

REPUBLICA ARGENTINA  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**



**FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**CÁTEDRA DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**  
**INSTITUTO DE AGROBIOTECNOLOGÍA DEL LITORAL**

***Estudio de genes involucrados en la biogénesis de  
complejos respiratorios en plantas***

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTORA  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Autora: Lic. Carolina V. Attallah**

**Director: Dr. Daniel H. González**

**2009**

*A mis padres*

## ***Agradecimientos***

*En primer lugar quiero agradecerle al Dr. Daniel González por la oportunidad que me brindó de concretar un sueño que comencé a gestar en mis primeros pasos por la facultad. En todos estos años he aprendido mucho junto a él, aprendí de ciencia, aprendí a desenvolverme en el laboratorio, aprendí a reconocer cómo quiero escribir mi historia en esta profesión.*

*Agradezco a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, institución en la que he recibido mi formación de grado y que me ha permitido llevar a cabo esta etapa de formación de postgrado. Además quiero agradecer a CONICET y a la ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) por otorgarme las becas con las cuales he podido realizar este trabajo.*

*Quiero agradecer a Elina que me ha acompañado desde la realización de mi tesina. No tengo palabras que me permitan expresar mi infinita gratitud hacia ella. Cada uno de mis recuerdos en el laboratorio está empapado de sus risas, consejos y mucho cariño. He ganado una amiga en estos años.*

*Siento un cariño enorme por Graciela, a la cual más que una compañera en el laboratorio, la considero una hermosa compañera de vida. Graciela me ha hecho sentir como en casa en el transcurso de estos años. Su sonrisa y sus cálidas y sabias palabras me alegran los días y me ayudan a elegir ser una mejor persona cada día. Gracias Grace.*

*Me emociono al pensar en las palabras que deseo dedicarle a Rosa, que me acompañó como una madre en estos años. De su mano di mis primeros pasos en la docencia y, además de mostrarme el camino, aprendí que la humildad y la grandeza van de la mano.*

*Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio. Todos me han ayudado mucho, no sólo con los experimentos, sino que también me han acompañado en distintas etapas de mi vida. A Edu, por escucharme siempre y hacerme reír, aunque esté triste. A Nori por alegrar mis días y por confrontarme con otra manera de hacer las cosas, lo cual me hace crecer mucho. A Ivi por nuestras charlas eternas, por sus*

*consejos, por sus ganas de verme bien. A Luli, a Fran y a Rodri por sus ganas de hacer las cosas, por contagiarme su buen humor, por escucharme. A Lea por demostrarme tanto cariño y respeto. Siento que me llevo varios amigos del laboratorio.*

*También quiero agradecer a las personas que me acompañaron durante algún tiempo en el laboratorio y lo siguen haciendo aún hoy. A Carlos por la linda amistad que me brinda, por escucharme siempre y acompañarme, por confiar en mí. A Fede porque es la persona que me ha enseñado a enamorarme de la vida, a descubrir que lo más importante es encontrarse a uno mismo. A Juli por sus risas eternas, por su alegría, por su forma de contagiar sus ganas de disfrutar la vida, por pelear día a día por lo que cree. A Toto por sus consejos, por su generosidad al compartir su tiempo y conocimientos conmigo, por escucharme y hacerme reír. A Agus por nuestras charlas, por escucharme y compartir sus reflexiones conmigo. A Eva, por pelear por sus convicciones y entenderme. A Pablo por sus consejos, por alegrar los días, por transmitir su pasión por lo que hace.*

*A Marta por ayudarme a crecer, por alentarme. Por compartir miles de tardes juntas, por sus consejos y su cariño.*

*No puedo dejar de agradecer a las personas que me han acompañado desde afuera de este ámbito. ¡A mis amigas de toda la vida! Por haberme escuchado siempre sin entender ni una palabra de lo que estaba diciendo, por estar a mi lado en cada momento, por brindarme su cariño incondicional, por tenderme sus brazos durante todo el viaje para que pueda sostenerme. No existen palabras que puedan expresar mi eterna gratitud y mi inmenso cariño hacia todas ellas.*

*A Griselda, por nuestro reencuentro, por acompañarme y desearme lo mejor. Por enseñarme otra manera de hacer las cosas.*

*A Juan Pablo, por ayudarme a crecer, por acompañarme en este último tiempo que ha sido el más difícil. Por escucharme y aconsejarme.*

