



Facultad de Biología

Facultá de Bioloxía
Faculty of Biology

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Desarrollo y validación de un método de fraccionamiento
celular compatible con análisis ómicos en *Pinus pinaster***



Alicia Arenas Romero
13 de junio, 2024

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Desarrollo y validación de un método de fraccionamiento celular
compatible con análisis ómicos en *Pinus pinaster*

Development and validation of a cell fractionation method
compatible with omics analysis in *Pinus pinaster*

Alicia Arenas Romero

TUTORES

Jesús Pascual Vázquez

Pedro Mendo Expósito

RESUMEN

Los estudios sobre la respuesta y adaptación al estrés en especies arbóreas están aumentando dado el impacto ecológico y económico que el cambio climático está teniendo sobre los bosques. A nivel celular, los mecanismos de aclimatación al estrés suponen una remodelación del proteoma y requieren de una fina coordinación entre el núcleo, las mitocondrias y los cloroplastos. En este contexto, la subproteómica es una herramienta poderosa para profundizar en la función de los orgánulos, la comunicación y la dinámica de proteínas en respuesta al estrés, reduciendo la complejidad del proteoma de las células vegetales. Sin embargo, en organismos no modelo es necesario desarrollar más herramientas y procedimientos experimentales que permitan llevar a cabo estos análisis, siendo de especial interés el aislamiento de diferentes orgánulos a partir de la misma muestra para minimizar la variabilidad.

En este trabajo, en base a la bibliografía existente, se ha desarrollado un protocolo de aislamiento secuencial de fracciones enriquecidas en núcleos, cloroplastos y mitocondrias en la especie *Pinus pinaster* partiendo de acículas. Las fracciones se caracterizaron mediante microscopía de fluorescencia y confocal, el análisis del perfil de proteínas y el uso de anticuerpos específicos, así como la evaluación del rendimiento de proteínas por cuantificación. Los resultados mostraron que se logró el enriquecimiento de las fracciones en los orgánulos deseados. Con todas las optimizaciones probadas sobre el gradiente de Percoll, el rendimiento de proteína alcanzado a partir de 4 g de acícula fue de 119 µg de proteína nuclear, 606 µg de proteína cloroplástica y 14 µg de proteína mitocondrial, cantidades suficientes para realizar análisis proteómicos mediante LC-MS.

Aunque el protocolo aquí descrito no es definitivo, constituye una primera aproximación por la que comenzar los análisis subproteómicos en *P. pinaster*, además de servir de referencia para futuros estudios en otras coníferas.

Palabras clave: cambio climático, subproteómica, fracciones enriquecidas, rendimiento de proteína.

ABSTRACT

Studies on stress response and adaptation in tree species are increasing given the ecological and economic impact that climate change is having on forests. At the cellular level, stress acclimation mechanisms involve a remodelling of the proteome and require fine coordination between the nucleus, mitochondria and chloroplasts. In this context, subproteomics is a powerful tool to gain insight into organelle function, communication and protein dynamics in response to stress, reducing the complexity of the plant cell proteome. However, in non-model organisms, it is necessary to develop more tools and experimental procedures to carry out these analyses, being of particular interest the isolation of different organelles from the same sample to minimise variability.

In this work, based on the existing literature, a protocol has been developed for the sequential isolation of fractions enriched in nuclei, chloroplasts and mitochondria of *Pinus pinaster* from needles. The fractions were characterised by fluorescence and confocal microscopy, protein profile analysis and the use of specific antibodies, as well as the assessment of protein yields by quantification. The results showed that enrichment of the fractions in the desired organelles was achieved. With all optimisations tested on the Percoll gradient, the protein yield achieved from 4 g of needles was 119 µg of nuclear proteins, 606 µg of chloroplastic proteins and 14 µg of mitochondrial proteins, enough to perform proteomic analysis by LC-MS.

Although the protocol described here is not definitive, it is a first approximation to start subproteomic analyses in *P. pinaster*, as well as serving as a reference for future studies in other conifers.

Key words: climate change, subproteomics, enriched fractions, protein yield.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Rinonucleico

ASB: Albúmina de Suero Bovino

BCA: Ácido bicinconínico

DTT: Ditiotreitól

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FAO: *Food and Agriculture Organization* / Organización para la Agricultura y la Alimentación

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-il etanosulfónico

LC-MS: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* / Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas

NP40: nonil fenoxipolietoxietanol

PBS: tampón fosfato salino

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVDF: fluoruro de polivinilideno

PVP: polivinilpirrolidona

PVPP: polivinilpolipirrolidona

Redox: reducción-oxidación

ROS: *Reactive Oxygen Species* / especies reactivas del oxígeno

RuBisCO: Ribulosa 1,5-Bisfosfato Carboxilasa/Oxigenasa

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* / Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

UV: Ultravioleta

ÍNDICE

1. Introducción	5
1.1. Antecedentes	5
1.2. Planteamiento	7
1.3. Objetivos.....	8
2. Materiales y métodos	9
2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	9
2.2. Fraccionamiento celular: gradientes de Percoll y sacarosa.....	9
2.3. Extracción de proteínas	10
2.4. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE.....	11
2.5. Western blot.....	11
2.6. Tinción Coomassie R-250	11
2.7. Microscopía de fluorescencia y láser confocal	11
3. Resultados y discusión	13
3.1. El fraccionamiento en gradientes de Percoll permite aislar núcleos, cloroplastos y mitocondrias de <i>P. pinaster</i> , pero se requieren modificaciones para mejorar su limpieza.....	13
3.2. La limpieza de las fracciones depende del volumen de tampón de aislamiento utilizado, pero es independiente de la cantidad de material de partida	16
3.3. El gradiente de sacarosa enriquece la fracción de núcleos del gradiente de Percoll, pero reduce su rendimiento.....	18
3.4. La reducción de la intensidad de homogeneizado y el doble filtrado equipara la calidad del fraccionamiento en gradiente de Percoll al de sacarosa, sin perder rendimiento de proteína.....	20
3.5. El estado del material de partida, fresco o congelado, no afecta significativamente al enriquecimiento y el rendimiento del fraccionamiento.	21
3.6. Las fracciones subcelulares presentan un perfil diferencial de proteínas	22
3.7. La fracción mitocondrial está enriquecida en mitocondrias	23
4. Conclusiones	24
5. Referencias bibliográficas	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Las plantas, como organismos sésiles, han evolucionado para detectar e integrar constantemente la dinámica de su entorno y poder mantener la homeostasis, lo que requiere de numerosos mecanismos moleculares y redes de interacción complejas. De forma natural, las condiciones ambientales cambian a lo largo del día y las estaciones del año, determinando la fisiología, el desarrollo y el ciclo vital de las plantas. Sin embargo, debido al cambio climático inducido por la actividad humana, cada vez son más frecuentes los fenómenos extremos de temperaturas, la sequía y la incidencia de radiación ultravioleta que no es filtrada por la capa de ozono. Los modelos climáticos prevén que la temperatura media global seguirá aumentando y las olas de calor serán cada vez más frecuentes (Lesk et al., 2016). Estos cambios suponen un estrés para los organismos, que han de adaptarse y responder en el menor tiempo posible para asegurar su supervivencia, con lo que disminuye el crecimiento de las plantas, incluidas las cultivadas, y por tanto se reduce el rendimiento de las cosechas (Shahzad et al., 2021). Según un nuevo informe de la FAO, las pérdidas mundiales agrícolas que son directamente atribuibles a los fenómenos extremos, (sequía, tormentas, inundaciones e incendios entre los más frecuentes), son del 49%, con una pérdida económica que asciende a una media de 13.000 millones de dólares estadounidenses al año (FAO, 2023).

En este contexto de cambio climático, las especies forestales y los bosques también están siendo afectados, ya que supone un impacto negativo en la salud y la productividad de los bosques, que crecen lentamente y tardan años en recuperarse de los daños (Khaine & Woo, 2015). Los árboles constituyen el 82% de la biomasa continental y albergan el 50% de la biodiversidad del planeta (Neale & Kremer, 2011). Además, proporcionan madera, biocombustibles y papel para el consumo humano. Entre las coníferas, *P. pinaster*, especie autóctona mediterránea, destaca por su rápido crecimiento y representa una parte considerable de las reservas de madera en España, aunque ahora también se encuentra en Europa central y el norte de África (<https://www.euforgen.org/species/pinus-pinaster/>). Su distribución geográfica es amplia, y sólo en la Península Ibérica existen localizaciones climáticas muy contrastadas con diferentes tipos de suelo que dan lugar a un número significativo de adaptaciones locales. Hay un interés en esta especie por su gran capacidad de adaptación, la diversidad genética que presenta y su importancia en el secuestro de carbono a largo plazo. Considerando la relevancia ecológica y económica de los bosques, nace un profundo interés por conocer las vías de señalización y los mecanismos de respuesta al estrés para poder diseñar estrategias, como programas de mejora genética, que aumenten la resistencia de los árboles al cambio climático.

De forma general, la respuesta y tolerancia al estrés involucra la prevención y/o atenuación del daño celular, el retorno a la homeostasis y la reanudación del crecimiento (Harfouche et al., 2014). A nivel molecular, dichos procesos requieren una amplia remodelación del proteoma que propicia cambios a nivel fisiológico y que pueden conducir a una eventual aclimatación al estrés. Comúnmente, en plantas la respuesta al estrés consiste en una secuencia de eventos moleculares que comienzan con la acumulación de ROS, principalmente en cloroplastos y mitocondrias, culminando con

cambios de expresión génica en el núcleo (Bardou et al., 2014; Locato et al., 2018; Pastori & Foyer, 2002). Dada la relevancia de las ROS en la respuesta al estrés y de la mitocondria y el cloroplasto como sus principales lugares de producción, actualmente existe un interés creciente en entender el papel que juegan estos orgánulos, considerados sensores ambientales, en la respuesta al estrés, incluyendo tanto su detección y señalización temprana como su implicación en las distintas fases de la respuesta (Pfannschmidt et al., 2020). De hecho, cada vez hay más estudios que subrayan la importancia de la interacción entre orgánulos en la modulación del metabolismo redox celular y la respuesta al estrés (Locato et al., 2018), con la tríada núcleo-cloroplasto-mitocondria desempeñando un papel central.

Los mecanismos de aclimatación al estrés dependen de la coordinación precisa entre el núcleo celular y los orgánulos endosimbióticos (mitocondrias y cloroplastos), que se produce a través de la denominada señalización retrógrada (Pfannschmidt et al., 2020), en el sentido de estos orgánulos hacia el núcleo. En el sentido contrario también existe comunicación, denominada señalización anterógrada (Unal et al., 2020), y tiene que ver con las proteínas mitocondriales y cloroplásticas que están codificadas en el ADN nuclear y han de ser transportadas hasta los orgánulos. Mientras que el núcleo es el principal centro regulador de la célula, el cloroplasto emerge como el orgánulo definitorio de las células vegetales, albergando procesos esenciales como la fotosíntesis y la biosíntesis de precursores de metabolitos secundarios (Dobrogojski et al., 2020). Por otra parte, a las ROS generadas en las mitocondrias de las plantas se les han atribuido diversas funciones en la señalización redox, la señalización retrógrada, la acción de fitohormonas, la muerte celular programada y la defensa ante el estrés (Zhao et al., 2020). Se ha visto que los mecanismos de señalización mencionados a su vez ejercen una influencia reguladora sobre el *splicing* alternativo (Pascual et al., 2021) y contribuyen a la homeostasis bajo condiciones de estrés (Chen et al., 2010; Pastori & Foyer, 2002), lo que permite la aclimatación de las plantas a las señales ambientales siempre cambiantes. En esta misma línea, se han desentrañado importantes conexiones cloroplasto-núcleo en *Arabidopsis thaliana*, donde los microARNs median procesos de silenciamiento génico postranscripcional (Fang et al., 2019; Ravichandran et al., 2019).

