

REPUBLICA ARGENTINA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

CÁTEDRA DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Biogénesis Mitocondrial en Plantas
Mecanismos de Expresión de Genes Nucleares que Codifican
Componentes de la Cadena Respiratoria

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTORA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Autora: Bioq. Elina Welchen
Director: Dr. Daniel H. Gonzalez

2005

A mis Padres

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Postgrado de la Cátedra de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Litoral. La gran mayoría de los resultados presentados en este trabajo manuscrito han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a Congresos:

Publicaciones en Revistas Internacionales con Referato Estricto:

- ❖ **Welchen, Elina**; Chan, Raquel and Gonzalez, Daniel. (2002) Metabolic Regulation of Genes Encoding Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Oxidase Subunit Vb in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*. 25, 1605-1615.
- ❖ Curi, Graciela; **Welchen, Elina**; Chan, Raquel and Gonzalez, Daniel. (2003) Nuclear and mitochondrial genes encoding cytochrome *c* oxidase subunits respond differently to the same metabolic factors. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41, 689-693.
- ❖ **Welchen, Elina**; Chan, Raquel and Gonzalez, Daniel. (2004) The promoter of the Arabidopsis nuclear gene *cox5b-1*, encoding subunit 5b of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase, directs tissue-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 55, No. 405, 1997–2004.
- ❖ **Welchen, Elina** and Gonzalez, Daniel H. (2005) Differential Expression of the *Arabidopsis* Cytochrome *c* Genes *cytc-1* and *cytc-2*: Evidence for the Involvement of TCP-Domain Protein Binding Elements in Anther- and Meristem-Specific Expression of the *cytc-1* Gene. *Plant Physiology* 139, 88-100.

Trabajos presentados en congresos Nacionales e Internacionales:

- Gonzalez, Daniel; Chan, Raquel; Curi, Graciela; Felitti, Silvina; Ribichich Karina; Tioni, Mariana y **Welchen, Elina**. "Biogénesis mitocondrial en plantas: expresión de genes nucleares que codifican componentes de la cadena respiratoria". XXX Congreso Argentino de Genética. IV Jornadas Argentino-Uruguayas de Genética. Mar del Plata. 16-19 de setiembre de 2001. Organizado

por la Sociedad Argentina de Genética. Journal of Basic and Applied Genetics(2001), número XIV , supl 2, pág.27.

- **Welchen, Elina;** Chan, Raquel L.; and González, Daniel H. "Metabolic Regulation of Genes Encoding Cytochrome *c* and Cytochrome *c* Oxidase Subunit Vb in Arabidopsis". XXXVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz. Córdoba.20-23 de noviembre de 2001.Organizado por la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. BIOCELL 25(2): 30 (abstract).
- **Welchen, Elina;** Chan, Raquel L.; Gonzalez, Daniel H. "Functional analysis of promoters of genes encoding components of the plant mitochondrial respiratory chain". XXXVIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz. Córdoba. 5-9 de noviembre de 2002. Organizado por la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. BIOCELL. 26(3): 46 (abstract).
- **Welchen, Elina;** Viola, Ivana; Chan, Raquel; Gonzalez, Daniel H. "Análisis of the cytochrome *c* promoters from Arabidopsis". XL Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Iguazú. Misiones. 5-8 de diciembre de 2004. Organizado por la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. BIOCELL 28(1): 44 (abstract).
- **Welchen, Elina;** Gonzalez, Daniel H. "Expression of the *Arabidopsis thaliana* cytochrome *c* gene *cytc-1* in anthers and meristems is controlled by TCP-domain protein binding elements and an internal telomeric repeat". International Congress on Plant Mitochondrial Biology. ICPMB 2005. Obernai, Francia. 28 de mayo al 2 de junio de 2005. Organizado por la Societé Francaise de Biologie Végétale. Resumen del trabajo publicado en el libro de Resúmenes del Congreso, Pág. P36.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer muy especialmente al Dr Daniel Gonzalez y a la Dra Raquel Chan por haberme abierto las puertas de su laboratorio y haberme permitido cumplir con esta etapa tan importante para mi formación. Por haber confiado en mí y haberme ayudado tanto, sobre todo en los primeros momentos en los que las cosas parecían más que inciertas. Por la gran dedicación al trabajo y por el firme compromiso en la mejor formación de la buena gente que forma parte del laboratorio.

Al Dr Daniel Gonzalez, por su enorme generosidad y paciencia, por brindarme su tiempo y sus conocimientos, por su confianza y por darme la oportunidad de crecer día a día.

A la Dra Raquel Chan, por su ejemplo de trabajo y dedicación permanentes, por el afecto que me ha demostrado siempre, por sus consejos acertados, su permanente colaboración y su siempre buena predisposición para atender a todas mis inquietudes y necesidades.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, institución en la que he recibido mi formación de grado y que también me permitió cumplir con esta etapa de formación de postgrado. Recuerdo cuando ingresé por primera a esta facultad con muchos miedos y una gran incertidumbre, entre otras cosas. Hoy solo siento felicidad por los hermosos y gratificantes momentos que viví aquí, por las valiosas personas que por suerte encontré y de las que recibí excelente formación tanto académica como "para la vida". Gracias a la Dra Mabel Aleanzi, tu ejemplo como docente hizo que me acercara a vos para transmitirte mis inquietudes, y quizás tu buena predisposición y la oportunidad que me diste en aquel momento hayan marcado el inicio de este camino, que ojalá pueda continuar. Gracias al Dr Víctor Mantovani, por su tiempo y sus consejos, por preocuparse tanto por brindar la mejor calidad de enseñanza a sus alumnos y por todo el aprendizaje que me lleve durante la pequeña experiencia docente que tuve en su cátedra. Gracias a la excelente docente Marta Fuentes, siempre voy a recordar tu ayuda y dedicación invaluable.

Al Dr Juan Clauss, por su siempre buena predisposición y el tiempo invertido en atender a las necesidades ajenas. Por su interés en que esta facultad pueda brindarle la mejor formación posible a sus doctorando.

A todos los integrantes del laboratorio de postgrado de la cátedra de biología celular y molecular. A los que me recibieron y me integraron a su grupo de trabajo y con los que compartí los primeros momentos, quizás los más difíciles:

A Claudia, por tu calidez y enorme generosidad, porque a pesar de que compartimos poco tiempo de trabajo juntas, supiste contagiarme tu espíritu de trabajo y esfuerzo.

A Silvina, por tu paciencia, tus consejos y todo el tiempo que me brindaste para enseñarme técnicas y transmitirme experiencias. Por tu alegría, optimismo y el enorme afecto que me diste.

A Gabi, por toda la ayuda que me brindaste tanto en lo laboral como en lo personal. Por tu gran corazón y tu afecto, por los lindos momentos de esparcimiento que compartimos y que espero siempre puedan existir, aun a pesar de la distancia.

A Mariana, fuiste una persona muy importante y especial en mi vida, con la que compartí muchas horas de trabajo y otros preciosos e inolvidables momentos. Nunca voy a olvidar tu apoyo, tu compañerismo, tus palabras de aliento y tu enorme calidez.

A Adriana, gracias por tu ejemplo de trabajo incansable y por tu esfuerzo, por tu optimismo y tu ansia y espíritu de superación con el que nos contagiaste a todos.

A mis compañeros actuales y algunos verdaderos amigos con los que comparto muchas horas de mis días tratando de que las cosas funcionen de la mejor manera posible:

En primer lugar y no casualmente, quiero agradecerte a vos Graciela. No encuentro las palabras que expresen mi enorme gratitud. Porque fuiste una excelente docente, que desde entonces trataste de despertar en mi un pensamiento crítico. Porque transmitías unas enormes ganas de enseñar y de ayudarnos a tus alumnos a crecer. Por tu espíritu de lucha y esfuerzos a pulmón cuando tratabas de sacar lo mejor durante nuestro período compartido en el INTEBIO. Por tu ejemplo de humildad y de que a pesar de todo SIEMPRE SE PUEDE. Por tantas horas de trabajo compartidas, por tu alegría, tu confianza, tus consejos, tu ayuda incondicional en mi afán de prolongar las horas del día, por ser tan buena amiga, por tu respeto, gracias Grace! Espero seguir aprendiendo de vos mucho más.

A Carlos, por ser tan buena persona, por colaborar siempre con todos los integrantes del laboratorio, por tu humildad y generosidad en compartir tus conocimientos y brindarte a todos sin esperar nada a cambio. Porque a pesar de nuestras diferencias existe entre nosotros un profundo afecto y respeto, que hacen que te considere un buen amigo.

A Ivana, por tantas horas de trabajo compartidas y por tantos otros momentos tan especiales que disfrutamos juntas, por ser tan buena persona, por las charlas y las inquietudes comunes, porque quizás seas una de las personas que mejor me comprenda, por tu calidez y tu gran corazón.

A Eva, gracias por tu amistad, por tu alegría, por tu preocupación y tu compromiso compartido para que las cosas funcionen de la mejor manera, por enseñarme a ser más frontal, por conocerme tan bien y demostrarme tu amistad en todo momento.

A Carolina, gracias por tu ayuda, por tu respeto, por tu compromiso, por tus contagiantes ganas de trabajar y de hacer bien las cosas. Por tu afecto y por todo lo que me ayudaste a crecer en todo el tiempo de trabajo compartido.

A los que llegaron al laboratorio hace un poco menos de tiempo: A Pablo, muchas gracias por tu valioso asesoramiento en el manejo de programas para el procesamiento de imágenes, por tus ganas de trabajar y de hacer cosas nuevas. A los estudiantes que están haciendo sus tesinas de grado: A Eduardo, Raúl, Federico, Julieta, Agustín y Luciana, gracias por su respeto y su buen humor.

A todos los estudiantes que pasaron, con los que compartí hermosos momentos y de los que tengo lindos recuerdos: Laura, Carlos B., Griselda, Diego S., Diego M. y Natalia.

Al maravilloso grupo de docentes de la cátedra de biología celular y molecular, algunos de los cuales también fueron mis docentes y ahora comparten conmigo horas de trabajo. Gracias Rosa por tus conocimientos, por tu asesoramiento siempre que te necesito, por tu cariño, por tu ejemplo como excelente docente y como persona. Gracias Esteban por tu optimismo, por estar lleno siempre de proyectos que contagian. A Cristina y Marta, gracias por su ejemplo y esfuerzo permanentes.

A mis compañeros de estudio, a los que quiero un montón, porque han sido excelentes amigos y personas invaluable que la vida me puso en el camino. Gracias Cora, Maica, Nora, Darío, Yanina, Carina, Santiago, Luciana, Paula, Quique, Adrián, Niqui, Daniela. Gracias por los lindos recuerdos y por estar siempre en contacto!

Gracias a mis amigas de siempre, que a pesar de no entender demasiado lo que hago me demuestran su apoyo y cariño incondicional: Viqui, Yani, Ana, Yudit. Gracias porque se que con ustedes siempre puedo contar.

Muchas gracias a Mauricio y a Pauli, que compartieron conmigo y trataron de acompañarme en estos años de esfuerzos. Gracias por su paciencia. Espero hija algún día comprendas mi entusiasmo, y las horas dedicadas al estudio y al trabajo.

Por último, debo agradecer especialmente a mis padres, que han procurado para mí siempre lo mejor y para eso me llenaron de cariño y buenos ejemplos. Gracias por estar siempre a mi lado apoyándome, compartiendo conmigo y alegrándose por mis logros. Gracias mamá porque siempre supiste darme ejemplos de trabajo incansable, sacrificio, compromiso y entrega, respeto por los demás, humildad, generosidad, rectitud, honestidad.

Gracias a todas las personas que han compartido conmigo estos años de formación, docentes, compañeros de estudio, amigos, compañeros de trabajo, a mi familia, a mis padres. Gracias a todos!

Índice:

	ÍNDICE	I
	ABREVIATURAS	V
1.	INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1	La mitocondria en las células vegetales	2
2	Genoma nuclear de plantas	3
3	Genoma mitocondrial de plantas	4
3.1	Estructura física de genomas mitocondriales	4
3.2	El genoma mitocondrial de plantas difiere en estructura y composición entre distintas especies	5
3.3	Información contenida en genomas mitocondriales de plantas	5
4	Expresión de genes en mitocondrias de plantas: control transcripcional y postranscripcional	7
4.1	Transcripción	8
4.2	Procesamiento de los transcriptos	9
4.3	Editado de los transcriptos	10
4.4	Las estrategias específicas de regulación del genoma mitocondrial de plantas han evolucionado luego de la integración del genoma endosimbionte	10
5	Importación de proteínas a la mitocondria	11
6	Origen y evolución de la mitocondria	12
7	Conexiones entre organelas	15
8	Interacciones entre el núcleo y la mitocondria	19
8.1	Biogénesis mitocondrial y señalización mitocondria-núcleo	19
8.1.1	Regulación retrógrada	20
8.1.2	Direccionamiento simultáneo de proteínas a distintas organelas	23
8.1.3	Coordinación de la síntesis de proteínas en distintas organelas	24
8.2	Coordinación de la expresión de genomas nucleares y mitocondriales durante el desarrollo vegetal	24
9	Cadena respiratoria mitocondrial	26
	HIPÓTESIS PLANTEADAS PARA EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS	33
	OBJETIVOS	35
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1	Material utilizado	36
2.1.1	Material vegetal y condiciones de cultivo de las plantas de <i>A. thaliana</i>	36
2.1.1.1	Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo	36
2.1.1.2	Plantas de Arabidopsis utilizadas para Agroinfiltración	36
2.1.1.3	Plantas de Arabidopsis utilizadas para ensayos metabólicos y estudios de expresión	37
2.1.1.4	Plantas transformantes de Arabidopsis	37
2.1.2	Tratamientos de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2.1.3	Cepas bacterianas utilizadas	39
2.2	Métodos de clonado y análisis de recombinantes	40
2.2.1	Clones de ADN copia de <i>A. thaliana</i> utilizados	40
2.2.2	Aislamiento y clonado de genes de <i>A. thaliana</i>	40
2.2.2.1	Búsqueda y aislamiento de genes en una biblioteca de ADN genómico de <i>A. thaliana</i>	40
2.2.3	Clonado de las regiones promotoras de los genes <i>cytc-1</i> , <i>cytc-2</i> y <i>cox5b-1</i> de <i>A. thaliana</i>	41
2.2.3.1	Clonado de la región promotora del gen <i>cytc-1</i>	41
2.2.3.2	Clonado de la región promotora del gen <i>cytc-2</i>	43

2.2.3.3	Clonado de la región promotora del gen <i>cox5b-1</i>	43
2.2.4	Amplificación por PCR de fragmentos de ADN	44
2.2.5	Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	45
2.2.6	Ligación de moléculas de ADN	45
2.3	Transformación de bacterias	45
2.3.1	Transformación de ADN con ADN plasmídico	45
2.3.1.1	Método de CaCl ₂	45
2.3.1.2	Electrotransformación	46
2.3.2	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con ADN plasmídico	46
2.4	Análisis de transformantes por hibridización en colonias	47
2.5	Preparación de Ácidos nucleicos	48
2.5.1	Minipreparación de ADN plasmídico	48
2.5.2	Preparación de ADN total de bibliotecas	48
2.5.3	Minipreparación de ADN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
2.5.4	Extracción y purificación de ARN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
2.6	Cuantificación de ácidos nucleicos	50
2.7	Análisis de ácidos nucleicos	51
2.7.1	Determinación de las secuencias de los fragmentos de ADN clonados	51
2.7.2	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	51
2.7.3	Electroforesis de ARN en geles desnaturalizantes	52
2.8	Técnica de northern blot	52
2.9	Hibridización de membranas de nylon	53
2.10	Marcación de sondas de ADN	53
2.11	Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i>	54
2.11.1	Método de transformación	54
2.11.2	Selección de las plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas	55
2.11.3	Análisis de plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas	56
2.12	Análisis de la expresión del gen reportero en plantas transformadas	57
2.12.1	Análisis histoquímico de la actividad	57
2.12.2	Análisis fluorométrico de la actividad β -glucuronidasa en plantas transformadas	58
2.12.2.1	Cultivo y tratamiento de las plantas transformadas	58
2.12.2.2	Extracción de proteínas y ensayo fluorométrico de actividad β -glucuronidasa	58
2.12.2.3	Cuantificación de proteínas totales	59
2.13	Expresión y purificación de proteínas recombinantes de <i>E. coli</i>	59
2.14	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS	60
2.15	Preparación de extractos proteicos nucleares de inflorescencias de coliflor	61
2.16	Ensayos de retardo en geles	61
2.17	Análisis filogenético	62
	ANEXO I	63
	ANEXO II	65
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
3	CAPITULO I	
	Estructura y regulación de la expresión de genes codificantes para el citocromo <i>c</i> y la subunidad 5b de la citocromo <i>c</i> oxidasa mitocondrial de <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
3.1	Introducción	67
3.2	Resultados	70
3.2.1	Identificación y caracterización de genes que codifican para el citocromo <i>c</i> (<i>cytc</i>) en <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
3.2.2	Identificación y caracterización de genes que codifican para la subunidad 5b de la	

	enzima citocromo <i>c</i> oxidasa(COX5b) en <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
3.2.3	Aislamiento y obtención de clones de ADNc para los genes en estudio	73
3.2.4	Estudio de los niveles de expresión de genes <i>cytc</i> y <i>cox5b</i> de <i>Arabidopsis</i> Análisis de los factores reguladores de la expresión de los mismos	74
3.2.5	Estudio de expresión de los genes <i>cytc</i> y <i>cox5b</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3.2.5a	Los genes <i>cytc</i> y <i>cox5b</i> son inducidos por hidratos de carbono metabolizables	75
3.2.5b	Efecto de la iluminación sobre la expresión de los genes en estudio	80
3.2.5c	La expresión de los genes <i>cytc</i> y <i>cox5b</i> está regulada por compuestos de nitrógeno inorgánico	81
3.2.5d	Análisis del efecto combinado de fuentes de carbono y nitrógeno	85
3.3	Discusión	87
4.	CAPÍTULO II Estudio de la región promotora del gen codificante para la subunidad 5b de la citocromo <i>c</i> oxidasa (COX5b) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	92
4.1	Introducción	92
4.1.1	Los complejos multienzimáticos que componen la cadena respiratoria	92
4.1.2	Complejo IV: citocromo <i>c</i> oxidasa	93
4.1.2.1	Funciones del complejo citocromo <i>c</i> oxidasa	93
4.1.2.2	Subunidades que constituyen la citocromo <i>c</i> oxidasa	94
4.1.2.21	Composición de la citocromo <i>c</i> oxidasa de plantas	95
4.1.2.3	Subunidad 5b (COX5b) de <i>Arabidopsis</i>	98
4.2	Resultados	99
4.2.1	Determinación de los patrones de expresión específicos de tejidos	99
4.2.1.1	Análisis de la expresión del gen reportero <i>gus</i> mediante histoquímica	99
4.2.1.2	Análisis de la expresión del gen reportero <i>gus</i> por fluorimetría	102
4.2.2	El promotor del gen <i>cox5b-1</i> es inducido por hidratos de carbono y hormonas	102
4.2.2.1	Inducción por sacarosa	102
4.2.2.2	Inducción por BAP	103
4.2.3	Estudio de regiones del promotor <i>cox5b-1</i>	105
4.2.3.1	Análisis de la actividad GUS en plantas transformadas con las diferentes deleciones generadas	106
4.2.4	El promotor <i>cox5b-1</i> contiene elementos regulatorios positivos y negativos	107
4.2.5	Análisis de la regulación por azúcares y hormonas	110
4.3	Análisis de los elementos regulatorios presentes en el promotor <i>cox5b-1</i>	112
4.4	Discusión	114
5.	CAPÍTULO III Estudio de las regiones promotoras de los genes <i>cytc-1</i> y <i>cytc-2</i>, codificantes para el citocromo <i>c</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	120
5.1	Introducción	120
5.2	Resultados	125
5.2.1	El promotor del gen <i>cytc-1</i> dirige una expresión del gen <i>gus</i> específica de tejido	125
5.2.2	La región promotora de <i>cytc-2</i> dirige una expresión diferente a la observada para <i>cytc-1</i>	128
5.2.3	Cuantificación de los niveles de actividad GUS en distintos órganos por fluorimetría	130
5.2.4	Análisis de la región promotora del gen <i>cytc-1</i>	131

5.2.5	Mutagénesis del fragmento del promotor <i>cytc-1</i> requerido para la expresión GUS	133
5.2.6	Inducción del promotor <i>cytc-1</i> por sacarosa y citoquininas	139
5.2.7	Proteínas presentes en extractos nucleares de coliflor unen específicamente regiones del promotor <i>cytc-1</i> requeridos para la transcripción	141
5.2.8	Proteínas de la familia TCP unen la región mínima requerida para la expresión de <i>cytc-1</i>	143
5.2.9	El elemento regulador <i>site II</i> está presente en numerosos genes codificantes para proteínas que participan en la vía respiratoria dependiente del citocromo <i>c</i>	146
5.2.10	Análisis de la región promotora del gen <i>cytc-2</i>	149
5.2.10.1	Análisis de la región promotora del gen <i>cytc-2</i> por histoquímica	150
5.3	Discusión	154
6.	CONCLUSIONES	164
7.	RESUMEN	173
8.	ABSTRACT	176
9.	BIBLIOGRAFÍA	179

Abreviaturas:

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ADNr	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa A
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
cm	centímetros
col.	colaboradores
<i>cox</i>	citocromo <i>c</i> oxidasa
<i>cytc</i>	citocromo <i>c</i>
Da	daltons
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato(mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
g	gravedad
GUS	β -glucuronidasa
h	hora
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
IPTG	isopropil- -D-tiogalactopiranosido
kDa	kilodaltons
kpb	kilopares de bases
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	miliamper/s
Mb	megabases
Mpb	megapares de bases

min	minuto
ml	mililitro/s
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimoles
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
MS	medio de cultivo Murashige-Skoog
MU	4-metilumbeliferona
nm	nanómetros
MUG	4-metilumbeliferil- β ,D-glucurónido
P/V	peso en volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
Poli (dIdC)	ácido polidesoxiinosínico-polidesoxicitidínico
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio
T	temperatura
TA	temperatura ambiente
TCA	ácido tricarbóxico
TEMED	N,N,N',N',-tetrametilendiamina
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
U	unidad/es
UFP	unidades formadoras de placas
UV	ultravioleta
V/V	volumen en volumen
vol	volumen/es
W	watt/s
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactósido.
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido

A lo largo de este manuscrito se ha adoptado la siguiente convención al referirnos a proteínas, genes y mutantes:

Proteínas: las proteínas se escriben con mayúscula. Ej: COX 6a

Genes: los genes se escriben con minúscula e itálica. Ej: *cox6a*

Las mutantes de levaduras o de diferentes especies de plantas se escriben con minúscula e itálica.

1. Introducción

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las mitocondrias tienen una amplia variedad de funciones relacionadas con la bioquímica y el funcionamiento celular. Su función primaria está representada por la oxidación de ácidos orgánicos a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la síntesis de ATP acoplada a la transferencia de electrones desde el NADH hacia el O₂ en la cadena de transporte de electrones ubicada en la membrana interna mitocondrial (Siedow y Umbach, 1995). Las mitocondrias contienen su propio genoma (Gray y col., 1999) y son capaces de realizar la transcripción y traducción del mismo (Binder y Brennicke, 2002). Incorporan activamente proteínas y metabolitos desde el citosol a través de complejos mecanismos de importación perfectamente regulados (Braun y Schmitz, 1999; Lister y col., 2003), juegan un papel central en la regulación de la muerte celular programada o apoptosis (Balk y Leaver, 2001) y responden a señales celulares tales como el estrés oxidativo (Moller, 2001; Sweetlove y col., 2002) y la falta de nutrientes (Giegé y col., 2005).

Además, las mitocondrias de plantas tienen funciones adicionales y características distintivas (Mackenzie y McIntosh, 1999), tales como la síntesis de nucleótidos, aminoácidos, lípidos y vitaminas (Rebeille y col., 1997; Bartoli y col., 2000; Gueguen y col., 2000; Millar y col., 2004). Participan indirectamente en la fotosíntesis, debido a que un paso muy importante en la fotorrespiración es la descarboxilación de los residuos de Gly que tiene lugar en la mitocondria (Raghavendra y col., 1994, 1998). Su cadena respiratoria es mucho más ramificada que la de otros organismos: posee una vía de respiración alternativa, insensible al KCN, y numerosas NADH deshidrogenasas alternativas capaces de utilizar NADH o NADPH internos o externos como sustrato (Vanlerberghe y McIntosh, 1997; Rasmusson y col., 1999; Siedow y Umbach, 2000). Además se han identificado proteínas integrantes de los complejos respiratorios, exclusivas y con funciones adicionales en plantas (Parisi y col., 2004; Millar y col., 2003, 2004a).

Debido al papel central de la mitocondria en la viabilidad celular, es esencial comprender la amplia gama de funciones que las mismas realizan y los complejos mecanismos que regulan su biogénesis, especialmente la forma en que la actividad mitocondrial es percibida por el núcleo y coordinada con el resto de las funciones de la célula (Heazlewood y col., 2004).

1. La mitocondria en las células vegetales:

Las mitocondrias están presentes en los organismos de los reinos animal, vegetal, protista y fungi. Su función principal es la de generar energía disponible en forma de ATP para el normal funcionamiento del metabolismo celular. Son orgánulos delimitados por dos membranas muy diferentes, externa e interna. Entre ellas, queda delimitado un espacio (intermembrana) y el conjunto encierra una matriz o compartimiento central (fig. 1). Debido a la complejidad de los procesos metabólicos que involucra y su relación funcional con los cloroplastos y el núcleo, es uno de los orgánulos celulares más estudiados (Lodish y col., 2000).

La membrana externa es similar a la de los procariotas y es permeable a la mayoría de los solutos de menos de 4000 Da, a diferencia de la interna, mucho más selectiva y del doble de superficie. La membrana interna forma crestas hacia la matriz mitocondrial y contiene partículas ricas en proteínas que constituyen el 75-80% de su estructura. Entre los lípidos que la componen se encuentra la cardiolipina, responsable de su reducida permeabilidad a los protones. La matriz mitocondrial contiene ADN, ARNm y ARNt, ribosomas 78S, ARNr 26S, ARNr 18S y ARNr 5S (ausente en mitocondrias animales), solutos y enzimas (Alberts y col., 1996).

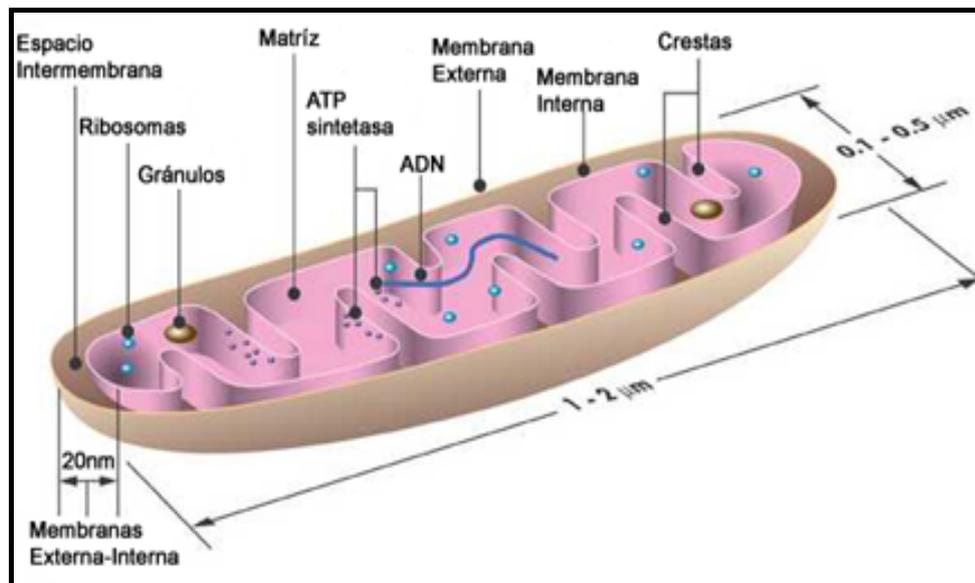


Figura 1: Estructura de la mitocondria

La membrana interna y la matriz son los sitios en donde ocurren la mayoría de las reacciones implicadas en la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos. El piruvato es el producto resultante del metabolismo de los azúcares en el citoplasma (glucólisis). Los procesos de oxidación se acoplan a la síntesis de ATP en la membrana interna.

