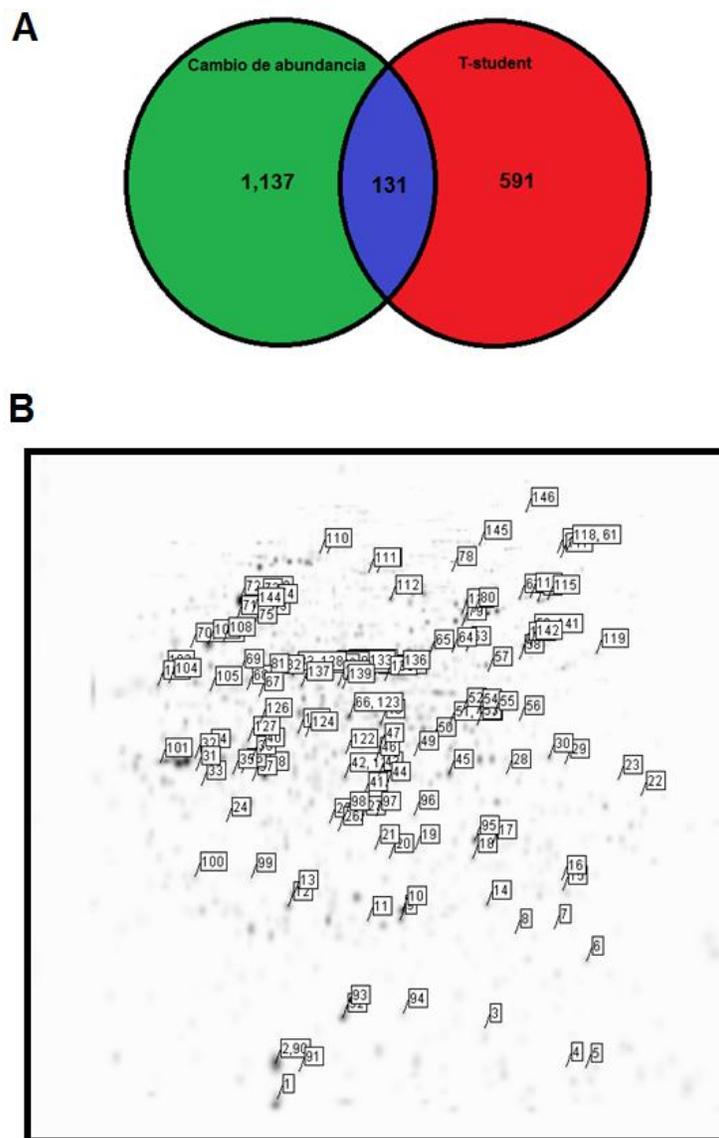


**Figura 7.** Perfiles proteicos de 2-D. Se muestran las imágenes de los geles de 2-D donde se resuelven tres replicas independientes de extractos proteicos de plantas mutantes *clb2* de 16 días de crecimiento. Intervalo de pH 3-10.

De manera independiente se integraron al análisis computacional los geles correspondientes a los extractos proteicos de las mutantes *clb2*, utilizando los mismos criterios mencionados anteriormente, se detectaron 40 puntos adicionales, que cumplen con los criterios de abundancia y estadísticos pero que su aparición es debida a la integración de la mutante *clb2* al análisis. A pesar que se lograron detectar puntos asociados a la integración de la mutante *clb2* al análisis, estos puntos no fueron sometidos a ninguno de los análisis posteriores.

En la Figura 9 se muestran dos ejemplos de puntos que cumplen con los criterios de selección establecidos, el punto 79 es un ejemplo de una proteína

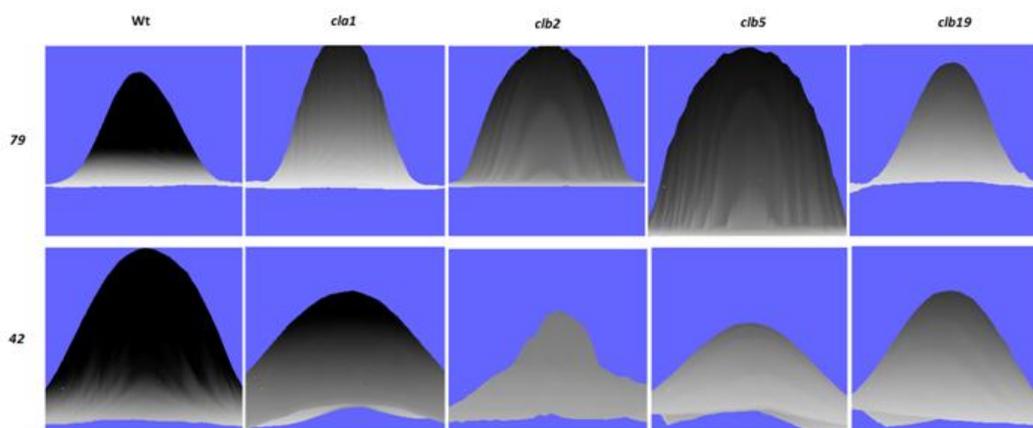
cuya abundancia es mayor en las mutantes que en las plantas tipo silvestre y que aún entre las mutantes muestra patrones de acumulación contrastantes, *clb5* muestra una mayor acumulación de esta proteína. Por otra parte, el punto 42 es un ejemplo de una proteína cuya abundancia se encuentra disminuida en las mutantes *clb*, siendo más afectada en la mutante *clb2*.



**Figura 8.** (A) Diagrama de Venn con los grupos de datos generados a partir del análisis de imágenes. En el diagrama el segmento azul representa la intersección entre los grupos de puntos que cambian su abundancia (segmento verde) y los que satisfacen la prueba de T-student (segmento rojo). Los números dentro de los segmentos representan la cantidad de puntos en cada grupo. (B) Gel digital generado a partir de las imágenes de los gels de extractos proteicos de plantas tipo silvestre y las mutantes bajo estudio, se muestran los 131 puntos detectados que satisfacen los parámetros de cambio de abundancia y estadísticos.

#### 4. Identificación de PAC por espectrometría de masas.

Por espectrometría de masas con el sistema MALDI-TOF descrito en la sección de métodos, se logró la identificación de 111 puntos de los 146 (131 únicos más 15 controles) detectados a partir del análisis computacional de los geles de 2-D, lo cual corresponde al 76% del total de puntos seleccionados para este tipo de análisis. Los espectros de  $m/z$  generados por espectrometría de masas se compararon contra las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>) y SwissProt (<http://www.isb-sib.ch/>), usando los algoritmos de búsqueda Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) y Profound (<http://prowl.rockefeller.edu>), para asignar identidades a los espectros de  $m/z$  generados de cada punto. Adicionalmente, durante el proceso de identificación, se tomaron en cuenta los datos sobre el peso molecular de cada punto, en comparación con la proteína detectada en cada base de datos. En total se logró la identificación de 79 proteínas distintas que fueron detectadas por ambos motores de búsqueda en las bases de datos utilizadas, con puntajes (Mascot) y valores de expectativa (Profound) significativos, y pesos moleculares predichos no mayores ni menores a 10 kDa del peso molecular del punto analizado. En la Tabla II se muestra la lista de las 79 proteínas identificadas por el método descrito con anterioridad.



**Figura 9.** Perfiles de abundancia. Se muestran dos ejemplos de perfiles de abundancia comparando la abundancia de cada spot seleccionado en cada una de las muestras analizadas.

**Tabla II.** Lista de las 79 proteínas identificadas por espectrometría de masas. Se muestra el número de identificador de los puntos en el gel maestro, el identificador asignado a cada punto en la base de datos UniprotKB, el nombre de la proteína correspondiente con una breve descripción de su actividad, algunas de sus localizaciones subcelulares anotadas, la disponibilidad de mutantes en el gen que codifica para cada proteína y el estado de abundancia relativa de cada proteína en las plantas mutantes comparadas con las plantas tipo silvestre. Los números de los puntos tabulados corresponden a su posición en el gel, de manera que los faltantes corresponden a aquellos puntos que no pudieron ser identificados en el análisis por espectrometría de masas.