Varios estudios recientes en pino ponen de manifiesto la utilidad del análisis del proteoma del cloroplasto para investigar las respuestas al estrés abiótico y los mecanismos subyacentes a la adquisición de memoria (García-Campa et al., 2022; Lamelas et al., 2022, 2024), la cual es muy relevante en la adaptación de las plantas al cambio climático. En ellos se ha revelado una profunda reordenación del metabolismo del ARN, destacando una vez más a los microARNs y a los mecanismos epigenéticos como potenciales reguladores de los procesos de aclimatación de las plantas para evitar una respuesta exagerada al estrés, todos ellos promovidos por señalización retrógrada. Aunque el conocimiento de los componentes implicados en la señalización retrógrada ha aumentado enormemente en la última década, los estudios sobre la regulación de las vías de señalización de las mitocondrias y cloroplastos han sido en gran medida independientes, y queda mucho por investigar sobre el mecanismo de integración de las señales retrógradas mitocondriales y cloroplásticas.

1.2. Planteamiento

Derivado de todo lo anterior, es evidente que existe una compleja red de señales entre los compartimentos subcelulares que debe estar finamente regulada para dar una respuesta celular coordinada al estrés. Todavía quedan muchas preguntas por resolver, y es necesario estudiar qué ocurre en las mitocondrias y los cloroplastos, pues son origen y objeto de la misma, y cómo se coordinan con el núcleo a través de las mencionadas rutas de señalización retrógradas y anterógradas.

La complejidad del proteoma de las células vegetales no se puede cubrir al completo con la capacidad analítica de las metodologías actuales basadas en LC-MS (Lamelas et al., 2020). Esto es debido a que las células vegetales contienen miles de proteínas cuyas abundancias varían en varios órdenes de magnitud, y aquellas que son menos abundantes no pueden ser detectadas la mayoría de las veces, quedando enmascaradas por las más abundantes. Por lo tanto, una estrategia metodológica poderosa para solventar este problema es reducir la complejidad del proteoma haciendo proteómica subcelular no dirigida, permitiendo no solo una cobertura más profunda del proteoma, sino también profundizar en cómo los orgánulos coordinan la señalización en respuesta al estrés ambiental, así como su participación y relevancia en dichas respuestas a nivel celular y, por extensión, a niveles de organización superiores.

Para poder hacer proteómica subcelular, se requiere en primer lugar obtener fracciones enriquecidas en los distintos compartimentos celulares que queremos estudiar: núcleo, cloroplastos y mitocondrias. De esta manera, se puede aislar posteriormente el proteoma de las diferentes fracciones y analizarlas por separado mediante LC-MS, mejorando la resolución con respecto a cuando se analiza el proteoma celular completo.

Ya existen protocolos establecidos para el aislamiento de orgánulos en plantas que han servido para los consiguientes análisis subproteómicos. Por ejemplo, se han hecho estudios proteómicos de los cloroplastos (Baginsky et al., 2005) y mitocondrias (Lee et al., 2013; Millar et al., 2001) de *A. thaliana*. En otra especie también muy estudiada, como es el musgo *Physcomitrella patens*, existe un protocolo para el aislamiento de cloroplastos y mitocondrias a partir del protonema (Lang et al., 2011). Más recientemente, se han hecho estudios en *P. radiata* para analizar el proteoma nuclear (Alegre et al., 2016), el proteoma de cloroplastos (García-Campa et al., 2022; Lamelas et al., 2024) y el proteoma conjunto de núcleos y cloroplastos (Lamelas et al., 2020, 2022).

Los estudios mencionados emplean gradientes de densidad para purificar los orgánulos deseados, en ocasiones combinándolos con electroforesis de flujo libre para separar los cloroplastos de las mitocondrias. Sin embargo, como los tamaños de los orgánulos y la composición de las paredes celulares varían entre especies (Richardson, 2019), no es esperable que los protocolos que utilizan funcionen directamente en *P. pinaster*. Por otra parte, los estudios mencionados han sido realizados de manera aislada y sería interesante obtener información simultánea de mitocondrias, núcleos y cloroplastos procedentes de la misma muestra. De esta forma se podrían solapar e integrar mejor los datos al eliminar la variación metodológica entre muestras, obteniendo así una imagen lo más fidedigna posible a la biología celular subyacente a la respuesta al estrés.

1.3. Objetivos

Por todos los motivos mencionados, es necesario ajustar y validar un método completo para la especie *P. pinaster*. Así pues, el principal propósito y novedad de este trabajo es desarrollar un protocolo que permita el aislamiento secuencial de fracciones subcelulares enriquecidas en núcleos, cloroplastos y mitocondrias intactas a partir de acículas de *P. pinaster*, obteniendo el rendimiento suficiente para llevar a cabo estudios subproteómicos, mediante análisis LC-MS, de respuesta a estrés en el futuro. Para la consecución del objetivo general, se plantean los dos siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización de las fracciones incluyendo la evaluación de su enriquecimiento mediante microscopía de fluorescencia, perfil total de proteínas e inmunodetección con anticuerpos específicos de orgánulos.
2. Optimización del fraccionamiento para mejorar el enriquecimiento en orgánulos y el rendimiento en proteína.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Como material vegetal se utilizaron plántulas de *P. pinaster* Aiton de 18 meses con región de procedencia de las semillas en la Sierra de Gredos (https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/recursosgeneticos/geneticosforestales/rgf_regiones_procedencia.html) producidas previamente por el grupo receptor. Para generar la plántula, se llevó a cabo en primer lugar la asepsia de las semillas, que se realizó mediante un primer lavado con hipoclorito de sodio: agua (2:1) durante 5 min, un segundo lavado con hipoclorito de sodio:agua (1:1) durante 5 min, un tercer lavado con etanol al 96% durante 10 s y 3 últimos lavados con agua destilada durante 5, 10 y 15 min respectivamente. Para la germinación, las semillas se activaron con agua destilada y se eliminaron las que flotaban, indicador de un defecto de densidad por desarrollo anómalo. Después se estratificaron durante 1 semana a 4°C en oscuridad. Se dispusieron en alvéolos con un sustrato de turba ácida: turba rubia: perlita (1:3:1) y bajo condiciones controladas de luz y temperatura (21°C con un fotoperiodo largo de 16h luz/8h oscuridad). A los 6 meses se trasplantaron a contenedores de 1L con el mismo sustrato y continuaron creciendo en condiciones de invernadero.

2.2. Fraccionamiento celular

- **Gradiente de Percoll**

El fraccionamiento está basado en un protocolo descrito en musgo (Lang et al., 2011). Para la puesta a punto se usaron plántulas que no recibieron ningún tratamiento de estrés. Se usaron 2 o 4 gramos de acículas adultas frescas de la zona apical e intermedia, que se cortaron en fragmentos de 1 cm y se trituraron con un homogeneizador (T 25 Basic ULTRA-TURRAX) resuspendidas en tampón de aislamiento de orgánulos [PVP 1% (p/v), D-sorbitol 300 mM, HEPES 50 mM, Na-EDTA 2 mM, MgCl₂ 1mM, ASB 0,1%]. El homogeneizado se filtró con tres capas de muselina una o dos veces, sin aplicar mucha presión con los dedos, y se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml. Los cloroplastos se sedimentaron centrifugando 10 min a 1,500 g y el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo para aislar las mitocondrias y los núcleos.

Por una parte, el pellet de cloroplastos se resuspendió en 3 ml de tampón de resuspensión [D-sorbitol 300 mM, HEPES 50 mM, Na-EDTA 2 mM, MgCl₂ 1mM, ASB 0,1%] con la ayuda de un pincel fino. Estos se cargaron cuidadosamente sobre un gradiente Percoll [de arriba a abajo: 5 ml 10%, 5 ml 40% y 5 ml 80 %]. Los gradientes se centrifugaron a 16.000 g durante 20 min. Los cloroplastos intactos, situados en la interfase 40-80%, se recogieron con una pipeta y se lavaron dos veces con 3 volúmenes de tampón de lavado [D-sorbitol 300 mM, HEPES 50 mM, Na-EDTA 2 mM, MgCl₂ 1mM]. Finalmente se centrifugó a 1.500 g durante 10 min, se eliminó por completo el tampón de lavado y los pellets se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Paralelamente, las mitocondrias y los núcleos se aislaron a partir del primer sobrenadante. Este se centrifugó a 3.000 g 5 min seguido de 6.000 g 5 min en el mismo tubo para peletear los núcleos y otros restos celulares. El sobrenadante se decantó a un nuevo tubo y se centrifugó a 18.000 g durante 20 min. Se juntaron dos pellets y se

resuspendieron en 1ml de tampón de lavado con un pincel fino, añadiendo 250 µl de Percoll 100% para tener una concentración final del 20%. Se preparó un gradiente Percoll [de arriba a abajo: 5 ml de Percoll 33% y 5 ml de Percoll 80% en tampón de lavado] colocando la resuspensión con Percoll 20% arriba del todo y se centrifugó a 18.000 g 1h. Se recogieron dos bandas mitocondriales, en la interfase 20-33% (banda M1) y en la interfase 33-80% (banda M2) y se limpiaron de restos celulares dos veces añadiendo 15 ml de tampón de lavado. Se centrifugaron a 18.000 g durante 20 min y se guardaron los pellets a -80°C hasta su análisis. A todos los tampones se les añadió β-mercaptoetanol [5% (v/v)] justo antes de su uso. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C.

- **Gradiente de sacarosa**

El gradiente de sacarosa empleado fue previamente descrito (Alegre et al., 2016). Consistió en la preparación de tres fases autoclavadas a las que se añadió 1 mM DTT y 0,5 % (v/v) NP-40 (en los casos indicados) justo antes del uso. La fase 1 [0,32 M sacarosa, 3 mM CaCl₂, 2 mM Mg(C₂H₃O₂)₂, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM DTT, 0,5 % (v/v) NP-40], la fase 2 [2 M sacarosa, 5 mM Mg(C₂H₃O₂)₂, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM DTT] y la fase 3 [3 M sacarosa, 5 mM Mg(C₂H₃O₂)₂, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM DTT] se dispusieron por orden decreciente de densidad en un tubo Falcon de 15 ml.

El pellet de la fracción de núcleos se disolvió en 400 µL de tampón C [0,25 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol y 0,015 mM PMSF] diluido al 50% en agua destilada. Los núcleos resuspendidos se centrifugaron sobre el gradiente durante 12 min a 3000 g, tras los cuales se recogieron dos interfases claramente diferenciadas (la superior denominada F1, la inferior F2) y se guardaron a -20°C hasta el análisis. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C.