Por otra parte, las células vegetales tienen algunas particularidades que no poseen las células animales y de hongos: a) contienen cloroplastos que son capaces de producir ATP y sintetizar cadenas carbonadas que ofician de sustratos de sus propios procesos respiratorios, b) producen metabolitos primarios y secundarios a expensas de cadenas carbonadas, en respuesta a agresiones específicas y c) fotorrespiran. Debido a estas características, las mitocondrias de plantas se ven involucradas en procesos metabólicos que no poseen los organismos no fotosintéticos (Mackenzie y McIntosh, 1999).

2. Genoma nuclear de plantas:

Los genomas nucleares de plantas de especies relacionadas comparten un alto grado de homología en sus secuencias y un número semejante de cromosomas. Dentro de las dicotiledóneas, los genomas de *B. oleracea*, *B. rapa* y *B. nigra* tienen grandes regiones de homología en sus cromosomas y varían en un número limitado de translocaciones. En géneros distintos, como es el caso de *Brassica* spp y *Arabidopsis thaliana*, los rearrreglos cromosómicos son evidentes y mayores que en otros géneros relacionados. A pesar de esto, existen 11 regiones conservadas entre *A. thaliana* y *B. oleracea*, y 3 regiones de los cromosomas 4 y 5 de *A. thaliana* que muestran una homología completa con el genoma de *B. napus* (Dean y Schmidt, 1995).

A diferencia de lo observado al analizar sus secuencias, los genomas de plantas presentan grandes variaciones en tamaño, aún dentro de especies de Angiospermas relacionadas. Estudios posteriores permitieron concluir sobre la falta de una relación directa entre complejidad funcional de ciertas plantas y la longitud del genoma y que, por el contrario, el alto contenido en ADN genómico de ciertas plantas se debía a la riqueza en secuencias altamente repetidas. Estas secuencias están formadas mayoritariamente por ADN_r asociado a la región nucleolar y ADN satélite (ADNs) de secuencias de 150 a 350 pb. El ADN_s forma

agrupaciones de heterocromatina constitutiva y se localiza cerca de los telómeros y los centrómeros de los cromosomas en la mayoría de las especies vegetales estudiadas.

El genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana* contienen un número diploide de 10 cromosomas y es uno de los genomas nucleares más pequeños y con más bajos niveles de ADN. Este bajo número de secuencias repetidas contribuye al pequeño tamaño del genoma, de aproximadamente 100 Mpb, considerando que los genomas de arroz y tomate, con un número aproximadamente igual de cromosomas (12), tienen un tamaño de 450 y 950 Mpb respectivamente (Unsel y col., 1997; Dean y Schmidt, 1995).

3. Genoma mitocondrial de plantas:

3.1 Estructura física de genomas mitocondriales:

A partir del análisis de mapas físicos, construidos en base a fragmentos de restricción superpuestos, se concluyó que la mayoría de los genomas mitocondriales de células eucariotas adoptan una estructura circular. Excepciones fueron encontradas en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* y en algunos protozoos como *Paramecium aurelia*, en los que se identificaron moléculas de ADN lineal (Schuster y Brennicke, 1994).

En células animales en cultivo fueron visualizadas por microscopía electrónica moléculas de ADN circular de aproximadamente 16 kpb. Por el contrario, la estructura *in vivo* de las grandes moléculas de ADN mitocondrial de levaduras, hongos y plantas superiores es heterogénea y éstas adquieren una conformación lineal. Además, contrariamente al modelo de replicación del genoma circular en forma bidireccional mediante la formación de estructuras *theta* que ocurre en mamíferos, existen amplias evidencias de que los genomas mitocondriales de plantas pueden replicarse mediante un mecanismo de círculo rodante, lo que explicaría la existencia *in vivo* de moléculas de ADN lineal (Mackenzie y col., 1994, Mackenzie y McIntosh, 1999).

3.2 El genoma mitocondrial de plantas difiere en estructura y en composición entre distintas especies:

El genoma mitocondrial de plantas difiere del de otros eucariotas superiores en la gran diversidad que existe tanto a nivel del tamaño como de la estructura del mismo. Aún dentro de una misma familia de plantas existen amplias diferencias en cuanto a la longitud del genoma mitocondrial, y ésta a su vez no se correlaciona con la limitada capacidad codificante del mismo (Mackenzie y col., 1994).

Un importante avance en la comprensión de la estructura de los genomas mitocondriales vegetales se logró con la elaboración del genoma mitocondrial de la briófito *Marchantia polymorpha* (Oda y col., 1992) y de *Arabidopsis thaliana* (Unseld y col., 1997) y *Oryza sativa* (Notsu y col., 2002) más recientemente. Del análisis de la composición de estos genomas pudo desprenderse que la variación en el tamaño se debería a la presencia de secuencias redundantes y los cambios en estructura ocurrirían por eventos de recombinación y/o integración de ADN extraño (Mackenzie and McIntosh, 1999).

Estos modelos tienen en cuenta la existencia de eventos de recombinación del ADN mitocondrial entre secuencias repetidas tanto homólogas como no, lo que conduciría a la existencia de múltiples partículas subgenómicas generadas mediante eventos de recombinación tanto inter como intramoleculares (Mackenzie y col., 1994; Mackenzie and McIntosh, 1999). En *Arabidopsis*, por ejemplo, encontramos dos grandes regiones repetidas de 6,5 kpb y 4,2 kpb en orientación directa y activas en recombinación que dividen el total del genoma en dos moléculas circulares subgenómicas de 233 kpb y 134 kpb respectivamente (Klein y col., 1994). Además, en *Arabidopsis* se han identificado homólogos a los genes *recA* y *mutS* cuyos productos juegan un papel fundamental en la recombinación y en la reparación del ADN, respectivamente, en *Escherichia coli* (Millar y col., 1994).

3.3 Información contenida en genomas mitocondriales de plantas:

El análisis de la secuencia completa del genoma mitocondrial de *Marchantia polymorpha* (Oda y col., 1992) primero y de *A. thaliana* (Unseld y col., 1997) más tarde constituyeron los principales pilares en la comprensión del contenido del genoma mitocondrial de plantas (fig. 2).

encontrados en la mitocondria. Entre estos genes encontramos 3 ARNr y 22 ARNt, cantidad insuficiente para decodificar el total de los codones encontrados en el genoma, por lo que al igual que lo observado en papa y en *M. polymorpha*, el resto de los ARNt deben ser importados desde el núcleo (Unselde y col., 1997). Además del aporte realizado desde el núcleo, que constituye un 4 por ciento del genoma mitocondrial de *Arabidopsis* y está representado en su mayoría por piezas de retrotransposones; encontramos un 1 por ciento de secuencias de origen plastídico que constituyen fragmentos de entre 30 y 930 nucleótidos que parecen no ser funcionales. Entre los genes codificados por el ADNmt se encuentran *nad1* a *nad9* del complejo I, *cob* del complejo III, *cox1*, 2 y 3 del complejo IV, *atp1*, 6 y 9 del complejo V, genes relacionados con la biogénesis del citocromo *c*, los que codifican los ARNr 26S, 18S y 5S y los que codifican las proteínas ribosomales *rpl2*, 5 y 16 y *rps3*, 4, 7 y 12 (Unselde y col., 1997).

4- Expresión de genes en mitocondrias de plantas: control transcripcional y postranscripcional:

En una célula vegetal, los tres genomas deben expresarse de manera coordinada a fin de realizar los procesos bioquímicos de fotosíntesis y respiración, fuentes de energía fundamentales en las plantas. Particular interés despierta la identificación de interconexiones entre requerimientos bioquímicos y electroquímicos y la expresión de genes en plantas.

Aún antes de que se completara la secuenciación del genoma mitocondrial de *Arabidopsis*, estaba claro que la mayoría de los componentes requeridos para la transcripción y traducción de genes mitocondriales eran codificados en el núcleo y necesitaban ser importados a la mitocondria (Unselde y col., 1997). No obstante, la información contenida en el genoma mitocondrial, aunque pequeña, es esencial para la célula y la expresión de genes en esa organela implica niveles de regulación tanto transcripcional como post-transcripcional. Mecanismos complejos de procesamiento y maduración transforman al transcrito primario mitocondrial en un ARNm traducible. Estos pasos incluyen el editado de ARN, el corte de las regiones intrónicas con su posterior empalme y la maduración del transcrito por procesamiento en los extremos 5' y 3' (Farré y col., 2001). Además, el control de la actividad del gen puede tener lugar durante la traducción o la degradación del ARNm, la cual es activada por señales de poliadenilación del mismo (Gagliardi y col., 1999).

4.1 Transcripción:

En plantas con flores existen tres ARN polimerasas codificadas en el genoma nuclear que presentan gran similitud a las ARN polimerasas de los bacteriófagos T7, T3 y SP6, y que además son similares a las encontradas en mamíferos y en hongos (Gray y col., 1992).

En *Arabidopsis*, se comprobó la existencia en el genoma nuclear de tres genes para estas ARN polimerasas, las cuales fueron originadas a partir de un único progenitor, a través de dos eventos de recombinación independientes. El producto de uno de estos genes (*rpoT3*) se dirige exclusivamente a plástidos, mientras que *rpoT1* tiene exclusiva función a nivel mitocondrial y el tercero, denominado *rpoT2*, sería responsable de dirigir la transcripción en ambas organelas (Hedtke y col., 2000).

La presencia de 57 genes en el genoma mitocondrial de *Arabidopsis* y de otras plantas superiores sugiere la existencia de regiones promotoras requeridas para la transcripción de los mismos (Unselde y col., 1997). Además, la identificación de regiones espaciadoras de entre 2 a 60 kpb entre cada gen apoya la idea de la existencia de unidades individuales de transcripción (Binder y Brennicke, 2003). En *Arabidopsis* se han identificado 29 regiones potenciales que cumplen con el criterio de clasificación como promotores definidos en dicotiledoneas. Del total, 16 se encuentran dentro de los 3 kpb corriente arriba de algún gen reconocido, incluyendo genes para ARNt y uno muy cercano al gen del ARNr 18S (Dombrowski y col., 1998).

Por otro lado, la presencia de otros tipos de promotores que no cumplen estrictamente con los criterios establecidos para un promotor "tipo" y que por el contrario cuentan con motivos únicos o propios, podría indicar que algunos genes requieren de cofactores específicos para la regulación de los mismos. Un ejemplo de esto es el gen nuclear de maíz *mct* cuyo producto sería capaz de reconocer el promotor del gen mitocondrial codificante para la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa (Cox2) (Newton y col., 1995)

Existen numerosos estudios en los que se han observado cambios en la abundancia relativa de los transcriptos mitocondriales durante determinadas etapas del desarrollo, hecho que demuestra la existencia de una coordinación según las demandas metabólicas (Logan y col., 2001). A pesar de todas las observaciones realizadas y de que en numerosos casos se pudo establecer que los niveles de proteínas mitocondriales se relacionan con la abundancia relativa

de los transcriptos (Daley y col., 2003), la modulación a nivel transcripcional no parece ser la forma más importante de regulación de la expresión génica en mitocondrias de plantas. Diferencias en la tasa de transcripción son balanceadas con la degradación del ARN o con una alta estabilidad del mismo, por lo que los procesos postranscripcionales de regulación parecen jugar un papel crucial en la determinación de la abundancia de cada ARN mitocondrial (Giegé y col., 2000; Millar y col., 2004).

4.2 Procesamiento de los transcriptos:

Otro nivel de regulación de la expresión del genoma mitocondrial se da a nivel de la maduración y el procesamiento del transcripto primario. A este nivel estarían actuando factores específicos controlados por el núcleo, siendo este un ejemplo más de la fina interrelación que se establece entre los tres genomas en una célula vegetal (Allen, JF., 2003). Diferentes motivos fueron descritos como los responsables del reclutamiento de exo y/o endonucleasas de origen nuclear, y los mismos han sido identificados en su mayoría en asociación con disfunciones mitocondriales.

Uno de los fenotipos asociados a mutaciones en mitocondrias de plantas es el de esterilidad citoplasmática masculina (*CMS: cytoplasmic male sterility*), en el que las líneas mutantes CMS poseen un desarrollo vegetativo normal pero presentan una producción de polen defectuosa. Fenotipos CMS han sido identificados en *Helianthus annuus*, *Brassica napus*, *Zea mays* y en géneros de *Petunia*, *Nicotiana*, *Sorghum*, *Phaseolus* y *Allium*, en los que la expresión de genes mitocondriales aberrantes es producto de eventos de recombinación genómica y generación de nuevos marcos abiertos de lectura (Liu y col., 2001). Productos de genes nucleares son capaces de regenerar la función mitocondrial mediante el procesamiento de estos nuevos transcriptos anómalos. De esta manera se impediría la producción de proteínas aberrantes capaces de anclarse o incorporarse a la membrana interna mitocondrial causando cambios fenotípicos importantes en condiciones en las que se requiere un aumento considerable de la actividad respiratoria en las mitocondrias (Mackenzie y McIntosh, 1999). El procesamiento de los transcriptos mitocondriales dirigido por el núcleo representaría la forma de regulación de la expresión más efectiva en mitocondrias de plantas (Gray y col., 1992).

4.3 Editado de los transcritos:

El editado es un tipo de modificación postranscripcional que se observa en la mayoría de los transcritos de mitocondrias de plantas y ha sido bien estudiado en *Arabidopsis*, donde se identificaron 456 sitios de editado en regiones codificantes del ARN (Giegé y Brennicke, 1999). El editado es esencial para una expresión génica adecuada del genoma mitocondrial y consiste en conversiones de C a U en regiones codificantes de ARNm, en intrones y en secuencias no codificantes en menor medida (Binder y Brennicke, 2003). Con una menor frecuencia se han observado cambios de U a C, no encontrándose esta modificación en mitocondrias y cloroplastos de *Arabidopsis* (Bonnard y col., 1992). El mecanismo de editado involucraría la remoción o adición de un grupo amino al nucleótido incorporado, sin ruptura del esqueleto azúcar-fosfato de la molécula de ARN. Existen evidencias de que tanto el sitio de editado, el genotipo nuclear y el tipo celular determinarían este proceso. Asimismo, la extensión del editado de un transcripto dependería del tipo de tejido, el estado de desarrollo y las condiciones de crecimiento y no todos los transcritos de un mismo gen serían editados a la misma velocidad. Si bien los transcritos editados y no editados son activos traduccionalmente, las proteínas ribosomales aberrantes sintetizadas a partir de transcritos no editados no son incorporadas a ribosomas funcionales (Mackenzie y col., 1994; Gagliardi y col., 1999).

La regulación de la expresión a este nivel podría tener interesantes implicancias ya sea creando nuevos codones de iniciación AUG a partir de ACG, o por eliminación de posibles codones de terminación. En este sentido, los únicos casos documentados que demuestran una función regulatoria del editado del ARN sobre la expresión de determinados genes mitocondriales de plantas fueron observados en un intrón y en algunos ARNts, los cuales pudieron ser procesados únicamente luego del editado (Marechal-Drouard y col., 1996; Singh, KB., 1998).

4.4 Las estrategias específicas de regulación del genoma mitocondrial de plantas han evolucionado luego de la integración del genoma endosimbionte:

Las características de la expresión de genes en mitocondrias de plantas antes mencionadas, en comparación con las de genomas nucleares, bacterianos, plastídicos y otros

sistemas mitocondriales, señalan que las mitocondrias de plantas presentan un modo único de procesamiento, especialmente en términos de maduración post-transcripcional. Tanto el editado del ARN, como el “*trans*-splicing” de intrones, la inestabilidad en el extremo 3’ originada por la cola de poliA, la maduración y estabilización de los extremos 5’ y 3’, etc., son únicos de mitocondrias de plantas. Es interesante destacar que algunas de estas estrategias específicas son también encontradas en plástidos, sugiriendo que podría ser una característica adquirida durante la evolución de ambas organelas en la planta (Binder y Brennicke, 2003).

5. Importación de proteínas a la mitocondria:

Alrededor del 95% de las proteínas encontradas en las mitocondrias de plantas y más del 98% de las proteínas mitocondriales en hongos y mamíferos son codificadas en el núcleo, por lo que la biogénesis de mitocondrias requiere de la síntesis y la importación de proteínas desde el citosol, así como también de lípidos y ácidos nucleicos (Braun y Schmitz, 1999). Si bien la importación de proteínas a la mitocondria vegetal fue informada por primera vez en el año 1987, no fue hasta la obtención de la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis*, sumado al desarrollo de nuevas tecnologías, que el aparato de importación de proteínas fue investigado en detalle. Para tal fin, fueron utilizados los datos obtenidos de *Saccharomyces cerevisiae* realizando en primer lugar una búsqueda por homología de secuencias. Se pudo concluir que en plantas existen importantes similitudes con levaduras, hongos y mamíferos, siendo una de las principales diferencias la presencia de familias multigénicas que codifican proteínas de la maquinaria de importación en plantas (Lister y col., 2003). Las proteínas poseen una señal de transporte (péptido de tránsito) como información adicional en el extremo N-terminal. Estas presecuencias son generalmente ricas en cargas positivas y aminoácidos hidroxilados y contienen pocos residuos ácidos. Alternan regularmente residuos básicos e hidrofóbicos y tienen capacidad para formar α -hélices anfipáticas (Sjölving y Glaser, 1998). Existen algunos ejemplos de genes nucleares cuyos productos se integraron a la mitocondria mediante la incorporación de presecuencias tomadas de genes nucleares preexistentes (Kadowaki y col., 1996; Martin y Herrmann, 1998).

Existen tres principales tipos de proteínas que constituyen la maquinaria de importación a la mitocondria: (i) traslocasas presentes en las membranas externa (TOM) e interna (TIM) que

reconocen las presecuencias y colaboran con el pasaje de las proteínas a través de la bicapa lipídica o con su inserción en la misma; (ii) enzimas proteolíticas ubicadas en el interior de las mitocondrias que reciben el nombre de peptidasas de procesamiento mitocondrial (MPP), encargadas de remover el péptido señal generando de esta manera la proteína madura; (iii) chaperonas presentes en el citosol que mantienen al precursor proteico en una conformación capaz de incorporarse a la mitocondria, y chaperonas de la organela involucradas en la traslocación de la proteína, su conversión en una proteína madura y su incorporación y/o ensamblado en su destino final (Braun y Schmitz, 1999; Wiedmann y col., 2004).

La proteína MPP es una metalo-endopeptidasa integrada al complejo *b-c₁* o citocromo *c* reductasa. Esta es una característica específica de las plantas, dado que en otros organismos como hongos y mamíferos la ubicación de estas proteínas homólogas a MPP es la matriz mitocondrial. Por otra parte, las chaperonas citoplasmáticas juegan un papel importante en la importación de proteínas a mitocondrias. La proteína HSP70 se asocia a la cara citosólica de la membrana externa mitocondrial en varias especies de plantas y ha sido identificada en arveja, papa, tomate, maíz y espinaca. El gen para HSP70 se expresa en forma constitutiva pero se ha observado que durante la maduración del tejido disminuyen los niveles de HSP70 en mitocondrias y también disminuye la importación de proteínas. Estos estudios y otros indicarían que el proceso de importación no sólo está relacionado con componentes citoplasmáticos, sino que depende del estado de desarrollo celular, del tipo de tejido y de las condiciones de estrés (Mooney y Harmey, 1996; Dudley y col., 1997; Taylor y col., 2003).

6. Origen y evolución de la mitocondria. Coevolución de genomas nuclear y mitocondrial:

Las evidencias obtenidas hasta el momento apoyan la idea de que las mitocondrias, organelas especializadas en la producción y conservación de energía en células eucariotas, se han originado a partir de un endosimbionte de la familia de las eubacterias (Gray y col., 1999; Lang y col., 1999). Más específicamente, mediante análisis filogenético de genes codificantes para proteínas, ARN ribosomales (ARNr) y genes mitocondriales, se pudo establecer que el endosimbionte más relacionado pertenecería a la subdivisión de los α -proteobacteriales (Gray y col., 2001). Dentro de esta subdivisión, miembros de la familia de los Rickettsiales parecen

presentar la mayor homología en secuencia, en comparación con las de otros parásitos intracelulares obligados de secuencia conocida.

Mediante el análisis de secuencias de genomas mitocondriales se observó una marcada pérdida de capacidad codificante de las mitocondrias en relación con la de sus ancestros más cercanos, originada mediante un proceso que se llamó “reducción evolutiva”. Así, el genoma mitocondrial de *Arabidopsis* (366 924 pb) es uno de los genomas mitocondriales más grandes hasta ahora secuenciados y su tamaño es sólo un tercio del de su ancestro eubacteriano más relacionado, *Rickettsia prowazekii* (1 111 523 pb). Su capacidad codificante es sólo de un 4% del total de proteínas (34 versus 834), presentando casi un 80% de secuencias de ADN no codificantes comparadas con un 24% en *Rickettsia* (Gray y col., 1999). La diferencia en capacidad codificante es atribuida fundamentalmente a una transferencia de genes desde la mitocondria al núcleo (Martin y col., 1998; Adams y col., 2000), y en este sentido, un requisito para la transferencia de genes sería la existencia de una maquinaria de importación de proteínas presente en las dos membranas que rodean las mitocondrias (Martin y Herrmann, 1998). Entre los genes que han desaparecido del genoma del parásito endosimbionte podemos destacar genes para la biosíntesis de aminoácidos y nucleósidos, y para la glicólisis anaeróbica.

También pudo haber ocurrido una temprana pérdida de los genes mitocondriales cuya función fuera sustituida por otro gen no relacionado de codificación nuclear. Un ejemplo notable sería el reemplazo de la ARN polimerasa formada por múltiples subunidades y de características más parecidas a las de bacterias que se encuentra en algunos ancestros proto-mitocondriales, por la ARN polimerasa del bacteriófago T3/T7 que dirige la transcripción de genes mitocondriales en la mayoría de los eucariotas (Gray y col., 2001). Por último, durante el proceso evolutivo pudo haber ocurrido una completa pérdida de genes ancestrales con la consecuente pérdida de la función, sin complementación funcional de los genes nucleares, siendo un ejemplo de esto la falta del complejo I (genes *nad*) en la cadena de transporte de electrones de levaduras (Kurland y Andersson, 2000).

Debido a que los genomas mitocondriales caracterizados difieren marcadamente en su estructura, resulta difícil especular acerca de la estructura inicial del genoma proto-mitocondrial. Esto requeriría la identificación de un ADN mitocondrial que refleje el estado ancestral, y en este sentido encontramos el genoma mitocondrial del protozoo *Reclinomonas americana*.

Características como el contenido de sus genes y la organización de su genoma similar a la de las eubacterias, indican que el ADN mitocondrial de *R. americana* se asemeja muy estrechamente al genoma del ancestro proto-mitocondrial (Lang y col., 1997).

La teoría endosimbiótica serial constituye el modelo favorito para intentar explicar el origen de la mitocondria. Según esta teoría, el organismo huésped poseía un metabolismo heterotrófico anaeróbico, característico de células eucariotas con núcleo y citoplasma. Este escenario de dos pasos implica inicialmente la formación de la célula eucariota amitocondrial por fusión de un Arqueabacterium y un Proteobacterium (Lang y col., 1997), seguida de la adquisición de la mitocondria por endosimbiosis de un α -Proteobacterium (Gray y col., 1999). Antes de que la mitocondria y el cloroplasto (organelas derivadas de una proteobacteria y una cianobacteria respectivamente) entraran a escena, la célula huésped proto-eucariota con su sistema de membranas y citoesqueleto debió haber adquirido la capacidad de hacer endocitosis (fagocitosis) (Doolittle y col., 2003). A partir de este momento se podría hablar de una coevolución de ambos genomas, siendo el genoma nuclear una quimera que recibió contribuciones tanto de las arqueobacterias como de las eubacterias (Raven y Allen, 2003). En este sentido, el componente eubacterial del genoma nuclear parece ser mayor que el recibido por simple transferencia de genes desde la mitocondria al núcleo durante la evolución del genoma mitocondrial, incluyendo la presencia de genes que nada tienen que ver con la biogénesis y función mitocondrial (Douglas y Raven, 2003).

Más recientemente, mediante el análisis de secuencias de eucariotas unicelulares (protistas), se planteó una hipótesis alternativa a la teoría endosimbiótica, denominada "hipótesis del hidrógeno" (Martin y Müller, 1998) (fig. 3). Esta alternativa sostiene la creación simultánea de núcleo y mitocondria mediante la asociación de una α -proteobacteria productora de hidrógeno (simbionte) y una Arqueabacteria metanogénica consumidora de hidrógeno (hospedante) (Muller y Martin, 1999). Esta asociación habría generado el núcleo eucariótico y un metabolismo energético anaeróbico mediado por un hidrogenosoma (genera ATP anaeróbicamente produciendo hidrógeno como producto final del metabolismo energético), que derivó posteriormente en un metabolismo aeróbico mediado por la mitocondria. Esta teoría sugiere que el origen de la mitocondria se relacionó con una situación de emergencia para lograr una mejor adaptación a las condiciones impuestas por el entorno celular. Además, sostiene que el origen

de la mitocondria está íntimamente relacionado con el surgimiento de la célula eucariota, cosa que no es tenida en cuenta por la teoría endosimbiótica (Gray y col., 1999).

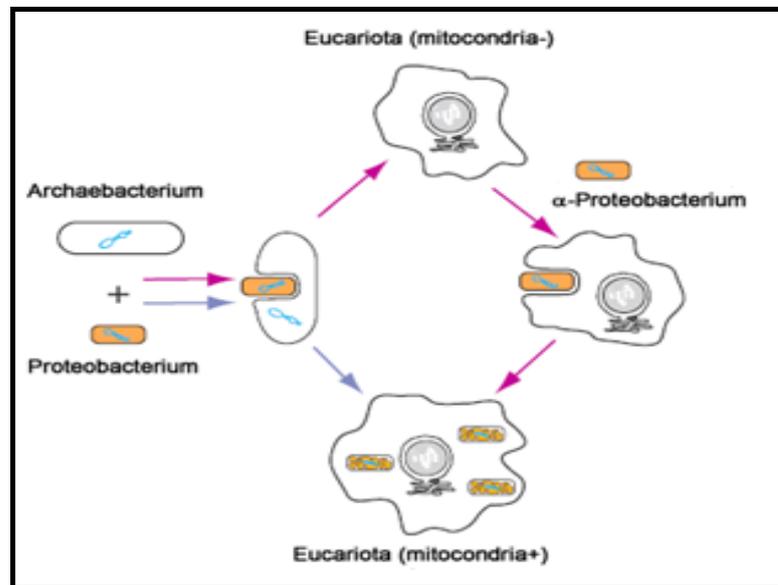


Figura 3: Hipótesis alternativas para describir el origen de la célula eucariota. Flechas lilas: "Hipótesis del hidrógeno", creación simultánea del núcleo eucariota (gris) y la mitocondria (naranja) por fusión de una Archeobacteria metanogénica consumidora de hidrógeno (huésped) con una Proteobacteria productora de hidrógeno (simbionte). Flechas rosas: creación en dos eventos independientes del núcleo eucariota y la mitocondria. La fusión inicial habría generado una célula eucariota, que luego habría incorporado la mitocondria por una nueva simbiosis con una α -proteobacteria (Extraído de Gray y col., 1999).

7. Conexiones entre organelas:

Numerosos esfuerzos han sido hechos en los últimos años para la identificación de moléculas mediadoras de la comunicación interorganelar. Está claro que pueden ocurrir múltiples interacciones interorganelares. En este sentido existen evidencias citológicas que sugieren la presencia de contactos físicos entre mitocondria y retículo endoplasmático, mitocondrias y cloroplastos, y mitocondrias y núcleo, en estadios particulares del desarrollo celular. Estos contactos podrían estar implicados en la transferencia de información genética desde y hacia la mitocondria así como también en el intercambio de componentes de membrana y moléculas de señalización. Asimismo, en una célula vegetal la presencia de cloroplastos impone características únicas en cuanto a la compartimentalización y a las interconexiones metabólicas

entre las distintas organelas (Mackenzie y McIntosh, 1999). En esta compleja red de interacciones metabólicas, la mitocondria jugaría un papel regulatorio central (Taylor y col., 2004). Además de la interacción entre cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas durante la fotorrespiración, se ha podido observar que la actividad fotosintética en luz es dependiente del ATP generado durante la fosforilación oxidativa (Mackenzie y McIntosh, 1999). El pasaje redox entre organelas puede ocurrir a través del transporte de ácidos orgánicos y sus interconversiones, y por reacciones de óxido-reducción de coenzimas específicas. En este pasaje, la mitocondria tiene un papel fundamental, siendo la maquinaria celular involucrada en estos procesos aún no del todo conocida.