Punto	Identificador (Uniprot)	Nombre/Descripción	Localización subcelular	Mutantes disponibles	Abundancia en mutantes
1	P10795	RBCS-1A; Subunidad pequeña 1A de la enzima RubisCO.	Cloroplasto	Si	Menor
2	Q9X191	EIF-5A; Codifica para el factor de inicio de la traducción 5A.	Citoplasma/Núcleo	Si	Mayor
3	Q949U7	Probable Peroxiredoxina.	Cloroplasto	Si	Mayor
6	P31265	TCPTP; Proteína tumoral controlada traduccionalmente.	Cloroplasto/Núcleo/Membrana	Si	Menor
7	Q9C5R8	2-Cys peroxiredoxin A; Eliminación de especies reactivas de oxígeno.	Cloroplasto	Si	Menor
8	Q96291	2-Cys peroxiredoxin B; Eliminación de especies reactivas de oxígeno.	Cloroplasto	Si	Menor
9	O65282	CPN20; Chaperonina 20.	Cloroplasto	Si	Mayor
10	Q42029	PSBP-1; Subunidad P-1 del fotosistema II. Proteína mejoradora de la producción de oxígeno.	Cloroplasto	No	Menor
11	Q9FWR4	DHAR1; Deshidroascorbato reductasa.	Cloroplasto/Mitocondria/Peroxisoma/Membrana	Si	Menor
12	P27140	Enzima anhidrasa carbonica 1.	Cloroplasto	No	Menor
13	Q05431	Ascorbato peroxidasa 1.	Cloroplasto/Membrana	Si	Mayor
15	Q9ZUU4	Probable proteína de unión a RNA, cp29.	Cloroplasto	Si	Menor
17	Q9S841	PSBO2; Subunidad O-2 del fotosistemas II; Proteína productora de oxígeno.	Cloroplasto	Si	Mayor
20	C0Z300	Proteína de unión a NADP; Perteneciente a la superfamilia Rossmann-fold.	Cloroplasto	Si	Mayor
21	P42737	CA2; Anhidrasa carbonica 2.	Citoplasma	Si	Menor
22	Q9XQC7	EMB1241; Embrión deficiente 1241. Co-chaperona con el factor intercambiador de nucleotidos GrpE.	Cloroplasto	Si	Menor
24	Q8W493	FNR2: Ferredoxina NADP(+) oxidoreductasa 2.	Cloroplasto	Si	Menor
25	Q9FKW6	Ferredoxina NADP(H) oxidoreductasa, isoforma foliar.	Cloroplasto	Si	Menor
28	Q9C524	Cinasa de carbohidratos tipo PfkB	Cloroplasto	Si	Menor
31	Q9SA52	CSP41B; Proteína de unión a RNA. Participa en el metabolismo del RNA 23S cloroplástico.	Cloroplasto/Peroxisoma	Si	Menor
32	P25856	Subunidad A de la enzima Glicer aldehido-3-fosfato deshidrogenasa.	Cloroplasto/Membrana	Si	Mayor
33	Q01908	Precursor de la subunidad $\gamma$ de la enzima ATP sintasa cloroplástica.	Cloroplasto/Membrana	No	Menor
34	P25858	Subunidad 1 de la enzima Glicer aldehido-3-fosfato deshidrogenasa C.	Membrana/Núcleo/Mitocondria/Citoplasma	Si	Menor
36	Q9LYA9	CSP41A; Proteína de unión a RNA. Participa en el metabolismo del RNA 23S cloroplástico.	Cloroplasto	Si	Menor
37	Q38827	Proteína 9 inducida por ácido Indol-3-acético.	Cloroplasto/Núcleo	Si	Menor
38	P93819	Enzima Malate deshidrogenasa	Cloroplasto/Núcleo/Vacuola	Si	Mayor
39	Q9LF98	Probable enzima Fructosabifosfato aldolasa.	Cloroplasto/Núcleo/Vacuola	Si	Mayor
41	P47999	OASB; o-acetilserine (thiol) liase B.	Cloroplasto/Mitocondria	Si	Menor
42	Q944G9	Probable enzima Fructosabifosfato aldolasa.	Cloroplasto	Si	Menor
44	Q9SJU4	Probable enzima Fructosabifosfato aldolasa.	Cloroplasto	Si	Menor
45	Q9SYT0	Annexin. Proteína de unión a membranas dependiente de calcio. Peroxidasa.	Cloroplasto/Membrana/Peroxisoma	Si	Mayor

46	Q9SAJ4	Enzima fosfoglicerato cinasa	Cloroplasto/Núcleo/Membrana/Vacuola	Si	Mayor
47	P10896	Enzima RubisCO activasa	Cloroplasto/Membrana	Si	Menor
48	P17745	ATRABE1B; Proteína homóloga a la GTPasa RAB E1B. Factor de elongación en la traducción.	Cloroplasto/Núcleo	Si	Mayor
49	Q9MA79	Enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa	Cloroplasto	Si	Menor
50	P25697	Enzima fosforibulosa cinasa	Cloroplasto	Si	Menor
51	Q43127	GS2; Enzima glutamina sintetasa 2	Cloroplasto/Mitocondria	Si	Menor
55	Q9M0V6	Enzima ferredoxina NADP+ reductasa	Cloroplasto	Si	Menor
57	Q8S9L5	Proteína perteneciente a la familia de las chaperonas "Trigger Factor". Involucrada en el plegamiento y transporte de otras proteínas.	Cloroplasto	Si	Menor
58	Q9M158	TROL; Proteína similar a la Rhodanasa del tilacoide. Necesaria para anclar flavoproteínas a la membrana tilacoide.	Cloroplasto	Si	Menor
60	Q9STW6	cpHsc70-1; Proteína cloroplástica de heat shock 70-1. Involucrada en el importe de proteínas.	Cloroplasto/Núcleo/Membrana	Si	Mayor
62	Q9LTX9	cpHsc70-2; Proteína cloroplástica de heat shock 70-2. Involucrada en el importe de proteínas.	Cloroplasto/Membrana	Si	Menor
63	P56757	Subunidad $\alpha$ de la Enzima ATP sintasa CF1	Cloroplasto/Núcleo/Membrana	Si	Menor
66	Q9LUT2	MTO3; Hiperacumuladora de metionina. Enzima metionina adenosiltransferasa.	Núcleo/Membrana	Si	Mayor
70	Q9SR37	PYK10; Beta glucosidasa.	Reticulo endoplasmico/Núcleo/Membrana	Si	Mayor
71	Q9SPK5	THFS; Enzima formiltetrahidrofolato sintasa.	Cloroplasto/Membrana	Si	Mayor
73	O23627	Probable Enzima glicil-tRNA sintetasa	Citoplasma/Mitocondria/Membrana	Si	Menor
77	Q9SXJ7	HSP93-III; Proteína homóloga a la subunidad reguladora de la protease cloroplástica Clp.	Cloroplasto/Membrana/Mitocondria	Si	Menor
78	Q9SI75	SCO1; Snowy Cotyledon. Factor de elongación de la traducción G.	Cloroplasto/Mitocondria	Si	Menor
79	B9TSP7	Enzima acido graso reductasa 6.	Cloroplasto/Mitocondria	Si	Menor
80	P22953	HSC70-1; Proteína cognado de la proteína de heat shock 70-1.	Cloroplasto/Núcleo/Peroxisoma	Si	Menor
83	O03042	Subunidad grande de la Enzima RubisCO.	Cloroplasto	Si	Menor
88	P19366	Subunidad $\beta$ de la Enzima ATP sintasa CF1.	Cloroplasto/Membrana	Si	Mayor
90	Q9SUR0	Proteína principal relacionada al latex.	Vacuola/Membrana	Si	Mayor
94	O04311	Probable proteína lectina; Proteína de la superfamilia de las lectinas de unión a manosa.	Núcleo/Extracelular	Si	Menor
96	O04314	PBP1; Proteína de unión a PYK10.	Núcleo/Extracelular	Si	Mayor
99	Q9S9M7	Proteína desconocida.	Cloroplasto	Si	Mayor
100	P41917	Proteína miembro de la familia de las GTPasas RAN.	Núcleo	Si	Mayor
100	Q8H156	Proteína miembro de la familia de las GTPasas RAN.	Membrana	Si	Mayor
102	Q9SZJ5	SHM1; Enzima serina transhidroximetil transferasa 1.	Cloroplasto/Núcleo/Mitocondria	Si	Menor
103	P25819	CAT2; Enzima catalasa 2.	Cloroplasto/Mitocondria/Peroxisoma	Si	Mayor
105	Q94CE5	HER1; Enzima aminotransferasa.	Mitocondria/Vacuola	Si	Mayor
109	O50008	METS; Enzima metionina sintasa independiente de cobalamina	Cloroplasto/Membrana/Citoplasma/Vacuola	Si	Mayor
110	O80988	GLDP2; Enzima glicina descarboxilasa P-2.	Cloroplasto/Mitocondria	Si	Menor
112	Q8RWV0	Enzima transcetolasa.	Cloroplasto	Si	Menor
113	Q9LHA8	HSP70; Proteína de heat shock 70.	Mitocondria/Vacuola/Membrana	Si	Mayor
118	Q9LSB4	TSA1; Proteína similar a la proteína asociada a TSK.	Reticulo endoplasmico/Peroxisoma	Si	Mayor
125	P25857	Subunidad B de la Enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.	Cloroplasto	Si	Mayor
126	Q9SRZ6	Enzima isocitrato deshidrogenasa.	Cloroplasto/Membrana	Si	Mayor
127	Q38946	GDH2; Subunidad 2 de la enzima glutamato deshidrogenasa.	Mitocondria/Vacuola	Si	Mayor
132	P25696	Proteína de unión a la enzima Mirosinasa.	Extracelular	Si	Menor