2.3. Extracción de proteínas

Para extraer las proteínas de cada fracción subcelular se empleó el método basado en Tris-Glicerol-SDS. Se resuspendió el pellet en 300 µl de tampón de extracción [100 mM Tris-HCl pH 8, 5% SDS (p/v), 10% glicerol (v/v), 2 mM PMSF, 10 mM DTT] y se incubó 5 min a 95°C. A continuación, se añadió 1 volumen de 1,5 M sacarosa y 10 mM DTT a cada tubo y se vortexó. Después se añadió 1 volumen de fenol (equilibrado pH 7,5 - 8), se vortexó y se centrifugó 5 min a máxima velocidad y temperatura ambiente. La fase superior (fenólica) se transfirió a un nuevo tubo y se re-extrajo con fenol sobre la fase inferior acuosa. Las dos fases fenólicas se mezclaron y limpiaron con 1 volumen de 1,5 M sacarosa y 10 mM DTT centrifugando de nuevo. Se recogió la fase fenólica en un nuevo tubo y para precipitar las proteínas se añadieron 2 volúmenes de 0,1 M de acetato de amonio en metanol dejándolo incubar a -20°C durante la noche.

Al día siguiente se centrifugó 5 min a 5.000 g y 4°C. Se retiró el sobrenadante y se lavó dos veces el pellet con metanol (0,5% β-mercaptoetanol) centrifugando posteriormente 5 min a 5.000 g y 4°C (un baño de ultrasonidos facilitó la disgregación del pellet). A continuación, se hizo un lavado igual con acetona (0,5% β-mercaptoetanol) y un último con acetona con 10% de agua destilada. Se dejaron secar al aire los pellets y se resolubilizaron las proteínas en 20 - 50 µl de tampón 8 M urea, 4% SDS con agitación a

30°C durante 2 horas. Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad y temperatura ambiente 5 min. Se guardó el sobrenadante a -20°C para los próximos usos.

Para cuantificar las proteínas extraídas se usó el método del BCA. De la mezcla de reactivos A y B (100:2) se añadieron 200 µl a 2 µl de proteína y se incubó 40 min a 45°C antes de leer la densidad óptica a 562 nm. Para la recta patrón se usaron diluciones de ASB con concentraciones conocidas.

2.4. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

Las proteínas se desnaturalizaron en tampón Laemmli [100 mM Tris pH 6,8, 1% SDS, 24% glicerol, 4% 2-mercaptoetanol y 10 µg/ml azul bromofenol] añadiendo un 5% β-mercaptoetanol fresco, durante 2 min a 96°C y se separaron mediante SDS-PAGE (Biorad) junto con un marcador de peso molecular (Thermo Scientific Unstained PageRuler, ref. 26614). Los geles eran de 1 mm de grosor, con 12% de acrilamida/bis (37,5:1) y se cargaron entre 10 y 20 µg de proteína por pocillo. Se usó tampón TGS [25 mM Tris, 192 mM Glicina y 0,1% SDS] en la cubeta de electroforesis.

2.5. Western Blot

Para poder detectar proteínas específicas de orgánulos, se transfirieron a una membrana de PVDF de 0,45 µm de grosor (Cytiva Amersham Hybond P) usando el sistema de western blot por sumersión (BioRad). El anticuerpo primario usado fue α-aconitasa (agrisera, ref. AS09 521) generado en conejo. Como anticuerpo secundario se usó α-conejo conjugado a peroxidasa de rábano (Invitrogen, ref. A16096). Se prepararon diluciones 1:1000 de α-aconitasa y 1:5000 de α-conejo en PBS con 1% de leche en polvo. Para el revelado se usó ECL (Cytiva).

2.6. Tinción Coomassie R-250

Para la visualización de las proteínas totales y el marcador de peso molecular, se tiñeron los geles y las membranas de PVDF tras la inmunodetección con una solución de Coomassie [metanol 40%, ácido acético 10%, Coomassie R-250 0,1%] durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Se hicieron varios lavados con solución de desteñido [metanol 40%, ácido acético 10%] hasta ver las bandas de proteínas con la intensidad deseada.

2.7. Microscopía de fluorescencia y láser confocal

Los pellets del fraccionamiento se prepararon para su análisis mediante microscopía de fluorescencia (Nikon eclipse E600). Para la preparación de las muestras, se separó una porción de pellet y se resuspendió en 30 µl de tampón de lavado [D-sorbitol 300 mM, HEPES 50 mM, Na-EDTA 2 mM, MgCl₂ 1mM] o tampón C [0,25 M sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol y 0,015 mM PMSF], según el gradiente de procedencia. Las muestras se tiñeron con DAPI durante 20 min en

oscuridad y se visualizaron los núcleos con una longitud de onda de excitación a 330-380 nm y de emisión a 420 nm (filtro UV-2A). Para la autofluorescencia de la clorofila se usó una longitud de 510-560 nm y se recogió la emisión a 590 nm (filtro G-2A). Las imágenes se tomaron acoplado una cámara (CMEX 5.0 DC 5000f) con objetivo 0,45X.

Para la visualización de las mitocondrias se usó un microscopio láser confocal (Leica TCS-SP8X) y los pellets se tiñeron con MitoTracker Orange CMTMRos (Invitrogen, cat. no. M7510). Para ello se preparó una disolución de MitoTracker 1 mM en DMSO, y esta se diluyó hasta 1 μ M en tampón de resuspensión del gradiente de Percoll. Los pellets se resuspendieron en 150 μ l de la última disolución. Se incubaron 20 min en oscuridad, se centrifugó y retiró el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 30 μ l de tampón de resuspensión y se usaron 10 μ l para la observación con el microscopio confocal con una longitud de onda de excitación de 543 nm y de 551-604 nm de emisión para MitoTracker; 633 nm de excitación y 650-700 nm de emisión para la clorofila. Se crearon imágenes individuales usando el software ImageJ con el complemento Fiji.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obtención de fracciones enriquecidas en núcleos y cloroplastos para análisis proteómicos se describió hace unos años en coníferas (Lamelas et al., 2020), y se consiguió empleando gradientes discontinuos de sacarosa para los núcleos y de sacarosa-Percoll para los cloroplastos. Sin embargo, no se aislaron las dos fracciones a partir de la misma muestra y este aspecto es crítico para reducir la variación metodológica y mejorar la integración de los datos. Además, tampoco incluyeron a las mitocondrias, las cuales son de interés dada su centralidad a nivel metabólico en la célula y su relevancia en la coordinación de la respuesta a situaciones de estrés mediante redes de señalización entre orgánulos.

Por otra parte, trabajaron con acículas de *P. radiata*, y aunque sea una especie cercana a *Pinus pinaster* el protocolo no es automáticamente trasladable. Por ello, este trabajo comenzó con una búsqueda bibliográfica que, con el objetivo de desarrollar un método apto para *P. pinaster*, combinó la información descrita en coníferas en el protocolo mencionado anteriormente, con otro desarrollado para musgos (*Physcomitrella patens*) que incluyó el aislamiento de mitocondrias (Lang et al., 2011). Durante la puesta a punto se hicieron varias pruebas de fraccionamiento, incorporando diferentes variaciones sobre los protocolos de referencia con el fin de obtener fracciones enriquecidas en proteínas nucleares, cloroplásticas y mitocondriales.

3.1. El fraccionamiento en gradientes de Percoll permite aislar núcleos, cloroplastos y mitocondrias de *P. pinaster*, pero se requieren modificaciones para mejorar su limpieza

Para comenzar, se hizo un primer ensayo siguiendo los pasos descritos en el protocolo de musgo (Lang et al., 2011) con algunos cambios. En primer lugar, el tipo y la cantidad de material de partida, que en el caso del musgo fueron 20 gramos de tejido fresco de protonema, mientras que de *P. pinaster* se usaron acículas maduras frescas. Estas constituyen acículas con todas sus competencias fisiológicas y son las que normalmente se utilizan en estudios de estrés, ya que permiten obtener resultados representativos acerca de cómo el árbol responde al estrés y son idóneas para los venideros análisis subproteómicos. Sin embargo, la cantidad de acículas maduras por plántula es muy limitada y utilizar 20 gramos aumentaría demasiado el número de ejemplares necesarios, haciendo los experimentos difícilmente abordables por razones de espacio en las cámaras de cultivo estándar. La idoneidad de un protocolo destinado a proteómica no dirigida depende en gran medida del rendimiento de proteína, entendido como la abundancia de proteína purificada por peso de material inicial. En el protocolo desarrollado en *P. radiata*, con 1 gramo de acículas congeladas se obtuvo un rendimiento de 100 µg de proteína en la fracción de núcleos, y de 700 µg en la fracción de cloroplastos (Lamelas et al., 2020). Así pues, esperando obtener un rendimiento suficiente en un fraccionamiento simultáneo de núcleos, cloroplastos y mitocondrias, se decidió partir de 4 g de acícula fresca.

En segundo lugar, se sustituyó el PVPP del tampón de aislamiento de orgánulos por su forma polimérica soluble, el PVP, que sirve para absorber los polifenoles que abundan en pino y pueden interferir tanto en la preparación de la muestra como en los análisis posteriores.

En tercer lugar, para la homogeneización se empleó un rotor-estator. No se utilizó un mortero ni nitrógeno líquido, como es habitual en otros métodos de purificación, debido a que es un método de homogeneización agresivo que podría afectar a la integridad de los orgánulos.

Como resultado, tras centrifugar el pellet de cloroplastos resuspendido en tampón de resuspensión en el primer gradiente de Percoll (10-40-80%), a diferencia de lo descrito en musgo (Lang et al., 2011) se observó una única banda de cloroplastos (figura 1A) que combinaba los cloroplastos intactos con otros restos celulares, como posteriormente se comprobó mediante microscopía de fluorescencia (figura 1C). Esta diferencia de resultado entre el protonema de musgo y las acículas de pino puede deberse a que existe una variación natural del tamaño de los cloroplastos entre especies y también entre tipos celulares de la misma especie (Richardson, 2019).