La gran mayoría de las proteínas plastídicas o mitocondriales han derivado de su ancestro bacteriano endosimbionte, pero los genes respectivos residen ahora en los cromosomas nucleares, en lugar de haber permanecido en las respectivas organelas. La mayoría de este proceso de transferencia parece haber ocurrido tan pronto se produjo el evento endosimbiónico. Esta transferencia y la activación funcional de los respectivos genes parecen haber cesado en animales, de acuerdo a su contenido constante aparente de genes mitocondriales (Boore y col., 1999). Sin embargo, un importante número de eventos de transferencia evolutivamente “recientes” desde la mitocondria al núcleo han sido identificados en plantas, indicando que el proceso aún tiene lugar en determinadas especies (Adams y col., 2000; Kadowaki y col., 1996; Wischmann y Schuster, 1995; Daley y col., 2002).

Para constituirse en un gen nuclear activo, capaz de retornar a la organela como una proteína funcional, el gen organelar debe introducirse primero en el genoma nuclear para luego transcribirse y adquirir un péptido de tránsito que dirija la proteína sintetizada en el citoplasma de nuevo a la organela. Una vez en la organela, la proteína debe ser modificada para adoptar la estructura final correcta y en muchos casos debe ensamblarse para constituir un complejo multiproteico. Finalmente, el gen nuclear debe ser regulado de manera de ajustarse a los requerimientos y a las funciones de la organela en cuestión (Blanchard y Lynch, 2000). En conclusión, dada la complejidad de establecer y regular una copia nuclear, ¿por qué los genes organelares terminan en el núcleo?

Existe un número de factores posibles que podrían ser los responsables de la migración de los genes organelares al núcleo. Uno de ellos tiene en cuenta las funciones propias de las

organelas asociadas con la generación de radicales libres y ROS, las que podrían dañar al material genético e inducir mutaciones en los genes presentes dentro de las organelas, favoreciendo de esta manera su migración al núcleo (Allen y Raven, 1996). Otro factor podría ser la falta de recombinación de los genes dentro de la organela luego del evento endosimbiótico, con la consiguiente acumulación de mutaciones deletéreas que podrían propagarse rápidamente a través de una población clonal de organelas (Saccone y col., 2000). Al transferirse los genes al núcleo se mueven desde un genoma asexual hacia uno sexual, restaurándose el fenómeno de recombinación. A largo plazo, este factor favorece fuertemente la transferencia de los genes hacia el núcleo (Martin y Herrmann, 1998).

Como en levaduras, la mayoría de los fragmentos derivados de organelas encontrados en el núcleo de plantas y animales son fragmentos que regularmente no superan los 150 pb. Sin embargo, la secuencia del cromosoma II de *Arabidopsis* contiene fragmentos que superan los 270 kpb, codificando alrededor del 75% de su genoma mitocondrial. Debido a los complejos mecanismos de procesamiento de los transcritos en la mitocondria, entre ellos el editado, no es del todo claro si estos grandes bloques insertados en el genoma nuclear constituyen nuevos genes funcionales (Lin y col., 2000). Transferencias recientes de ADN de organelas al núcleo en plantas parecen haber sido mediadas por moléculas de ARN intermediarias (Wichmann y col., 1995).

Del análisis de los genomas mitocondriales contemporáneos se desprende que los genes que podrían haber migrado desde las organelas más recientemente son aquellos responsables de la respiración y la traducción. Entre los que podrían haberse fijado más tempranamente en el núcleo, podemos nombrar a aquellos con actividad regulatoria más que con funciones estructurales o enzimáticas (Martin y Herrmann, 1998).

Por otra parte, si la mayoría de los genes se han movido hacia el núcleo, ¿por qué no todos?, ¿por qué las mitocondrias y los cloroplastos requieren su propio genoma mientras que otras organelas citoplasmáticas como peroxisomas y lisosomas no?, ¿cuál es la razón para mantener este mecanismo en parte tan costoso para la célula?

Una de las hipótesis existente hasta el momento sostiene que tanto cloroplastos como mitocondrias contienen dentro de su genoma a aquellos genes cuya expresión es regulada directamente por el estado redox de los productos que codifican o por los transportadores de

electrones con los que estos productos interaccionan (Allen, JF., 2003). La transferencia de protones y/o electrones ejercería un control sobre la expresión de genes que codifican proteínas directamente involucradas en la generación o el mantenimiento del poder redox. Esta regulación es indispensable en la adaptación y respuesta rápida a cambios ambientales como los niveles de oxígeno, luz o dióxido de carbono. Esta hipótesis recibe el nombre de *CORR*, por “co-localización para la regulación redox de la expresión” y está basada en numerosos principios entre los que se destaca que el control redox directo de la expresión de ciertos genes estuvo presente en los progenitores de cloroplastos y mitocondrias, y ha sido vital para el funcionamiento de la célula antes, durante y después de la transición desde bacteria a organela (Allen y Raven, 1996; Allen, JF, 2003).

Otras explicaciones que intentan fundamentar la persistencia de genes dentro de las organelas son: (i) la idea de que el proceso evolutivo de transferencia de genes al núcleo se continúa produciendo y la información codificada en los genomas de organelas está representada por genes que aún restan por migrar, desde el punto de vista evolutivo (Daley y col., 2002; Adams y col., 2000); (ii) la hipótesis “lock-in” de Bogorad (1975) que enuncia que los componentes que constituyen el “core” o núcleo de los complejos multienzimáticos deben ser sintetizados *de novo* en el compartimiento celular correcto para impedir que los complejos respiratorios o fotosintéticos multienzimáticos puedan ensamblarse en la membrana plasmática, en membranas de vacuolas o en el retículo endoplasmático; (iii) la idea de que determinadas proteínas o cofactores, por características de hidrofobicidad o de estructura, son incapaces de ser importados y por lo tanto deben ser sintetizados dentro de la organela; (iv) el principio que sostiene que algunos genes no pueden ser movidos de la organela debido simplemente a las diferencias existentes entre los códigos genéticos nuclear y mitocondrial (Allen, JF., 2003). Estas y otras hipótesis al respecto quizás estén actuando conjuntamente y no sean mutuamente excluyentes a la hora de intentar explicar la persistencia de determinados genes dentro del ambiente organelar.

Por otra parte, si bien la transferencia de genes es un fenómeno altamente polar, los genomas de organelas no son refractarios al ADN exógeno. Los genomas mitocondriales de plantas han recibido copias parciales y completas de genes nucleares y plastídicos. El análisis de la secuencia del genoma mitocondrial de *Arabidopsis* permitió observar una mezcla de secuencias exógenas entre las que se enumeran 16 fragmentos de ADN plastídico, fragmentos

de ADN nuclear, retrotransposones y secuencias similares a virus de ARN. El repertorio de ARNt mitocondriales de *Arabidopsis* incluye 12 ARNt “nativos”, 6 derivados del genoma plastídico (ahora codificados por el genoma mitocondrial), y probablemente otros 10 importados desde el núcleo (Kadowaki y col., 1996). También existen casos documentados de inserción de intrones dentro del genoma mitocondrial (Blanchard y Lynch, 2000).

8. Interacciones entre el núcleo y la mitocondria:

8.1 Biogénesis mitocondrial y señalización mitocondria-núcleo:

Una célula eucariota contiene organelas funcionalmente distintas, cada una con la composición proteica, de lípidos y cofactores necesarias para llevar a cabo estas funciones distintivas. Así el retículo endoplasmático (RE), la mitocondria y los peroxisomas tienen en sus membranas receptores para seleccionar su conjunto específico de proteínas, no observándose tráfico de proteínas entre estas organelas quizá debido a su origen evolutivo diferente. En algunos casos, las señales que influyen la biogénesis de organelas provienen desde el interior de la célula o de la organela misma, mientras que en otros casos estas señales se originan de necesidades metabólicas propias del desarrollo o de cambios en el medio ambiente como por ejemplo variaciones en la disponibilidad de los nutrientes (Nunnari y Walter, 1996). De esta manera las organelas pueden auto-regular su abundancia y composición a través de diferentes vías de señalización intracelular, o por otra parte, cambios en el estado de algunas organelas pueden modular la expresión de genes requeridos para la biogénesis de otras (este es el caso del fenómeno de regulación retrógrada) o bien, cambios en el ambiente extracelular pueden alterar la abundancia y composición de determinadas organelas según el requerimiento particular de cada una de ellas (Nunnari y Walter, 1996).

La biogénesis mitocondrial puede ser definida como un incremento en el número y/o en la masa de mitocondrias. Este proceso está ocurriendo constantemente durante el desarrollo normal de una célula eucariota, y una cuestión crucial es lograr una mayor comprensión acerca de cómo este proceso es coordinado en el tiempo con el resto de las organelas y a qué nivel actúan los mecanismos de regulación. En este sentido, han sido propuestos tres modelos potenciales para explicar la biogénesis coordinada de organelas. Entre ellos: el fenómeno de

regulación retrógrada, el direccionamiento simultáneo de proteínas a distintas organelas y el mecanismo de transcripción en respuesta a estímulos externos comunes (Millar y col, 2004).

8.1.1 Regulación retrógrada:

La regulación retrógrada de la expresión de genes en el contexto de la biogénesis de organelas se refiere a la regulación de la expresión de genes nucleares por cambios metabólicos o señales originados en las organelas (Yu y col., 2001). En este sentido, los primeros informes mostrando que el estado funcional de la mitocondria podía influenciar la expresión de genes nucleares fueron obtenidos en levaduras que carecían de genoma mitocondrial. En estas levaduras mutantes se observó que los niveles de expresión de numerosos genes nucleares tales como el *cit2* (citrato sintetasa peroxisomal), *mrp3* (proteína ribosomal mitocondrial), *dld3* (D-lactato deshidrogenasa citosólica) y los genes *cox5A* y *cox6* que codifican subunidades de la citocromo *c* oxidasa, estaban alterados (Traven y col., 2001; Yu y col., 2001). Además, mediante tecnología de chips de ADN comparando los niveles de expresión de genes nucleares de levaduras salvajes con los de levaduras carentes de ADN mitocondrial (*rho⁰*) pudo establecerse que la expresión de numerosos genes se encontraba alterada. Entre otros, genes involucrados en la biogénesis de mitocondrias, genes regulados por la vía del AMPc-PKA y por los factores de transcripción Msn2/Msn4, genes codificantes para componentes de membrana, transportadores y enzimas implicadas en la glicólisis y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Traven y col, 2001).

Numerosos informes señalan que este mecanismo de regulación retrógrada juega un papel fundamental en la síntesis de proteínas mitocondriales en plantas. En este sentido, se observó que el agregado de inhibidores de la cadena de transporte de electrones o de metabolitos, o la imposición de estrés ambiental u oxidativo, resulta en la inducción de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales (Varlenberghe y McIntosh, 1996). Un ejemplo son los genes que codifican para la oxidasa alternativa (AOX). Estos genes son inducidos por condiciones de estrés entre las que se incluyen el frío, ciertas drogas y el ataque por patógenos (Varlenberghe y McIntosh, 1997). Se observó que los niveles de expresión de los genes *aox1* de tabaco y *aox1a* de *Arabidopsis* están aumentados en plantas tratadas con antimicina A (AA), un inhibidor de la cadena de transporte de electrones a nivel del complejo III (fig. 4). Por otra parte,

los niveles de expresión del gen codificante para el citocromo *c* descendieron en forma transiente en células de tabaco sometidas al mismo tratamiento (Varlenberghe y McIntosh, 1994). Mediante el análisis de chips de ADN se observó que cientos de genes nucleares resultaron afectados cuando hojas de *Arabidopsis* fueron sometidas a tratamientos con AA. Los mismos codifican para proteínas cuyos destinos finales constituyen distintos compartimientos celulares entre los que se destacan el citoplasma, el núcleo, los plástidos y la mitocondria. Mientras que la función de algunos genes no está aún dilucidada, otros están involucrados en diversas actividades como la transcripción, el metabolismo energético y la fosforilación de proteínas. Al realizar una comparación entre estudios similares realizados en plantas sometidas a estrés por aluminio y cadmio, a infección por virus y a tratamientos con hidroperóxidos (muerte celular) se pudo observar una importante similitud en los resultados, lo que podría significar la existencia de un mecanismo de respuesta común a estos tipos de estrés. Estos resultados podrían implicar también que tanto el aluminio, como el cadmio, el peróxido de hidrógeno y la infección por virus estarían actuando sobre la mitocondria y la respuesta común de las plantas estaría mediada por la comunicación mitocondria-núcleo. Es por esto razonable especular que señales comunes, entre ellas las ROS, estarían implicadas y la mitocondria actuaría como blanco y sensor de estos tipos de estrés en la célula vegetal (Yu y col., 2001; Sweetlove y col., 2004) (fig. 4).

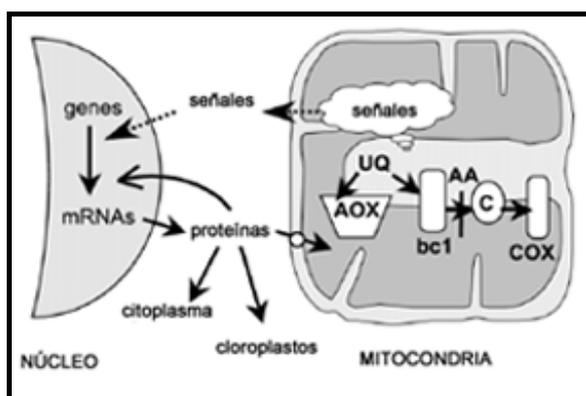


Figura 4: Regulación Retrógrada. Comunicación entre la mitocondria y el núcleo. Ejemplo de regulación del gen nuclear codificante para la oxidasa alternativa (*aox*) en *Arabidopsis*. La antimicina A (AA) se une al citocromo *b* en el complejo *bc1*, bloqueando de esta manera la vía respiratoria mitocondrial dependiente del citocromo *c*. Las "señales" que representan el cambio en el estado funcional de la mitocondria son transmitidas al núcleo y regulan la expresión de numerosos genes nucleares. Los productos de estos genes son destinados a distintos compartimientos en la célula, incluyendo núcleo, mitocondria, citoplasma y cloroplasto. (Extraído de Yu y col., 2001).

Además, siendo la mitocondria el sitio en el que se conectan los procesos celulares de metabolismo de hidratos de carbono y nitrógeno a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos y la fotorrespiración, la acción de diferentes fuentes de estrés ambientales como las ROS o la acción indirecta de productos de peroxidación de compuestos lipídicos sobre el normal funcionamiento de la mitocondria tendrá consecuencias importantes sobre el metabolismo de carbono y nitrógeno y sobre las reacciones biosintéticas en una célula vegetal (Taylor y col., 2004).

Usando mutantes de maíz con deleciones en el genoma mitocondrial (mutantes NCS: non-chromosomal stripe) pudo establecerse que esta deficiencia permanente en la mitocondria disparaba nuevas vías de señalización, independientes de las vías de señalización por Ca^{2+} o por ROS, y más bien relacionadas con una disminución del potencial de membrana, lo que conducía a un aumento de la expresión de genes codificantes para chaperonas y proteínas de choque térmico (HSPs) de diferentes clases. Estos resultados permiten señalar a esta expresión de genes *hsp* dependiente de la mitocondria como un importante proceso fisiológico de regulación retrógrada en el que la disfunción mitocondrial no estaría limitada a la generación de estrés oxidativo o a la iniciación del fenómeno de apoptosis sino que además contribuiría al establecimiento de la tolerancia al estrés facilitando la defensa y la supervivencia celular (Kuzmin y col., 2004).

Existen numerosas líneas de evidencia que señalan al complejo I de la cadena respiratoria como un componente importante en la vía de regulación retrógrada. A modo de ejemplo, se observó en tabaco que mutaciones en subunidades codificadas en la mitocondria inducían la expresión de enzimas antioxidantes en la célula, pero sin afectar el estado redox de compuestos reducidos como el glutatión o el ascorbato (Dutilleul y col., 2003). Además, se demostró que el agregado de rotenona, un inhibidor del complejo I, a células de *Arabidopsis* en cultivo, induce la expresión de las NAD(P)H dehidrogenasas alternativas y de la oxidasa alternativa (AOX), así como de numerosos componentes de la maquinaria de importación y ensamblado de la cadena respiratoria (Lister y col., 2004).

8.1.2 Direccionamiento simultáneo de proteínas a distintas organelas:

La biogénesis de organelas y el mantenimiento de las funciones celulares requieren de la compartimentalización de la célula y de proteínas específicas que se sinteticen o bien sean direccionadas hacia esos destinos. Numerosos estudios han demostrado que algunas proteínas son direccionadas simultáneamente hacia varios compartimientos mediante una serie de mecanismos entre los que se enumeran: la existencia de sitios de inicio de la transcripción alternativos conteniendo o no secuencias “target” para la localización celular, controles a nivel transcripcional y/o traduccional, y más recientemente, la presencia de cambios en el ambiente celular o de estímulos internos que haría que las proteínas sean requeridas en determinada localización subcelular para atender a esas necesidades (Babiychuck y col., 2003; Beardslee y col., 2002).

El direccionamiento dual de proteínas, sumado al mecanismo de señalización retrógrada al núcleo, constituye una vía de comunicación entrecruzada y efectiva entre organelas. Es una fuerte explicación al mecanismo de biogénesis coordinada entre organelas, en el que señales provenientes de una organela pueden inducir la expresión de proteínas en otras (Small y col., 1998). Si bien este mecanismo se encuentra fuertemente caracterizado para mitocondrias y plástidos, existen ejemplos documentados para el citosol y la mitocondria, mitocondria y retículo endoplasmático, y mitocondria y peroxisomas (Silva-Filho, 2003). Enzimas involucradas en la reparación y replicación del ADN, en la transcripción y traducción del ARN, la síntesis de lípidos, y varias vías metabólicas importantes permiten ilustrar el papel fundamental de proteínas que son dirigidas hacia numerosos compartimientos en la célula (Millar y col, 2004).

Un cuestionamiento importante sería por qué las células han evolucionado hacia mecanismos de traslocación simultánea de algunas proteínas hacia múltiples compartimientos mientras que para la mayoría de las proteínas la estrategia ha sido la duplicación de genes de manera de proveer diferentes isoformas, cada una con una determinada pre-secuencia. Esta no sería una cuestión relacionada con el tamaño del genoma ya que este fenómeno se ha observado en especies que tienen genomas grandes (Peeters y Small, 2001). Las razones de la existencia de este mecanismo “express” en el que las proteínas podrían cambiar su destino final en respuesta a cambios ambientales o requerimientos celulares aún necesitan ser debidamente esclarecidas (Silva-Filho, 2003).

8.1.3 Coordinación de la síntesis de proteínas en distintas organelas:

Esta coordinación existiría como un mecanismo de respuesta común frente a estímulos externos. Un ejemplo de esto sería la regulación de la expresión de numerosos genes involucrados en la respiración por la luz y en este sentido las proteínas mitocondriales más estudiadas son las del complejo glicina descarboxilasa (GDC). La regulación dependiente de la luz de la expresión de estos genes estaría a nivel de los ARNm e implicaría eventos de comunicación de los cloroplastos hacia el núcleo, lo que afectaría además la expresión de numerosos genes implicados en reacciones fotosintéticas (Millar y col, 2004).

8.2 Coordinación de la expresión de genomas nucleares y mitocondriales durante el desarrollo vegetal:

El desarrollo normal de hojas primarias de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en condiciones de iluminación fue utilizado para estudiar la biogénesis de proteínas mitocondriales en relación con la edad y los cambios fisiológicos dentro de la hoja. Los resultados indicaron que la composición de proteínas en la mitocondria cambia marcadamente durante el desarrollo pudiéndose observar tres grupos diferentes de proteínas: un grupo (a) en el que se encontraban proteínas de codificación mitocondrial como las subunidades II y III de la citocromo *c* oxidasa, y otras de codificación nuclear como subunidades del complejo piruvato deshidrogenasa, la oxidasa alternativa y la enzima málica, que presentaban un incremento en su concentración desde el meristema basal de la hoja (20 mm), disminuyendo abruptamente hacia el final de la zona de elongación; un grupo (b) representado por proteínas del TCA y proteínas encargadas del transporte de polipéptidos hacia la matriz mitocondrial como la mtHSP70, cuya concentración aumentaba desde la región basal llegando a un pico a los 50 mm desde la base de la hoja; y un grupo (c) constituido por subunidades del complejo glicina decarboxilasa (GDC) y otras proteínas involucradas en las reacciones de fotosíntesis, cuyos niveles de expresión se incrementaban al máximo hacia la zona del apical de la hoja. Este estudio permitió observar la marcada heterogeneidad existente en la composición proteica de la mitocondria, dependiendo de la función predominante en las células de acuerdo a sus niveles de desarrollo y a su capacidad para llevar a cabo reacciones de fotosíntesis y/o fotorrespiración (Thompson y col., 1998; Logan y col., 2001). Resultados similares se habían obtenido previamente, al analizar por hibridización

in situ la expresión de genes mitocondriales en diferentes tejidos y tipos celulares en plántulas de maíz, demostrándose que los niveles de transcritos mitocondriales aumentaban en aquellas células que se estaban dividiendo activamente (Xiu-Qing y col., 1996).

Por otro lado se realizó un análisis de la expresión de genes nucleares y/o mitocondriales para componentes de la cadena respiratoria en cotiledones de soja durante su desarrollo post-germinativo. La mayoría de los componentes analizados mostraron un patrón de expresión similar durante los 20 días luego de la germinación. Componentes de la vía dependiente de citocromo incrementaban sus niveles luego de la imbibición, llegando a un pico en el día 15 para declinar tan pronto se iniciaba la senescencia. Una notable excepción era el gen para la oxidasa alternativa (AOX) el cual aumentaba su expresión con el crecimiento de la plántula, llegando a un pico a los 20 días, momento en el que se iniciaba el proceso de senescencia en donde esta proteína juega un papel crucial. Este estudio avala la idea de que la expresión de algunos componentes de la cadena respiratoria se encuentra coordinada para responder a demandas del desarrollo o por imposiciones de tipo metabólico. La abundancia de estas proteínas es aparentemente determinada por un control transcripcional o post-transcripcional (Daley y col., 2003).

La expresión de un gran número de genes mitocondriales codificados en el núcleo ha sido examinada durante el desarrollo en *Arabidopsis*. Así como en otras especies, existe un incremento general de los niveles de transcritos en inflorescencias (Millar y col., 2004). La expresión de tres componentes del complejo I, así como los elementos que controlan su expresión, han sido extensamente estudiados. De esta manera, la subunidad de unión a NADH de 55-kDa, la subunidad PSST de 22-kDa y la proteína FeS de 28-kDa presentan un mecanismo de regulación común y sus promotores tienen entre las posiciones -100 a -250 un motivo denominado *pollen-box* responsable de dirigir una fuerte expresión en anteras y granos de polen, el que sería reconocido específicamente por el regulador de la transcripción ARR2 (Zabaleta y col., 1998; Lohrmann y col., 2001; Binder y Brennicke, 2003). Por otro lado, se observó que la perturbación del complejo I, ya sea por inhibición directa con rotenona o por mutantes “knock-out”, resultaría en un incremento de la biogénesis mitocondrial o en una incapacidad de responder a condiciones de estrés por frío, respectivamente (Lee y col., 2002; Lister y col., 2004). Además, se observó un incremento general en la expresión de genes nucleares para componentes del complejo I (nCI) en *Arabidopsis*: *psst*, *tyky* y *nadhbp*, asociados con una

disfunción mitocondrial y un fenotipo de esterilidad masculina generado por la sobreexpresión de una forma no editada del gen para la subunidad 9 de la ATP sintetasa de trigo (Gomez-Casati y col., 2002).

Por otro lado, estudios de la expresión de componentes de los complejos respiratorios mitocondriales, de las vías de catabolismo de aminoácidos, de la fotorrespiración, y del complejo piruvato deshidrogenasa, permitieron concluir que la expresión de los genes nucleares codificantes para proteínas implicadas en la biogénesis de distintos complejos mitocondriales responde a un número amplio de señales metabólicas. Mientras componentes de la cadena respiratoria como la citocromo oxidasa son inducidos por incrementos en los niveles de sacarosa o en las condiciones de iluminación (Ohtsu y col., 2001; Figueroa y col., 2002; Curi y col., 2003), las enzimas involucradas en el catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada son inducidas por niveles bajos de azúcares (Fujiki y col., 2002).

9. Cadena Respiratoria Mitocondrial:

La fosforilación energética u oxidativa es la forma de energía usada por la célula para realizar los procesos necesarios para la vida. Los electrones conteniendo alta energía capturados durante el ciclo de los ácidos tricarbóxicos en la forma de NAD(P)H y FADH₂ deben ser convertidos a ATP de manera de poder ser utilizados por la maquinaria celular. Estos procesos dependientes del O₂ molecular involucran una serie de complejos que actúan como transportadores de estos electrones que se ubican en la membrana interna mitocondrial constituyendo la cadena de transporte de electrones (Siedow y Umbach, 1995) (fig. 5). El mecanismo fundamental de transducción de la energía en la mitocondria se basa en la teoría quimiosmótica, como un mecanismo general de conservación de la energía a través de membranas biológicas. Según esta teoría, la orientación asimétrica de los transportadores de electrones dentro de la membrana interna permite la transferencia de protones (H⁺) a través de la misma durante el flujo de electrones, generando un potencial electroquímico que es utilizado en etapas subsiguientes para la síntesis del ATP (Frey y Mannella, 2000; Taiz y Zeiger, 1998).

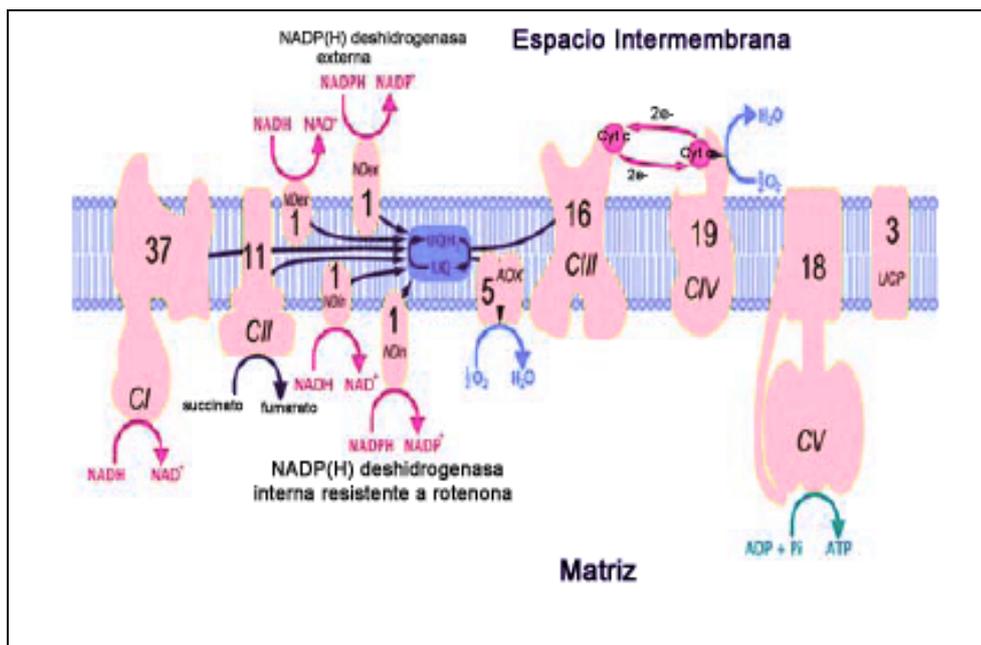


Figura 5: Cadena respiratoria mitocondrial de plantas. En rosa se esquematiza la localización de los complejos que integran la cadena respiratoria (CI a CV). El número de genes que codifican polipéptidos en *Arabidopsis thaliana* se indica dentro de cada complejo. En azul se representa la ubiquinona (UQH₂-UQ) y en rojo el citocromo *c* (*cyt c*). Las flechas indican el sentido de las reacciones que se llevan a cabo en cada complejo y el direccionamiento del flujo de energía. (Extraído de Millar y col., 2004).