134	P83483	Subunidad $\beta$ de la enzima ATP sintasa.	Mitcondria/Peroxisoma	Si	Menor
135	Q9SH69	Enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa.	Cloroplasto/Membrana	Si	Mayor
136	Q9SDM9	Proteína de unión a la enzima Mirosinasa.	Extracelular	Si	Mayor
137	Q9M9P3	Enzima UDP-glucosa pirofosforilasa.	Membrana	Si	Menor
138	P30184	Enzima aminopeptidasa	Cloroplasto/Membrana/Vacuola	Si	Mayor
140	P21238	CPN60; Proteína chaperonina $\alpha$ de 60 kDa.	Cloroplasto/Mitocondria	Si	Mayor
141	Q9SRG3	ATPDIL1-2; Enzima disulfuro isomerasa.	Reticulo endoplasmico/Vacuola	Si	Mayor
145	Q9LJL3	PREP1; Proteasa dependiente de Zinc. Degrada péptidos de transito a mitocondria y plástido.	Cloroplasto/Mitocondria	Si	Mayor

Una inspección detallada de los integrantes de la lista de proteínas obtenidas a partir de los experimentos de espectrometría de masas, reveló que en las mutantes bajo estudio, la abundancia de muchas de las proteínas involucradas en procesos como la fotosíntesis (RBCS-1A, PSBP-1 y RBCL) y la generación de ATP (Subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de la ATP sintasa cloroplástica), está afectada de manera negativa. Mientras que muchas de las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, fructosabifosfato aldolasa e isocitratodeshidrogenasa), el metabolismo de aminoácidos (MTO3, GDH2 y METS), la síntesis, plegamiento e importe de proteínas al plástido (CPN60, CPN20, cpHsc70-1, HSP70, PREP1), presentan niveles de abundancia mayores en las plantas mutantes que en las plantas control. Estos resultados concuerdan con los resultados reportados en experimentos de proteómica de las plantas albinas *ppi1*, *clpr4* y *ffc1-2*, porque al igual que en nuestro estudio, algunas de las proteínas relacionadas con la fotosíntesis y la síntesis de ATP también bajan su abundancia en relación a las plantas control en estos estudios, mientras que las proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, el metabolismo de aminoácidos, la síntesis, plegamiento e importe de proteínas al plástido están reportadas con abundancias mayores en relación a las plantas tipo silvestre. A pesar de que existen resultados que concuerdan entre nuestro trabajo y la literatura disponible sobre el tema, en este estudio se identificaron algunas proteínas involucradas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (2-Cys peroxiredoxin A y B), cuya abundancia es menor en las líneas mutantes que en las plantas control, este resultado contrasta con los de los trabajos citados, pues en ellos se reportan a este tipo de proteínas como más abundantes en las líneas mutantes analizadas (77; 78; 79).

Por otra parte, la lista contiene un grupo de proteínas cuya función anotada no parece estar relacionada con el cloroplasto y que tampoco fueron reportadas como presentes en los trabajos de proteómica de las plantas albinas ya mencionados. Entre estas proteínas están por ejemplo las proteínas TCPTP y la proteína de unión a la enzima Mirosinasa que presentan abundancias menores en las plantas mutantes, y las proteínas PYK10, PBP1, TSA1, la proteína principal relacionada al látex, lectinas de unión a manosa y GTPasas RAN, que presentan abundancias mayores en las plantas mutantes. El análisis posterior de estas proteínas resulta interesante, pues sus diversas funciones y localizaciones subcelulares pueden dar indicios de algunos otros procesos deficientes en las plantas mutantes, que podrían estar directa o indirectamente ligados a la biogénesis o función de los cloroplastos. Análisis más detallados de algunas de estas proteínas se describirán más adelante.

Cabe resaltar que la comparación de los datos generados en los estudios previos y los obtenidos en este trabajo debe tomarse con cautela, pues en los trabajos citados los niveles de aumento en la abundancia de las clases de proteínas mencionadas son de alrededor de 1.5 veces los niveles de abundancia en las plantas control, mientras que en nuestro estudio el umbral de detección implica aumentos de 2 veces en la abundancia de las proteínas. Esto puede causar que algunos de los grupos de proteínas identificados en otros estudios como aumentados en su abundancia, no estén lo suficientemente representados en nuestro estudio y el efecto global sea una aparente disminución en la abundancia de tales grupos. También debe tomarse en cuenta que la naturaleza de la comparación realizada en este trabajo es muy distinta a las comparaciones realizadas en los reportes anteriores. Como ya se ha establecido, los resultados mostrados en la Tabla II corresponden a las comparaciones hechas entre los perfiles de expresión de proteínas de plantas tipo silvestre y tres líneas mutantes afectadas en diferentes procesos moleculares, lo cual hace que los datos obtenidos tengan un mayor nivel de complejidad y puede ser la causa de algunas de las

discrepancias observadas en los resultados de ambos tipos comparaciones, esto debido a que los estudios (77; 78; 79) están basados en comparaciones entre una sola línea mutante y las plantas tipo silvestre.

## **5. Análisis *in silico* de las proteínas identificadas por espectrometría de masas.**

Los análisis se realizaron bajo las especificaciones establecidas en el apartado de Materiales y Métodos, estos estudios dieron como resultado la generación de una serie de grupos funcionales, de enriquecimiento de GOs (por Gene Ontology), así como jerarquización de los GOs más recurrentes entre las 79 proteínas analizadas. Nuestros resultados son descritos y discutidos brevemente a continuación, mientras que las figuras derivadas del análisis se incluyen en el Apéndice I como material suplementario.

En primer lugar, el uso de la herramienta "Functional Classification" del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) permitió la clasificación de las proteínas bajo análisis en 3 grupos distintos, en base a las funciones anotadas para cada una de ellas (Figs. S1-S3). Una búsqueda de los términos funcionales asociados a cada uno de esos grupos reveló que corresponden a proteínas plásticas (Fig. S1), proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos (Fig. S2) y proteínas responsables de la síntesis de ATP (Fig. S3). Estos resultados confirman los datos obtenidos de la caracterización de las mutantes *clb*, pues indican que a nivel funcional las distintas mutantes *clb* bajo análisis están afectadas en procesos relacionados con el cloroplasto y el metabolismo central. (83; 84; 85; 86; 91). Además, se generó una lista de proteínas cuyas funciones no guardan suficiente relación entre ellas para formar grupos independientes (Fig. S4).

En segundo lugar, la herramienta "GO Enrichment Analysis" del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) permitió la identificación de 16 grupos distintos de términos ontológicos que se presentan juntos mas recurrentemente entre las 79 proteínas analizadas. Estos grupos de GOs corresponden a términos asociados con el cloroplasto (Fig. S5), respuesta a iones metálicos (Fig. S6), respuesta a estrés abiótico (Fig. S7), respuesta a

estrés biótico (Fig. S8), fotosíntesis (Fig. S9), metabolismo de hexosas (Fig. S10), balance REDOX (Fig. S11), transporte de electrones (Fig. S12), respuesta al estrés oxidativo (Fig. S13), síntesis de ATP (Fig. S14), metabolismo de aminoácidos (Fig. S15), respuesta a azúcares (Fig. S16), metabolismo del azufre (Fig. S17), respuesta a hormonas (Fig. S18), transporte de proteínas (Fig. S19) y desarrollo post-embriionario (Fig. S20).