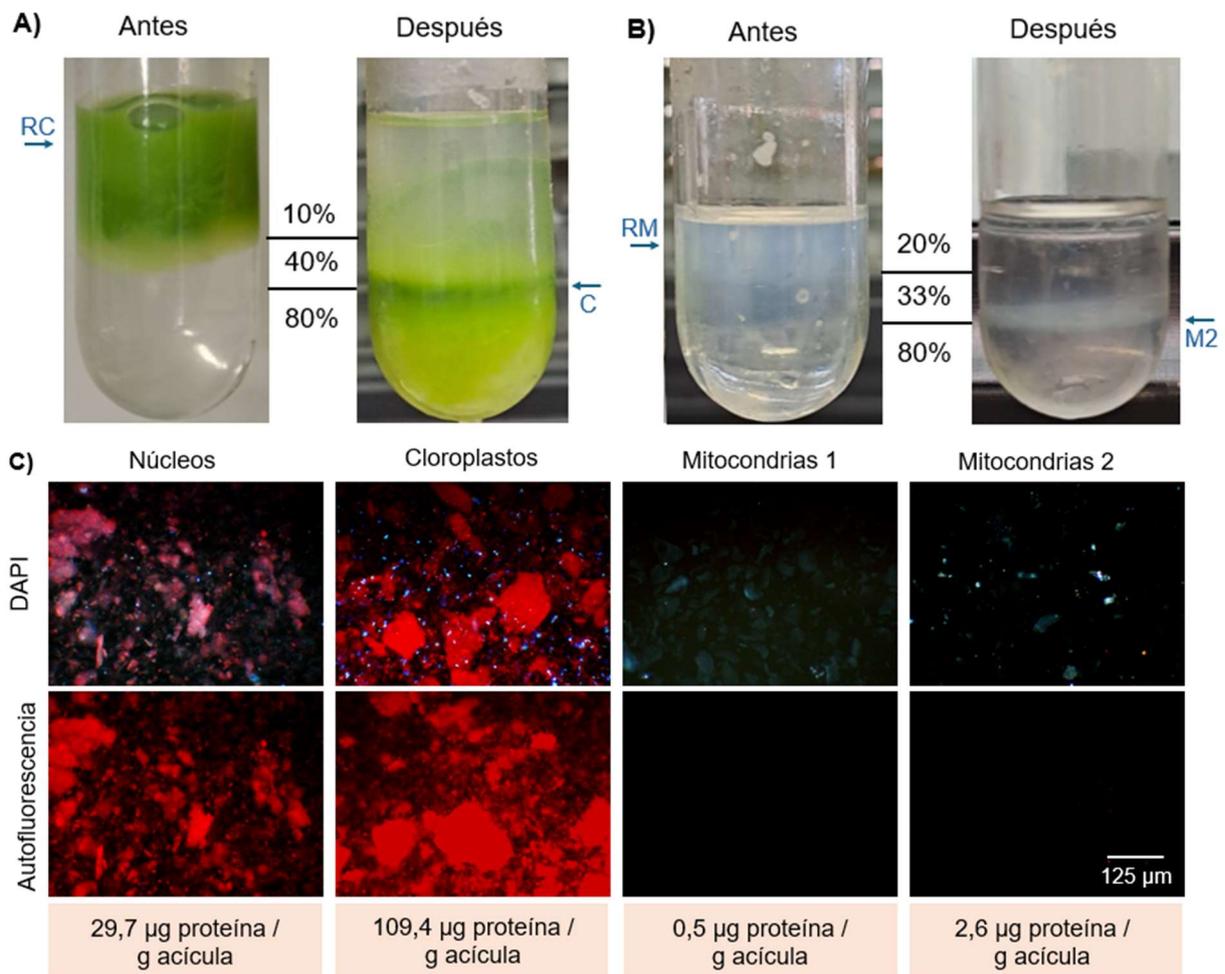


Figura 1. Caracterización de las fracciones subcelulares aisladas en gradientes de Percoll. **A)** Primer gradiente de Percoll cargado con la resuspensión del pellet de cloroplastos, (RC), antes y después de la centrifugación. La flecha azul indica la fase de cloroplastos aislada, (C). **B)** Segundo gradiente de Percoll cargado con la resuspensión del pellet de mitocondrias, (RM), antes y después de la centrifugación. La flecha azul indica la fase mitocondrial inferior aislada, (M2). Los porcentajes de Percoll se detallan al lado de cada fase. **C)** Microscopía de fluorescencia de las fracciones de núcleos, cloroplastos, M1 y M2 teñidas con DAPI. Se usó el aumento 20x. Los núcleos se ven en azul por la tinción DAPI, con longitud de onda de excitación a 330-380 nm, y de emisión a 420 nm. Los cloroplastos se ven en rojo por autofluorescencia de la clorofila, con una longitud de onda de excitación a 510-560 nm, y de emisión a 590 nm. El rendimiento en proteína, expresado en µg/g de acícula, se indica debajo de cada fracción.

En el segundo gradiente de Percoll (20-33-80%), donde se cargó el pellet de mitocondrias resuspendido en tampón de lavado, se esperaban dos bandas mitocondriales, una superior (M1) y otra inferior (M2), correspondientes a dos poblaciones mitocondriales reportadas en protonema de musgo (Lang et al., 2011). En cambio, en acículas de *P. pinaster* sólo fue distinguible a simple vista la banda M2 (figura 1B). No obstante, se aisló la zona del gradiente donde se esperaba la banda M1 y se vio que la cantidad de proteína era ínfima.

Una de las aspiraciones principales del trabajo fue obtener fracciones subcelulares enriquecidas. El enriquecimiento de las fracciones se comprobó a través de varias aproximaciones complementarias. La primera estrategia consistió en la observación de las fracciones en el microscopio de fluorescencia para evaluar cuán contaminadas estaban por otros orgánulos o restos celulares. Las cuatro fracciones se tiñeron con DAPI, agente de unión específica a las regiones ricas en adenosina-timidina del ADN nuclear (Tarnowski et al., 1991), infiriendo así la presencia de núcleos por excitación con luz UV. La presencia de cloroplastos se evaluó por autofluorescencia de la clorofila (Kodama, 2016).

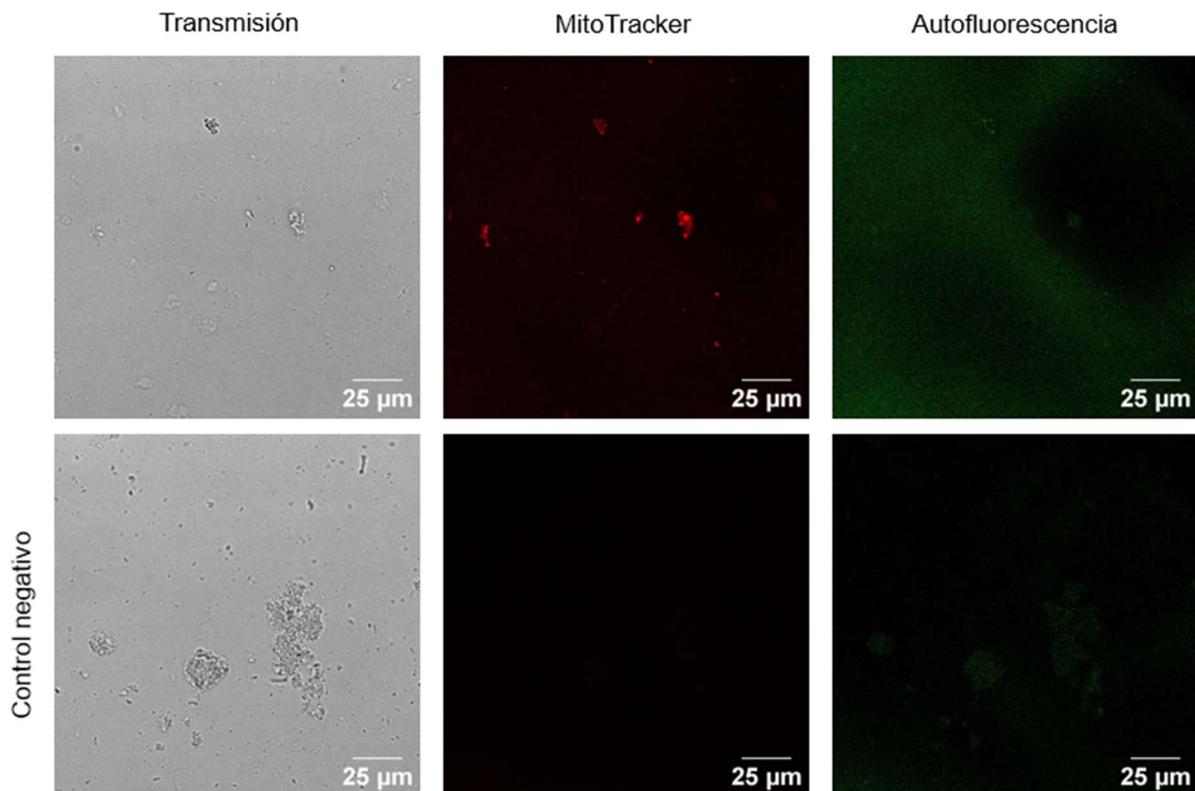


Figura 2. Microscopía láser confocal de la fracción mitocondrial teñida con MitoTracker. Para la observación de las muestras se usó el objetivo 40x con aceite de inmersión. El control negativo, indicado en la fila inferior izquierda, no se tiñó con MitoTracker. Por columnas se indica en la parte superior el tipo de filtro usado, de izquierda a derecha: transmisión en campo claro, longitud de onda de excitación del MitoTracker a 543 nm y autofluorescencia de la clorofila a 633 nm.

Como puede observarse en las imágenes de microscopía (figura 1C), las fracciones de núcleos y cloroplastos estaban muy contaminadas entre sí, habiendo incluso más presencia de núcleos en la fracción de cloroplastos que en la de núcleos. Este resultado

era esperado, ya que durante el fraccionamiento en gradiente de Percoll el pellet de núcleos mantenía un color verdoso, indicativo de la presencia de cloroplastos. Las fracciones mitocondriales superior e inferior, M1 y M2, fueron las más limpias, entendiendo por limpieza un bajo nivel de restos celulares indeseados, y además no estaban aparentemente contaminadas por cloroplastos ni por núcleos. Para demostrar la presencia de mitocondrias en esta fracción se hizo una tinción selectiva de las mitocondrias con MitoTracker y se observó por microscopía láser confocal (figura 2). Los resultados indicaron que las fracciones mitocondriales estaban enriquecidas en mitocondrias, siendo esta una de las principales aspiraciones del desarrollo del protocolo de fraccionamiento.

Respecto a los rendimientos en forma de proteína purificada de cada fracción, que es otro de los pilares de este trabajo junto con el enriquecimiento de las fracciones, las cuantificaciones de proteínas realizadas mostraron que la cantidad, en μg , de proteínas de las fracciones de cloroplastos y mitocondrias fueron de 109,4 μg y 2,6 μg por gramo de acícula respectivamente (figura 1C). Este rendimiento es ligeramente inferior al que se obtuvo con el mismo protocolo en musgo, siendo en este de 150-250 μg por gramo de protonema fresco en la fracción de cloroplastos y de 3-5 μg en la fracción de mitocondrias (Lang et al., 2011).

Durante todo el proceso de optimización del protocolo fue esencial caracterizar las fracciones para saber qué contenían y en base a eso, tomar las decisiones oportunas para mejorarlo. Como conclusión, esta primera prueba demostró que 4 gramos podría ser una cantidad acertada y que el gradiente de Percoll permite fraccionar los orgánulos deseados en *P. pinaster*, si bien, como era esperado, hay diferencias con respecto a los resultados en musgo y se requieren cambios para mejorar el rendimiento y reducir la contaminación de las fracciones, sobre todo en la de núcleos.

3.2. La limpieza de las fracciones depende del volumen de tampón de aislamiento utilizado, pero es independiente de la cantidad de material de partida

Buscando aumentar el rendimiento de proteína, en los pasos previos al fraccionamiento se añadió tampón de aislamiento de orgánulos hasta alcanzar una consistencia más líquida en el homogeneizado, que fue de 7 ml por gramo de acícula. Esto podría facilitar el homogeneizado y aumentar la eficiencia en la rotura del tejido. Adicionalmente, para comprobar si era posible reducir la cantidad de acícula de partida, se hicieron simultáneamente fraccionamientos partiendo de 2 y 4 gramos de acícula.