Los complejos respiratorios mitocondriales representan un modelo particularmente atractivo para el estudio de los mecanismos de coordinación núcleo-mitocondria. Esto se debe no sólo a que la mayoría de los complejos tiene componentes codificados en ambos genomas, sino también a que éstos están relacionados con la síntesis de ATP, conectando en ambos puntos el metabolismo mitocondrial con la economía celular global.

Por cada molécula de glucosa oxidada durante la glicólisis y el ciclo de los TCA, se generan dos moléculas de NADH en el citosol y ocho moléculas de NADH más dos de FADH₂ (asociados a la enzima succinato deshidrogenasa) en la matriz mitocondrial (Taiz y Zeiger, 1998). Los electrones generados por el NADH en la matriz son oxidados por el complejo I o NADH-UQ oxidoreductasa, el cual transfiere los electrones a la ubiquinona, una molécula de *p*-benzoquinona química y funcionalmente similar a la plastoquinona de la cadena de transporte fotosintética.

El complejo I está formado por 30 a 46 subunidades en hongos y animales. En plantas, se han separado por SDS-PAGE más de 30 subunidades en papa, poroto y trigo (Rasmusson y

col., 1998). En *Arabidopsis*, un conjunto de 35 posibles proteínas que presentan una alta homología con 29 de los 46 componentes del complejo I de mamíferos están codificadas por alguno de los dos genomas. Geles de separación nativos permitieron observar que 20 componentes constituirían nuevas proteínas integrantes de este complejo, características de plantas (Heazlewood y col., 2003). Entre los nuevos componentes identificados en plantas que agregarían nuevas funciones a proteínas integrantes de este complejo respiratorio se destaca una enzima con actividad de anhidrasa carbónica (Parisi y col., 2004) y una enzima final para la síntesis de ascorbato, un antioxidante muy abundante presente en plantas (Bartoli y col., 2000). En *Arabidopsis*, la enzima galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH) está físicamente asociada al complejo I, pudiéndose demostrar que la síntesis de ascorbato es sensible a la función del complejo I ya que ambas actividades del metabolismo celular son fuertemente inhibidas mediante el tratamiento con rotenona (Millar y col., 2003). Por otra parte, los transportadores de electrones que constituyen el complejo I incluyen varias proteínas hierro-azufre y el cofactor FMN (flavin mononucleótido).

El complejo II o succinato deshidrogenasa es una enzima tanto del ciclo del ácido cítrico como de la cadena de transporte de electrones, de modo que los electrones provenientes de la oxidación del succinato son transferidos vía FADH_2 y un grupo de proteínas Fe-S hacia el pool de ubiquinonas. Al igual que el complejo IV, su composición está menos definida en mitocondrias de plantas y el mayor número de presunciones están basadas en estudios hechos en mitocondrias de otros organismos (Capaldi y col., 1990). Este complejo está clásicamente constituido por cuatro subunidades: una flavoproteína (SDH1), una subunidad hierro-azufre (SDH2), y dos subunidades de anclaje a membranas (SDH3 y SDH4) (Figuroa y col., 2002). SDH2 es codificada por un único gen nuclear en mamíferos y hongos, y por un gen mitocondrial en algunos protistas. En *Arabidopsis*, los ortólogos a SDH2 son codificados por tres genes nucleares conteniendo todos ellos las secuencias esenciales para su función perfectamente conservadas (Figuroa y col., 2001). Utilizando geles de separación nativos se ha podido separar el complejo SDH intacto a partir de membranas mitocondriales de *Arabidopsis*. Este complejo contiene SDH1-3, así como otras cuatro proteínas que migran junto con el complejo SDH, dos de las cuales han sido identificadas por espectroscopía de masa como proteínas de función desconocida dentro del genoma de *Arabidopsis* (Eubel y col., 2003). Recientemente se han realizado análisis de geles nativos en dos dimensiones (2D-SDS-PAGE) en los que se han podido separar ocho bandas (SDH 1 a 8) correspondientes a diferentes subunidades del

complejo II de Arabidopsis, siete de las cuales habían sido identificadas previamente mediante geles nativos (Eubel y col., 2003; Millar y col., 2004a). Todas las subunidades están codificadas en el genoma nuclear en todos los organismos estudiados, constituyendo una excepción dentro de los componentes de la cadena de transporte de electrones

El complejo III actúa como una ubiquinol:citocromo *c* oxidorreductasa oxidando la ubiquinona reducida (ubiquinol) y transfiriendo los electrones vía un centro Fe-S, dos citocromos de tipo *b* (*b*₅₆₅ y *b*₅₆₀) y un citocromo *c*₁ unido a la membrana, hacia el citocromo *c* (Siedow y col., 1995). Este complejo consiste en 10 subunidades que mediante separaciones en geles nativos (BN-PAGE) han sido identificadas como codificadas en su mayoría por el genoma nuclear (Kruft y col., 2001). Una subunidad de este complejo, citocromo *b* (*cob*) es codificada en Arabidopsis por el genoma mitocondrial (Unselde y col., 1997).

Entre los complejos III y IV encontramos al citocromo *c* que actúa transfiriendo los electrones entre estos complejos y representa el único componente de la cadena que no es una proteína integral de membrana y funciona como un transportador móvil ubicado hacia el espacio intermembrana.

El complejo IV representa la citocromo *c* oxidasa y contiene dos centros de cobre (Cu_A y Cu_B) y citocromos *a* y *a*₃. Este complejo emplea cuatro electrones para la reducción del O₂ formando dos moléculas de H₂O. En mamíferos, se identificaron 13 subunidades, 3 codificadas en el genoma mitocondrial y 10 en el núcleo. Eubel y colaboradores (2003) lograron separar en Arabidopsis un complejo compuesto por más de 12 bandas, pudiendo identificar por espectroscopía de masa seis de las subunidades COX conocidas: COXI, COXII, COXIII, COX5b, COX5c y COX6a. Recientemente, mediante geles nativos en dos dimensiones (2D-SDS-PAGE) se lograron separar seis nuevas posibles proteínas que formarían parte de este complejo, las que fueron nombradas como COXX1-6. Como resultado, el complejo citocromo *c* oxidasa de plantas tendría alrededor de 12 a 14 subunidades diferentes y por lo tanto su complejidad sería comparable a la observada en levaduras (11 subunidades) y bovinos (13 subunidades) (Millar y col., 2004a).

El complejo V es una F₁F₀ ATP sintetasa unida a la membrana que cataliza el paso terminal de la respiración oxidativa convirtiendo la generación de potencial electroquímico en ATP, energía utilizable por la célula para la realización de todos los procesos biosintéticos. La

estructura general y las subunidades que constituyen el núcleo de esta enzima se encuentran altamente conservadas tanto en organismos eucariotas como procariotas. Su estructura consiste en una porción hidrofílica F_1 que constituye el sitio de unión a nucleótidos y el canal de protones unido a membrana F_0 (Millar y col., 2004).

Existe un gran número de evidencias que indican que los complejos enzimáticos que constituyen la cadena respiratoria interaccionan entre sí formando estructuras supramoleculares denominadas supercomplejos (Eubel y col., 2003). Uno de los más ampliamente estudiados recibe el nombre de respirasoma y fue encontrado tanto en mamíferos como en plantas. El mismo presenta una composición $I:III_2:IV_{1-4}$ (Eubel y col., 2004).

Además de los complejos transportadores de electrones involucrados en la fosforilación oxidativa, las mitocondrias de plantas contienen algunos componentes no comúnmente encontrados en otros organismos. Un ejemplo está dado por uno o más complejos NAD(P)H deshidrogenasas que se localizan en el espacio intermembrana del lado de la membrana interna, aparentemente facilitando la oxidación del NADH citoplasmático y posiblemente del NADPH. Los electrones desde estas deshidrogenasas externas entran en la cadena principal de transporte de electrones a nivel de las ubiquinonas. Una segunda característica inusual de las mitocondrias de plantas es la presencia de dos vías para la oxidación del NADH proveniente de la matriz. Además de la vía descrita anteriormente, existiría otro camino posible que pasa por alto al complejo I y está representado por NADH deshidrogenasas insensibles a la rotenona o a inhibidores del complejo I (Moller, IM., 2002). Este grupo de deshidrogenasas está ampliamente relacionado con las NAD(P)H deshidrogenasas de tipo 2 encontradas en bacterias y su actividad, al igual que la de las otras deshidrogenasas, no contribuye al gradiente de protones ni a la síntesis de ATP (Michalecka y col., 2003).

Las mitocondrias de plantas también poseen una vía oxidativa independiente de citocromo *c* en la cual los electrones de la ubiquinona son cedidos a una oxidasa terminal u oxidasa alternativa insensible a KCN, cuya actividad tampoco está asociada a un gradiente de protones ni a la producción de ATP (Vanlenberghe y McIntosh, 1997; Siedow y Umbach, 2000). Cuando la vía de transporte de electrones por citocromos se satura, las relaciones ATP/ADP y NADH/NAD⁺ aumentan y se ve limitada la producción de esqueletos carbonados por medio del ciclo de Krebs. En estas condiciones la oxidasa alternativa, que se induce en presencia de estrés

ambiental, se acopla al ciclo de Krebs para compensar la demanda de compuestos carbonados. De esta manera, la dupla ciclo de Krebs/oxidasa alternativa contribuye al aumento del flujo de compuestos carbonados y a los procesos anabólicos. El mecanismo de control de esta relación parece ser postraducciona y depender del estado redox del homodímero oxidasa alternativa (Mackenzie y McIntosh, 1999). Teniendo en cuenta estos mecanismos de control, cualquier condición metabólica que lleve a la acumulación de ubiquinona reducida, NADPH o piruvato, conduciría a un mayor flujo de electrones hacia la vía alternativa (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Según Poyton y McEwen (1996), la mitocondria es el mayor productor de especies reactivas de oxígeno (ROS), las que se ven incrementadas en condiciones de estrés ambiental. Estas condiciones producen un desbalance metabólico entre el metabolismo del carbono y el transporte de electrones e inducen la síntesis de oxidasa alternativa. Este aumento de la vía alternativa asegura la provisión de esqueletos carbonados y la síntesis de compuestos que puedan mitigar el daño que las ROS provocan en las células vegetales (Wagner y Moore, 1997). Este es uno de los principales mecanismos del que disponen las plantas para enfrentar las condiciones ambientales adversas (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). La oxidasa alternativa es codificada por cinco genes en *Arabidopsis*, cuatro del tipo *aox1* y uno del tipo *aox2*. La expresión de los diferentes genes ha demostrado ser tanto específica de tejido como relacionada con el estadio de desarrollo del mismo (Thirkettle-Watts y col., 2003).

Uno de los modelos mejor estudiados de expresión de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo ha sido la expresión de subunidades de la citocromoc *c* oxidasa de levaduras. En eucariotas no fotosintéticos este componente de la cadena respiratoria es un regulador crítico de la producción de energía y, en levaduras, los niveles de este complejo multienzimático están regulados por efectores ambientales como el oxígeno y las fuentes de carbono. En mamíferos, la fuente de carbono no parece jugar un rol aparente, mientras que el oxígeno y las hormonas son los efectores responsables de la síntesis de factores de transcripción específicos (Poyton y McEwen, 1996).

Las plantas presentan mecanismos más complejos de regulación de la expresión génica debido a que contienen plástidos, capaces de producir tanto oxígeno como compuestos carbonados, ambos sustratos de la respiración. Además las mitocondrias de plantas tienen funciones diferentes y posiblemente más elaboradas que las de mamíferos u hongos (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Esta complejidad adicional y el hecho de que los complejos

respiratorios constituyan un modelo interesante para el estudio y la comprensión de los mecanismos implicados en la regulación de la biogénesis de mitocondrias en organismos fotosintéticos, constituyen el fundamento de este trabajo de tesis.

HIPÓTESIS PLANTEADAS PARA EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS:

Las mitocondrias de plantas, al igual que los cloroplastos, tienen un origen bacteriano y poseen sus propios genomas. Sin embargo, durante la evolución del endosimbionte primitivo la mayoría de los genes organelares han sido transferidos al núcleo. Por esto, los genomas de estas organelas codifican un número limitado de proteínas que son indispensables pero a la vez insuficientes para llevar a cabo los procesos celulares vitales, y la mayoría de los componentes proteicos que integran los complejos multienzimáticos deben ser importados desde el citosol. Deben existir, entonces, mecanismos capaces de regular finamente la expresión de los genes codificados en ambos genomas de manera de asegurar el correcto ensamblado y funcionamiento de estos complejos, cuya actividad es crucial para la célula. Además, las mitocondrias de plantas constituyen el sitio en el que se conectan los procesos metabólicos que regulan la economía y el funcionamiento celular por lo que la regulación de estos procesos también debe estar coordinada con los requerimientos de la planta, a través de su ciclo de vida y de los estímulos ambientales externos.

Numerosos grupos de investigadores han utilizado a los complejos respiratorios mitocondriales como modelo para intentar dilucidar diferentes aspectos de las interconexiones existentes entre el núcleo y la mitocondria en las células vegetales, y poder establecer así mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de ambos genomas (Zabaleta y col., 1998; Traven y col., 2001; Binder y Brennicke, 2003; Goffart y Wiesner, 2003; Giegé y col., 2005).

Resultados previos obtenidos en el laboratorio donde se realizó la presente tesis doctoral apoyan fuertemente las hipótesis antes planteadas, pudiéndose observar que los niveles de transcripto correspondiente al citocromo *c* y a la subunidad 5c de la citocromo *c* oxidasa de girasol (*Helianthus annuus* L.) varían de acuerdo al tejido en estudio y, además, están regulados por factores externos tales como la presencia de nitrato, hidratos de carbono y luz (Felitti y col., 1997; 1998; Curi y col., 2002; 2003). Mediante análisis por hibridización *in situ* se ha establecido que los niveles de transcripto codificante para el citocromo *c* varían de acuerdo al tipo celular y al estado de desarrollo en flores de girasol y *Arabidopsis thaliana* (Ribichich y col., 2001). Se ha determinado también que la regulación por factores externos se halla conservada en el alga unicelular

Chlamydomonas reinhardtii (Felitti y col., 2000). En base a estos resultados previos, resulta interesante extender el análisis a otros genes involucrados en la actividad respiratoria, profundizando el estudio desde el punto de vista molecular, intentando recabar mayor información acerca de los mecanismos reguladores de la expresión de estos genes a nivel transcripcional o post-transcripcional.

OBJETIVOS PROPUESTOS:

Objetivo general:

El objetivo del presente trabajo es estudiar la estructura de genes vegetales que codifican proteínas mitocondriales, analizar los factores que influyen sobre su expresión y conocer cómo se logra la expresión coordinada de los distintos componentes del sistema. Para avanzar en el estudio de los mecanismos moleculares de expresión, se utilizará el modelo de estudio en vegetales, *Arabidopsis thaliana*, dado que posee un genoma relativamente sencillo y existen protocolos establecidos de transformación.

Objetivos específicos:

1. Aislar y caracterizar clones de ADNc y genómicos que codifican para el citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana*.
2. Aislar y caracterizar clones de ADNc y genómicos que codifican para la subunidad Vb de la citocromo *c* oxidasa de la misma especie.
3. Determinar los patrones de expresión de los genes en estudio para establecer si existen mecanismos comunes de regulación.
4. Estudiar las secuencias promotoras de los genes aislados, con el objetivo de establecer qué tipo de secuencias están involucradas en la regulación.

2. Materiales y Métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material utilizado

2.1.1 Material vegetal y condiciones de cultivo de las plantas de *Arabidopsis thaliana*:

Todos los ensayos realizados durante la etapa experimental de este trabajo fueron llevados a cabo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Heyn. ecotipo Columbia (Col-O) fueron provistas por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA).

2.1.1.1 Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo:

Las plantas fueron crecidas en una cámara de cultivo bajo condiciones de temperatura, humedad e iluminación controladas. Las mismas simulaban un fotoperíodo denominado de “día largo”, el cual consiste en 16 horas de luz a una temperatura aproximada de 24°C y 8 horas de oscuridad a una temperatura que descendía a los 20 - 22°C aproximadamente. La humedad se mantuvo en un rango variable entre 40-70%. Las condiciones de iluminación fueron logradas con una combinación de lámparas fluorescentes blancas frías y de tipo GroLux (Silvania, Vinhedo, SP, Brasil), con una densidad de flujo de fotones fotosintética de 200 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.1.1.2 Plantas salvajes de *Arabidopsis* utilizadas para agroinfiltración:

Para realizar la transformación de plantas adultas de *Arabidopsis* mediante el método de inmersión floral (“floral dip”) usando *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998), se sembraron semillas en macetas con tierra. Las mismas fueron cubiertas con redes de nylon e irrigadas en forma subterránea durante todo el período de crecimiento de las plantas. Estas plantas se dejaron crecer hasta el momento de la floración (aproximadamente cuatro semanas para las condiciones de cultivo empleadas), momento en el que se empezaron a cortar las inflorescencias de manera de aumentar el número de flores por planta y disminuir la variabilidad normal en el desarrollo de las distintas plantas a ser transformadas.

2.1.1.3 Plantas salvajes de *Arabidopsis* utilizadas para ensayos metabólicos y estudios de expresión:

Para la realización de ensayos metabólicos y posterior análisis de los niveles de transcritos de los genes en estudio mediante ensayos de northern blot, se utilizaron plantas de *Arabidopsis* de 21 días. Estas plantas fueron crecidas en tierra según las condiciones de cultivo detalladas anteriormente. Cuarenta y ocho horas antes de la realización de los diferentes tratamientos, las mismas fueron pasadas a oscuridad de manera de disminuir los niveles de metabolitos generados en el proceso fotosintético, presentes al momento de realizar los diferentes ensayos. Estas plantas etioladas fueron cuidadosamente pasadas a placas de Petri de 90 mm conteniendo medio Murashige y Skoog 1x (MS) (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con diferentes soluciones.

2.1.1.4 Plantas transformantes de *Arabidopsis*:

Para la realización de ensayos de medida de la actividad GUS por fluorimetría o histoquímica las plantas transformantes con distintas delecciones de los promotores en estudio fusionadas al gen reportero *gus* fueron sembradas en placas de Petri conteniendo medio MS 0,5x suplementado con vitaminas de Gamborg 1x (Gamborg y col., 1968), 0,8% agar y el antibiótico kanamicina en una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. Para el análisis del gen reportero por histoquímica las placas fueron incubadas a 4°C durante 2 días y luego transferidas a la cámara de cultivo, realizando un seguimiento de la expresión del gen reportero en las primeras etapas del desarrollo de plántulas de *Arabidopsis*. Para los ensayos fluorométricos las semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en placas de Petri conteniendo MS suplementado previamente con las distintas soluciones de prueba. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 4°C durante 4 días y luego pasadas a cámara de cultivo en las mismas condiciones de oscuridad, hasta completar un período de incubación de entre 12 y 14 días.

2.1.2 Tratamientos de las plantas de *Arabidopsis thaliana*:

2.1.2.1 Tratamientos utilizando plantas no transformadas. Realización de ensayos metabólicos y posterior análisis por northern blot:

Las plantas salvajes de *Arabidopsis* usadas en los distintos tratamientos se mantuvieron durante tres semanas en cámara de cultivo y posteriormente se transfirieron a oscuridad durante 48 h. Luego del período de adaptación a oscuridad, se sometieron a los distintos tratamientos que se detallan a continuación. A fin de evaluar el efecto de los compuestos carbonados (azúcares metabolizables y no metabolizables) las plantas de *Arabidopsis* se sumergieron a nivel de las raíces en soluciones conteniendo glucosa, sacarosa, fructosa, manosa y manitol a concentraciones de 1%, 3% y 5% (P/V) en medio MS. Las incubaciones se realizaron poniendo en contacto las plantas con las distintas soluciones a nivel de las raíces (utilizando redes de nylon para sostener las plantas), como así también sumergiendo la planta entera o las hojas aisladas, separándolas previamente del resto de la planta mediante un corte de las mismas en la base del pecíolo. Durante los tiempos de incubación ensayados (2, 6, 8, 12, 18 y 24 h) se mantuvieron las condiciones de oscuridad. Para analizar el efecto de la luz sobre la expresión de los genes en estudio estos tratamientos se repitieron en condiciones de iluminación. Por otro lado se realizaron pruebas con distintas concentraciones de nitrato o amonio. Los nutrientes nitrogenados usados fueron KNO_3 y NH_4Cl en concentraciones 0,5 y 5,0 mM preparados en medio MS libre de nitrógeno y como control se utilizó un medio MS modificado en su composición, libre de compuestos nitrogenados. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las muestras fueron recogidas, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su posterior procesamiento y extracción de ARN total como se indica en el punto 2.5.4.

2.1.2.2 Tratamientos utilizando plantas transformadas. Realización de ensayos metabólicos y posterior análisis por medida del gen reportero mediante técnicas fluorométricas:

Las plantas transformadas seleccionadas para realizar los ensayos fluorométricos fueron sembradas en placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo medio MS 0,5x suplementado con vitaminas de Gamborg 1x (Gamborg y col., 1968), 0,8% agar y el antibiótico kanamicina en

una concentración de 50 µg/ml. Para los distintos tratamientos realizados, las placas fueron suplementadas con soluciones madres a fin de obtener las siguientes condiciones de prueba: sacarosa al 3% (P/V), NH₄Cl 5 mM, 6-benzilaminopurina (BAP) 50 a 200µM. Como controles se utilizaron placas conteniendo el medio base MS 0,5X. Las placas fueron incubadas en oscuridad a 4°C durante 4 días y luego pasadas a cámara de cultivo en las mismas condiciones de oscuridad hasta completar un período de incubación de entre 12 y 14 días.

2.1.3 Cepas bacterianas utilizadas

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas fueron:

DH5α (supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1^r) thi-1 relA1) (Hanahan, 1983)

NM538 (supF hsdR (r_{k-}, m_{k+}) trpR lac Y)

Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas fueron:

GV2260: presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/l). Esta cepa utiliza el sistema co-integrado de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pGV2260 que se obtuvo de reemplazar la región ADN-T del plásmido pTiB6S3 de la cepa salvaje C58 por el plásmido pBR322 (Deblaere et al., 1985).

LB 4404: presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/l). Esta cepa utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomicina (300 mg/l)) en la cepa Ach5. Esta cepa además posee el plásmido pTi/pRi pTiAch5 (Ooms et al., 1982).

2.2 Métodos de clonado y análisis de recombinantes

2.2.1 Clones de ADN copia de *Arabidopsis thaliana* utilizados:

Clones conteniendo EST de los genes *cytc-1* (clon 172G24T7; n° de acceso H35987) y *cytc-2* (clon APZ69d09; n° de acceso AV521939) fueron provistos por el ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University, Columbus, OH, USA) y el Kazuka DNA Research Institute (Chiba, Japón), respectivamente. También se utilizó un clon de EST comprendiendo los exones 2 a 6 del gen *cox5b-1* (clon 234B12T1; n° de acceso N65183), provisto también por el ABRC.

Por otra parte, el clon de ADN copia con la secuencia codificante completa del gen *cox5b-2* fue obtenido mediante una reacción de amplificación de ADN por PCR (ver punto 2.2.4) utilizando como molde ADN preparado a partir de una biblioteca de ADNc de flores de *Arabidopsis* (Weigel et al. 1992, ABRC). Se utilizó para tal fin el siguiente par de oligonucleótidos: 5'-CATTATGTGGAGGAGAATC-3' y 5'-AATAGATTGTTTTCTTGG-3'. El producto de amplificación fue clonado posteriormente en el vector pGEM-T Easy (Promega Corp., Madison, WI, USA).

2.2.2 Aislamiento y clonado de genes de *Arabidopsis thaliana*

2.2.2.1 Búsqueda y aislamiento de genes en una biblioteca de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*:

Para el aislamiento de las regiones promotoras de los genes *cytc-1* y *cox5b-1* se utilizó una biblioteca de ADN genómico. La misma fue construida a partir de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Landsberg, en el vector λ FIX (Stratagene) digerido en el sitio *Xho*I. λ FIX es un vector de 41,9 kpb que contiene una región de múltiple clonado entre las dos regiones promotoras de los bacteriófagos T₃ y T₇. Un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *Not*I en la terminación de las regiones promotoras permite extraer por digestión estas regiones unidas al inserto y mapear el ADN clonado con sondas específicas de reconocimiento de T₃ y T₇. Esta biblioteca fue obtenida del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (Voytas y col., 1990).

Para la identificación y el aislamiento de clones genómicos se siguió la metodología descrita por Ausubel y col. (1987). Se cultivaron células de la cepa NM538 de *Escherichia coli* hasta saturación a 37°C en medio λ Broth (ver anexo II) suplementado con maltosa 0,2% (P/V) y MgSO₄ 10 mM. De este cultivo se tomaron alícuotas de 500 μ l, las que fueron infectadas con una dilución adecuada de la biblioteca de ADN genómico de *Arabidopsis* utilizada en solución SM (ver anexo II). Las mezclas de infección se incubaron 10 min a TA, 15 min a 37°C y posteriormente se transfirieron a tubos que contenían 8 ml de Top Agar (ver anexo II) mantenidos a 48°C. El contenido de los mismos fue vertido sobre cajas de Petri de 150 mm con medio sólido λ Plates (ver anexo II). Las placas se incubaron a 37°C durante 6-7 h hasta obtener la lisis de las células. Las placas de lisis obtenidas fueron transferidas a membranas de nylon *Hybond-N* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) y éstas fueron luego incubadas y expuestas a sondas específicas marcadas como se detalla en el punto 2.10.

Para el aislamiento de clones conteniendo los genes *cytc-1* y *cox5b-1* se analizaron alrededor de 1×10^5 UFP, empleándose en cada caso como sondas de ADN fragmentos marcados de los clones de EST 172G24T7 y APZ69d09 respectivamente, obtenidos en el ABRC.

Los clones positivos fueron purificados tomando la porción de medio que contenía la placa de lisis correspondiente a cada señal de la autorradiografía. El material recogido se incubó en 1 ml de SM a 4°C para permitir la elución de los bacteriófagos. Los clones positivos fueron obtenidos a través de sucesivas rondas de plaqueo e hibridización y fueron utilizados posteriormente para la obtención de ADN.

2.2.3 Clonado de las regiones promotoras de los genes *cytc-1*, *cytc-2* y *cox5b-1* de *Arabidopsis thaliana*:

2.2.3.1 Clonado de la región promotora del gen *cytc-1*:

Para el aislamiento de clones conteniendo el gen *cytc-1* (At1g22840), se realizó una búsqueda en una biblioteca de ADN genómico de *Arabidopsis*. (Voytas y col., 1990). Utilizando una sonda de ADNc marcada radiactivamente (ver punto 2.10) se analizaron aproximadamente 1×10^5 UFP de la biblioteca. Luego de sucesivas rondas de purificación de los clones positivos se realizó una preparación de ADN de fago de los mismos (punto 2.5.2) para su posterior análisis.

De la búsqueda de clones positivos en la biblioteca genómica se obtuvo un fragmento *NheI/EcoRI* de aproximadamente 1,4 kpb, el que fue clonado en el vector pUC119. De este clon, se obtuvo un fragmento de 1,23 kpb del gen *cytc-1* que comprendía los nucleótidos -1182 a + 54 (posiciones tomadas con respecto al codón de iniciación) mediante digestión con las enzimas *SalI* y *BglII*. Este fragmento fue clonado en los sitios *SalI* y *BamHI* del vector pBI101.3 (Jefferson y col., 1987).

A partir de esta construcción se generaron deleciones sucesivas del promotor mediante reacciones de amplificación por PCR con los pares de oligonucleótidos CATP16 hacia el extremo 3' del gen y los oligonucleótidos CATP15, CATP13, CATP14, CATP19, CATP17 o CATP11 hacia el 5' del mismo (ver anexo I). Estos oligonucleótidos permitieron introducir los sitios *BglII/HindIII* en los fragmentos amplificados para realizar el clonado de los mismos en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3.