De este análisis resulta interesante que los grupos de GOs con los puntajes de enriquecimiento más significativos ( $PE \geq 6$ ) tengan, a excepción del grupo cloroplástico, aparentemente poco que ver con el desarrollo de los cloroplastos (Tabla III). Si bien se sabe que durante el desarrollo de los cloroplastos es necesario  $Mg^{2+}$  (99), la posible participación del  $Cd^{2+}$ , como lo sugieren nuestros datos, en este proceso es desconocida, además, la presencia de proteínas de respuesta a este metal pesado en nuestro grupo de datos sin duda resulta un parámetro que habrá de tomarse en cuenta durante la caracterización de las plantas afectadas en la biogénesis del cloroplasto que se pretenden encontrar a partir de este estudio. Así mismo, tomando en consideración los grupos de GOs de respuesta a estrés biótico y abiótico y los datos de abundancia de proteínas de los fotosistemas y de eliminación de especies reactivas de oxígeno, parece claro que las plantas mutantes están afectadas severamente en sus mecanismos de respuesta a estrés, lo cual pone de manifiesto la importancia de los cloroplastos en este tipo de respuesta y abre la posibilidad a que el desarrollo del cloroplasto esté relacionado a alguno de los sistemas de respuesta a estrés.

De manera independiente, se realizó una búsqueda individual de mutantes y sus fenotipos en el banco de mutantes de inserción de T-DNA del ABRC (<http://abrc.osu.edu/>). La disponibilidad de mutantes, junto con los niveles de abundancia, la función que desempeñan y la localización subcelular anotada de cada proteína identificada en las muestras analizadas, fueron ponderados para seleccionar los candidatos para analizar con mayor detalle a nivel experimental en búsqueda de aquellos cuyos productos estén involucrados en la biogénesis de los cloroplastos (Tabla II). Bajo estos criterios de selección,

se decidió descartar del análisis a todas las proteínas directamente relacionadas con la fotosíntesis y el metabolismo plastídico, pues los cambios de abundancia de estas proteínas son un efecto claro de la ausencia de cloroplastos en las mutantes.

**Tabla III.** Grupos de términos ontológicos generados mediante el paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>).

Grupo	Cantidad de GOs	Cantidad de proteínas	Puntaje de enriquecimiento (PE)
Cloroplasto	3	38	27.14
Respuesta a iones metálicos	3	30	23.51
Respuesta a estrés abiótico	3	37	16.04
Respuesta a estrés biótico	3	19	9.28
Fotosíntesis	6	13	5.9
Metabolismo de hexosas	22	25	5.32
Balance REDOX	6	7	2.44
Transporte de electrones	5	9	2.25
Respuesta a estrés oxidativo	4	10	2.11
Síntesis de ATP	33	25	1.68
Metabolismo de aminoácidos	4	4	1.62
Respuesta a azúcares	4	6	1.49
Metabolismo del azufre	9	9	1.1
Respuesta a hormonas	4	11	0.56
Transporte de proteínas	9	4	0.44
Desarrollo post-embrionario	5	6	0.25

En resumen, en total se seleccionaron 22 proteínas posiblemente involucradas en la CLB, de las cuales 13 disminuyen y 9 aumentan su abundancia en las mutantes. Entre las proteínas seleccionadas se destaca la presencia de chaperonas moleculares, proteínas de unión a RNA, enzimas involucradas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), proteínas involucradas en el importe de proteínas citoplásmicas al cloroplasto y proteasas cloroplásticas. La Tabla IV muestra la lista de mutantes de inserción adquiridas, junto con una breve descripción del fenotipo mutante en los casos en que existen reportes al respecto. Adicionalmente, se incluyeron 6 líneas mutantes para genes que codifican para proteínas que si bien no parecen estar directamente relacionadas con la CLB, son importantes en otros procesos celulares, por lo que nos pareció que su identificación en este análisis resulta interesante de investigar con mayor profundidad (Tabla IV).

Para incluirla en los estudios posteriores que representan la continuación de este proyecto, también se adquirió una mutante para el gen que codifica para la proteína VAR2 (103), la cual fue identificada en la base de datos NCBI nr, pero no fue confirmada por la base de datos SwissProt. Sin embargo, debido a su función molecular y su fenotipo reportado (103), decidimos incluirla a pesar de que no está contemplada en la lista de las 79 proteínas identificadas, ni en los análisis de enriquecimiento.

Finalmente es importante destacar que la selección de candidatos para estudios moleculares y funcionales más detallados, solamente representa la primera etapa de nuestro enfoque para intentar identificar proteínas involucradas en la biogénesis del cloroplasto, que no hayan sido previamente asociadas con este importante proceso de desarrollo. De tal manera, la pertinencia y relevancia de la estrategia experimental, así como de los criterios de selección referidos, solo podrá ser evaluada a través de los resultados de la caracterización molecular y funcional de las mutantes que recientemente se están iniciando para darle continuidad a este proyecto.

**Tabla IV.** Genes posiblemente involucrados en la CLB.

<b>Gen (ID TAIR)</b>	<b>Descripción/Función</b>	<b>Fenotipo mutante</b>
At5g06290 <sup>(-)</sup>	Eliminación de especies reactivas de oxígeno.	No reportado
At3g11630 <sup>(-)</sup>	Eliminación de especies reactivas de oxígeno.	No reportado
At3g01500 <sup>(-)</sup>	Regulación de los movimientos de estomas.	No reportado
At1g07890 <sup>(+)</sup>	Eliminación de especies reactivas de oxígeno.	Tallos jóvenes estresados
At2g37220 <sup>(-)</sup>	Proteína de unión a RNA	No reportado
At5g14740 <sup>(-)</sup>	Isoforma no relacionada a la fotosíntesis de la anhidrasa carbónica.	No reportado
At5g17710 <sup>(-)</sup>	Co-chaperona de la familia GrpE.	Embriones deficientes en la etapa preglobular.
At1g09340 <sup>(-)</sup>	Metabolismo del rRNA 23S cloroplástico.	Plantas con coloración verde pálido.
At3g63140 <sup>(-)</sup>	Metabolismo del rRNA 23S cloroplástico.	Plantas con coloración verde pálido.
At5g65670 <sup>(-)</sup>	Proteína inducible por ácido indolacético	No reportado
At1g35720 <sup>(+)</sup>	Eliminación de especies reactivas de oxígeno.	No reportado
At4g20360 <sup>(+)</sup>	Elongación de la síntesis de proteínas.	No reportado
At4g24280 <sup>(+)</sup>	Importe de proteínas al plástido.	Plantas variegadas, enanas y con raíces cortas
At5g49910 <sup>(-)</sup>	Importe de proteínas al plástido.	No reportado
At3g48870 <sup>(-)</sup>	Importe de proteínas al plástido.	No reportado
At1g62750 <sup>(-)</sup>	Elongación de la síntesis de proteínas.	Retraso en la germinación, cotiledones albinos.
At2g30950 <sup>(-)</sup>	Biogénesis de tilacoides y reparación del fotosistema II.	Plantas variegadas.
At5g55190 <sup>(+)</sup>	Exporte de proteínas nucleares.	No reportado
At4g35090 <sup>(+)</sup>	Eliminación de especies reactivas de oxígeno.	Plantas enanas con coloración verde pálido.
At2g28000 <sup>(+)</sup>	Plegamiento de proteínas.	Embriones albinos con defectos en el desarrollo.
At3g19170 <sup>(+)</sup>	Importe de proteínas al plástido.	Acumulación de clorofila.
At3g12580 <sup>(+)</sup>	Plegamiento de proteínas.	No reportado.
At3g15950 <sup>(+)*</sup>	Organización del retículo endoplásmico.	Ausencia de cuerpos ER
At3g09260 <sup>(+)*</sup>	Respuesta a estrés biótico y abiótico.	Cuerpos ER menos frecuentes y más grandes.
At1g29880 <sup>(-)*</sup>	Síntesis de proteínas.	No reportado.
At3g16450 <sup>(-)*</sup>	Respuesta a estrés abiótico.	No reportado.
At3g16420 <sup>(+)*</sup>	Respuesta a estrés biótico y abiótico.	No reportado.
At3g16400 <sup>(+)*</sup>	Respuesta a estrés biótico.	No reportado.

Se muestra una breve descripción de la función de cada proteína seleccionada y el fenotipo reportado de las plantas mutantes. \* Genes con funciones inusuales. <sup>(+)</sup> Genes de proteínas con mayor abundancia en mutantes. <sup>(-)</sup> Genes de proteínas con abundancia menor en mutantes.

## **VII. Conclusiones y perspectivas.**

En base a los resultados descritos en la sección anterior, es posible concluir que:

1. El método de proteómica comparativa abordado en este trabajo parece una buena estrategia para la identificación de proteínas involucradas en la biogénesis del cloroplasto, como lo confirman los resultados en común entre este estudio y la literatura citada.
2. La estrategia permite la identificación de proteínas con funciones novedosas que posiblemente están involucradas en el desarrollo y función de los plástidos.
3. Se lograron identificar, algunos procesos biológicos inesperados como la respuesta a iones metálicos y a estrés biótico, cuya participación en el desarrollo de los plástidos resulta interesante investigar con mayor profundidad.