Como puede observarse en las imágenes tomadas por microscopía, la adición de 5 ml de tampón de aislamiento por gramo de acícula empeoró considerablemente el grado de limpieza de las fracciones (figura 3). Aunque se pensó que facilitar la rotura del tejido por contacto con el tampón mejoraría el rendimiento al liberarse más orgánulos al medio, se ha visto que también incrementó la cantidad de otros restos celulares filtrados. Al igual que en la prueba anterior (figura 1C), se ve que la fracción de cloroplastos contiene más núcleos que la fracción de núcleos. Por otra parte, en esta prueba se compararon los fraccionamientos partiendo de dos cantidades de material inicial y se vio que esta variable no influyó en la limpieza de las fracciones, si bien no se cuantificó el rendimiento

de proteína debido a la alta contaminación. Aun así, al igual que en la primera prueba, la fracción mitocondrial permaneció sin contaminación por núcleos, independientemente de usar 2 (figura 3A) o 4 gramos de acícula (figura 3B).

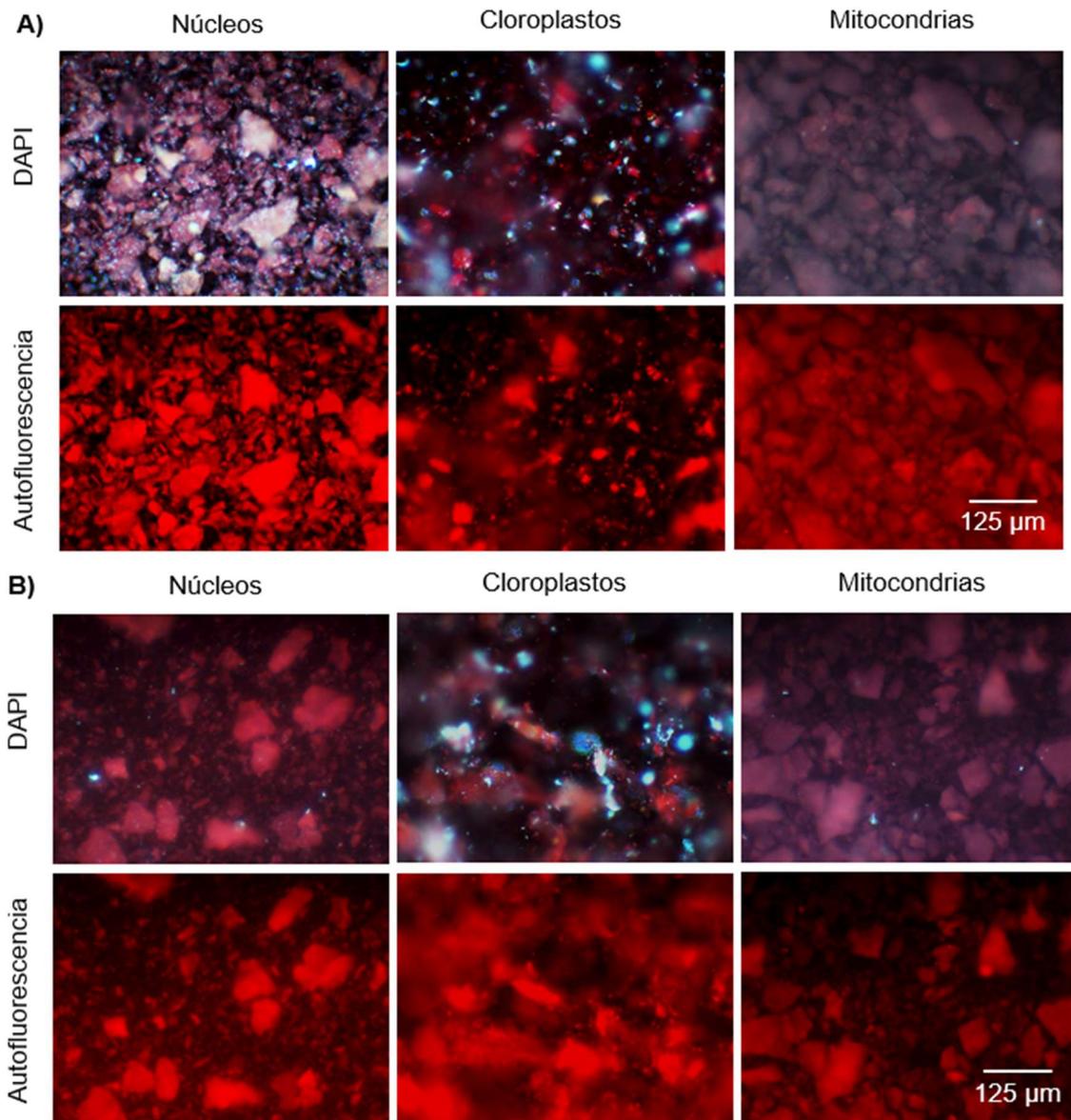


Figura 3. Microscopía de fluorescencia de diferentes fracciones subcelulares aisladas del gradiente de Percoll. A) Fracciones de núcleos, cloroplastos y mitocondrias obtenidas usando 2 gramos de acícula iniciales. **B)** Fracciones de núcleos, cloroplastos y mitocondrias obtenidas usando 4 gramos de acícula iniciales. Todas las fracciones se tiñeron con DAPI para la visualización de los núcleos. Se usó el aumento 20x. Los núcleos se ven en azul por la tinción DAPI, con longitud de onda de excitación a 330-380 nm, y de emisión a 420 nm. Los cloroplastos se ven en rojo por autofluorescencia de la clorofila, con una longitud de onda de excitación a 510-560 nm, y de emisión a 590 nm.

Esta prueba demostró que no hay diferencias significativas entre usar 2 o 4 gramos de acícula sobre la limpieza de las fracciones, teniendo en común la adición de 7 ml por gramo de acícula de tampón de aislamiento, que aumentó considerablemente la cantidad de restos celulares en ambas por igual. Este resultado supuso idear tres planes para conseguir fracciones más limpias de restos celulares y enriquecidas en orgánulos en las próximas pruebas:

1. Comprobar la utilidad de limpiar las fracciones de núcleos y cloroplastos en un gradiente de sacarosa.
2. Reducir la intensidad del homogeneizado y la cantidad de tampón de aislamiento.
3. Filtrar doblemente el homogeneizado usando tres capas de muselina.

3.3. El gradiente de sacarosa enriquece la fracción de núcleos del gradiente de Percoll, pero reduce su rendimiento

Poniendo a prueba el primer plan para eliminar los restos celulares indeseados que se observaron en las fracciones de núcleos y cloroplastos, resultantes del fraccionamiento en gradiente de Percoll, se hizo una limpieza de estas dos fracciones sometiéndolas a un gradiente adicional de sacarosa. Esta aproximación se utilizó en un estudio con acículas de *P. radiata* obteniendo un buen enriquecimiento y rendimiento en la fracción de núcleos (Alegre et al., 2016).

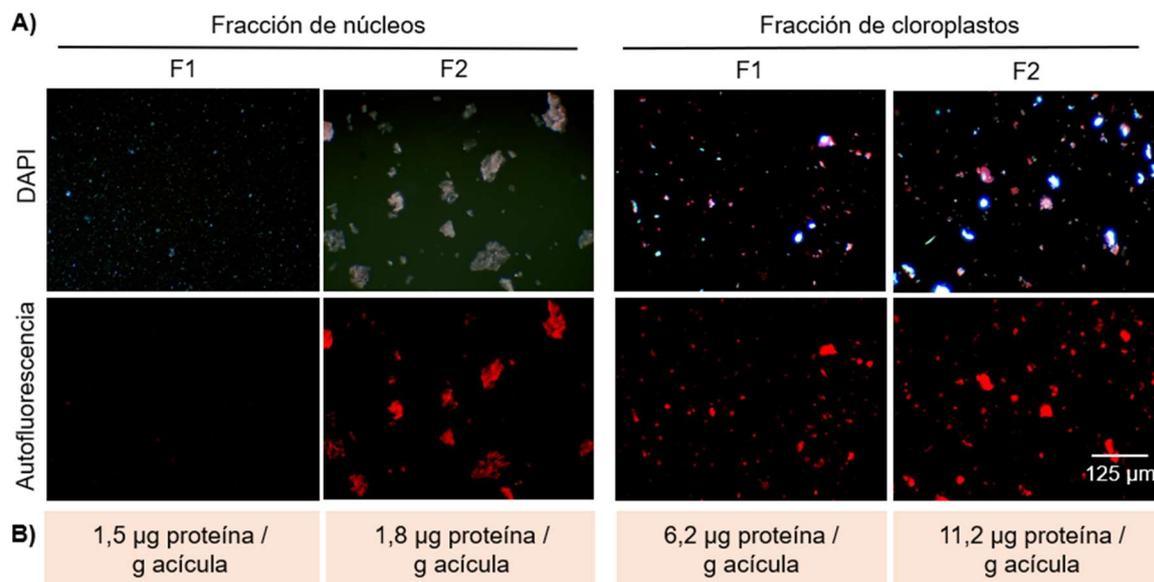


Figura 4. Microscopía de las fracciones F1 y F2 del gradiente de sacarosa en que se limpiaron de restos celulares las fracciones de núcleos y cloroplastos procedentes del gradiente de Percoll. Todas las fracciones se tiñeron con DAPI para la visualización de los núcleos. Se usó el aumento 20x. Los núcleos se ven en azul por la tinción DAPI, con una longitud de onda de excitación a 330-380 nm, y de emisión a 420 nm. Los cloroplastos se ven en rojo por autofluorescencia de la clorofila, con una longitud de onda de excitación a 510-560 nm, y de emisión a 590 nm.

Tras centrifugar el gradiente de sacarosa se observaron dos fases, una superior (F1) y otra inferior (F2), que se aislaron por separado para su análisis por microscopía de fluorescencia. Lo que se vio fue que para los núcleos la fase más limpia de restos celulares y enriquecida fue la F1, mientras que para los cloroplastos fue la F2, aunque en esta última hubo una mayor presencia de núcleos (figura 4A).

En términos de limpieza quedó justificado el uso del gradiente de sacarosa en la fracción de núcleos, ya que mejoró mucho (figura 4A) con respecto al gradiente de Percoll (figura

1C). Comparando el rendimiento de proteína de la fracción de núcleos del gradiente de Percoll (29,7 µg/g de acícula) con la del gradiente de Percoll seguido de sacarosa (1,5 µg/g de acícula), se vio una reducción de hasta 16 veces. En *P. radiata* los núcleos aislados con el mismo protocolo tuvieron un rendimiento más alto, de 100 µg de proteína por gramo de acícula (Lamelas et al., 2020). Este hecho puede explicarse considerando que se sometió la misma muestra a dos fraccionamientos diferentes, el de gradiente de Percoll y el de sacarosa, y esto podría suponer perder una gran cantidad de material en el procedimiento. Sería necesario afinar la composición del gradiente de sacarosa para aumentar su eficiencia, lo que demuestra que, aunque *P. radiata* y *P. pinaster* sean especies del mismo género, los protocolos existentes no son directamente trasladables entre ellas.