Una vez acotada la zona responsable de la expresión del gen, se realizaron mutaciones puntuales y una deleción completa dentro de la misma, siguiendo la técnica descrita por Silver y colaboradores (1995). Para realizar la deleción completa dentro de la región promotora comprendida entre las posiciones -147 y -218 se realizaron dos amplificaciones por PCR utilizando oligonucleótidos que hibridaban a ambos lados de la región a deleccionar. Los mismos se nombraron delA1 y delA2 (ver anexo I) y fueron usados en reacciones de PCR con los oligonucleótidos CATP13 y CATP16, respectivamente, de manera de amplificar las regiones del promotor flanqueantes a la región a deleccionar. Los productos fueron purificados y mezclados en un tubo de reacción conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, y 0,1 mM DTT. Esta mezcla de reacción se incubó a 95°C durante 5 min y luego se hizo descender lentamente la temperatura hasta los 24°C de modo de favorecer la hibridación entre las regiones complementarias de los dos productos de PCR generados en el paso anterior. Seguidamente, se adicionó al tubo de reacción 0,5 mM de cada dNTP y 5 unidades de la enzima Klenow ADN polimerasa I (Promega), y se realizó una incubación durante 1 h a 37°C para extender los fragmentos hibridados. Una alícuota de este volumen de reacción fue utilizada directamente para amplificar este fragmento químico empleando los oligonucleótidos CATP13 y CATP16.

Siguiendo una estrategia similar se realizaron mutaciones puntuales sucesivas entre las posiciones -147 y -218 de la región promotora y en elementos regulatorios específicos putativos

dentro de otras regiones del promotor. Todas las construcciones generadas fueron verificadas por la técnica de secuenciación de ADN según se indica en el punto 2.7.1. Las secuencias de los distintos oligonucleótidos utilizados, así como la posición en la que hibridan dentro de la región promotora y los sitios de restricción que permiten introducir para la realización de los diferentes clonados están especificados en una tabla en el anexo I.

2.2.3.2 Clonado de la región promotora del gen *cytc-2*:

Para el clonado de la región promotora del gen *cytc-2* (At4g10040) se procedió a la preparación de ADN genómico de *Arabidopsis* según se describe en el punto 2.5.3. Usando este ADN genómico como molde se efectuó una reacción de PCR usando los oligonucleótidos CATP22 y CATP26 (ver anexo I). Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1021 pb entre las posiciones -967 y +54 de la región promotora del gen. A partir de este fragmento, se realizaron delecciones sucesivas utilizando los oligonucleótidos CATP22 en el extremo 3' y CATP23, CATP24, CATP29, CATP210, CATP25, CATP211 o CATP212 en el extremo 5' de la región promotora (ver anexo I). Como resultado de las reacciones de amplificación con los distintos pares de oligonucleótidos se obtuvieron fragmentos que abarcaban regiones del promotor contenidas entre las posiciones -604, -386, -315, -259, -189, -140 o -97 y +54, según el orden respectivo de los oligonucleótidos utilizados. Los fragmentos resultantes, que contenían los sitios *HindIII* y *BglII*, fueron clonados en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3. Además, siguiendo una estrategia similar a la empleada para el promotor *cytc-1*, se realizó una mutación puntual en el elemento regulador *G-box* identificado en la posición -172 del promotor *cytc-2*, utilizando los oligonucleótidos mutGF y mutGR (ver tabla anexo I).

2.2.3.3 Clonado de la región promotora del gen *cox5b-1*:

Como resultado de la búsqueda y aislamiento de clones genómicos según se detalla en el punto 2.2.2.1 se obtuvo un fragmento de 4 kpb aislado con la enzima de restricción *HindIII* que contenía regiones transcritas hasta el quinto intrón y secuencias ubicadas corriente arriba de la región codificante del gen *cox5b-1*. Este fragmento fue subclonado en el vector pBluescript SK- y

recibió el nombre VBATH1. Dicho clon fue analizado por secuenciación parcial según el punto 2.7.1.

El clon VBATH1 fue usado como molde para una reacción de PCR utilizando el oligonucleótido COXB12 (ver anexo I), que permite generar un sitio *SalI*, y el oligonucleótido universal -40. Se obtuvo de esta manera un fragmento de 2 kpb *HindIII/SalI* comprendiendo la región corriente arriba del codón de iniciación (ATG) del gen *cox5b-1*. Este fragmento fue clonado en los mismos sitios de restricción del plásmido pBI101.3.

A partir de este clon (llamado COX 1), se construyeron delecciones sucesivas mediante reacciones de amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos. De esta manera, utilizando los oligonucleótidos COXB13, COXB14, COXB15 y COXB16 (ver anexo I) y el primer universal -40 se obtuvieron fragmentos de 609, 387, 195 y 96 pb respectivamente. Estos fragmentos, al igual que el anterior de 2 kpb, fueron clonados en los sitios *HindIII* y *SalI* del vector pBI101.3, para generar las construcciones que luego fueron llamadas COX 2, COX 3, COX 4 y COX 5.

Estas construcciones fueron usadas para transformar las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 o LBA4404 según se detalla en el punto 2.3.2.

2.2.4 Amplificación por PCR de fragmentos de ADN (reacción en cadena de la polimerasa):

En las reacciones de amplificación por PCR se usaron en todos los casos volúmenes de reacción de 50 μ l, empleándose 1,5 U de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega) por reacción. Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima compuesta por Tris-HCl (pH 9 a 25°C), KCl 50 mM y Tritón X-100 0,1%, a la cual se le agregó: MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM c/u y 500 ng de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporó el ADN molde y la enzima. Finalmente se añadió una gota de aceite mineral (Promega) y se sometió a la reacción de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PT-100™ (MJ Research, Inc.) utilizando los programas apropiados para cada caso y en donde la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m=2(A+T) + 4(G+C)$]. Los productos de las reacciones de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa según el punto 2.7.2.

2.2.5 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción:

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos fueron utilizadas entre 1 y 5 U de enzima por cada μg de ADN a digerir en un volumen final que varió entre 20 y 50 μl , dependiendo de la cantidad de ADN. Cuando fue necesario, se adicionó a la reacción de corte la enzima ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.2.6 Ligación de moléculas de ADN:

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10 μl y empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1 respectivamente. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C, o a 16°C.

2.3 Transformación de bacterias:

2.3.1 Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico:

2.3.1.1 Método del CaCl_2 :

La técnica utilizada para transformar células de *E. coli* con los distintos plásmidos fue la descrita por Kushner (1978) y se realizó según se describe en Maniatis y colaboradores (1982). Luego de realizar una dilución 1:100 en medio LB fresco (ver anexo II) a partir de un cultivo saturado, se cultivaron células de la cepa adecuada en un agitador orbital a 37°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 g durante 5 min y se resuspendieron en 0,5 ml de solución de transformación I (ver anexo II). Se centrifugaron a 5000 g durante 5 min y se resuspendieron en 0,5 ml de solución de transformación II (ver anexo II). Se incubaron en hielo durante 15 min, se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en 100 μl de la misma solución. A estas células competentes se les agregaron 5 μl de la reacción de ligación y esta mezcla se incubó primero en hielo durante 1 h y luego 45 s a 42°C a fin de producir un

choque térmico. Inmediatamente se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubó a 37°C durante 1 h. Las células transformadas se centrifugaron durante 5 min a 5000 g, se resuspendieron en 100 µl de medio LB y se sembraron en placas de Petri conteniendo medio LB en agar 1,5% suplementado con el antibiótico usado para la selección de transformantes que correspondiese en cada caso. Cuando los plásmidos que se utilizaron presentaban α -complementación, se agregaron al medio agarizado 20 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactopiranosido (X-Gal) 5% (P/V) y 10 µl de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 M. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos sin ADN plasmídico, controles de religación del vector sin inserto y controles positivos con ADN plasmídico no digerido.

2.3.1.2 Electrotransformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico:

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene Pulser™*, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm de separación entre los electrodos (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y se las incubó durante 1 h a 37°C. Después de centrifugar a 4000 g durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado.

2.3.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con ADN plasmídico:

Para la preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* y su posterior transformación, se utilizó el método descrito por Hôfgen y Willmitzer (1988). Las células bacterianas de la cepa GV2260 se cultivaron 12 h en medio LB en presencia de rifampicina 50 mg/l a 28°C con agitación. Con este cultivo saturado se inocularon 200 ml de medio LB fresco suplementado con antibiótico y se dejó crecer durante 4-5 h. Se cosecharon las células por centrifugación a 3000 g durante 20 min a 4°C y el sedimento se lavó en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM. El sedimento final fue resuspendido en 20 ml de medio LB con rifampicina 50 mg/l y se fraccionaron alícuotas de 500 µl. Las células competentes se

mantuvieron en hielo y se agregaron 0,5-1 μg de ADN plasmídico. Se mantuvieron en hielo 5 min y luego se sometieron sucesivamente a 5 min de N_2 líquido y 5 min a 37°C . Luego de agregar 1 ml de medio LB líquido, las células se incubaron durante 2 h a 28°C con agitación. Luego de la incubación, se centrifugaron los tubos a 5000 g durante 5 min y se sembraron alícuotas de 200 μl en placas con LB en 1,5% agar suplementado con los antibióticos kanamicina y rifampicina 50 mg/l. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 h. Las colonias se cultivaron en LB líquido en presencia de los antibióticos, se realizó minipreparación de plásmidos como se detalla en el punto 2.5.1, y los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

2.4 Análisis de transformantes por hibridización en colonias:

Las colonias obtenidas en los experimentos de transformación fueron repicadas por duplicado en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado. Se utilizó sobre la base de la placa una grilla numerada para facilitar la identificación de cada colonia. Luego del período de incubación a 37°C , una de las placas fue conservada en la heladera y sobre la otra se colocó una membrana de nylon convenientemente rotulada para identificar la posición de las colonias.

La membrana se dejó secar y luego se la colocó sobre papeles de filtro saturados con solución de desnaturalización, de neutralización y finalmente con SSC 2x (ver anexo II) durante 1 min en cada una de las soluciones. Una vez seca la membrana, el ADN plasmídico presente en las colonias fue fijado por exposición a luz UV (310 nm) durante 5 min. Posteriormente, la membrana fue hibridizada con la sonda adecuada y analizada como se detalla en el punto 2.10.

Las bacterias de las colonias que arrojaron un resultado positivo por hibridización se crecieron en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados, se preparó ADN plasmídico y se analizaron por digestión con enzimas de restricción. Los clones bacterianos confirmados como positivos se cultivaron en medio LB líquido en presencia del antibiótico y se guardaron a -80°C con glicerol 50%.

2.5 Preparación de ácidos nucleicos:

2.5.1 Minipreparación de ADN plasmídico:

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *Escherichia coli* transformadas se realizaron según el protocolo de Birnboim y Dolly (1979). Se centrifugaron a 5000 g durante 5 min 1,5 ml de cultivo saturado de células cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado. El sedimento celular fue resuspendido en 100 μ l de solución de miniprep I (ver anexo II). Luego de 5 min de incubación a TA se agregaron 200 μ l de solución de miniprep II (ver anexo II). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Se agregaron 150 μ l de acetato de potasio 5 M pH 5,2 y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 400 μ l de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl pH 8,0 y cloroformo (1:1) con el fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó durante 5 min a 8000 g a TA y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 2 h a -20°C con 2 vol de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M pH 5,2. El ADN plasmídico se recuperó por centrifugación a 12 000 g durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 μ l de agua destilada estéril.

Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad se utilizó el kit comercial *Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System* de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.5.2 Preparación de ADN total de bibliotecas:

2.5.2.1 Amplificación en medio líquido y preparación de ADN del bacteriófago lambda:

Los bacteriófagos de los clones purificados se utilizaron para infectar células de la cepa NM538 crecidas en medio λ Broth suplementado con maltosa 0,2% (P/V) y MgSO₄ 10 mM. La mezcla se incubó a TA durante 10 min y a 37°C durante 15 min adicionales. Luego se transfirieron las células infectadas a un Erlenmeyer de 50 ml con medio λ Broth adicionado de maltosa 0,2% (P/V) y MgSO₄ 10 mM y la mezcla se incubó toda la noche a 37°C con agitación.

El cultivo se centrifugó a 8000 g durante 5 min para descartar los restos de bacterias lisadas, y el sobrenadante se utilizó para preparar ADN.

La preparación de ADN de bacteriófago lambda se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Kaslow (1986). Luego de realizar la amplificación en medio líquido, cada 10 ml de sobrenadante obtenido se agregaron 0,6 g de NaCl y 0,7 g de PEG 6000 con agitación continua hasta disolución total. Luego de 2 h de incubación a 4°C, se centrifugó a 8000 g durante 5 min y el precipitado fue resuspendido en 1 ml de solución de dilución de fagos (ver anexo II). A esta suspensión se le agregaron ADNasa y ARNasa en concentración final 100 µg/ml de cada una y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalizada la incubación se agregaron 100 µl de solución de ajuste salino (ver anexo II) y 125 µl de PEG 6000 40% (P/V) por ml de suspensión y se dejó a 4°C durante 2 h para precipitar los bacteriófagos. Luego de la incubación en frío se centrifugó durante 10 min a 10 000 g y se resuspendió el precipitado en 1 ml de solución TE (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; EDTA 1 mM). Los bacteriófagos se lisaron por agregado de SDS en concentración final 1% (P/V) y se eliminaron las proteínas en sucesivas extracciones con una mezcla 1:1 de fenol/cloroformo. Se recuperó el ADN de la fase acuosa y se precipitó con 2 vol de etanol absoluto en medio acetato de sodio 0,3 M pH 5,2. Luego de incubar durante 30 min a -20°C se centrifugó durante 15 min a 12 000 g, se lavó el precipitado con etanol 70% y se lo resuspendió en agua destilada estéril. La cantidad y calidad del ADN obtenido se analizó por electroforesis en geles de agarosa 0,7 %.

2.5.3 Minipreparación de ADN de *Arabidopsis thaliana*:

El ADN de hojas de *Arabidopsis* se preparó siguiendo la técnica de Li y Chory (1998). Una ó 2 hojas de la planta se disgregaron con un pilón plástico en tubo Eppendorf a TA durante 15 s. Se agregaron 700 µl de solución amortiguadora de extracción (ver anexo II) y se mezcló en vórtex durante 5 s. Se centrifugó durante 10 min a 15 000 g y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 600 µl de isopropanol frío y se centrifugó a 15 000 g durante 10 min. El precipitado de ADN se secó y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

2.5.4 Extracción y purificación de ARN de *Arabidopsis thaliana*:

El ARN se preparó según la técnica de Carpenter y Simon (1998). Se procesaron 2 g de plantas enteras en mortero con N₂ líquido hasta polvo fino, el que se transfirió a un tubo de 30 ml. Se agregaron 10 ml de solución amortiguadora de extracción (ver anexo II) y se mezcló vigorosamente. Se agregaron 10 ml de fenol saturado en agua y se centrifugó durante 5 min a 5000 g a TA. Se recuperó la fase acuosa y se repitió el paso anterior con 10 ml de fenol y posteriormente con 10 ml de cloroformo. A la fase acuosa final se le agregaron 2 vol de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M pH 5,3 y se incubó durante 30 min a -70°C. Se recuperó el ARN por centrifugación a 12 000 g durante 10 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en LiCl 2 M. Luego de incubar en hielo toda la noche, se centrifugó en iguales condiciones a las utilizadas en el paso anterior y el precipitado se disolvió en 400 µl de agua destilada estéril. Se agregaron 2 vol de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M pH 5,3. Luego de incubar 5 min a -70°C, se recuperó el ARN por centrifugación a 12 000 g durante 5 min. Se lavó el precipitado con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.

2.6 Cuantificación de ácidos nucleicos:

La calidad y cantidad del ADN purificado se analizó por lectura espectrofotométrica a 260/280 nm, considerando que $D.O_{(260\text{ nm})} = 1$ equivale a 50 µg/ml de ADN, y por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% en presencia de bromuro de etidio 0,3 µg/ml. La concentración de ARN en solución se estimó a partir de la absorbancia a 260/280 nm, considerando que $D.O_{(260\text{ nm})} = 1$ corresponde a 40 µg/ml de ARN y se evaluó su calidad por corrida en geles de agarosa 1,5% en condiciones desnaturalizantes y tinción con bromuro de etidio 0,1 µg/µl de muestra sembrada.

2.7 Análisis de ácidos nucleicos:

2.7.1 Determinación de las secuencias de los fragmentos de ADN clonados:

Las técnicas de ADN recombinante se realizaron siguiendo protocolos estándar. Para determinar la secuencia de ADN se empleó el equipo comercial *T7 Sequencing Kit* (USB corporation), basado en el método desarrollado por Sanger y col. (1977) que combina una primera etapa de marcación seguida de una etapa de extensión/terminación por incorporación de didesoxinucleótidos a las cadenas crecientes de ADN. Las reacciones se realizaron sobre ambas hebras del ADN utilizado como molde, respetando las condiciones sugeridas por los proveedores del equipo. Según el caso se utilizaron cebadores universales específicos para los plásmidos utilizados o que reconocían el inserto.

Las reacciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en solución amortiguadora TBE 0,5x (ver anexo II) siguiendo los protocolos descritos por Ausubel y col. (1987). Una vez finalizada la corrida, los geles se colocaron sobre papel Whatman 3MM (Sigma Chemical Company) y se secaron al vacío durante 30 min a 80°C. Luego se expusieron a una placa radiográfica con pantalla intensificadora a -80°C durante el tiempo requerido según la marca radioactiva del gel.

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, éstas se analizaron con el grupo de programas DNASTar. Para las búsquedas de secuencias homólogas se consultaron los bancos de datos del EMBL, GenBank y SWISS PROT utilizando el grupo de programas BLAST (Altschul y col., 1997) a través del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.7.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa:

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa de tipo submarino de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2% (P/V) de acuerdo con el tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en solución TAE 1x (ver anexo II). El ADN se sembró con 1/10 vol de solución de siembra (ver anexo II) y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio 0,3 µg/ml. Las corridas

electroforéticas se realizaron en solución TAE 1x a una intensidad de corriente constante de 70 mA y se utilizó como marcador de tamaño de los fragmentos ADN del bacteriófago λ (Promega) digerido con la enzima de restricción *Hind*III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb). Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm). El registro de los geles se llevó a cabo empleando un sistema de captura de imágenes (UVP Lab. Prod.).

2.7.3 Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes:

Para realizar la corrida electroforética de ARN en condiciones desnaturalizantes se sembraron 20 μ g de ARN por calle (cuantificado por lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm). Antes de sembrar, las muestras conteniendo ARN fueron desnaturalizadas mezclando 1 vol de ARN en solución acuosa y 3 vol de solución de desnaturalización (formamida 66% V/V; HEPES 1,3 x y formaldehído 8% P/V) e incubando esta mezcla a 65°C durante 5 min.

Los geles en condiciones desnaturalizantes se prepararon con agarosa al 1,5% (P/V) en solución amortiguadora HEPES 1x (ver anexo II) y formaldehído al 6% (P/V) según Ausubel y colaboradores (1987). A cada muestra a sembrar se le agregaron 1/10 vol de solución de siembra (ver anexo II) y 2,5 a 5 μ g de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en solución de HEPES 1x en forma submarina y a intensidad de corriente constante de 40 mA. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm) y su registro se llevó a cabo empleando un sistema de captura de imágenes (UVP Lab. Prod.).

2.8 Técnica de Northern blot:

Los geles de separación de ARN por electroforesis descritos en el punto 2.7.3 se transfirieron por capilaridad en medio SSC 6x (ver anexo II) a membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). Las membranas fueron secadas y fijadas por exposición a radiación ultravioleta ($\lambda=310$ nm) durante 3-5 min. Luego fueron hibridizadas con las sondas apropiadas, lavadas y expuestas a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS como se describe en el punto 2.9. Para analizar los niveles de ARN transferido, los filtros fueron re-hibridizados con una sonda

de ARNr 25S de *Vicia faba* en condiciones similares a las descritas en el punto 2.10 pero a 68°C. Las autorradiografías se cuantificaron por digitalizado en escáner SnapScan 1212 mediante el programa FotoSnap™ 3.00 y la intensidad relativa de las bandas fue determinada por medio del programa Image-Pro Plus™ 3.0.01.00.

2.9 Hibridización de membranas de nylon:

Las membranas de nylon a las cuales se fijaron los ARN o ADN fueron prehibridizadas a 65°C en horno de hibridización durante por lo menos 2 h en solución SSC 5x, Denhardt 5x y SDS 0,2% (P/V) (ver anexo II). La hibridización se realizó en las mismas condiciones pero con el agregado de la sonda marcada correspondiente y durante toda la noche. Luego de la hibridización, los filtros a los que se habían transferido los ARN se lavaron 3 veces a 65°C durante 15 min con SSC 2x. Las membranas que contenían fragmentos de ADN se lavaron con SSC 2x, SDS 0,1% a 65°C (2 veces); con SSC 1x, SDS 0,1% a 65°C (2 veces), con SSC 0,5x, SDS 0,1% a 65°C (2 veces) y con SSC 0,5x a 65°C (1 vez). Luego de los lavados se secaron y expusieron a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS según cada caso.

2.10 Marcación de sondas de ADN:

2.10.1 Purificación de fragmentos de ADN:

El fragmento de ADN específico a utilizar como sonda se purificó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (Promega). Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos esperados se escindieron e incubaron con 1-2 vol de agua destilada estéril en un baño de agua a 65°C, hasta observar la completa disolución de la agarosa. Posteriormente se llevaron a cabo 2 extracciones sucesivas con 1 vol de fenol y a continuación una extracción con 1 vol de cloroformo. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1/10 vol de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 vol de etanol absoluto. En algunos casos, para facilitar la precipitación de fragmentos de muy bajo peso molecular, se adicionaron 2,5 µg de ARN_t (Sigma) a la solución etanólica. El ADN

purificado se resuspendió en 20 μ l de agua destilada estéril y se mantuvo a -20°C hasta el momento de su marcación radiactiva.

En los casos en donde fue necesario obtener ADN de alta calidad a partir de geles de agarosa, se empleó el equipo comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

2.10.2 Marcado radioactivo de los fragmentos de ADN:

La marcación de ADN doble hebra se realizó utilizando el método de cebado al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983). Para la desnaturalización del ADN doble hebra, se incubaron aproximadamente 100 ng en un vol de 35 μ l de agua a 100°C durante 3-5 min y se lo transfirió inmediatamente a hielo. Se agregaron 10 μ l de solución OLB (ver anexo), 2 μ l de ASB 10 mg/ml; 2 μ l de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, NEN) y 2-3 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (5 U/ μ l, Promega, Madison, WI, USA). La mezcla de reacción se incubó a TA entre 3 y 15 h, se diluyó en 200 μ l finales de agua y se filtró a través de una columna de Sephadex G-50 según el método descrito por Ausubel y col. (1987), para eliminar el exceso de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ no incorporado. La sonda purificada (actividad específica de aproximadamente 10^8 cpm/ μg) fue desnaturalizada a 100°C durante 3 min y diluida en una cantidad adecuada de solución de hibridización como lo indica el punto 2.10.

2.11 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*:

2.11.1 Método de transformación:

El método utilizado para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*), descrito por Clough y Bent (1998). Se prepararon aproximadamente 8 macetas con tierra para cada una de las construcciones de los distintos promotores en estudio. Estas macetas se cubrieron con una tela de fibra de nylon que actuó como una especie de “barrera sostén” para evitar la caída del pote de tierra durante el proceso de transformación. Se sembraron alrededor de 20 semillas por pote, lo que permitió luego poder seleccionar las que

mostraban un aspecto más saludable y reducir el número de plantas por maceta a 12. Las plantas se crecieron en una cámara de temperatura, humedad y fotoperíodo controlados, según las condiciones de cultivo antes descritas. Se cultivaron hasta la floración (aproximadamente 4 semanas), momento en el que se empezaron a cortar las inflorescencias para aumentar el número de flores por planta a ser sometida al evento de transformación

Para preparar la suspensión de transformación se cultivaron células de *A. tumefaciens* previamente transformadas según el punto 2.3.2. Se realizó un preinóculo de 30 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 mg/l y kanamicina 50 mg/l, en el caso de la cepa GV 2260, y kanamicina 50 mg/l y estreptomycinina 300 mg/l para la cepa LBA 4404. Este preinóculo se creció hasta saturación durante 24 h a 28°C y una agitación de 160 rpm. Con este cultivo se inocularon 3 erlenmeyers con 200 ml de medio LB suplementado de la misma manera que en el paso anterior, los que se dejaron crecer hasta llegar a la fase estacionaria (12-16 h, a 28°C, con agitación). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5500 g durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron cuidadosamente en 1 l de una solución de infiltración (sacarosa 5%), a la que se le adicionaron 300 µl del detergente *Silwet L-77* (OSI Specialties, Inc.) al momento de hacer la transformación. Esta suspensión de *Agrobacterium* se colocó en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético de manera de lograr una agitación suave. Las plantas fueron sumergidas durante 30 s tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. Luego, los pots se ubicaron en forma horizontal en una bandeja, se taparon con nylon para conservar un ambiente húmedo y se llevaron a cámara de cultivo. A las 24-48 h se colocaron en posición vertical y se les agregó abundante agua permitiendo que las plantas se desarrollaran hasta la formación y maduración de semillas (4-5 semanas aproximadamente para nuestras condiciones de cultivo).

Finalmente se recolectaron las semillas de cada pote por separado, se limpiaron de los restos de vainas y tierra y se guardaron a 4°C hasta su posterior análisis.

2.11.2 Selección de las plantas de *Arabidopsis* transformadas:

Una vez que las semillas estuvieron maduras, lo que se evidencia por el tono marrón-amarillento de las vainas que las contienen, las mismas fueron cosechadas o recuperadas para

proceder a la identificación de posibles transformantes. Una vez separadas de restos de material vegetal y tierra, se procedió al lavado y esterilización de las mismas. La esterilización consiste en realizar un primer lavado con etanol 70% (V/V) (1 min) y luego con una solución de lavandina 5% y SDS 1% (15 min). Luego de este paso de desinfección, las semillas se lavaron 3 veces en agua destilada estéril y finalmente se resuspendieron en agar 0,1%. Una vez resuspendidas se sembraron en placas de Petri de 150 mm con medio MS 0,8% agar, suplementado con vitaminas de Gamborg 1x y kanamicina 40 mg/l como agente selectivo. Las placas fueron mantenidas en la heladera durante dos días y luego fueron pasadas a cámara de cultivo. Se mantuvieron en la cámara durante 12-15 días; en ese período sólo las plantas transformadas generaron hojas verdaderas muy verdes y raíces suficientemente largas. Las plantas se dejaron crecer hasta la aparición de las hojas primarias y se transplantaron a potes con tierra. Cuando las rosetas alcanzaron un tamaño de 2 cm de diámetro, se recolectaron hojas para el análisis por PCR de las transformantes según se describe en 2.5.3. Cuando las semillas estuvieron maduras, éstas se recolectaron, rotularon y guardaron a 4°C.

2.11.3 Análisis de plantas de Arabidopsis transformadas:

Con el objetivo de confirmar que las plantas resistentes al antibiótico usado para la selección de transformantes contengan la inserción de T-DNA y no correspondan a falsos positivos o “escapes” se procedió al análisis de la presencia del transgén por PCR. Para ello se realizó una minipreparación de ADN genómico a partir de una o dos hojas de cada planta siguiendo el protocolo que se describe en el punto 2.5.3. El ADN obtenido fue utilizado como molde en una reacción de PCR. Para verificar en las plantas la presencia de los transgenes se utilizaron los oligonucleótidos pGUSNH₂ 5'-TTGGGGTTTCTACAGGAC-3', en forma general para todas las construcciones analizadas, mientras que el otro oligonucleótido usado para completar el par correspondió a uno específico según la secuencia del fragmento analizado. Los tamaños de los fragmentos se obtuvieron mediante la comparación de los mismos con los fragmentos de tamaño conocido del marcador de peso molecular. Las plantas que evidenciaron el tamaño de banda esperado en la reacción de PCR se dejaron crecer hasta maduración de las vainas, se colectaron las semillas y se sembraron en tierra. Las semillas de estas plantas (2°

generación), se utilizaron para los estudios histoquímicos y fluorométricos de expresión de β -glucuronidasa.

2.12 Análisis de la expresión del gen reportero en plantas transformadas:

2.12.1 Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa:

Las plantas de *A. thaliana* que resultaron resistentes al antibiótico kanamicina en la selección del punto 2.11.2 y cuyas reacciones de PCR del punto 2.11.3 mostraron productos del tamaño requerido, se sometieron a pruebas histoquímicas de actividad β -glucuronidasa.