Sin duda la principal perspectiva de este proyecto es la caracterización molecular y funcional de las mutantes afectadas en algunos de los genes que codifican para las proteínas identificadas en este estudio. El desarrollo de los cloroplastos es un proceso muy estudiado, pero aun es poco comprendido, de tal manera pensamos que el análisis a profundidad de algunas de las mutantes referidas, resultara en la generación de datos que ayuden a esclarecer algunos de los fenómenos involucrados en la biogénesis de este importante organelo cuya función, en muchos sentidos, sostiene la vida en el planeta.

## VIII. Bibliografía

1. Mereschkowsky, C. (1979). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Zentralblatt*, 25(18), 593-604.
2. Yoon, H. S., Hackett, J. D., Ciniglia, C., Pinto, G., & Bhattacharya, D. (2004). A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 809-818.
3. Howe, C. J., Barbrook, A. C., Nisbet, R. E. R., Lockhart, P. J., & Larkum, A. W. D. (2008). The origin of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 363(1504), 2675-2685.
4. Keeling, P. J. (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 365(1541), 729-748.
5. Block, M. A., Douce, R., Joyard, J., & Rolland, N. (2007). Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynthesis Research*, 92(2), 225-44.
6. Howe, C. J., Barbrook, A. C., Koumandou, V. L., Nisbet, R. E. R., Symington, H. A., & Wightman, T. F. (2003). Evolution of the chloroplast genome. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 358(1429), 99-107.
7. Harris, E. H., Boynton, J. E., & Gillham, N. W. (1994). Chloroplast ribosomes and protein synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 58(4), 700-754.
8. Hirose, T., & Sugiura, M. (2004). Functional Shine-Dalgarno-like sequences for translational initiation of chloroplast mRNAs. *Plant cell physiology*, 45(1), 114-117.
9. Drechsel, O., & Bock, R. (2011). Selection of Shine-Dalgarno sequences in plastids. *Nucleic Acids Research*, 39(4), 1427-1438.
10. Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. Plant Cells. *Biology of Plants*. 7. s.l. : W. H. Freeman, 1, pp. 15-19.
11. Thomas, H., Huang, L., Young, M., & Ougham, H. (2009). Evolution of plant senescence. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 163.
12. Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. Photosynthesis: Light Reactions. *Biology of Plants*. 7. s.l. : W. H. Freeman, 7.

13. Caffarri, S., Kouril, R., Kereïche, S., Boekema, E. J., & Croce, R. (2009). Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 28(19), 3052-3063.
14. Gordon, G. W., Berry, G., Liang, X. H., Levine, B., & Herman, B. (1998). Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 74(5), 2702-2713.
15. Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. Photosynthesis: Carbon Reactions. *Biology of Plants*. 7. s.l. : W. H. Freeman, 8.
16. Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [Cited: 2010 31-12.] [http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo\\_de\\_Calvin](http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclo_de_Calvin).
17. Buchanan, B. B., Schürmann, P., Wolosiuk, R. A., & Jacquot, J.-P. (2002). The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynthesis Research*, 73(1-3), 215-22.
18. Von Caemmerer, S., Hendrickson, L., Quinn, V., Vella, N., Millgate, A. G., & Furbank, R. T. (2005). Reductions of Rubisco Activase by Antisense RNA in the C4 Plant *Flaveria bidentis* Reduces Rubisco Carbamylation and Leaf Photosynthesis. *Plant Physiology*, 137(2), 747-755.
19. Carmo-Silva, A. E., Keys, A. J., Andralojc, P. J., Powers, S. J., Arrabaça, M. C., & Parry, M. A. J. (2010). Rubisco activities, properties, and regulation in three different C4 grasses under drought. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2355-2366.
20. Lorimer, G. H., Badger, M. R., & Andrews, T. J. (1976). The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism, and physiological implications. *Biochemistry*, 15(3), 529-36.
21. Waters, M. T., & Langdale, J. A. (2009). The making of a chloroplast. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 28(19), 2861-2873.
22. Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., & Tabata, S. (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA research an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 6(5), 283-90.
23. Shaver, J. M., Oldenburg, D. J., & Bendich, A. J. (2008). The Structure of Chloroplast DNA Molecules and the Effects of Light on the Amount of Chloroplast DNA during Development in *Medicago truncatula*1[C][OA]. *Plant Physiology*, 146(3), 1064-1074.
24. Sun, Q., Emanuelsson, O., & Van Wijk, K. J. (2004). Analysis of curated and predicted plastid subproteomes of *Arabidopsis*. Subcellular compartmentalization leads to distinctive proteome properties. *Plant Physiology*, 135(2), 723-734.

25. Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., et al. (2002). Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12246-12251.
26. Cullis, C. A., Vorster, B. J., Van Der Vyver, C., & Kunert, K. J. (2009). Transfer of genetic material between the chloroplast and nucleus: how is it related to stress in plants? *Annals of Botany*, 103(4), 625-633.
27. Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., & Van Wijk, K. J. (2008). Sorting Signals, N-Terminal Modifications and Abundance of the Chloroplast Proteome. (K.-W. Koch, Ed.) *PLoS ONE*, 3(4), 19.
28. Stegemann, S., Hartmann, S., Ruf, S., & Bock, R. (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(15), 8828-8833.
29. Huang, C. Y., Ayliffe, M. A., & Timmis, J. N. (2003). Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus. *Nature*, 422(6927), 72-76.
30. Thurmond, S., Henry, D., Oates, R., Palmer, M., Pries, G., Gibson, J., Paradkar, M., et al. (2003). In-depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome 10. *Science*, 300(5625), 1566-9.
31. Matsuo, M., Ito, Y., Yamauchi, R., & Obokata, J. (2005). The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. *The Plant Cell*, 17(3), 665-675.
32. Martin, W. (2003). Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15), 8612-8614.
33. Kolodner, R. D., & Tewari, K. K. (1975). Chloroplast DNA from higher plants replicates by both the Cairns and the rolling circle mechanism. *Nature*, 256(5520), 708-711.
34. Heinhorst, S., & Cannon, G. C. (1993). COMMENTARY DNA replication in chloroplasts. *Journal of Cell Science*, 9, 1-9.
35. Krishnan, N. M., & Rao, B. J. (2009). A comparative approach to elucidate chloroplast genome replication. *BMC Genomics*, 10, 237.
36. Nielsen, B. L., Cupp, J. D., & Brammer, J. (2010). Mechanisms for maintenance, replication, and repair of the chloroplast genome in plants. *Journal of Experimental Botany*, 61(10), 2535-2537.

37. Waters, M. T., & Langdale, J. A. (2009). The making of a chloroplast. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 28(19), 2861-2873.
38. Jiao, Y., Lau, O. S., & Deng, X. W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics*, 8(3), 217-230.
39. Deng, X.-W., & Quail, P. H. (1992). Genetic and phenotypic characterization of cop1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2(1), 83-95.
40. Wei, N., & Deng, X. W. (1992). COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 4(12), 1507-1518.
41. Chory, J., & Peto, C. A. (1990). Mutations in the DET1 gene affect cell-type-specific expression of light-regulated genes and chloroplast development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(22), 8776-8780.
42. Yanagawa, Y., Sullivan, J. A., Komatsu, S., Gusmaroli, G., Suzuki, G., Yin, J., Ishibashi, T., et al. (2004). *Arabidopsis* COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes & Development*, 18(17), 2172-2181.
43. Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N., & Deng, X. W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, 405(6785), 462-6.
44. Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., et al. (2007). Analysis of Transcription Factor HY5 Genomic Binding Sites Revealed Its Hierarchical Role in Light Regulation of Development[W]. *The Plant Cell*, 19(3), 731-749.
45. Yang, H.-Q., Tang, R.-H., & Cashmore, A. R. (2001). The Signaling Mechanism of *Arabidopsis* CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *The Plant Cell*, 13(12), 2573-2587.
46. Bauer, D., Viczián, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K. C. S., et al. (2004). Constitutive Photomorphogenesis 1 and Multiple Photoreceptors Control Degradation of Phytochrome Interacting Factor 3, a Transcription Factor Required for Light Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(6), 1433-1445.
47. Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I. S., Bae, G., Lee, C.-H., Lee, D., et al. (2009). Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(18), 7660-7665.