Aunque el gradiente de sacarosa mejore considerablemente el enriquecimiento de la fracción de núcleos, reduce demasiado el rendimiento de proteína, no alcanzando la cantidad total (6 µg de los 4g de acícula) el mínimo deseable para la realización solvente de un análisis proteómico mediante espectrometría de masas LC-MS/MS (10 µg) (Alegre et al., 2016; Pascual et al., 2017). Por otra parte, la fracción de cloroplastos no se vio favorecida ni en enriquecimiento, ya que no disminuyó la presencia de núcleos, ni en rendimiento de proteína, que pasó de 109,4 µg/g de acícula en el gradiente de Percoll a 11,2 µg/g de acícula tras el paso por el gradiente de sacarosa.

No obstante, antes de descartar definitivamente el uso del gradiente de sacarosa se intentó mejorar el rendimiento de proteína añadiendo NP40 a las fases del gradiente. Este agente surfactante se utiliza en la mayoría de los tampones de lisis celular de los protocolos estándar para favorecer la solubilización de las proteínas. El inconveniente de usarlo para el propósito del fraccionamiento de orgánulos intactos es que compromete la integridad de los cloroplastos y, según un artículo, potencialmente también la de los núcleos al permeabilizar la membrana (Holden & Horton, 2009). Aprovechando el inconveniente, se pensó que al añadir NP40 a la fracción de núcleos, este podría romper las membranas de los cloroplastos y al estar más fragmentados se esperaba que se separen mejor de los núcleos por diferencia de densidad. Por lo tanto, se probó a repetir los gradientes sólo en la fracción de núcleos con NP40 para compararlo con el anterior resultado sin NP40. Lo que se vio fue que, la adición de NP40 no mejoró el enriquecimiento de la fracción F1, que ya era bueno sin la adición de NP40 (figura 4), pero sí aumentó el rendimiento de proteína hasta 5 veces (figura 5). Comparando ambas imágenes de microscopía se puede observar una mayor cantidad de núcleos intactos por área cuando se usó NP40, lo cual encaja con que de ahí se extrajeran más proteínas. Sin embargo, es difícil determinar exactamente cómo el NP40 influyó en esto, ya que si efectivamente el NP40 permeabilizó las membranas nucleares (Holden & Horton, 2009), estos no estarían intactos.

Considerando que las ventajas de utilizar el gradiente de sacarosa sólo beneficiaron a la fracción de núcleos de forma parcial, se decidió continuar con nuevas optimizaciones sobre el gradiente de Percoll, ya que lo ideal sería conseguir que el protocolo conste de un único fraccionamiento. No obstante, este resultado pudo servir de registro para continuar desarrollando el método en caso de que el gradiente de Percoll no lograra adaptarse a los objetivos del trabajo.

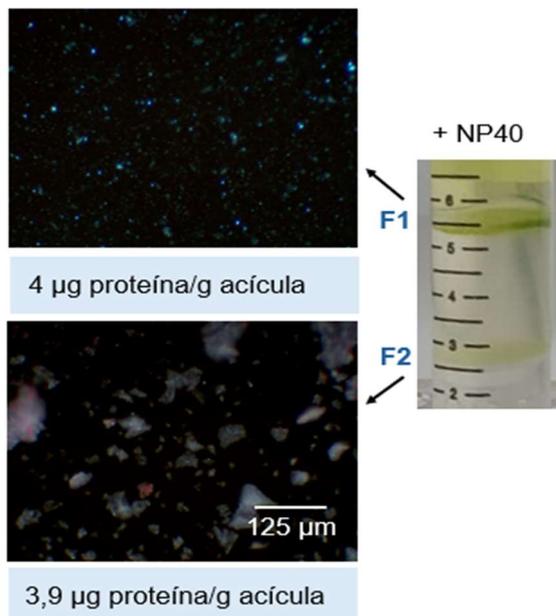


Figura 5. Microscopía de fluorescencia de las fracciones F1 y F2 de núcleos del gradiente de sacarosa con NP40. Las fracciones se tiñeron con DAPI para la visualización de los núcleos. Se usó el aumento 20x. Los núcleos se ven en azul por la tinción DAPI, con una longitud de onda de excitación a 330-380 nm, y de emisión a 420 nm.

3.4. La reducción de la intensidad de homogeneizado y el doble filtrado equipara la calidad del fraccionamiento en gradiente de Percoll al de sacarosa, sin perder rendimiento de proteína

Finalmente, en el proceso de optimización se probaron dos últimas modificaciones con el fin de mejorar la limpieza y el enriquecimiento de las fracciones, ya que el gradiente de sacarosa no demostró ser una alternativa plausible en términos de rendimiento de proteína. Para ello, se redujo la intensidad de homogeneizado en el rotor-estator y la cantidad de tampón de aislamiento de orgánulos añadido se redujo a 3 ml por gramo de acícula, dejando una consistencia espesa en el homogeneizado. Adicionalmente, el homogeneizado se filtró dos veces consecutivas pasándolo por tres capas de muselina con la idea de eliminar más restos celulares. Cuando se analizaron las fracciones por microscopía de fluorescencia se vio que, sorprendentemente, la fracción de núcleos alcanzó un grado de enriquecimiento comparable al obtenido cuando se empleó el gradiente de sacarosa (figura 6). La fracción de cloroplastos también quedó más limpia de restos celulares en comparación con las dos primeras pruebas de fraccionamiento, pero no se logró reducir la abundancia de núcleos que se aprecia en todas las pruebas.

Con esta última optimización aplicada sobre el gradiente de Percoll, el rendimiento total de proteína, a partir de 4 g de acícula iniciales, es de 119 µg de proteína nuclear, 606 µg de proteína cloroplástica y 14 µg de proteína mitocondrial, cantidades suficientes para realizar análisis proteómicos mediante LC-MS.

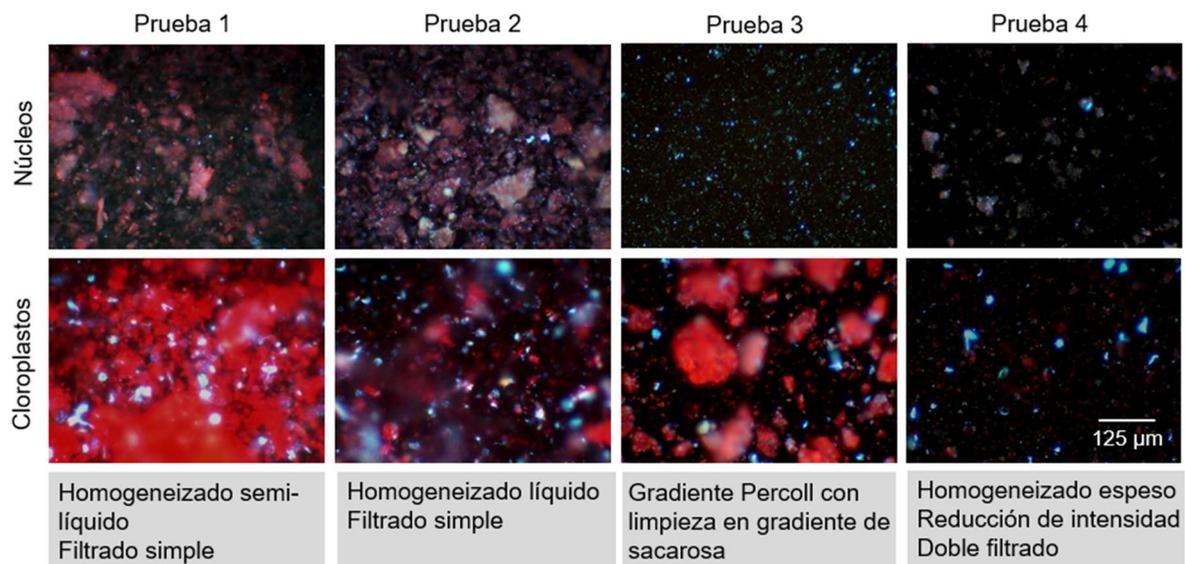


Figura 6. Comparación de la limpieza y el rendimiento de las fracciones de núcleos y cloroplastos en las sucesivas pruebas de optimización. Las fracciones caracterizadas por microscopía de fluorescencia procedieron de la prueba indicada y están ordenadas de izquierda a derecha, de la más antigua a la más reciente en el proceso de optimización del protocolo. Todas las fracciones se tiñeron con DAPI para la visualización de los núcleos. Se usó el aumento 20x. Los núcleos se ven en azul por la tinción DAPI, con una longitud de onda de excitación a 330-380 nm, y de emisión a 420 nm. Los cloroplastos se ven en rojo por autofluorescencia de la clorofila, con una longitud de onda de excitación a 510-560 nm, y de emisión a 590 nm.

3.5. El estado del material de partida, fresco o congelado, no afecta significativamente al enriquecimiento y el rendimiento del fraccionamiento

En todas las pruebas realizadas para optimizar el fraccionamiento se utilizó como material de partida acícula fresca, debido a que, si bien el material vegetal puede ser tanto fresco como congelado, se considera en general preferible que sea fresco para obtener una mejor purificación y por consiguiente, un mejor rendimiento de proteína (Lamelas et al., 2020). Sin embargo, con el fin de facilitar el muestreo en los ensayos de estrés para los que se usará el protocolo, sería conveniente saber si el hecho de congelar las acículas reduce significativamente el enriquecimiento o el rendimiento de las fracciones de *P. pinaster*. Para ello, se hicieron dos fraccionamientos, partiendo de 4 gramos de acícula fresca o congelada, y se comparó el perfil de proteínas y el rendimiento en la fracción de cloroplastos.

Los resultados indicaron que el perfil de proteínas en la fracción de cloroplastos no se ve afectado por el uso de acícula fresca o congelada (figura 7). Además, el rendimiento en la misma fracción fue de 250,19 μg de proteína/g acícula fresca y de 330,25 μg de proteína/g acícula congelada, manteniéndose en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, aunque siempre que sea posible es preferible usar material fresco para hacer el fraccionamiento, podrían congelarse las acículas sin grandes preocupaciones si ello supone facilitar el desarrollo experimental.

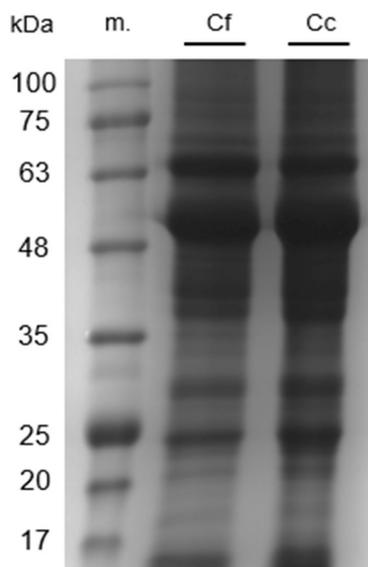


Figura 7. Perfil de proteínas de las fracciones de cloroplastos partiendo de acícula fresca y congelada. Cf, cloroplastos aislados de acícula fresca. Cc, cloroplastos aislados de acícula congelada. Gel SDS-PAGE con tinción Coomassie.