Las plántulas y órganos analizados fueron lavados en solución fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 durante algunos min para eliminar restos de tierra o medio de cultivo. Se transfirieron a una solución fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1%, X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido) 2 mM, se sometieron a vacío durante 5 min y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 2-16 h (Jefferson, y col., 1987). Luego de la incubación se fijaron en una solución de formaldehído 10% V/V, etanol 20% V/V y ácido acético 5% V/V durante 10 min a TA. Se retiró el fijador, se agregó etanol 70% para decolorar los tejidos y se guardaron en solución etanólica a 4°C hasta ser fotografiados. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara Coolpix 995 digital de Nikon sobre microscopio óptico y se procesaron con el software Adobe Photoshop 7.0.

El análisis histoquímico se realizó en plántulas de 12 h y 1, 3, 5, 7, 10, 15 y 20 días, crecidas en placas de Petri con medio MS 1x/0,8% agar, y en órganos (hojas, tallos, flores, vainas y raíces) de plantas adultas crecidas en macetas con tierra según se describe anteriormente.

2.12.2 Análisis fluorométrico de la actividad β -glucuronidasa en plantas transformadas:

2.12.2.1 Cultivo y tratamiento de las plantas transformadas:

Las plantas transformadas que resultaron resistentes al antibiótico, confirmadas como líneas positivas por reacción de PCR y que expresaron histoquímicamente la enzima β -glucuronidasa, se utilizaron para realizar estudios fluorométricos comparativos de expresión del gen *gus*. Se cultivaron entre 30 y 50 semillas de las líneas positivas de plantas transformadas en placas de Petri de 90 mm con medio MS 1x-agar. Las semillas control de plantas transformadas con los T-DNA provenientes de los vectores pBI101.3 o pBI121 y plantas no transformadas fueron cultivadas en el mismo medio y condiciones. Las placas se dejaron 2 días a 4°C y posteriormente se mantuvieron en cámara de cultivo durante 14 días.

Luego de un crecimiento apropiado (10-15 días), las plantas se transfirieron a tierra y se dejaron crecer durante 10 días más. Cuando las rosetas presentaban un diámetro de aproximadamente 1,5 cm, se recogieron 4-5 plantas de cada línea transformante y control y se procesaron como se indica en el punto 2.9.2. Algunas de las plantas transferidas a tierra se dejaron crecer hasta la formación de vainas. Estas plantas fueron separadas de la tierra y lavadas con agua. Los órganos de 12 plantas de cada línea fueron separados en raíces, hojas, flores y vainas y procesados por separado, a fin de realizar estudios fluorométricos comparativos de expresión de la β -glucuronidasa en los distintos órganos de cada línea transformante.

2.12.2.2 Extracción de proteínas y ensayo fluorométrico de actividad β -glucuronidasa:

Las plantas cultivadas según 2.12.2.1 se procesaron en mortero hasta obtener un polvo fino, agregándose luego 500 μ l de la solución amortiguadora de extracción (ver anexo). La mezcla se transfirió a un tubo y se centrifugó a 13.000 g durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se mantuvo en baño de hielo.

La reacción fluorométrica se realizó según el método de Jefferson y col. (1987). Se agregaron 2,5 μ l de extracto proteico a 100 μ l de una solución 1 mM de sustrato MUG (4-metilumbelliferil- β -D-glucurónido) en metanol 40%. Con una alícuota de 25 μ l se realizó inmediatamente una medida fluorométrica a tiempo = 0. Los 75 μ l restantes se incubaron a 37°C

en baño de agua y a los 10 min se extrajo una alícuota de 25 μ l y se realizó una segunda medida fluorométrica (tiempo = 10 min). Para detener la reacción enzimática se utilizaron 975 μ l de Na_2CO_3 0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en pmoles de MU (4-metilumbeliferona).min⁻¹.(mg de proteínas totales)⁻¹ de acuerdo a una curva patrón de RFU (unidades de fluorescencia relativa) *vs* concentración de producto 4-MU. A fin de eliminar la actividad enzimática endógena, a cada lectura de determinación enzimática se le restó el valor correspondiente al extracto proteico proveniente de plantas no transformadas. Las medidas fluorométricas se realizaron en un equipo *VersaFluor™ Fluorometer System* de Bio-Rad (filtros EM 460/10 y EX 360/40) en cubetas de 1 ml.

2.12.2.3 Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método descrito por Sedmak y Grossberg (1977). Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (ASB) cuya concentración se determinó espectrofotométricamente, considerando 0,667 unidades de $\text{Abs}_{(280\text{ nm})} = 1$ mg/ml de ASB en solución.

Las determinaciones se realizaron con 2 μ l de extracto proteico en 500 μ l de agua destilada y 500 μ l del reactivo de Azul Brillante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie G-250 10 mg%, etanol absoluto 5% (V/V) y ácido fosfórico 10% (V/V)). La absorbancia se determinó en espectrofotómetro a 595 nm.

2.13 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*:

Clones expresando las proteínas recombinantes de *Arabidopsis thaliana* AtPura y AtTCP20 como productos de fusión a la proteína de unión a maltosa de *E. coli* fueron cedidos por los Dres. Bernard Lescure y Dominique Trémousaygue (CNRS-INRA, Castanet-Tolosan, Francia). La expresión y purificación de las proteínas recombinantes fueron realizadas según las indicaciones de los fabricantes del sistema pMAL-c2 (New England Biolabs, Beverly, MA). Un cultivo saturado de células conteniendo el clon de interés se diluyó en una proporción 1/100 en un volumen final de 100 ml de LB con ampicilina 100 μ g/ml y se dejó crecer entre 2 y 3 h a 37°C

con agitación continua, en un agitador orbital a 180 rpm. Una vez alcanzada una DO_{600} de 0,8, la expresión de las proteínas recombinantes se indujo por el agregado de IPTG a una concentración de 0,5 mM. Luego de 3 h más de incubación, las células se cosecharon por centrifugación a 5000 g y se lavaron con solución de TE. Después de centrifugar en las mismas condiciones anteriores, el sedimento celular fue resuspendido en 10 ml de TE (1/10 volúmenes con respecto al volumen de medio de cultivo procesado) con el agregado del inhibidor de proteasas PMSF, a una concentración final de 1 mM. Las células se rompieron con tres pulsos de 10 s de ultrasonido, en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra-cell™ VCX-600, Sonics & Materials). Posteriormente se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación a 10000 g durante 10 min a 4°C.

La purificación de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* como productos de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP) fue llevada a cabo utilizando una resina de amilosa, según el protocolo descrito por el fabricante (Kellerman y Ferenci, 1982)

2.14 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS:

La electroforesis de proteínas en presencia de SDS fue llevada a cabo según el método de Laemmli (1970), empleando sistemas de geles verticales. En todos los casos se utilizó una relación de acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (P:P). El gel de separación se preparó en solución Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1% (P/V), con una concentración de acrilamida final de 10% (P/V). El gel de concentración se preparó con acrilamida al 4,5% (P/V), en solución Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1% (P/V). La separación electroforética fue llevada a cabo en solución LAEMMLI 1X (ver anexo II), aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel. Las muestras se sembraron previa desnaturalización sometiéndolas a una incubación durante 3 min a 100°C en solución de siembra de proteínas (ver anexo). Una vez terminada la corrida electroforética los geles fueron sumergidos en solución colorante de proteínas y se visualizaron las bandas correspondientes a las proteínas luego de tratar los geles coloreados con solución decolorante.

2.15 Preparación de extractos proteicos nucleares de inflorescencia de coliflor:

La extracción de proteínas nucleares se llevó a cabo según el protocolo descrito por Maliga y col. (1995). Como material de partida para realizar la extracción de las proteínas nucleares se emplearon inflorescencias de coliflor obtenidas en el mercado local.

Se colocó el material en un mortero previamente enfriado y se agregaron 5 ml de solución de homogenización por gramo de tejido procesado. El homogenato se filtró a través de dos mallas de nylon (280 y 80 μm) y se centrifugó a 4225 g durante 20 min a 4°C. El sedimento enriquecido en núcleos fue lavado 4 veces con 20 ml de la misma solución de homogenización sometiendo la suspensión a centrifugaciones sucesivas de 10 min a 1912 g, 10 min a 1464 g, 8 min a 1464 g y 6 min a 1464 g, todas a 4°C. Finalmente se resuspendió al sedimento nuclear en 1 ml de solución de almacenamiento, se congeló en N_2 líquido y se conservó a -80°C.

Para lograr la ruptura de los núcleos, se agregó NaCl hasta una concentración final de 0,47 M (182 μl de solución de lisis por cada ml de suspensión) y se agitó durante 30 min a 4°C. Luego se centrifugó a 12000 g durante 20 min a 4°C para separar la cromatina. El sobrenadante fue dializado durante 4 h a 4°C en membranas de diálisis (Sigma), cambiando la solución de diálisis al menos 4 veces. La suspensión dializada se centrifugó a 12000 g durante 5 min a 4°C y la fracción soluble que contenía los extractos proteicos nucleares se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.16 Ensayos de retardo en geles:

Los ensayos de retardo en geles fueron llevados a cabo según el protocolo descrito por Sessa y col. (1993) con algunas modificaciones. Las reacciones de unión se realizaron en un volumen de 18 μl con 200 ng de proteína de fusión purificada o 2 μg de extracto proteico nuclear, según el caso. Alícuotas del extracto proteico o la proteína purificada fueron incubadas con ADN doble hebra marcado (30000 cpm) obtenido por amplificación de los fragmentos correspondientes con los pares de oligonucleótidos CATP16/CATP17, CATP16/CATP11 o CATP12/CATP17, seguida de una reacción de marcación según se describe en el punto 2.11. La reacción de unión fue realizada en las siguientes condiciones: 20 mM HEPES (pH 7,5), 50 mM

KCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 1,0 mM ditioneitol, 0,5% Triton X-100, 10% glicerol, 1.5 µg poli (dI-dC) y 22 ng/µl ASB.

El tubo con la mezcla de reacción fue incubado a 20°C durante 30 min para la reacción con la proteína recombinante. Cuando se analizó la unión con proteínas presentes en los extractos nucleares la incubación se efectuó en hielo durante 20 min. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se adicionó a cada tubo de reacción ficoll 2,5% (P/V) y se sembraron las mezclas en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes [(acrilamida 5% (P/V), bis-acrilamida 0,08% (P/V), TBE 0,5X y glicerol 2,5% (V/V)], previamente precorridos a un voltaje de 100 V durante 90 min. Una vez sembradas las muestras, la electroforesis se dejó transcurrir durante 2 h a 4°C para los ensayos con extractos y a TA para los ensayos con las proteínas recombinantes. La corrida se realizó en solución amortiguadora TBE 0,5X y, una vez finalizada, el gel se secó y se expuso a una placa radiográfica (Kodak MXP/Plus) con pantalla intensificadora a -80°C durante el tiempo necesario para la observación de la señal.

2.17 Análisis filogenético:

Las secuencias completas de los genes citocromo *c* y *cox5b* de plantas fueron utilizadas para la búsqueda y el reconocimiento de secuencias homólogas en bancos de datos de secuencias nucleotídicas, utilizando los Programas TBLASTN (Altschul y col., 1990). Para el análisis filogenético se utilizaron programas del grupo PHYLIP sobre un alineamiento de secuencias proteicas generado por ClustalW (Thompson y col., 1994).

ANEXO I

Tabla de oligonucleótidos utilizados para generar las distintas construcciones para el análisis de las regiones promotoras de los genes en estudio:

Nombre	5' → 3'	Posición ^a	Promotor	Dirección ^b	Sitio de clonado
CATP 11	GGCAAGCTTCATTAAGATTGGAGATAC	- 146	<i>cytc-1</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 12	GCAGAATTCGCAGTATCTCCAATCTTA	- 126	<i>cytc-1</i>	reversa	<i>EcoR</i> I
CATP 13	GGCAAGCTTGTAGAAGTAGGATAAAGA	- 369	<i>cytc-1</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 14	GGCGAATTCGATTCTTTATCCTA	- 347	<i>cytc-1</i>	reversa	<i>EcoR</i> I
CATP 15	GAGCAAGCTTGTAACGGT	- 532	<i>cytc-1</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 16	CCTGAAGATCTTCTCACC	+ 60	<i>cytc-1</i>	reversa	<i>Bgl</i> II
CATP 17	AAGTATGAGTAACAAGCAT	- 218	<i>cytc-1</i>	directa	-
delA 1	ATCTTAATGGCGAAGGACCATCCCCCTA	- 138	<i>cytc-1</i>	directa	-
delA 2	GTCTTTCGCCATTAAGATTGGAGATAC	- 227	<i>cytc-1</i>	reversa	-
mutA 1	ACTACGGCGCATTAAAGGGCCCATTAAGA	- 166	<i>cytc-1</i>	directa	-
mutA 2	GCGCCGTAGTGGGCTCATATTTATTTCA	- 157	<i>cytc-1</i>	reversa	-
mutA 3	ACTACGGCGCACCTAAACCCATTAAGGG	- 176	<i>cytc-1</i>	directa	-
mutA 4	GCGCCGTAGTTTATTTTCATATATAATGCTG	- 167	<i>cytc-1</i>	reversa	-
mutA 5	ACTACGGCGCATATGAGCCACCTAAAC	- 186	<i>cytc-1</i>	directa	-
mutA 6	GCGCCGTAGTTATAATGCTGTTTATGCTT	- 177	<i>cytc-1</i>	reversa	-
mutA 7	ACTACGGCGCTATGAAATAAATATGAGC	- 196	<i>cytc-1</i>	directa	-
mutA 8	GCGCCGTAGTTTTATGCTTGTTACTCATA	- 187	<i>cytc-1</i>	reversa	-
mutA 9	CCGCCTTCGACATTAAGATTGGAGATAC	- 156	<i>cytc-1</i>	directa	-
mutA 10	TCGAAGGCGGGGTTTAGGTGGGCTCAT	- 147	<i>cytc-1</i>	reversa	-
mut II 1	ACCTAAATCCAGTAAGAGTTCATTAAGATTG	- 166	<i>cytc-1</i>	directa	-
mut II 2	TCTTACTGGATTTAGGTGTTCTCATATTTAT	- 150	<i>cytc-1</i>	reversa	-
TELOmut 1	GTGAATTCGAAAGGAACTTCGGCAAGC	- 97	<i>cytc-1</i>	directa	-
TELOmut 2	TCCTTTCGAATTCAGTGTGAAAAAGTG	- 83	<i>cytc-1</i>	reversa	-
mut Q 1	TTTTTAAGAGATTGAACTTTTTCCAC	- 124	<i>cytc-1</i>	directa	-
mut Q 2	GTGAAAAAGTTCAATCTCTTAAAAA	- 99	<i>cytc-1</i>	reversa	-
CATP 22	GCACTTGGTTCTGAAGAT	+ 69	<i>cytc-2</i>	reversa	-
CATP 23	CGGAAGCTTTTTTGGCATACTCTTTA	- 604	<i>cytc-2</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 24	CGGAAGCTTCTATATATAGTAGTCAAG	- 386	<i>cytc-2</i>	directa	<i>Hind</i> III

Nombre	5' → 3'	Posición ^a	Promotor	Dirección ^b	Sitio de clonado
CATP 26	CCGAAGCTTTAGGAGAAAAATGGTATT	- 967	<i>cytc-2</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 29	GGCAAGCTTAACAAATATGTGAATTTTAGG	- 315	<i>cytc-2</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 210	GGCAAGCTTAACAAATATGTGAATTTTAGG	- 259	<i>cytc-2</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 25	CGGAAGCTTACCACTATTTAGACGCCA	- 189	<i>cytc-2</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 211	CCGAAGCTTATCTCTCACGCCACCTCT	- 140	<i>cytc-2</i>	directa	<i>Hind</i> III
CATP 212	GGCAAGCTTCTTTTTCTCACTTCTCAT	- 97	<i>cytc-2</i>	directa	<i>Hind</i> III
mutGF	TTTAGACGCCAATGGTACCCAGAAC	- 182	<i>cytc-2</i>	directa	
mutGR	GTTCTGGGTACCATTGGCGTCTAAA	- 158	<i>cytc-2</i>	reversa	
COX B12	GGCGTCGACGATGATGATGAGTCAAAG	- 3	<i>cox5b-1</i>	reversa	<i>Sal</i> I
COXB13	CGGAAGCTTATTGTGTACGTCTTTATC	- 609	<i>cox5b-1</i>	directa	<i>Hind</i> III
COXB14	GGGAAGCTTCTTGCTTGTGCCTGTGTG	- 387	<i>cox5b-1</i>	directa	<i>Hind</i> III
COXB15	GCCAAGCTTAATATCGAGATTCCAAGT	- 195	<i>cox5b-1</i>	directa	<i>Hind</i> III
COXB16	CGCAAGCTTTTTGGGGAGTTTCTTCGC	- 96	<i>cox5b-1</i>	directa	<i>Hind</i> III

Tabla de oligonucleótidos utilizados para generar las distintas construcciones para el análisis de las regiones promotoras de los genes en estudio (continuación).

^a Posición del extremo 5' con respecto al sitio de inicio de la traducción.

^b Dirección respecto de la orientación de la hebra codificante.

ANEXO II

Composición de las soluciones o medios de cultivo utilizados .

Medio Murashige y Skoog: KNO_3 1,9 g/l; NH_4NO_3 1,65 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,44 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,37 g/l; KH_2PO_4 0,17 g/l; Na_2EDTA 37,3 mg/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8 mg/l; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3 mg/l; H_3BO_3 6,2 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/l. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añade 8 g/l de agar

Vitaminas de Gamborg: m-inositol 100 mg/l; tiamina-HCl 10 mg/l; ácido nicotínico 1 mg/l; piridoxina-HCl 1 mg/l

Medio λ Broth: peptona de carne 10 g/l; NaCl 2,5 g/l

Solución SM: Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgSO_4 10 mM; NaCl 100 mM

Top Agar: peptona de carne 10 g/l; NaCl 2,5 g/l; agar 7 g/l

Medio λ Plates: peptona de carne 10 g/l; NaCl 2,5 g/l; agar 10 g/l

Solución de dilución de fagos: Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 5M; EDTA 10 mM

Solución de ajuste salino: Tris-HCl 100 mM pH 7,5; MgSO_4 10 mM; NaCl 100 mM

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB): peptona de carne 10 g/l; NaCl 5 g/l; extracto de levadura 5 g/l. Para preparar medio LB sólido se agrega agar al 1,5% P/V

Solución de transformación I: MOPS 10 mM pH 7,0; KCl 10 mM

Solución de transformación II: MOPS 100 mM pH 6,5; CaCl_2 50 mM y KCl 10 mM

Solución de SSC 1x: NaCl 0,15 M; citrato de sodio 0,015 M

Solución de desnaturalización para membranas de nylon: NaOH 0,2 N; NaCl 1,5 M

Solución de neutralización para membranas de nylon: Tris-HCl 0,4 M pH 7,6; SSC 2x

Solución de Miniprep I: Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glucosa 50 mM y EDTA 10 mM

Solución de Miniprep II: NaOH 0,2 N y SDS 0,1% (P/V)

Solución amortiguadora de extracción de ADN de Arabidopsis por minipreparación: Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%

Solución amortiguadora de extracción de ARN de Arabidopsis: Tris-HCl 200 mM pH 9,0; LiCl 0,4 M; EDTA 25 mM; SDS 1%

Solución TAE 1x: Tris-acetato 40 mM pH 8,0; EDTA 1 mM

Solución TBE 1x: Tris-HCl 89 mM, pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM (pH8).

LAEMLI 1X: tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% (P/V). (pH 8,3).

Solución de siembra de ADN y ARN en geles de agarosa: Azul de bromofenol 0,25% (P/V); xilencianol FF 0,25% (P/V); glicerol 30% (V/V)

Solución de siembra para proteínas: tris-HCl (pH 7,0) 10 mM; EDTA (pH 8) 2 mM; SDS 2%(P/V); β -mercaptoetanol 0,5%(P/V); azul de bromofenol 0,5 mg/ml.

Solución colorante de geles de proteínas: Coomasie Brilliant BLue R-250 1% (P/V) en una mezcla de etanol:acético:agua 50:10:40.

Solución decolorante de geles de proteínas: mezcla etanol:ácido acético: agua 25:10:65.

Solución de unión ADN-proteínas: HEPES (pH 7,5) 20 mM; glicerol 10% (P/V); tritón X-100 0,5% (V/V) EDTA (pH 8) 0,5 mM; KCl 50 mM; MgCl₂ 2mM, DTT 1 mM.

Solución de Denhardt 100x: polivinilpirrolidona 2% (P/V); albúmina sérica bovina 2% (P/V); Ficoll 2% (P/V)

Solución de OLB: Tris-HCl 0,25 M pH 8,0; MgCl₂ 50 mM; HEPES 1 M pH 6,6; dCTP 1mM; dGTP 1 mM; dTTP 1mM; β -mercaptoetanol 65 mM y 350 ng de hexanucleótidos de secuencia al azar (dN₆)

Mezcla de soluciones patrones A, B y C en una relación 1:2,5:1,5

Solución A: 1 ml de solución O (Tris-HCl 1,25 M pH 8,0; MgCl₂ 0,125 M); 18 μ l β – mercaptoetanol; 5 μ l dATP; 5 μ l dCTP; 5 μ l dTTP (0,1M c/u)

Solución B: Hepes 2M pH 6,6

Solución C: Hexanucleótidos de secuencia al azar (dN₆) de concentración 90 D.O./ml

Solución amortiguadora de extracción de proteínas para prueba fluorométrica de ensayo de actividad β -glucuronidasa: Na₂HPO₄ 50 mM pH 7,0; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,1%; β -mercaptoetanol 10 mM; Tritón X-100 1%

Solución madre de IPTG: IPTG 0,5M disuelto en agua.

Solución madre de X-Gal: X-Gal 5% (P/V) en dimetilformamida.

Solución madre de X-gluc: X-Gluc 50 mM en N-N-dimetilformamida.

Resultados y Discusión

3. CAPÍTULO I

“Estructura y regulación de la expresión de genes codificantes para el citocromo *c* y la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial de *Arabidopsis thaliana*”.

CAPÍTULO I

Estructura y regulación de la expresión de genes codificantes para el citocromo *c* y la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial de *Arabidopsis thaliana*.

3.1 Introducción

La biogénesis mitocondrial puede ser definida como un incremento en el número y/o en la masa de mitocondrias por célula e involucra la expresión coordinada de genes presentes en dos genomas distintos. Esto es especialmente válido cuando se trata de los componentes de la cadena respiratoria que participan en la transferencia de electrones a través de complejos multiméricos (Brownleader y col., 1997). Las mitocondrias de plantas tienen una característica distintiva que es la de poseer dos vías diferentes de transferencia de electrones al oxígeno, una mediada por la oxidasa alternativa, codificada por unos pocos genes nucleares (Vanlerberghe y McIntosh, 1997; Siedow y Umbach, 2000), y otra mediada por la citocromo *c* reductasa, el citocromo *c* y la citocromo *c* oxidasa.

Además, las mitocondrias de plantas contienen las vías metabólicas y los componentes que relacionan los procesos celulares del metabolismo de carbono y nitrógeno con la fotorrespiración. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) relaciona ambos metabolismos mediante la oxidación de ácidos orgánicos provenientes de la glicólisis y libera α -cetoglutarato o citrato como esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos. Los productos de las reacciones de fotorrespiración, como la glicina, también liberan amonio que constituye una fuente para la asimilación de nitrógeno y la producción de aminoácidos en plantas. Tanto el TCA como el ciclo de fotorrespiración producen la reserva de NADH en la mitocondria necesaria para el transporte de electrones y la producción de ATP. Cualquier alteración en el funcionamiento normal de la mitocondria ocasionará serios inconvenientes y tendrá consecuencias para el metabolismo y las reacciones biosintéticas de la célula en general (Taylor y col., 2004).

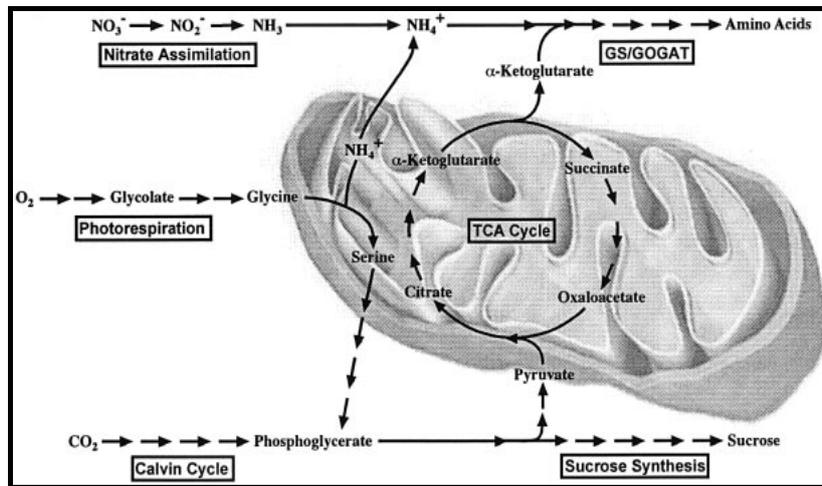


Figura 6: Papel central de la mitocondria en la interconexión de las vías del metabolismo del carbono, el nitrógeno y la fotorrespiración. (Extraído de Taylor y col., 2004).

Por otra parte, trabajos previos han demostrado que la mayoría de los componentes mitocondriales tienen una expresión aumentada en flores (Felitti y col., 1997; Heiser y col., 1997; Zabaleta y col., 1998), y mediante hibridización *in situ* se observó que esta expresión es tejido-específica y que existirían mecanismos coordinados de regulación, ya que existe una buena correlación con la expresión de algunos genes mitocondriales (Smart y col., 1994; Ribichich y col., 2001). Además, se observó en girasol que los niveles de transcripto del citocromo *c* son modificados por la presencia de luz y de azúcares metabolizables (Felitti y col., 1997; Felitti y Gonzalez, 1998) y por el crecimiento de las plantas en condiciones de hipoxia y posterior re-aireación (Curi y col., 2002). Estudios recientes demostraron que la privación de sacarosa a células de *Arabidopsis* en cultivo conduce a cambios estructurales en las mitocondrias, una disminución en el volumen de las mismas y una reducción en la tasa de respiración celular. Los niveles de abundancia de los ARNm transcritos analizados revelaron que, al menos para este sistema estudiado, no existiría una coordinación en la expresión de ambos genomas a nivel transcripcional y la misma estaría dada a un nivel post-traducciona, durante el ensamblado de los complejos respiratorios (Giegé y col., 2005).

En este capítulo se realiza la caracterización y el estudio de la expresión de cuatro genes de *Arabidopsis* que constituyen componentes importantes de la vía respiratoria

dependiente del citocromo *c*. Dos de estos genes codifican para el citocromo *c* y dos codifican distintas isoformas de la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa en *Arabidopsis*.

El citocromo *c* es uno de los componentes más simples de la cadena de transporte de electrones. Es una hemoproteína compuesta por un único polipéptido unido covalentemente a un grupo hemo mediante dos enlaces tioéster entre grupos vinilo del hemo y dos residuos de cisteína pertenecientes al motivo CxxCH de la proteína. El grupo hemo tiene en su interior un átomo de hierro que alterna entre los estados ferroso (FeII) y férrico (FeIII) al transportar los electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria (Lodish y col., 1999). El apocitocromo *c* es sintetizado en el citoplasma y luego es importado hacia el espacio intermembrana por un mecanismo distinto al observado para la mayoría de las proteínas mitocondriales de codificación nuclear (Gonzalez y Neupert, 1990). Una vez en el espacio intermembrana, adopta su estructura madura por unión con el grupo hemo en una reacción catalizada por la enzima de codificación nuclear citocromo *c* hemo liasa. Actualmente se conocen las secuencias codificantes para el citocromo *c* de numerosos organismos, las que se han utilizado para el análisis filogenético (Mori y Morita, 1980).

