

los sistemas de absorción K⁺. Para evitar el efecto tóxico del Na⁺ en el citosol las células vegetales presentan mecanismos de extrusión del Na⁺ a través de la membrana plasmática y de retención de este catión en el compartimento pre-vacuolar o vacuolar. Estudios previos llevados a cabo en levadura mostraron que Vnx1, un antiportador de la familia CAX, tiene un papel importante en la acumulación de Na⁺ y K⁺ en la vacuola. Los mutantes vnx1Δ mostraban una pérdida total de actividad de antiporte Na⁺(K⁺)/H⁺ a nivel de membranas vacuolares aisladas. Sin embargo, al cambiar las condiciones experimentales, hemos demostrado la existencia de actividad antiportadora K⁺/H⁺ en esta fracción, aunque esta actividad fue mucho menor que la detectada para Vnx1p. Analizando mutantes con disrupciones en genes candidatos para esta actividad hemos identificado Vcx1p como responsable del transporte de potasio. El uso de la levadura como un organismo eucariota modelo, señala claramente el papel de dos intercambiadores Ca²⁺/H⁺ (CAX) en la acumulación de potasio y sodio en la vacuola. Puesto que ambos intercambiadores Ca²⁺/H⁺ son los principales responsables del transporte de Na⁺ y K⁺ en vacuolas, los mutantes vnx1Δvcx1Δ proporcionan una herramienta importante para la expresión heteróloga y la caracterización funcional de antiportadores de plantas. En plantas, también se obtuvieron pruebas indicativas de que algunos miembros de la familia CAX podrían estar involucrados en la homeostasis de iones alcalinos. Así, estudios preliminares de caracterización funcional de transportadores CCXs de *A.thaliana* utilizando mutantes de levadura sensibles a altas concentraciones de iones (Ca²⁺, K⁺, o Na⁺) demuestran que, contrariamente a resultados previamente publicados, AtCCX3 es responsable de la acumulación de Na⁺, pero no de K⁺, en vacuolas. Actualmente estamos intentando confirmar estos resultados, midiendo el transporte catalizado por AtCCX3 en vacuolas aisladas de las levaduras mutantes nhx1Δvnx1Δvcx1Δ.

P 05-004: UN SISTEMA DE CHAPERONAS CLOROPLASTÍDICAS PROTEGE AL PRINCIPAL ENZIMA DE LA RUTA DEL MEP

Pulido Gómez, P. - Rodríguez Concepcion, M.
Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG)

Las Hsp70s constituyen una familia de chaperonas moleculares que participan en multitud de procesos tales como plegamiento de proteínas de novo, replegamiento de proteínas que han perdido su conformación nativa, disolución de agregados o translocación de proteínas a orgánulos. Si bien en bacterias existe un amplio número de sustratos conocidos de Hsp70, en plantas apenas se conocen unos pocos candidatos.

La 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) es el primer enzima de la ruta del MEP para la biosíntesis de isoprenoides en el cloroplasto. DXS constituye uno de los puntos principales de regulación de la ruta existiendo una buena correlación entre los niveles de DXS y los niveles de isoprenoides plastídicos como carotenoides y clorofilas. DXS está sometida a una fuerte regulación postranscripcional, hecho que nos llevó a realizar estudios de doble híbrido para encontrar posibles factores implicados en *Arabidopsis thaliana*. Una de las proteínas de encontradas con un péptido de tránsito a plastos fue DXI1 (DXS-interacting factor 1). A pesar de que análisis de western-blot muestran un acúmulo de DXS en el mutante dxi1-1 de *Arabidopsis*, es probable que la proteína acumulada sea inactiva como sugiere la mayor sensibilidad del mutante a clomazona (CLM), un inhibidor específico de DXS. Además, la velocidad de degradación de DXS tras un choque térmico está incrementada en ausencia de DXI1, lo que sugiere que la proteína protege a DXS frente a situaciones de estrés. DXI1 tiene un dominio J y se ha descrito que las proteínas con este dominio actúan como cofactores de las Hsp70 uniendo y transportando los sustratos desnaturalizados siendo, por tanto, el factor que da especificidad al sistema. Mutantes de *Arabidopsis* para las dos isoformas cloroplastídicas de Hsp70 también mostraron sensibilidad a CLM y mayor

acúmulo de DXS. Para el correcto funcionamiento del sistema que forman las chaperonas Hsp70 a su vez es imprescindible la presencia de un intercambiador de nucleótidos denominado GrpE, que facilita la salida del ADP y permite la liberación del sustrato una vez plegado. Un mutante para una isoforma cloroplastídica, grpE1-1, mostró un fenotipo similar a dxi1-1 y a los mutantes de Hsp70 en presencia de CLM, corroborando que el sistema actúa coordinadamente en el cloroplasto.

P 05-005: SINGLET OXYGEN TRIGGERS PROGRAMMED CELL DEATH RESPONSE IN ARABIDOPSIS CELL CULTURE UNDER HIGH LIGHT CONDITIONS

Arellano, J.¹ -González Pérez, S.¹ -García García, F.² -Revuelta Doval, J.L.¹

¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC)

² Functional Genomics Node, INB. Centro de Investigación Príncipe Felipe

The transcriptional profile of *Arabidopsis* cell suspension culture under high light conditions reveals the activation of a genetic defence response that notably coincides with published transcriptional profiles of whole plants exposed to a variety of adverse external stimuli (pathogen attack, wounding, drought, etc.). The oxygen evolution rate, the chlorophyll a/b ratio and the quantum efficiency of primary photochemical reactions indicate that chloroplasts are active and functional organelles in *Arabidopsis* cell suspension culture. After the dark/high light transition, the analysis of the differential expression by means of Limma and SAM packages shows statistically significant changes in the expression of approximately 300 genes; most of which are upregulated and very few downregulated. The functional genomic analysis by FatiGo and FatiScan (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>) unveils some of the key components of a general ROS signalling transduction pathway, namely, the generation of calcium signals, the activation of several phospholipases and kinases, and the induction of a list of transcription factors that regulate ROS scavenging. There was no evidence for any increase in ROS signalling involving NADPH oxidases; instead, interplay between singlet oxygen and ethylene is reflected based on the upregulation of a few singlet-oxygen responsive genes such as BAP1 and genes encoding for ethylene-responsive element-binding factors and redox-responsive transcription factors (i.e. ERF and AP2). The results indicate that chloroplasts of *Arabidopsis* cell culture suspension are effective sensors of adverse external conditions leading to the activation of a wide range of genetic defence responses and that chloroplast-to-nucleus retrograde signalling must play a key role in the initial steps of the genetic response to stress. The ROS signalling network activated by high light in *Arabidopsis* cell suspension culture starts with the perception of the over-reduction of the photosynthetic electron transport chain and the prompt generation of singlet oxygen at the heart of photosystem II. Finally, we suggest that the integration of singlet oxygen and ethylene signalling pathways can co-regulate a programmed cell death in *Arabidopsis* cell suspension culture.

P 05-006: ESTUDIO DE LA SEÑALIZACIÓN POR AS (V) EN ARABIDOPSIS THALIANA

Castrillo Molina, G. -Pablo Catarecha Zoido, P. -Eduardo Sánchez Bermejo, E.

Leo Del Puerto, Y. -Leyva Tejada, A.
Centro Nacional de Biotecnología-CSIC

En los suelos, el arsénico se encuentra fundamentalmente en forma de arseniato [As(V)] (Tamaki and Frankenberger, 1992; Brown et al., 1999). Debido a su similitud química con el fosfato (Pi), el As(V) es excepcionalmente tóxico para las plantas ya que se incorpora