3.6. Las fracciones subcelulares presentan un perfil diferencial de proteínas

El interés de la proteómica subcelular parte de la base de que el proteoma de los compartimentos celulares es diferente, reflejando la función de los orgánulos, la dinámica y el tráfico de proteínas, y en última instancia, la especialización de las funciones celulares (Harvey Millar & Taylor, 2014). Por este motivo, se caracterizaron las diferentes fracciones a nivel de proteína mediante electroforesis SDS-PAGE, pues lo esperable es que las diferencias a nivel de proteoma se reflejen en patrones de banda distintivos entre las muestras.

Los resultados de este análisis con las muestras de la primera prueba de fraccionamiento mostraron que existen diferencias a nivel del proteoma entre las diferentes fracciones subcelulares (figura 8), lo cual es indicativo de que las fracciones aisladas difieren de la fracción de partida y, en combinación con la caracterización de las fracciones mediante técnicas de microscopía, de que están enriquecidas en los diferentes orgánulos. Destacó una banda prominente de aproximadamente 50 kDa en las fracciones de núcleos y cloroplastos, que coincide con el tamaño de 51,86 kDa de la subunidad grande de RuBisCO (RBCL) de *P. pinaster* (ref. Uniprot C3W2K1). La contaminación es inevitable durante el proceso de fraccionamiento y las metodologías actuales no permiten eliminarla, por lo que el objetivo del trabajo es enriquecer las fracciones en los orgánulos deseados. Sin embargo, en este análisis vemos que además la banda de RBCL es más intensa en la fracción de núcleos que en la de cloroplastos (figura 8A). La fracción de núcleos podría estar enriquecida en núcleos con respecto a la fracción inicial de proteína total, el inconveniente es que este resultado indica que también se enriqueció en cloroplastos, lo cual es coherente con lo que se observó al microscopio, donde la cantidad de cloroplastos sobrepasaba a la cantidad de núcleos en la fracción de núcleos (figura 1C). En las fracciones mitocondriales (figura 8A), la falta de banda de RBCL podría deberse a que no había muchos cloroplastos como se observó mediante microscopía (figura 1C), o a que la cantidad de proteína cargada (3 µg) estaba por debajo del límite de detección de la tinción Coomassie.

En una segunda caracterización del perfil de proteínas de las fracciones de la cuarta prueba, en la que se redujo el volumen de tampón de aislamiento y la intensidad del homogeneizado junto con la realización de un doble filtrado del mismo, se cargó adicionalmente proteína total de *P. pinaster* y de *A. thaliana* con el fin de tener un control de proteína total con el que comparar los perfiles de proteína subcelulares (figura 8B). Se observó de nuevo la banda correspondiente a RuBisCO. El control de *A. thaliana* reafirma que se trata de esta proteína, conservando esta especie un tamaño de la subunidad RCBL de 52,95 kDa (ref. Uniprot O03042), que también se observa en *P. pinaster*. Una vez más, la presencia de RuBisCO en la fracción de núcleos señala la contaminación por cloroplastos, no obstante, su intensidad indica que se logró enriquecer la fracción de núcleos, ya que, cargando la misma cantidad de proteína por muestra, la banda es más intensa en cloroplastos que en núcleos (figura 8B), a diferencia de lo que ocurrió con las muestras de la primera prueba (figura 8A). Por lo tanto, la implementación de las variaciones de la cuarta prueba sobre el protocolo de referencia de fraccionamiento en gradiente de Percoll permitió mejorar el enriquecimiento de las fracciones de núcleos y cloroplastos.

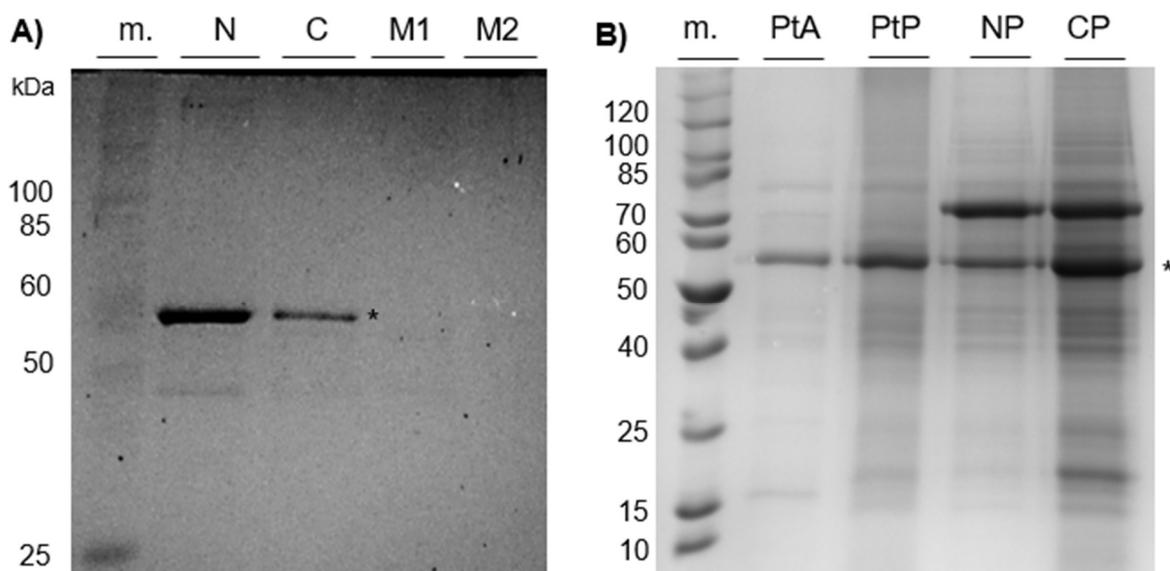


Figura 8. Perfil de proteínas totales de diferentes fracciones subcelulares aisladas del gradiente de Percoll. Geles SDS-PAGE teñido con azul Coomassie. **A)** Proteínas extraídas de las diferentes fracciones aisladas del gradiente Percoll en la primera prueba. N, núcleos; C, cloroplastos; M1, mitocondrias de la interfase superior; M2, mitocondrias de la interfase inferior. **B)** Proteínas extraídas de las diferentes fracciones aisladas del gradiente Percoll en la cuarta prueba. PtA, proteína total de *Arabidopsis*; PtP, proteína total de *P. pinaster*; NP, núcleos del gradiente Percoll; CP, cloroplastos del gradiente Percoll. m. indica el marcador de peso molecular (kDa). Los asteriscos señalan la banda correspondiente a la proteína RBCL.

3.7. La fracción mitocondrial está enriquecida en mitocondrias

A lo largo del proceso de optimización del protocolo, la fracción mitocondrial siempre ha sido aparentemente la de menor presencia de núcleos y cloroplastos (figuras 1C y 3), pero con el rendimiento de proteína más bajo (2,6 µg/g de acícula). Hasta ahora, sólo la microscopía confocal (figura 2) permitió demostrar la presencia de mitocondrias en esta fracción. Con este fin, se hizo un ensayo de inmunodetección utilizando el anticuerpo α -

ACONITASA, (ACO), de la isoforma mitocondrial que participa en el ciclo del ácido cítrico (Moeder et al., 2007).

Una de las desventajas de trabajar con organismos no modelo es que hay menos anticuerpos comerciales disponibles, y el anticuerpo usado no estaba probado en *P. pinaster*. El exceso de bandas indicó que hubo reconocimientos inespecíficos (figura 9), pero en la muestra correspondiente a las mitocondrias del fraccionamiento Percoll (MP) aparece una banda que no está presente en las demás y que se corresponde con el tamaño de 40,72 kDa de un fragmento de la enzima aconitasa en *P. pinaster* (ref. Uniprot E3V291). Este resultado encaja con las observaciones anteriores de la fracción mitocondrial y podría indicar tanto la ausencia de contaminación por mitocondrias en las otras fracciones como la presencia de mitocondrias en la fracción mitocondrial. En combinación con la tinción MitoTracker observada mediante microscopía confocal (figura 2), permite afirmar que la fracción mitocondrial está enriquecida. Aunque el rendimiento en proteína sea bajo, una cantidad total de 14 µg de proteína mitocondrial es suficiente para hacer proteómica mediante análisis LC-MS según la experiencia del grupo en el que se realiza este trabajo.

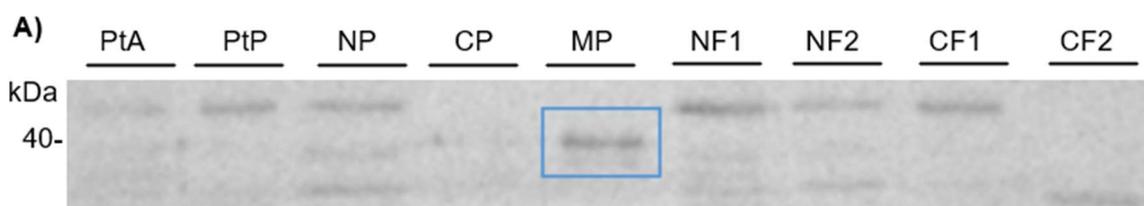


Figura 9. Inmunodetección de la enzima mitocondrial aconitasa. Membrana de western blot incubada con α -ACO. PtA, proteína total de *A. thaliana*; PtP, proteína total de *P. pinaster*; NP, fracción de núcleos del gradiente Percoll; CP, fracción de cloroplastos del gradiente Percoll; MP, fracción de mitocondrias del gradiente Percoll; NF1, núcleos de la interfase superior del gradiente de sacarosa; NF2, núcleos de la interfase inferior del gradiente de sacarosa; CF1, cloroplastos de la interfase superior del gradiente de sacarosa; CF2, cloroplastos de la interfase inferior del gradiente de sacarosa. Se cargaron 12 µg de proteína de todas las muestras.

4. CONCLUSIONES

- Mediante el protocolo desarrollado en este trabajo, se han logrado aislar secuencialmente núcleos, cloroplastos y mitocondrias partiendo de acículas de la misma muestra en la especie *P. pinaster*.
- El fraccionamiento empleando gradientes de Percoll ha resultado ser el más adecuado en términos de enriquecimiento y rendimiento.
- El protocolo desarrollado demostró ser adecuado tanto para material vegetal de partida fresco como congelado.
- El rendimiento en proteína obtenido de las fracciones enriquecidas en núcleos, cloroplastos y mitocondrias es suficiente para realizar análisis proteómicos mediante LC-MS.

Como perspectiva a futuro, el protocolo optimizado permitirá analizar el subproteoma de diferentes orgánulos aislados simultáneamente y partiendo de la misma muestra, lo que facilitará integrar los datos proteómicos generados a partir de las distintas fracciones evitando sesgos. De esta manera será posible generar un conocimiento más completo acerca de las dinámicas intracelulares en respuesta a estrés de *P. pinaster*.