La citocromo *c* oxidasa es un complejo multimérico denominado complejo IV y está compuesto por varias subunidades diferentes (Capaldi 1990; Jänsch y col., 1996), algunas codificadas en el genoma mitocondrial (2 ó 3 según la especie vegetal) (Unselde y col., 1997) y varias codificadas en el genoma nuclear (Nakagawa y col., 1990; Kadowaki y col., 1996; Ohtsu y col., 2001). La primera proteína de plantas con actividad de citocromo *c* oxidasa se identificó en raíces de *Ipomoea batatas*. En la misma se observó por primera vez la presencia de dos bandas proteicas adicionales, que se denominaron fracción proteica IV y V, además de las subunidades Cox1, Cox2 y Cox3 presentes en otros organismos eucariotas. La fracción V de raíces de batata, que parecía ser en un principio una sola proteína de 6 kDa, estaba formada en realidad por 3 polipéptidos. En un primer momento estos polipéptidos se denominaron COX5a, COX5b y COX5c. La subunidad 5b (COX5b) fue identificada por primera vez mediante homología de secuencias en arroz (Kadowaki y col., 1996) y es la más ampliamente conservada entre todas las subunidades de codificación nuclear (Rizzuto y col., 1991) y quizá este sea un indicio de su importancia en la funcionalidad del complejo multienzimático, en el que participa uniendo cofactores metálicos (Grossmann y Lomax, 1997). Estudios posteriores de expresión permitieron evidenciar que *cox5b* en arroz se expresa en todos los órganos y se regula en forma diferente a

la subunidad mitocondrial Cox1 (Hamanaka y col., 1999). En semillas de *Arabidopsis*, se observó que los niveles basales de ARNm de COX5b aumentaban con el progreso de la germinación y en relación directa con el aumento de la capacidad de la vía citocromo *c* dependiente (Saish y col., 2001).

Por todo esto, basándonos en el papel crucial de las mitocondrias en el metabolismo y los procesos biosintéticos de una célula eucariota, en la complejidad adicional de las células vegetales que poseen además la capacidad de fotosintetizar y en la necesidad de lograr un mayor conocimiento de los mecanismos reguladores de la biogénesis de complejos respiratorios vegetales cuyos componentes están codificados en dos genomas distintos, se plantea el análisis de la expresión de estos dos constituyentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Nuestros resultados indicarían que la expresión de estos componentes estaría regulada a nivel transcripcional a través de compuestos de carbono y nitrógeno, sugiriendo la existencia de una expresión coordinada, relacionada con los requerimientos metabólicos de las células vegetales.

3.2 Resultados:

3.2.1 Identificación y caracterización de genes que codifican para el citocromo *c* (*cytc*) en *Arabidopsis thaliana*:

Mediante una búsqueda de secuencias codificantes para el citocromo *c* en *Arabidopsis thaliana*, se identificaron dos genes para esta proteína componente de la cadena respiratoria. Estos genes fueron nombrados como *cytc-1* (At1g22840) y *cytc-2* (At4g10040) en forma arbitraria, estando los mismos ubicados en los cromosomas I y IV respectivamente. Ambos genes presentan una estructura conservada en cuanto a la posición de exones e intrones dentro de la secuencia. Además se observó que esta estructura también está preservada en la secuencia para el citocromo *c* de arroz (Kemmerer y col., 1991). Al realizar una comparación con la secuencia del gen para el citocromo *c* de *Chlamydomonas reinhardtii*, se vio que ambos intrones se localizan en la misma posición con respecto al segundo y tercer intrón del gen de *C. reinhardtii* (Felitti y col., 2000). Esto sugeriría que esos intrones estaban presentes en el ancestro común tanto de algas como de plantas de tierra (Amati y col., 1988).

3.2.2 Identificación y caracterización de genes que codifican para la subunidad 5b de la enzima citocromo *c* oxidasa (COX5b) en *Arabidopsis thaliana*:

Un análisis de secuencias codificantes para este componente de la cadena respiratoria en el genoma completo de *Arabidopsis* permitió observar la presencia de dos genes localizados en los cromosomas I y III, y de un posible pseudogén ubicado en el cromosoma I. Los genes identificados presentaron una alta homología de secuencia con subunidades 5b de otros organismos. Ambos genes tienen una estructura muy conservada en cuanto a la presencia y posición de las regiones intrónicas y los exones, con cinco intrones localizados en la misma posición dentro de la secuencia codificante. Por otra parte, el pseudogén presenta la misma estructura, excepto por el hecho de que los dos primeros exones no están presentes en la secuencia. Al realizar un análisis de los polipéptidos codificados se pudo observar un alto grado de conservación, excepto en la región N-terminal de la proteína, la cual está codificada en los primeros exones y contendría las pre-secuencias responsables del direccionamiento e importación de cada proteína a la mitocondria. De acuerdo a lo observado, esta porción de la proteína sería rica en residuos de aminoácidos hidroxilados y positivamente cargados, careciendo por completo de aminoácidos cargados negativamente.

De forma arbitraria, se le asignaron los nombres *cox5b-1* y *cox5b-2* a los genes ubicados en los cromosomas III y I, respectivamente, respetando el orden en el que estas secuencias estuvieron disponibles en el banco de datos de *Arabidopsis thaliana*.

Al realizar una búsqueda en las bases de datos disponibles, y un posterior análisis de secuencias codificantes para proteínas de la subunidad 5b de plantas, se pudo observar la presencia de homólogos en numerosas especies de plantas. La elaboración de un alineamiento de las secuencias disponibles, incluyendo la proteína COX5b de rata, permitió concluir acerca de la existencia de regiones conservadas (fig. 7). En la porción C-terminal de las proteínas existirían residuos de aminoácidos altamente conservados, incluyendo tres cisteínas que estarían involucradas en una posible coordinación con Zn (Grossman y Lomax, 1997). Por el contrario, no existiría una alta homología en el tercio amino terminal de las proteínas, el cual contiene las señales de direccionamiento e importación a la mitocondria. Estos alineamientos de secuencias fueron realizados utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson y col., 1994).

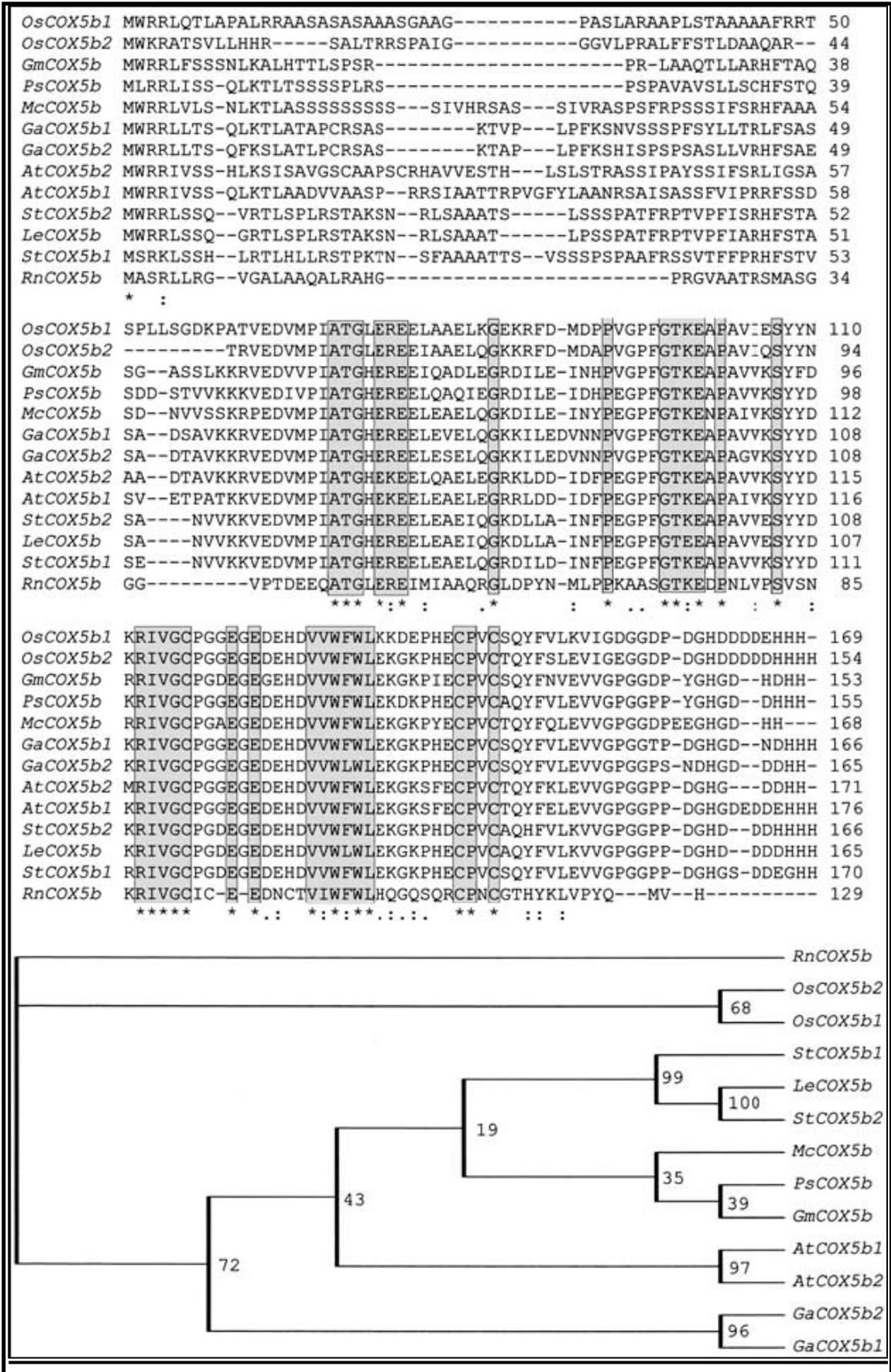


Figura 7: Alineamiento de secuencias de proteínas COX5b de plantas. Las secuencias de proteínas correspondientes fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL W. Para la comparación se incluye la secuencia de COX5b de rata (RnCOX5b). Las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos se marcan con asteriscos; aquellas ocupadas por aminoácidos relacionados se marcan con dos puntos. Posiciones ocupadas por aminoácidos conservados se marcan con un punto. Las regiones con alto grado de conservación están sombreadas. Debajo del alineamiento se observa un árbol filogenético derivado de estas secuencias, construido con el grupo de programas PHYLIP. Las secuencias utilizadas para el análisis son las de *Oryza sativa* (OsCOX5b, acc. N° D85381 y AP000399), *Glicine max* (GmCOX5b, acc. N° BE610249), *Pisum sativum* (PsCOX5b, acc. N° AA430940), *Mesembryanthemum crystallinum* (McCOX5b, acc. N° BE576840), *Gossypium arboreum* (GaCOX5b, acc. N° BG441122 and BF274168), *Arabidopsis thaliana* (AtCOX5b, acc. N° AF367258 y AV526104), *Solanum tuberosum* (StCOX5b, acc. N° BG590337 y BG595228), y *Lycopersicon esculentum* (LeCOX5b, acc. N° BG125994).

En la figura 7 se observa un árbol filogenético construido con las mismas secuencias utilizando programas del grupo PHYLIP. Este análisis filogenético sugeriría que la presencia de dos genes codificantes para proteínas de la subunidad 5b tanto en *Arabidopsis* como en arroz, algodón y papa, se debería a eventos de duplicación recientes en los genomas de las especies analizadas.

3.2.3 Aislamiento y obtención de clones de ADNc para los genes en estudio:

Con el objetivo de realizar un análisis de los niveles de expresión de los genes en estudio y los factores que regulan la misma, mediante ensayos de northern (ver materiales y métodos), se obtuvieron secuencias de ADNc para su posterior marcación radioactiva y utilización como sonda.

Para estudiar los niveles de expresión de las distintas isoformas codificantes para el citocromo *c* se obtuvieron dos clones de EST con la secuencia completa de ambos genes. El clon de EST para el gen *cytc-1* (clon 172G24T7, número de acceso H35987) fue cedido por el *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC, Ohio State University, Columbus, OH, USA), mientras que el clon para el gen *cytc-2* (clon APZ69d09, número de acceso AV521939) fue obtenido del Kazusa DNA Research Institute (Chiba, Japón).

Por otra parte, para analizar los niveles de mensajero del gen *cox5b-1*, se obtuvo un clon

parcial de EST conteniendo los exones 2 al 6 en el centro ABRC (clon 234B12T7, número de acceso N65183). Para el estudio del gen *cox5b-2*, se aisló un clon con la secuencia completa del mismo mediante una reacción de PCR utilizando como molde ADN total preparado a partir de una biblioteca de ADNc de flores de *Arabidopsis* (Weigel y col., 1992). Para la reacción de amplificación se diseñaron oligonucleótidos específicos deducidos a partir de las secuencias genómicas disponibles (ver materiales y métodos).

3.2.4 Estudio de los niveles de expresión de los genes *cytc* y *cox5b* de *Arabidopsis*. Análisis de los factores reguladores de la expresión de los mismos:

Para la realización de los ensayos de northern blot se utilizaron como sondas fragmentos de ADN marcados radioactivamente con ^{32}P (Feinberg y Vogelstein, 1983). Debido a que los fragmentos de ADN utilizados como sonda incluían las regiones codificantes de los genes en estudio se procedió a evaluar la especificidad de los mismos. Con tal fin se diseñó un ensayo de hibridación en el que se enfrentaron diferentes concentraciones a ADN de cada gen, fijadas en una membrana de nylon utilizada como soporte, a todos los fragmentos de ADNc marcados radioactivamente. Luego de la exposición a las distintas sondas pudo observarse un muy bajo nivel de reacción cruzada (menor al 10%) para las distintas isoformas codificantes para el citocromo *c*, mientras que no se detectó hibridación cruzada entre los dos genes codificantes para COX5b (fig. 8).

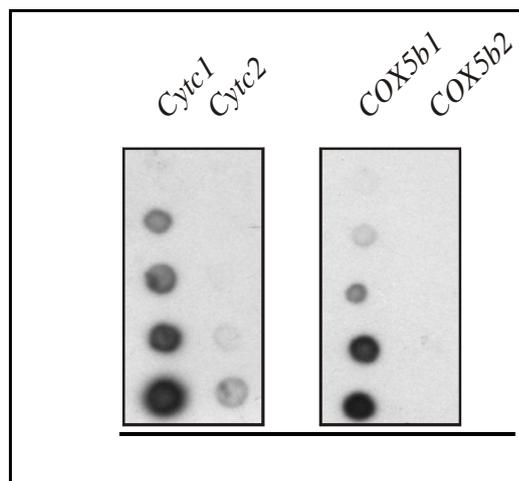


Figura 8: Análisis de la especificidad de las sondas utilizadas. La especificidad de la sonda fue analizada depositando diferentes cantidades de cada ADN utilizado para realizar la marcación (25, 50, 100, 200 y 400 pg) en forma de gota, sobre membranas de nylon. Las membranas fueron hibridadas con las sondas *cytc-1* (panel de la izquierda) o *cox5b-1* (panel de la derecha).

Este resultado preliminar permitió validar el uso de los fragmentos de ADN elegidos para ser utilizados como sonda en los ensayos de northern.

3.2.5 Estudios de expresión de los genes *cytc* y *cox5b* de *Arabidopsis thaliana*:

Los estudios de la regulación de la expresión de los genes en estudio y de los factores que podrían alterar o modificar los niveles de transcritos de los mismos fueron realizados mediante ensayos de northern.

Como se detalla en el capítulo de materiales y métodos, las plantas de *Arabidopsis* fueron sometidas a distintos pre-tratamientos según la condición metabólica a evaluar. Luego se les realizó una extracción de ARN total y éste fue separado por electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturizantes. Estos ARN fueron transferidos a membranas de nylon y posteriormente enfrentados a las sondas específicas elegidas en cada caso.

3.2.5a Los genes *cytc* y *cox5b* son inducidos por hidratos de carbono metabolizables:

Los azúcares participan en la regulación de la expresión de un número importante de genes. Se ha observado que los azúcares afectan la concentración y la actividad catalítica de enzimas involucradas en la cadena respiratoria. Así, la actividad oxidasa sobre el citocromo *c* reducido disminuye en presencia de azúcares como la glucosa, sacarosa y fructosa, mientras que los niveles de oxidasa alternativa no se ven afectados por los mismos azúcares pero sí aumentan por la presencia de citrato (Millenaar y col., 2002).

Resultados previos obtenidos en el laboratorio permitieron observar que los niveles de transcritos para el citocromo *c* de girasol eran modificados por las condiciones de iluminación de la planta o por incubación de las hojas en soluciones con azúcares metabolizables (Felitti y col., 1997; Felitti y Gonzalez, 1998).

En base a estos datos previos nos pareció interesante responder a la pregunta de si este comportamiento podía hacerse extensivo a otros genes codificantes para componentes de la vía respiratoria dependiente del citocromo *c* utilizando como modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*.

Para analizar el efecto de azúcares metabolizables se utilizaron plantas de *Arabidopsis* de 21 días aproximadamente. Con la finalidad de disminuir el aporte de compuestos carbonados generados durante el proceso fotosintético, las plantas fueron adaptadas a la oscuridad durante un período de 48 h previas al tratamiento. Luego de este período de adaptación, las plantas fueron incubadas sumergiendo las raíces en diferentes soluciones de azúcares, semi-cuantificando los niveles de transcripto en el tejido aéreo.

Se analizó el efecto de soluciones que contenían sacarosa, glucosa, manosa o fructosa a una concentración de 3% (P/V). Además, debido a que el manitol es un azúcar no metabolizable, y a fin de descartar posibles efectos debidos a cambios en las condiciones de osmolaridad de las soluciones de prueba, las plantas se sumergieron en una solución de manitol al 3% (P/V) a manera de control.

De la observación de la figura 9 se puede inferir que las plantas incubadas en soluciones de sacarosa, glucosa y fructosa al 3% (P/V) tienen aumentados los niveles de transcripto para ambas isoformas codificantes para el citocromo *c*. Además, los niveles de mensajero de *cytc-1* y *cytc-2* no parecen aumentar en presencia de manitol al 3% (P/V), con lo cual se descartaría que este aumento de la expresión se deba a efectos osmóticos. Tampoco se observa una mayor expresión al incubar las plantas en soluciones de manosa al 3% (P/V). Este resultado estaría de acuerdo con la hipótesis planteada de que el efecto de los hidratos de carbono en el aumento de la expresión de los genes analizados se debe al papel fisiológico que tendrían los mismos en el metabolismo de la célula vegetal. Si bien la manosa es capaz de ingresar a la célula, su metabolización no avanza más allá de su conversión a manosa-6-P, con lo que su aporte sería menor.

En la figura 9 también puede observarse el efecto de los azúcares sobre la inducción de genes *cox5b*. Si bien, en general, el aumento del nivel de los transcriptos parece ser menor al observado para genes *cytc*, la respuesta fue similar. En base a este resultado se podría plantear la posible existencia de un mecanismo común de regulación, capaz de coordinar la expresión de estos cuatro genes nucleares en estudio.

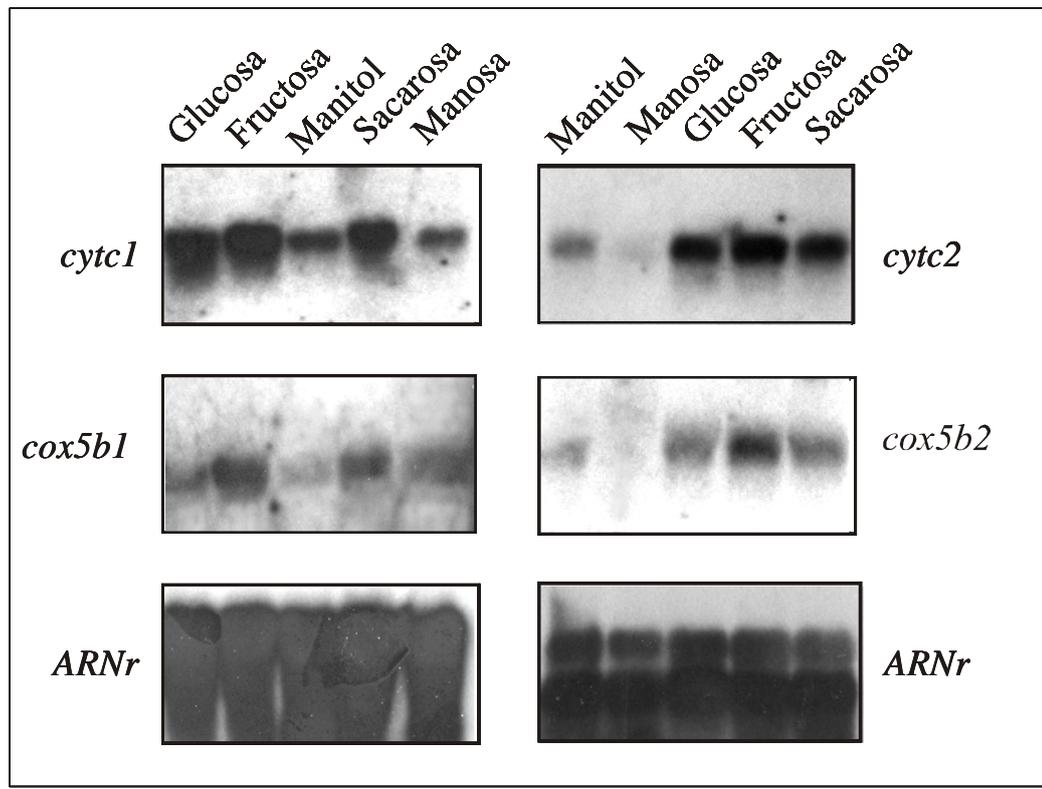


Figura 9: Efecto de los hidratos de carbono metabolizables en la expresión de genes *cytc* y *cox5b*. Plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la oscuridad fueron incubadas por un período de 12 h en oscuridad, en medio MS 1x conteniendo distintos carbohidratos en una concentración de 3% (P/V) según como se señala en la figura. Luego del período de incubación, se realizó una extracción de ARN total, el que se analizó por hibridación con sondas específicas (ver materiales y métodos).

Seguidamente se profundizó este análisis estudiando el efecto en plantas tratadas con soluciones de diferente concentración del azúcar metabolizable. Se vio que todas las soluciones ensayadas conteniendo entre 1% (P/V) y 5% (P/V) de sacarosa producían un aumento en los niveles de mensajero para los cuatro genes en estudio, con un efecto máximo a una concentración de 3% (P/V) (fig. 10).

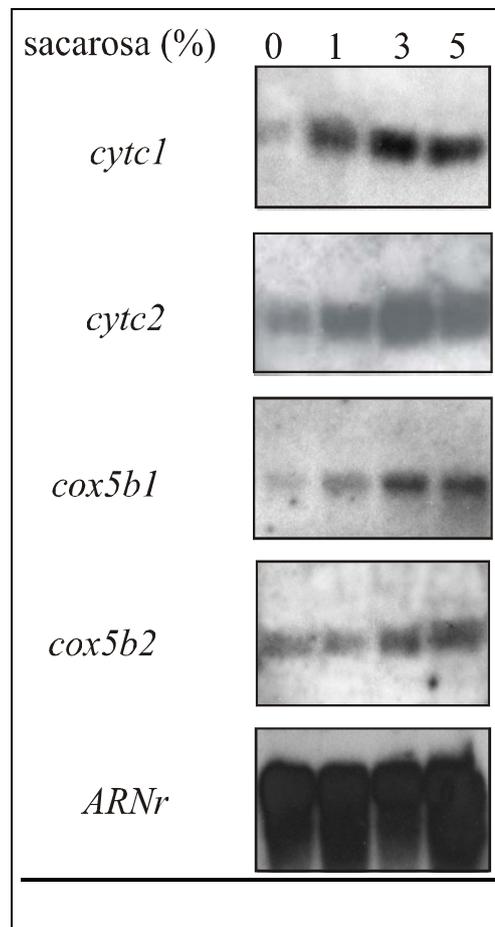


Figura 10: Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la expresión de genes *cytc* y *cox5b*. Plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la oscuridad fueron incubadas, manteniendo las condiciones de oscuridad, durante 12 h, en MS 1x suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa (0, 1, 3 y 5 % (P/V)) según como se indica en cada línea. Fue adicionado manitol a las diferentes soluciones para igualar a 5 % (P/V) las concentraciones de carbohidratos en todos los puntos. Luego de la incubación, se realizó una extracción de ARN total y un posterior análisis por hibridización como se detalla en materiales y métodos.

Este incremento en los niveles de mensajero fue también analizado en función del tiempo de incubación en la solución de azúcar. Para esto las plantas de *Arabidopsis* se incubaron en una solución de sacarosa al 3% (P/V) durante 0, 6, 12, 18, 24 y 48 h, manteniendo siempre las condiciones de oscuridad, tanto durante el período de adaptación de las plantas como en la incubación con el azúcar de prueba. En la figura 11 se puede apreciar que el efecto

se hace observable a las 12 h de incubación (tiempo elegido para todos los ensayos realizados anteriormente), con un pico de expresión a las 18 h. Asimismo, este efecto es más notorio para los genes *cytc-1* y *cytc-2*, con respecto al aumento relativo en la expresión de los genes *cox5b*. En presencia de manitol al 3% (P/V), los niveles de transcripto (fig. 11, calle C) se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo (fig. 11, calle 0), por lo que efectivamente estos resultados reflejan una inducción por azúcares de los genes analizados durante la incubación, más que un efecto negativo del manitol en la expresión de los mismos.

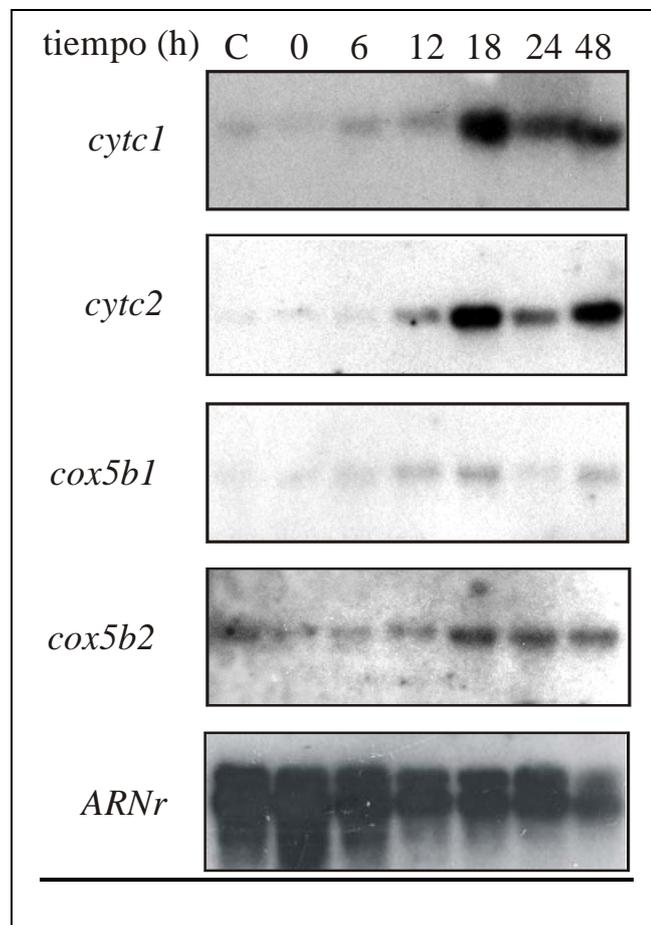


Figura 11: Dependencia del tiempo sobre el efecto inductor de la sacarosa en el aumento de los transcritos de los genes *cytc* y *cox5b*. Plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la oscuridad fueron incubadas, manteniendo estas condiciones, en medio MS 1x conteniendo sacarosa al 3% (P/V) durante períodos de 0, 6, 12, 18, 24 y 48 h. Como control, las plantas fueron incubadas en manitol 3% durante 12 h (C).

3.2.5b Efecto de la iluminación sobre la expresión de los genes en estudio:

Teniendo en cuenta las interacciones metabólicas existentes entre fotosíntesis y respiración y que los experimentos descritos hasta el momento fueron realizados con plantas adaptadas y mantenidas en oscuridad de manera de disminuir el posible efecto de los azúcares acumulados durante el proceso fotosintético, se analizó el efecto de la iluminación en la expresión de genes *cytc* y *cox5b*.

Con este objetivo, plantas adaptadas a la oscuridad durante un período de 48 h fueron trasladadas y sometidas a las condiciones de iluminación normales de la cámara de cultivo. Al cabo de 12 h de iluminación las mismas fueron cosechadas, se realizó una extracción de ARN total y se analizaron los niveles de mensajero de los genes en estudio.

Los resultados mostraron un leve incremento de los niveles de transcripto luego de 12 h de iluminación. Este aumento relativo fue nuevamente mayor para las isoformas codificantes del citocromo *c* que para los genes *cox5b* (dato no mostrado).