*Y mi mayor gratitud es para mi familia. Por estar absolutamente siempre conteniéndome, acompañándome y entendiendo mis decisiones. Por respetarme, por haber fomentado mis ganas de dedicarme a la ciencia. Por su amor infinito. Por sus sabios consejos. A mi mamá, por ser una mujer hermosa a la que admiro*

*profundamente, por recordarme quién soy a cada paso. A mi papá, por su amor, por su necesidad de verme feliz. A mi hermano, por su pasión, por sus ganas interminables de disfrutar la vida, por acompañarme. A mis abuelos, tíos, primos... por entenderme y respetar mis tiempos.*

*Y a todas las personas que son parte de mi vida, a las que hoy no están físicamente conmigo pero viven en mi corazón, a las que dejaron sus granitos de arena, a todos quiero agradecerles, porque si soy quién soy y llegué a este lugar es gracias a todos los que me regalaron un abrazo, una palmada en la espalda, una sonrisa. Los llevo en mi corazón y para toda la vida.*

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 - Instituto de Agrobiotecnología 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:**

- **Attallah, C.V.**; Welchen, E. and González, D.H. (2007). The promoters of *Arabidopsis thaliana* genes *AtCOX17-1* and *-2*, encoding a copper chaperone involved in cytochrome *c* oxidase biogenesis, are preferentially active in roots and anthers and induced by biotic and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*. 129 (1), 123-134.
- Gonzalez, D.H.; Welchen, E.; **Attallah, C.V.**; Comelli, R.N. and Mufarrege, E.F. (2007). Transcriptional coordination of the biogenesis of the oxidative phosphorylation machinery in plants. *The Plant Journal*. 51, 105-116.
- **Attallah, C.V.**; Welchen, E.; Pujol, C.; Bonnard, G. and González, D. H. (2007). Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome *c* oxidase biogenesis. *Plant Molecular Biology*. 65, 343-355.
- **Attallah, C.V.**; Welchen, E.; Martín, A.P.; Palatnik, J.F.; González, D.H. (2009). Plants contain two forms of Sco proteins that are differentially involved in cytochrome *c* oxidase biogenesis, copper homeostasis and redox metabolism. En preparación.

#### **Trabajos presentados en congresos Nacionales e Internacionales:**

- **Attallah, C.V.**, Welchen, E. and González, D.H. Expression analysis of *cox19* genes in *Arabidopsis thaliana*. XL Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación

en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Iguazú, Misiones. Argentina. 05-08 de diciembre de 2004.

- **Attallah, C.V.**, Welchen, E. and González, D.H. Regulación de los genes *Atcox17-1* y *Atcox17-2*, codificantes de chaperonas de cobre, en condiciones de estrés biótico y abiótico. XXVI Reunión Nacional de la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Chascomús. Buenos Aires. Argentina. 04-06 de octubre de 2006.

- **Attallah, C.V.**, Welchen, E. and González, D.H. The promoters of genes encoding the Arabidopsis copper chaperone AtCOX17 are induced by stress. XLII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario. Santa Fe. Argentina. 12-15 de noviembre de 2006.

- González, D. H.; **Attallah, C. V.**; Comelli, R. N.; Mufarrege, E.F.; Welchen, E. Transcriptional coordination of genes encoding plant mitochondrial respiratory chain components. XLII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario. Santa Fe. Argentina. 12-15 de noviembre de 2006.

- **Attallah, C.V.**, Welchen, E. and González, D.H. AtSCO1: a copper chaperone essential during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. XLIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del plata. Buenos Aires. Argentina. 17-21 de noviembre de 2007.

- **Attallah, C.V.**, Welchen, E. and González, D.H. AtSCO1, a copper chaperone homolog of yeast sco1p, is essential during embryogenesis in arabidopsis plants. XXVII Reunión Nacional de la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Rosario. Santa Fe. Argentina. 21-25 de septiembre de 2008.

- **Attallah, C.V.**, Welchen, E., Comelli, R.N. and González, D.H. Characterization of Arabidopsis genes encoding cytochrome *c* oxidase assembly factors. XLIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Villa Carlos Paz. Córdoba. Argentina. 8-11 de noviembre de 2008.

- **Attallah, C.V.**; Welchen, E.; Martín, A.P.; Palatnik, J.F.; González, D.H. Sco proteins of plants are involved in COX biogenesis, copper homeostasis and redox metabolism. XLV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). San Miguel de Tucumán. Tucumán. Argentina. 10-13 de noviembre de 2009.