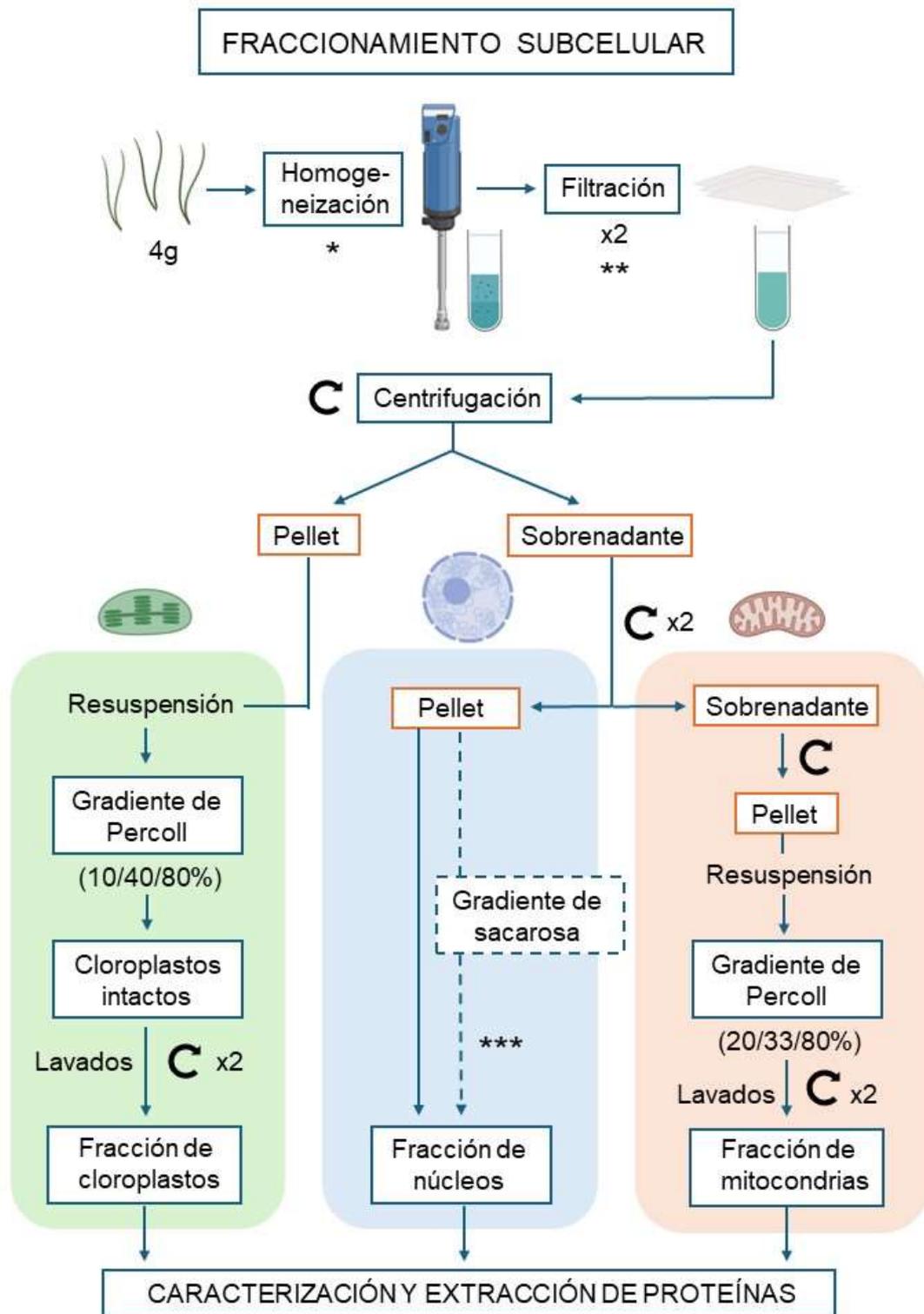


Figura 10. Representación del flujo de trabajo optimizado y adaptado a *P. pinaster* para el fraccionamiento subcelular. *En el homogeneizado es crítico añadir un volumen adecuado de tampón de aislamiento de orgánulos de 5 ml/g de acícula. **La filtración del homogeneizado se optimiza si se repite dos veces y se utilizan 3 capas de muselina. ***El gradiente de sacarosa es un paso opcional, si se quiere mejorar la limpieza de la fracción de núcleos a costa de disminuir su rendimiento.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegre, S., Pascual, J., Nagler, M., Weckwerth, W., Cañal, M. J., & Villedor, L. (2016). Dataset of UV induced changes in nuclear proteome obtained by GeLC-Orbitrap/MS in *Pinus radiata* needles. *Data in Brief*, 7, 1477-1482. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.03.074>
- Baginsky, S., Kleffmann, T., von Zychlinski, A., & Gruissem, W. (2005). Analysis of Shotgun Proteomics and RNA Profiling Data from *Arabidopsis thaliana* Chloroplasts. *Journal of Proteome Research*, 4(2), 637-640. <https://doi.org/10.1021/pr049764u>
- Bardou, F., Ariel, F., Simpson, C. G., Romero-Barrios, N., Laporte, P., Balzergue, S., Brown, J. W. S., & Crespi, M. (2014). Long Noncoding RNA Modulates Alternative Splicing Regulators in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 30(2), 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.06.017>
- Chen, X., Li, J., Hou, J., Xie, Z., & Yang, F. (2010). Mammalian mitochondrial proteomics: Insights into mitochondrial functions and mitochondria-related diseases. En *Expert Review of Proteomics* (Vol. 7, Número 3, pp. 333-345). <https://doi.org/10.1586/epr.10.22>
- Dobrogojski, J., Adamiec, M., & Luciński, R. (2020). The chloroplast genome: a review. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(6), 98. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03089-x>
- Fang, X., Zhao, G., Zhang, S., Li, Y., Gu, H., Li, Y., Zhao, Q., & Qi, Y. (2019). Chloroplast-to-Nucleus Signaling Regulates MicroRNA Biogenesis in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 48(3), 371-382.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.046>
- García-Campa, L., Guerrero, S., Lamelas, L., Meijón, M., Hasbún, R., Cañal, M. J., & Villedor, L. (2022). Chloroplast proteomics reveals transgenerational cross-stress priming in *Pinus radiata*. *Environmental and Experimental Botany*, 202. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.105009>
- Harfouche, A., Meilan, R., & Altman, A. (2014). Molecular and physiological responses to abiotic stress in forest trees and their relevance to tree improvement. *Tree Physiology*, 34(11), 1181-1198. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu012>
- Harvey Millar, A., & Taylor, N. L. (2014). Subcellular proteomics-where cell biology meets protein chemistry. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Número FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00055>
- Holden, P., & Horton, W. (2009). Crude subcellular fractionation of cultured mammalian cell lines. *BMC Research Notes*, 2. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-243>
- Khaine, I., & Woo, S. Y. (2015). An overview of interrelationship between climate change and forests. *Forest Science and Technology*, 11(1), 11-18. <https://doi.org/10.1080/21580103.2014.932718>
- Kodama, Y. (2016). Time gating of chloroplast autofluorescence allows clearer fluorescence imaging in planta. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152484>

- Lamelas, L., García, L., Cañal, M. J., & Meijón, M. (2020). *Subcellular Proteomics in Conifers: Purification of Nuclei and Chloroplast Proteomes* (pp. 69-78). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0528-8_5
- Lamelas, L., López-Hidalgo, C., Valledor, L., Meijón, M., & Cañal, M. J. (2024). Like mother like son: Transgenerational memory and cross-tolerance from drought to heat stress are identified in chloroplast proteome and seed provisioning in *Pinus radiata*. *Plant, Cell & Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.14836>
- Lamelas, L., Valledor, L., López-Hidalgo, C., Cañal, M. J., & Meijón, M. (2022). Nucleus and chloroplast: A necessary understanding to overcome heat stress in *Pinus radiata*. *Plant Cell and Environment*, *45*(2), 446-458. <https://doi.org/10.1111/pce.14238>
- Lang, E. G. E., Mueller, S. J., Hoernstein, S. N. W., Porankiewicz-Asplund, J., Vervliet-Scheebaum, M., & Reski, R. (2011). Simultaneous isolation of pure and intact chloroplasts and mitochondria from moss as the basis for sub-cellular proteomics. *Plant Cell Reports*, *30*(2), 205-215. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0935-4>
- Lee, C. P., Taylor, N. L., & Millar, A. H. (2013). Recent Advances in the Composition and Heterogeneity of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome. *Frontiers in Plant Science*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00004>
- Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, *529*(7584), 84-87. <https://doi.org/10.1038/nature16467>
- Locato, V., Cimini, S., & De Gara, L. (2018). ROS and redox balance as multifaceted players of cross-tolerance: epigenetic and retrograde control of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, *69*(14), 3373-3391. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery168>
- Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Giegé, P., & Leaver, C. J. (2001). Analysis of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome. *Plant Physiology*, *127*(4), 1711-1727. <https://doi.org/10.1104/pp.010387>
- Moeder, W., Del Pozo, O., Navarre, D. A., Martin, G. B., & Klessig, D. F. (2007). Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, *63*(2), 273-287. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9087-x>
- Neale, D. B., & Kremer, A. (2011). Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics*, *12*(2), 111-122. <https://doi.org/10.1038/nrg2931>
- Pascual, J., Canal, M. J., Escandon, M., Meijon, M., Weckwerth, W., & Valledor, L. (2017). Integrated physiological, proteomic, and metabolomic analysis of ultra violet (UV) stress responses and adaptation mechanisms in *pinus radiata*. *Molecular and Cellular Proteomics*, *16*(3), 485-501. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.059436>
- Pascual, J., Rahikainen, M., Angeleri, M., Alegre, S., Gossens, R., Shapiguzov, A., Heinonen, A., Trotta, A., Durian, G., Winter, Z., Sinkkonen, J., Kangasjarvi, J.,

- Whelan, J., & Kangasjarvi, S. (2021). ACONITASE 3 is part of the ANAC017 transcription factor-dependent mitochondrial dysfunction response. *Plant Physiology*, *186*(4), 1859-1877. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab225>
- Pastori, G. M., & Foyer, C. H. (2002). Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiology*, *129*(2), 460-468. <https://doi.org/10.1104/pp.011021>
- Pfannschmidt, T., Terry, M. J., Van Aken, O., & Quiros, P. M. (2020). Retrograde signals from endosymbiotic organelles: a common control principle in eukaryotic cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *375*(1801), 20190396. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0396>
- Ravichandran, S., Ragupathy, R., Edwards, T., Domaratzki, M., & Cloutier, S. (2019). MicroRNA-guided regulation of heat stress response in wheat. *BMC Genomics*, *20*(1), 488. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5799-6>
- Richardson, L. G. L. (2019). Decoding Natural Variation in Chloroplast Size. *Plant Physiology*, *181*(3), 840-842. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01159>
- Shahzad, A., Ullah, S., Afzal, & Dar, A., Fahad Sardar, M., Mehmood, T., Tufail, M. A., Shakoor, A., & Haris, M. (2021). Nexus on climate change: agriculture and possible solution to cope future climate change stresses. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*, 14211-14232. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12649-8>/Published
- Tarnowski, B. 1, Spinale, F. G., & Nicholson, J. H. (1991). *DAPI as a Useful Stain for Nuclear Quantitation*.
- The impact of disasters on agriculture and food security 2023. (2023). En *The impact of disasters on agriculture and food security 2023*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc7900en>
- Unal, D., García-Caparrós, P., Kumar, V., & Dietz, K.-J. (2020). Chloroplast-associated molecular patterns as concept for fine-tuned operational retrograde signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *375*(1801), 20190443. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0443>
- Zhao, X., Huang, J., & Chory, J. (2020). Unraveling the Linkage between Retrograde Signaling and RNA Metabolism in Plants. En *Trends in Plant Science* (Vol. 25, Número 2, pp. 141-147). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.10.009>