Al analizar el efecto combinado de la iluminación y los azúcares como la sacarosa al 3% (P/V) en plantas adaptadas a la oscuridad y luego incubadas en oscuridad y/o en luz (fig. 12), pudo observarse que (i) el pasaje de las plantas de la oscuridad a la luz durante un período de 12 h produce un aumento en los niveles de transcripto, sobre todo para el gen *cytc-1*; (ii) los azúcares producen un mayor aumento relativo en los niveles de mensajero, comparado con el efecto de la iluminación, (iii) en presencia de sacarosa al 3% (P/V) el efecto de la iluminación se vería disminuido o completamente abolido.

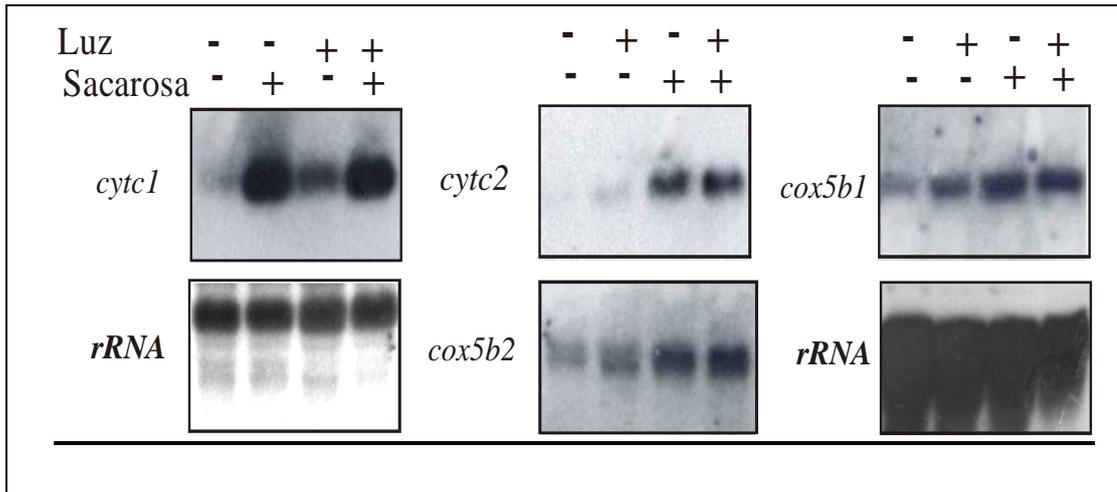


Figura 12: Efecto combinado de la luz y la sacarosa en la expresión de los genes *cytc* y *cox5b*. Plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la luz fueron incubadas por un período de 12 h, en oscuridad o en luz, en medio MS conteniendo sacarosa al 3% (P/V). Control, las plantas se incubaron en las mismas condiciones en una solución conteniendo manitol a la misma concentración. Luego de la incubación se extrajo ARN total, el que fue posteriormente analizado por ensayos de northern con sondas específicas

3.2.5c La expresión de los genes *cytc* y *cox5b* está regulada por compuestos de nitrógeno inorgánico:

Las mitocondrias de plantas constituyen el lugar en el que se interrelacionan importantes procesos celulares como el metabolismo del nitrógeno y de los hidratos de carbono a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de la fotorrespiración. El efecto observado de los hidratos de carbono sobre la expresión indicaría la existencia de mecanismos que relacionan el estado metabólico de la célula con los cambios en la expresión de los genes en estudio. Con el objetivo de analizar con mayor profundidad qué tipo de señales podrían intervenir en la regulación de la expresión de estos genes, realizamos ensayos adicionales sometiendo a las plantas de *Arabidopsis* a tratamientos con soluciones con distintas fuentes de nitrógeno, tanto en forma de nitrato como de amonio.

Plantas de *Arabidopsis* de 21 días fueron sumergidas a nivel de las raíces en soluciones de MS con NH_4Cl 5 mM y 0,5 mM, durante un período de 12 h y en oscuridad. Como tratamiento control, las plantas fueron sumergidas en medio MS 1X libre de sales de nitrógeno inorgánico.

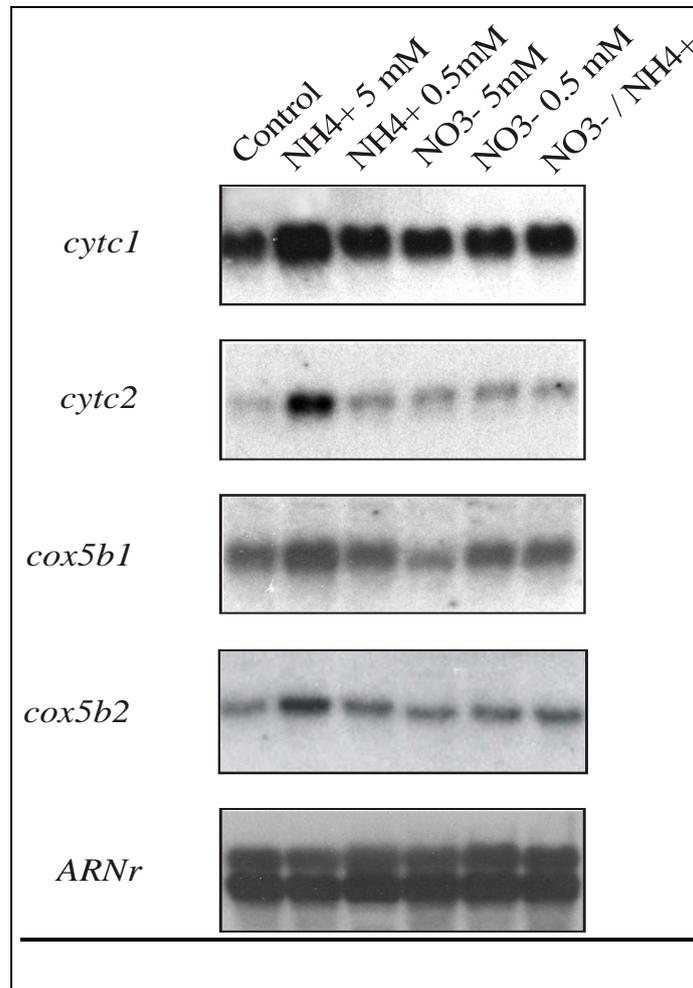


Figura 13: Efecto del amonio y el nitrato sobre la expresión de los genes *cytc* y *cox5b*. Plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la oscuridad fueron incubadas por un período de 12 h en oscuridad en medio MS 1X libre de compuestos nitrogenados. Este medio base usado en el punto control fue suplementado con NH_4Cl o KNO_3 a la concentración indicada en cada calle. Luego del período de incubación, se extrajo ARN total de las plantas y se analizaron los niveles de transcritos para los genes estudiados utilizando sondas específicas.

Puede observarse en la figura 13 que el tratamiento con sales de amonio 5 mM produjo un incremento en los niveles de transcritos para los cuatro genes en estudio, mientras que una concentración de 0,5 mM no produjo efecto alguno sobre la expresión de los mismos, al comparar los niveles de mensajero con los del respectivo control. Por otra parte, el nitrato de potasio a una concentración 5 mM produjo una leve disminución en los niveles de transcritos

para *cox5b-1* y revirtió el efecto de la sal de amonio 5 mM en la expresión de todos los genes analizados cuando ambos compuestos fueron incluidos en la misma solución de incubación (fig. 13).

Un experimento similar fue realizado con plantas incubadas en condiciones de iluminación. Los resultados, que se muestran en la figura 14, son los mismos que los obtenidos en el experimento realizado con plantas mantenidas en condiciones de oscuridad luego del período de adaptación (comparar fig. 13 y fig. 14). Puede observarse que el efecto inductor del amonio es menos pronunciado, respecto de los niveles de transcripto de las plantas incubadas en condiciones de iluminación en una solución libre de nitrógeno (fig. 14, calle -N).

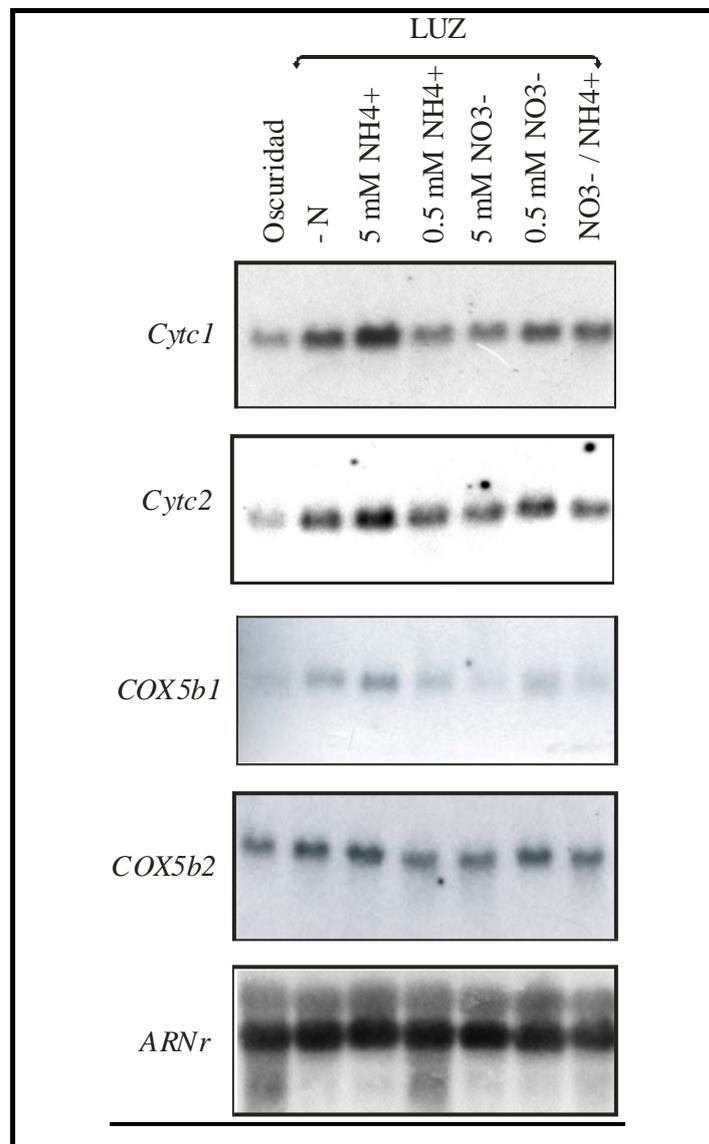


Figura 14: Efecto del amonio y el nitrato sobre la expresión de los genes *cytc* y *cox5b* en condiciones de iluminación. Plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la oscuridad fueron incubadas por un período de 12 h en luz en medio MS 1X libre de compuestos nitrogenados. Este medio base usado en el punto control fue suplementado con NH₄Cl o KNO₃ a la concentración indicada en cada calle. La calle (-N) corresponde a plantas incubadas en el medio MS sin el agregado de fuentes de nitrógeno. La calle NO₃⁻/NH₄⁺ corresponde a plantas incubadas en una solución conteniendo 5 mM de NH₄Cl y KNO₃. La calle indicada como "oscuridad" corresponde a plantas incubadas en el medio MS libre de compuestos nitrogenados manteniendo las condiciones de oscuridad durante todo el período de incubación. Luego se extrajo ARN total de las plantas y se analizaron los niveles de transcripto para los genes estudiados utilizando sondas específicas.

3.2.5d Análisis del efecto combinado de fuentes de carbono y nitrógeno:

Debido a la interrelación existente entre los dos metabolismos en la célula vegetal y teniendo en cuenta los resultados obtenidos al analizar el efecto de las fuentes de C y N por separado, se incubaron plantas de *Arabidopsis* en soluciones conteniendo sacarosa y fuentes de nitrógeno tanto en la forma de nitrato como de amonio.

De esta manera, en presencia de sacarosa al 3% (P/V), el amonio produjo un leve aumento en los niveles de transcripto (resultado no mostrado, similar a lo ocurrido al evaluar el efecto del amonio en condiciones de iluminación). Además, el efecto negativo del nitrato resultó ser más notorio pudiendo ser más claramente observado en estas condiciones (fig. 15).

Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de mecanismos que interrelacionan diferentes señales metabólicas (disponibilidad de nutrientes, presencia o no de luz) y condiciones impuestas por el ambiente celular, con la expresión de genes de la vía respiratoria dependiente del citocromo *c*.

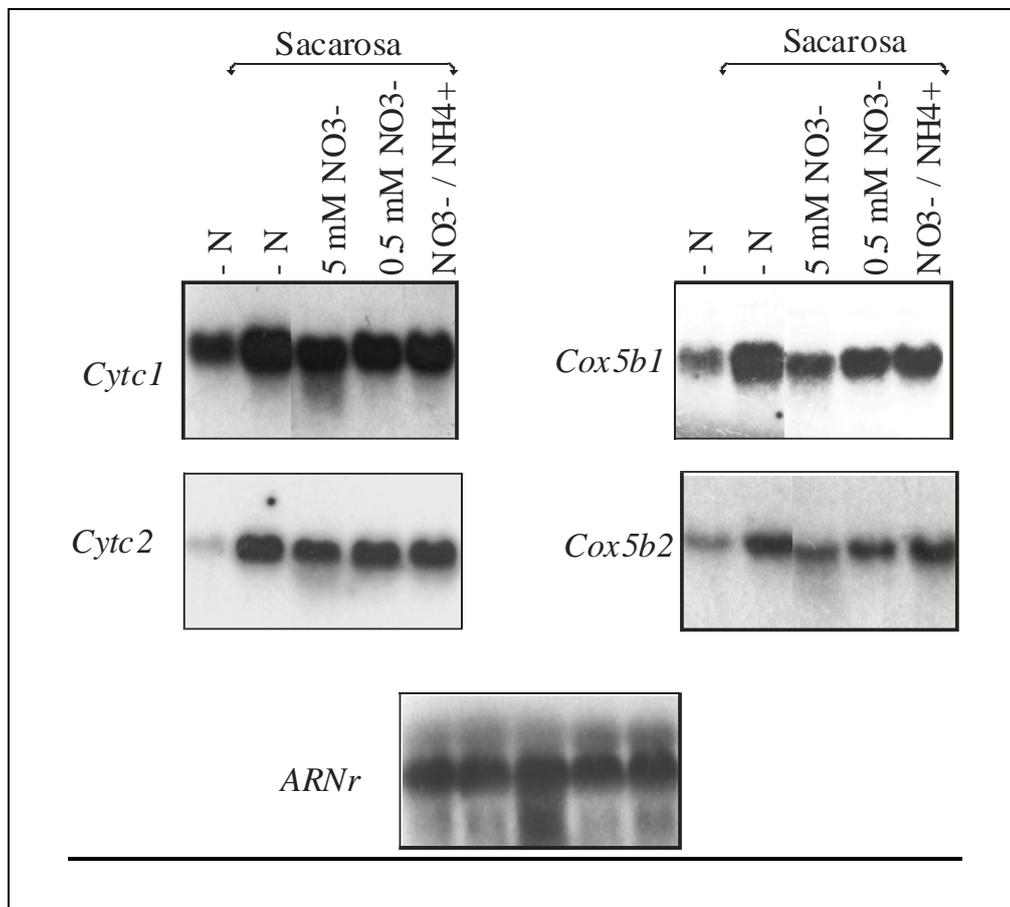


Figura 15: Efecto del nitrato en la expresión de genes *cytc* y *cox5b* en plantas tratadas con sacarosa. Plantas de *Arabidopsis* adaptadas a la oscuridad fueron incubadas durante un período de 12 h en oscuridad en medio MS 1X libre de nitrógeno, conteniendo sacarosa al 3% (P/V). Sobre este medio base se realizó el agregado de KNO₃ 5 mM ó 0,5 mM según como se indica en cada calle. La calle indicada como NO₃⁻/NH₄⁺ contiene 5 mM de cada una de las sales de prueba. Las calles marcadas como -N fueron incubadas en medios libres de nitrógeno pero con el agregado de manitol o sacarosa.

3.3 Discusión:

La cadena respiratoria mitocondrial en plantas presenta dos vías alternativas para derivar los electrones desde la ubiquinona, constituidas por dos oxidasas terminales diferentes. Una es la vía respiratoria sensible a CN⁻ dependiente del citocromo *c*, que finaliza en la citocromo *c* oxidasa y conduce a la síntesis de ATP como destino final de la energía generada por el transporte de electrones. El otro camino es considerado una vía alternativa y está representado por una oxidasa alternativa (AOX) cuya actividad no produce acumulación de ATP, y en la que la energía es disipada en forma de calor (Vanlerberghe y McIntosh, 1997; Siedow y Umbach, 2000). Mientras que se encuentra perfectamente bien establecido que la expresión de esta oxidasa alternativa está regulada por diversos factores tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS), la antimicina A, y ciertos metabolitos (Rhoads y McIntosh, 1992; Wagner, 1995; Wagner y Krab, 1995; Vanlerberghe y McIntosh, 1996,1997, Saish y col., 2001), poco es lo conocido acerca de la regulación de la expresión de los componentes de la vía dependiente del citocromo *c*. Estudios previos realizados en el laboratorio han mostrado que los niveles de transcripto para el citocromo *c* de girasol se encuentran regulados por las condiciones de iluminación y por la presencia de azúcares metabolizables (Felitti y col., 1997; Felitti y Gonzalez, 1998). Además, los niveles de transcripto de dos subunidades codificadas en el núcleo de la citocromo *c* oxidasa de arroz (subunidades Vb y Vc) se encuentran regulados en forma negativa en raíces sometidas a hipoxia (Tsuji y col., 2002). Este resultado es coincidente con el obtenido en este laboratorio para dos genes codificantes para las subunidades COX5c1 y COX5c2 de girasol, para los que se vio además que los niveles de transcripto se restablecían cuando las plantas retornaban a condiciones normales de aireación (Curi y col., 2002).

En este capítulo se han analizado los patrones de expresión de cuatro genes codificantes para componentes de la vía dependiente del citocromo *c* en Arabidopsis. Estos son los genes *cytc-1*, *cytc-2*, y dos genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa. Mediante ensayos de northern a partir ARN total de plantas de Arabidopsis de 21 días, adaptadas a la oscuridad y sometidas a distintos tratamientos, observamos la existencia de posibles mecanismos que ejercerían un control coordinado en la expresión de los genes estudiados, regulando los niveles de transcripto de acuerdo a las demandas metabólicas o requerimientos nutricionales de las células.

Se vio que todos los genes aumentaban su expresión en presencia de azúcares metabolizables como sacarosa, glucosa y fructosa en un rango de concentraciones entre 1 y 3% (P/V). Si bien los cuatro genes presentaron un aumento de los ARN mensajeros, el mayor incremento pudo observarse para los genes *cytc* en comparación con los niveles relativos para *cox5b*. Excepto por esta diferencia en los niveles relativos de expresión, la dependencia con el tiempo de incubación y la concentración del azúcar en la solución de prueba fue la misma para todos los genes analizados. Puede concluirse que los genes codificantes para el citocromo *c* y para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa de *Arabidopsis* responden, en diferente magnitud, a la misma señal producida por la acumulación de hidratos de carbono metabolizables. Esta misma consideración es aplicable también al efecto inductor de la iluminación sobre la expresión de estos cuatro genes.

Los azúcares afectan el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Existen en la bibliografía numerosos informes de genes cuya expresión es regulada en cierta forma por la presencia de hidratos de carbono (Koch, KE, 1996; Giege y col., 2005). Los azúcares son importantes no sólo como fuente de carbono y como componentes estructurales, sino que además funcionan como moléculas reguladoras que intervienen en el metabolismo, el ciclo celular, el desarrollo y la expresión génica tanto en procariontes como en eucariontes. Estas moléculas tienen la capacidad de activar o reprimir genes involucrados en procesos tales como la síntesis y degradación del almidón y la sacarosa, la defensa al ataque por patógenos, la respuesta de la planta a heridas, la pigmentación y la senescencia, entre otros importantes procesos del desarrollo celular vegetal (Chen y col., 1994; Mita y col., 1995; Reynolds y col., 1995). Por ejemplo, al estudiar la regulación de genes codificantes para proteínas que participan en el proceso fotosintético se vio que los carbohidratos actuarían como represores de la expresión, disminuyendo sensiblemente los niveles de transcripto (Krapp y col., 1993; Jang y Sheen, 1994; Koch, KE, 1996), estableciendo un mecanismo de regulación negativa que limitaría la vía fotosintética al encontrarse las células llenas de azúcares metabolizables. Un mecanismo similar opera para regular la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de carbohidratos a través del ciclo del glioxilato (Graham y col., 1994). Por otra parte, la inducción por azúcares fue reportada para numerosos genes, entre los que se destacan aquellos que codifican para productos involucrados en la utilización de los mismos o en la síntesis de productos de almacenamiento (Koch y col., 1992; Sokolow y col., 1998), y algunos involucrados en la asimilación de compuestos nitrogenados (Oliveira y Coruzzi, 1999). Este último ejemplo no sería

sorprendente debido a que la asimilación de nitrógeno requiere compuestos carbonados en la forma de ácidos orgánicos, por lo que este proceso podría considerarse de utilización de carbohidratos (Andrews, M., 1986). De hecho puede establecerse un modelo general en el que los niveles de hidratos de carbono serían capaces de modular en cierta forma la expresión de genes codificantes para proteínas involucradas en su síntesis y utilización. La inducción de los componentes de la cadena respiratoria, más precisamente de la vía dependiente del citocromo *c*, se ajusta a este modelo planteado e implica que las células vegetales podrían utilizar este mecanismo para derivar los compuestos carbonados hacia diferentes vías, según el estado metabólico de la célula y las demandas generadas por el ambiente que las rodea. En este sentido existiría un efecto contrapuesto de los niveles de azúcares en la célula sobre la expresión de componentes involucrados en la fotosíntesis y en la respiración.

Otro efecto sobre la expresión de los genes *cytc* y *cox5b* fue observado al realizar los experimentos con plantas adaptadas a la oscuridad y luego sometiéndolas a condiciones de iluminación durante los distintos tratamientos. Como resultado se observó que los niveles de mensajero de los cuatro genes estudiados aumentaban en luz. En este sentido, numerosos autores han propuesto la existencia de una interrelación entre la fotosíntesis y la respiración (Raghavendra y col., 1994), planteando que la fosforilación oxidativa es esencial para el funcionamiento óptimo del mecanismo fotosintético en plantas (Krömer y col., 1988; Krömer, S., 1995). Por otro lado, la fuente de poder reductor para la producción de ATP por parte de las mitocondrias podría ser la glicina producida durante la fotorrespiración (Gemel y Randall, 1992). Existen pocas evidencias sobre la inducción de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial por luz. Entre los reportes existentes, se ha informado sobre la inducción de la citocromo oxidasa, la succinato deshidrogenasa y la fumarasa en cotiledones de *Sinapis* (Hanson y Day, 1980). Además, los niveles de ARN mensajero del gen mitocondrial que codifica para la subunidad α de la H⁺-ATPasa son mayores en cotiledones verdes de girasol que en cotiledones etiolados (Horn y col., 1996). Este aumento de la expresión en condiciones de iluminación se observó también para genes codificantes para las subunidades COX6a y COX6b de *Arabidopsis*, ambas de codificación nuclear, y no en los niveles de ARNm para la proteína COX2, codificada en el genoma mitocondrial (Curi y col., 2003). Finalmente, podemos decir que los carbohidratos estimulan la producción de ARNm de varios genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial y estos compuestos podrían ser en parte responsables del efecto activador de la luz. Esto quedaría demostrado al observar que el efecto

inductor de la expresión de la sacarosa es mayor en oscuridad y que en presencia de azúcares el efecto activador de la luz quedaría solapado o abolido. El hecho de que los carbohidratos regulen la expresión de genes involucrados en la respiración mitocondrial es interesante ya que estas moléculas serían producidas durante la fotosíntesis y actúan a la vez reprimiendo la síntesis de proteínas involucradas en este proceso. En estudios recientes realizados en células en cultivo de *Arabidopsis* pudo observarse que la privación de sacarosa en el medio de cultivo conducía a importantes cambios estructurales en las mitocondrias, una disminución del número de mitocondrias por célula y por ende una brusca caída en la tasa de consumo de O₂. Además, mediante estudios de chips de ADN de estas células se observó una disminución en la expresión de genes nucleares codificantes para importantes componentes de todos los complejos respiratorios mitocondriales (Giegé y col., 2005). Estos resultados permitirían afirmar y generalizar nuestra hipótesis acerca del papel regulador de los azúcares sobre la expresión de genes nucleares para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial en plantas.

Por otra parte, se realizaron ensayos midiendo los cambios producidos en los niveles de transcripto para los genes *cytc* y *cox5b* debido a la presencia de compuestos nitrogenados como sales de nitrato y amonio. El amonio en forma de cloruro 5 mM produjo un marcado incremento en los niveles de expresión, fundamentalmente para los genes *cytc-1* y *cytc-2*. Con respecto a la metabolización de estos compuestos de amonio se postuló que los mismos serían captados por las raíces pudiendo ser asimilados *in situ* y los resultantes aminoácidos serían transportados hacia las partes aéreas de la planta. Sin embargo, evidencias más recientes señalan que el amonio, a una concentración superior a 2 mM, puede ser encontrado en la región del xilema en hojas, sugiriendo que el mismo podría ser transportado desde las raíces hacia el tejido aéreo sin necesidad de ser metabolizado (Cramer y Lewis, 1993; Husted y Schjoerring, 1995). En un estudio más reciente, Walch-Liu y col. (2000) reportaron que el amonio captado a nivel de las raíces produciría un aumento en los niveles de citoquininas y un notable incremento de los niveles de carbohidratos (hexosas y almidón) en tejidos aéreos de la planta. Estos dos factores podrían estar relacionados con el efecto inductor del amonio observado en estos ensayos.

Al analizar el efecto de sales de nitrato (KNO₃ 5mM y 0,5 mM) sobre la expresión de los genes *cytc* y *cox5b*, se observó una ligera disminución en los niveles de transcripto (sobre todo en plantas que además estaban siendo incubadas con sacarosa), y una reversión del efecto inductor del amonio cuando ambos compuestos se agregaron juntos a la solución de prueba en

la que fueron sumergidas las raíces de las plantas de Arabidopsis. El nitrato puede ser asimilado en raíces o transportado a hojas, especialmente cuando es incorporado en grandes concentraciones. Los resultados obtenidos serían consecuencia de una directa acumulación, reducción y/o asimilación en las hojas de la planta. En este sentido existen numerosas evidencias que señalan que el nitrato actuaría como un factor regulador de la expresión de numerosos genes, incluyendo enzimas involucradas en su metabolismo y asimilación (Vincentz y col., 1993), en la generación de equivalentes de reducción empleados en el mismo proceso (Bowsher y col., 1993), en el metabolismo de ácidos orgánicos y en la síntesis de almidón (Scheible y col., 1997). Estudios de Bloom y colaboradores indicaron además que la demanda de energía para la asimilación de nitrato limita el transporte de electrones mitocondrial, presumiblemente debido a una competencia por los agentes reductores (Bloom y col., 1992). Otros estudios han demostrado que la reducción durante el proceso de asimilación de nitrato implica la utilización de NADH producido en la mitocondria (Oaks y Hirel, 1985), y en este sentido el efecto negativo del nitrato en la expresión de genes involucrados en la respiración podría deberse a una competencia por el poder reductor de la célula (NADH) utilizado en los dos procesos.

En conclusión, estos estudios nos permitieron observar el efecto inductor de los hidratos de carbono metabolizables sobre la expresión de genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. Estos compuestos podrían ser en parte responsables del efecto inductor de la luz, lo que quedaría demostrado al observar que el efecto inductor de la expresión de la sacarosa es mayor en oscuridad y que en presencia de azúcares el efecto activador de la luz quedaría solapado o abolido. Además, observamos una regulación dependiente de la presencia de distintas fuentes de nitrógeno en el medio de incubación. Se podría especular acerca del efecto inductor de las sales de amonio en el sentido de que este compuesto estaría disponible para ser utilizado en distintos procesos celulares como por ejemplo la síntesis de aminoácidos. Por el contrario, la asimilación de nitrato implica el consumo de equivalentes de reducción que también son utilizados durante la síntesis de ATP en la cadena respiratoria mitocondrial.

Por último, estos resultados muestran, además, la fina regulación de la expresión de estos genes nucleares de acuerdo a las demandas metabólicas del ambiente celular.