48. Alabadí, D., Gil, J., Blázquez, M. A., & García-Martínez, J. L. (2004). Gibberellins Repress Photomorphogenesis in Darkness1. *Plant Physiology*, *134*(3), 1050-1057.
49. Soll, J., & Schleiff, E. (2004). Plant cell biology: Protein import into chloroplasts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(3), 198-208.
50. Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., & Kessler, F. (2000). The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature*, *403*(6766), 203-207.
51. Kubis, S., Patel, R., Combe, J., Bédard, J., Kovacheva, S., Lilley, K., Biehl, A., et al. (2004). Functional Specialization amongst the Arabidopsis Toc159 Family of Chloroplast Protein Import ReceptorsW. *The Plant Cell*, *16*(8), 2059-2077.
52. Von Heijne, G., Steppuhn, J., & Herrmann, R. G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*, *180*(3), 535-545.
53. Von Heijne, G., & Nishikawa, K. (1991). Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Letters*, *278*(1), 1-3.
54. Lee, D. W., Kim, J. K., Lee, S., Choi, S., Kim, S., & Hwang, I. (2008). Arabidopsis nuclear-encoded plastid transit peptides contain multiple sequence subgroups with distinctive chloroplast-targeting sequence motifs. *The Plant Cell*, *20*(6), 1603-1622.
55. Morré, D. J., Selldén, G., Sundqvist, C., & Sandelius, A. S. (1991). Stromal low temperature compartment derived from the inner membrane of the chloroplast envelope. *Plant Physiology*, *97*(4), 1558-1564.
56. Shimoni, E., Rav-Hon, O., Ohad, I., Brumfeld, V., & Reich, Z. (2005). Three-Dimensional Organization of Higher-Plant Chloroplast Thylakoid Membranes Revealed by Electron TomographyW. *The Plant Cell*, *17*(9), 2580-2586.
57. Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U. C., Soll, J., et al. (2001). VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(7), 4238-4242.
58. Wang, Q., Sullivan, R. W., Kight, A., Henry, R. L., Huang, J., Jones, A. M., & Korth, K. L. (2004). Deletion of the Chloroplast-Localized Thylakoid Formation1 Gene Product in Arabidopsis Leads to Deficient Thylakoid Formation and Variegated Leaves1. *Plant Physiology*, *136*(3), 3594-3604.
59. Gao, H., Sage, T. L., & Osteryoung, K. W. (2006). FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(17), 6759-6764.

60. Susek, R. E., Ausubel, F. M., & Chory, J. (1993). Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell*, 74(5), 787-799.
61. Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T., & Nagatani, A. (2008). The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15184-15189.
62. Moulin, M., McCormac, A. C., Terry, M. J., & Smith, A. G. (2008). Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15178-15183.
63. Mochizuki, N., Brusslan, J. A., Larkin, R., Nagatani, A., & Chory, J. (2001). Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(4), 2053-2058.
64. Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., et al. (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*, 316(5825), 715-719. AAAS.
65. Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., et al. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology Nature Publishing Company*, 14(1), 61-65.
66. O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 250(10), 4007-4021.
67. Görk, A. & Weiss, W. Protein profile comparisons of microorganisms, cells and tissues using 2D gels. [ed.] David Speicher. *Proteome Analysis, Interpreting the Genome*. s.l.: Elsevier B. V., 2004, 2, pp. 19-65.
68. Lubman, D. M., Kachman, M. T., Wang, H., Gong, S., Yan, F., Hamler, R. L., O'Neil, K. A., et al. (2002). Two-dimensional liquid separations-mass mapping of proteins from human cancer cell lysates. *Journal Of Chromatography B Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 782(1-2), 183-196.
69. James, P. Automation of proteome analysis. *Proteome Analysis, Interpreting the Genome*. s.l.: Elsevier B. V., 2004, pp. 306-323.
70. Jorrín, J. V., Maldonado, A. M., & Castillejo, M. A. (2007). Plant proteome analysis: a 2006 update. *Proteomics*, 7(16), 2947-2962.

71. Lilley, K. S., & Dupree, P. (2007). Plant organelle proteomics. *Current opinion in plant biology*, 10(6), 594-9.
72. Dunkley, T. P. J., Hester, S., Shadforth, I. P., Runions, J., Weimar, T., Hanton, S. L., Griffin, J. L., et al. (2006). Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6518-6523.
73. Peltier, J.-B., Cai, Y., Sun, Q., Zabrouskov, V., Giacomelli, L., Rudella, A., Ytterberg, A. J., et al. (2006). The oligomeric stromal proteome of Arabidopsis thaliana chloroplasts. *Molecular cellular proteomics MCP*, 5(1), 114-133.
74. Giacomelli, L., Rudella, A., & Van Wijk, K. J. (2006). High Light Response of the Thylakoid Proteome in Arabidopsis Wild Type and the Ascorbate-Deficient Mutant *vtc2-2*. A Comparative Proteomics Study1[W]. *Plant Physiology*, 141(2), 685-701.
75. Peltier, J. B., Friso, G., Kalume, D. E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I., & Van Wijk, K. J. (2000). Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell*, 12(3), 319-341.
76. Gómez, S. M., Nishio, J. N., Faull, K. F., & Whitelegge, J. P. (2002). The chloroplast grana proteome defined by intact mass measurements from liquid chromatography mass spectrometry. *Molecular cellular proteomics MCP*, 1(1), 46-59.
77. Kubis, S., Baldwin, A., Patel, R., Razzaq, A., Dupree, P., Lilley, K., Kurth, J., et al. (2003). The Arabidopsis *ppi1* mutant is specifically defective in the expression, chloroplast import, and accumulation of photosynthetic proteins. *The Plant Cell*, 15(8), 1859-1871.
78. Kim, J., Rudella, A., Ramirez Rodriguez, V., Zybailov, B., Olinares, P. D. B., & Van Wijk, K. J. (2009). Subunits of the plastid ClpPR protease complex have differential contributions to embryogenesis, plastid biogenesis, and plant development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(6), 1669-1692.
79. Rutschow, H., Ytterberg, A. J., Friso, G., Nilsson, R., & Van Wijk, K. J. (2008). Quantitative proteomics of a chloroplast SRP54 sorting mutant and its genetic interactions with CLPC1 in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 148(1), 156-175.
80. Guevara-García, A., San Román, C., Arroyo, A., Cortés, M. E., De La Luz Gutiérrez-Nava, M., & León, P. (2005). Characterization of the Arabidopsis *clb6* Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-d-Erythritol 4-Phosphate PathwayW. *The Plant Cell*, 17(2), 628-643.
81. Chateigner-Boutin, A.-L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, A., Andrés, C., De La Luz Gutiérrez-Nava, M., Cantero, A., Delannoy, E., et al. (2008). CLB19, a

- pentatricopeptide repeat protein required for editing of rpoA and clpP chloroplast transcripts. *The Plant Journal*, 56(4), 590-602.
82. De La Luz Gutiérrez-Nava, M., Gillmor, C. S., Jiménez, L. F., Guevara-García, A., & León, P. (2004). CHLOROPLAST BIOGENESIS genes act cell and noncell autonomously in early chloroplast development. *Plant Physiology*, 135(1), 471-482.
  83. Mandel, M. A., Feldmann, K. A., Herrera-Estrella, L., Rocha-Sosa, M., & León, P. (1996). CLA1, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *The Plant Journal*, 9(5), 649-658.
  84. Estévez, J. M., Cantero, A., Romero, C., Kawaide, H., Jiménez, L. F., Kuzuyama, T., Seto, H., et al. (2000). Analysis of the Expression of CLA1, a Gene That Encodes the 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase of the 2-C-Methyl-d-Erythritol-4-Phosphate Pathway in Arabidopsis1. *Plant Physiology*, 124(1), 95-104.
  85. Estévez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22901-22909.
  86. Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., Chu, C., et al. (2007). The Arabidopsis Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a zeta-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Research*, 17(5), 458-470.
  87. Armstrong, G. A., Runge, S., Frick, G., Sperling, U., & Apel, K. (1995). Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant physiology*, 108(4), 1505-17.
  88. Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N. K., Yoshida, K., & Okada, K. (1998). Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12719-12723.
  89. Espineda, C. E., Linford, A. S., Devine, D., & Brusslan, J. A. (1999). The AtCAO gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18), 10507-10511.
  90. Nott, A., Jung, H.-S., Koussevitzky, S., & Chory, J. (2006). Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 57(January), 739-59.
  91. Chateigner-Boutin, A.-L., Ramos-Vega, M., Guevara-García, A., Andrés, C., De La Luz Gutiérrez-Nava, M., Cantero, A., Delannoy, E., et al. (2008). CLB19, a

- pentatricopeptide repeat protein required for editing of rpoA and clpP chloroplast transcripts. *The Plant Journal*, 56(4), 590-602.
92. Andrés, C., Lurin, C., & Small, I. D. (2007). The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiologia Plantarum*, 129(1), 14-22.
  93. Saha, D., Prasad, A. M., & Srinivasan, R. (2007). Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant physiology and biochemistry PPB Societe francaise de physiologie vegetale*, 45(8), 521-534.
  94. Small, I. D., & Peeters, N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2), 46-47.
  95. Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., et al. (2004). Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant Cell*, 16(8), 2089-2103.
  96. Yu, A. Y. H., & Houry, W. A. (2007). ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Letters*, 581(19), 3749-3757.
  97. Encarnación, S., Hernández, M., Martínez-Batallar, G., Contreras, S., Del Carmen Vargas, M., & Mora, J. (2005). Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biological procedures online*, 7(1), 117-135.
  98. Encarnación, S., Del Carmen Vargas, M., Dunn, M. F., Dávalos, A., Mendoza, G., Mora, Y., & Mora, J. (2002). AniA Regulates Reserve Polymer Accumulation and Global Protein Expression in *Rhizobium etli*. *Journal Of Bacteriology*, 184(8), 2287-2295.
  99. Horlitz, M., & Klaff, P. (2000). Gene-specific trans-regulatory functions of magnesium for chloroplast mRNA stability in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 35638-35645.
  100. Joyard, J., Ferro, M., Masselon, C., Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Garin, J., & Rolland, N. (2009). Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways. *Molecular plant*, 2(6), 1154-1180.
  101. Ramagli, L. *Methods in Molecular Biology*. [ed.] A J Link. *2-D Proteome Analysis Protocols*. s.l. : Humana Press, 1999, pp. 99-103.
  102. Hurkman, W. J., & Tanaka, C. K. (1986). Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiology*, 81(3), 802-806.

103. Chen, M., Choi, Y., Voytas, D. F., & Rodermel, S. (2000). Mutations in the Arabidopsis VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *The Plant Journal*, 22(4), 303-313.

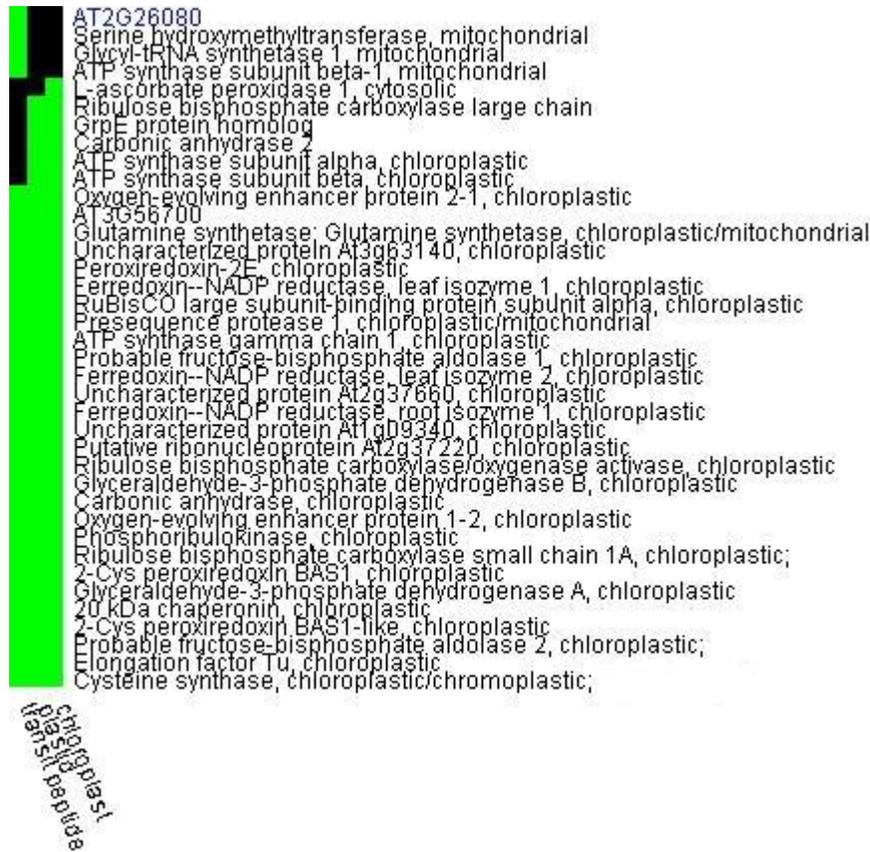






UNIPROT_ACCESSION	GENE NAME
O50008	<a href="#">5-methyltetrahydropteroyltriquelutamate--homocysteine methyltransferase</a>
Q9C524	<a href="#">AT1G66430</a>
Q9SR37	<a href="#">AT3G09260</a>
Q9LSB4	<a href="#">AT3G15950</a>
O04314	<a href="#">AT3G16420; AT5G54490</a>
O04311	<a href="#">AT3G16450</a>
Q94CE5	<a href="#">AT3G22200</a>
B9TSP7	<a href="#">AT3G56700</a>
Q9SUR0	<a href="#">AT4G23670</a>
Q8S9L5	<a href="#">AT5G55220</a>
Q38827	<a href="#">Auxin-responsive protein IAA9</a>
P25819	<a href="#">Catalase-2; Catalase</a>
P47999	<a href="#">Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic; Cysteine synthase</a>
Q9XI91	<a href="#">Eukaryotic translation initiation factor 5A-1</a>
Q9MA79	<a href="#">Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic</a>
P41917	<a href="#">GTP-binding nuclear protein Ran-2</a>
Q8H156	<a href="#">GTP-binding nuclear protein Ran-3</a>
Q38946	<a href="#">Glutamate dehydrogenase 2</a>
Q9FWR4	<a href="#">Glutathione S-transferase DHAR1, mitochondrial</a>
O23627	<a href="#">Glycyl-tRNA synthetase 1, mitochondrial</a>
Q05431	<a href="#">L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic</a>
P30184	<a href="#">Leucine aminopeptidase 1</a>
Q9SDM9	<a href="#">Nitrile-specifier protein 1</a>
Q9M9P3	<a href="#">Probable UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 2</a>
Q9SRG3	<a href="#">Protein disulfide-isomerase 2</a>
O03042	<a href="#">Ribulose bisphosphate carboxylase large chain</a>
Q9LUT2	<a href="#">S-adenosylmethionine synthetase 4</a>
Q9SZJ5	<a href="#">Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial</a>
P31265	<a href="#">Translationally-controlled tumor protein homolog</a>

**Figura S4.** Grupo de proteínas sin clasificar por medio de la herramienta “Functional annotation” del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>).

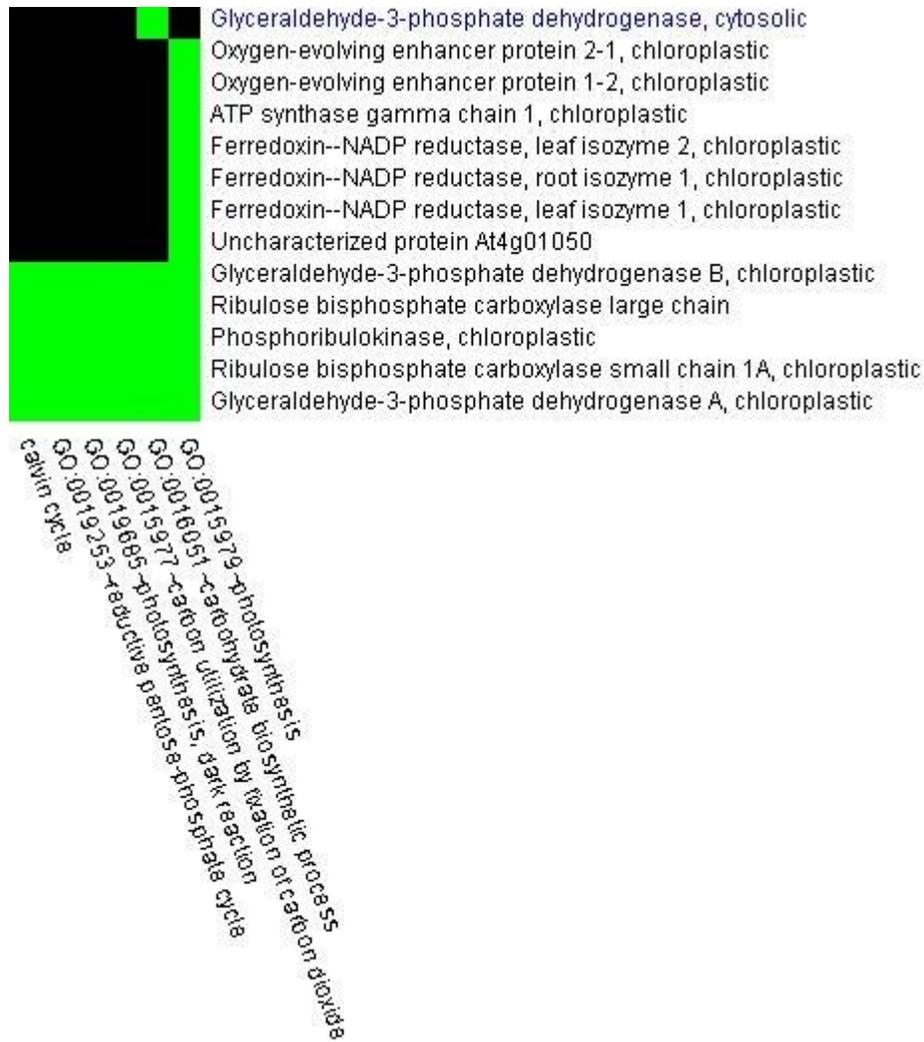


**Figura S5.** Esquema del grupo de GOs relacionados con el cloroplasto y las proteínas asociadas a ellos, generado con la herramienta “GO Enrichment Analysis” del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). En verde se muestran las coincidencias entre proteínas y términos ontológicos. En negro se muestran las faltas de coincidencia entre proteínas y términos ontológicos. Puntaje de enriquecimiento 27.14.









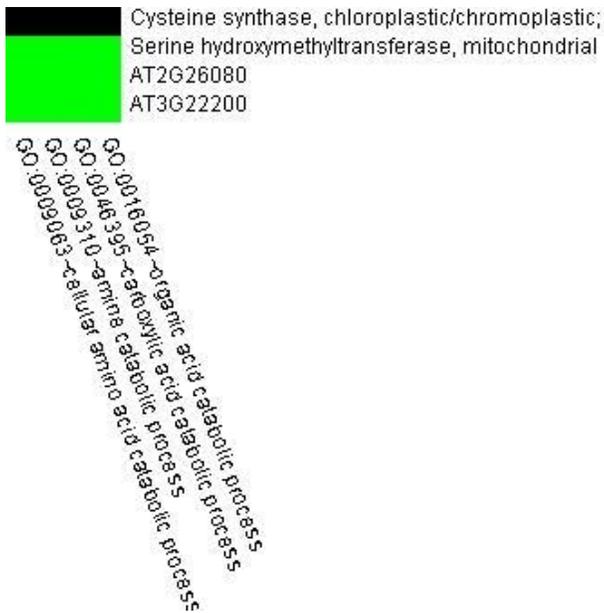
**Figura S9.** Esquema del grupo de GOs relacionados con la fotosíntesis y las proteínas asociadas a ellos, generado con la herramienta “GO Enrichment Analysis” del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). En verde se muestran las coincidencias entre proteínas y términos ontológicos. En negro se muestran las faltas de coincidencia entre proteínas y términos ontológicos. Puntaje de enriquecimiento 5.9.



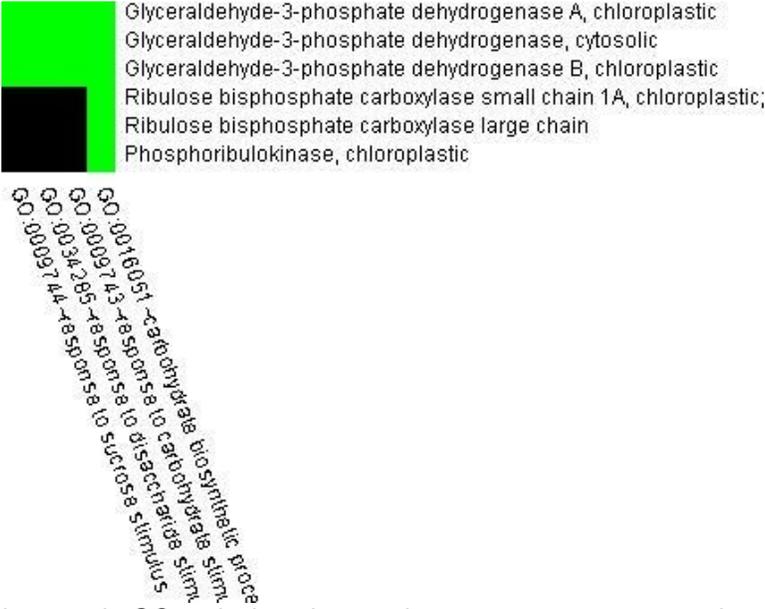






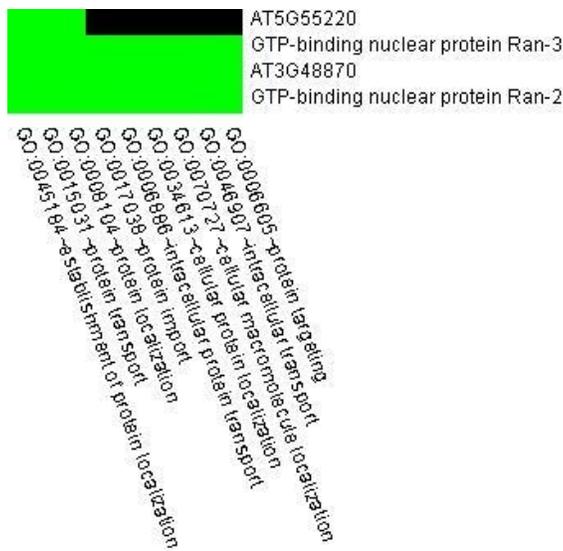


**Figura S15.** Esquema del grupo de GOs relacionados con el metabolismo de aminoácidos y las proteínas asociadas a ellos, generado con la herramienta “GO Enrichment Analysis” del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). En verde se muestran las coincidencias entre proteínas y términos ontológicos. En negro se muestran las faltas de coincidencia entre proteínas y términos ontológicos. Puntaje de enriquecimiento 1.62.

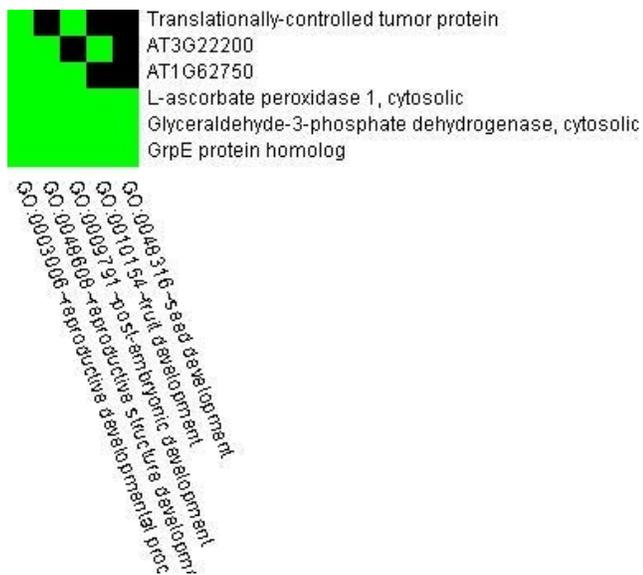


**Figura S16.** Esquema del grupo de GOs relacionados con la respuesta a azúcares y las proteínas asociadas a ellos, generado con la herramienta “GO Enrichment Analysis” del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). En verde se muestran las coincidencias entre proteínas y términos ontológicos. En negro se muestran las faltas de coincidencia entre proteínas y términos ontológicos. Puntaje de enriquecimiento 1.49.





**Figura S19.** Esquema del grupo de GOs relacionados con el transporte de proteínas y las proteínas asociadas a ellos, generado con la herramienta “GO Enrichment Analysis” del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). En verde se muestran las coincidencias entre proteínas y términos ontológicos. En negro se muestran las faltas de coincidencia entre proteínas y términos ontológicos. Puntaje de enriquecimiento 0.44.



**Figura S20.** Esquema del grupo de GOs relacionados con el desarrollo post-embriionario y las proteínas asociadas a ellos, generado con la herramienta “GO Enrichment Analysis” del paquete DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). En verde se muestran las coincidencias entre proteínas y términos ontológicos. En negro se muestran las faltas de coincidencia entre proteínas y términos ontológicos. Puntaje de enriquecimiento 0.25.