## **MIEMBROS DEL JURADO**

***Dra. María Elena Alvarez***

CIQUIBIC-CONICET, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

***Dr. Diego Gómez Casati***

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (I) (CEFOBI), CONICET - Rosario.

***Dr. Eduardo Zabaleta***

Instituto de Investigaciones Biológicas - CONICET, Universidad Nacional de Mar del Plata

---

**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades de mitocondrias	1
1.1.1. Origen de las mitocondrias	2
1.1.2. Organización mitocondrial	2
1.1.3. Funciones metabólicas de las mitocondrias	4
1.2. Características distintivas de las mitocondrias de plantas	7
1.2.1. Presencia de una segunda vía respiratoria	7
1.2.2. Presencia de NADH/NADPH deshidrogenasas insensibles a rotenona	9
1.2.3. Presencia de una proteína desacoplante que disipa el gradiente de protones	10
1.2.4. Generación de ROS en la mitocondria	11
1.3. Genoma mitocondrial de plantas e interconexión génica celular	12
1.3.1. Estructura del genoma mitocondrial de plantas	13
1.3.2. Información génica contenida en el genoma mitocondrial de plantas	15
1.3.3. Migración de genes mitocondriales al núcleo	16
1.3.4. Importación de las proteínas sintetizadas en el citosol a la mitocondria	18
1.3.5. Interconexión entre organelas	24
1.3.6. Biogénesis mitocondrial y señalización mitocondria-núcleo	25
1.4. Biogénesis de la citocromo c oxidasa	28
1.4.1. Organización de COX	29
1.4.1.1. Subunidades estructurales codificadas en el genoma mitocondrial	30
1.4.1.2. Subunidades estructurales codificadas en el genoma nuclear	31
1.4.1.3. Centros catalíticos de COX	36
1.4.1.4. Otros componentes	37
1.4.2. Ensamblado de COX	38

1.4.2.1.	Ensamblado de las subunidades codificadas en la mitocondria	38
1.4.2.2.	Ensamblado de las subunidades codificadas en el núcleo	44
1.4.2.3.	Formación y ensamblado del hemo a	45
1.4.2.4.	Formación de los centros metálicos	46
1.4.2.4.1.	Cox17	47
1.4.2.4.2.	Proteínas Sco	48
1.4.2.4.3.	Cox11	51
1.4.2.4.4.	Cox19	52
1.5.	¿Cómo llega el cobre hasta la mitocondria para el ensamblado de COX?	54
	<b>OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>62</b>
2.1.	Material utilizado	62
2.1.1.	Material vegetal y condiciones de cultivo de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
2.1.1.1.	Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo	62
2.1.1.2.	Plantas de Arabidopsis utilizadas para agroinfiltración	62
2.1.1.3.	Plantas de Arabidopsis utilizadas para estudios de expresión mediante Northern blot	63
2.1.1.4.	Plantas transformantes de Arabidopsis	63
2.1.1.5.	Plantas mutantes. Líneas SALK con inserción de T-DNA	64
2.1.2.	Cepas utilizadas	65
2.1.3.	Vectores utilizados	67
2.2.	Análisis informático de secuencias proteicas	68
2.3.	Métodos de clonado y análisis de recombinantes	69
2.3.1.	Clones de ADN copia de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizados	69
2.3.2.	Aislamiento y clonado de las regiones promotoras de interés de <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
2.3.2.1.	Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX19-1</i>	69
2.3.2.2.	Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX19-2</i>	71
2.3.2.3.	Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX17-1</i>	71
2.3.2.4.	Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX17-2</i>	72
2.3.2.5.	Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX11</i>	73
2.3.2.6.	Clonado de la región promotora del gen <i>AtSCO1</i>	74
2.3.2.7.	Clonado de la región promotora del gen <i>AtSCO2</i>	74

---

2.3.3.	Amplificación por PCR de fragmentos de ADN (reacción en cadena de la polimerasa)	75
2.3.4.	Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	75
2.3.5.	Ligación de moléculas de ADN	75
2.4.	Preparación de bacterias patógenas para ensayos de estrés biótico	76
2.5.	Transformación de células	76
2.5.1.	Transformación de bacterias	76
2.5.1.1.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico por electroporación	76
2.5.1.2.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con ADN plasmídico	77
2.5.1.2.1.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a través de choque térmico	77
2.5.1.2.2.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a través de electroporación	78
2.5.2.	Transformación de levaduras	78
2.6.	Análisis de transformantes por hibridización en colonias	79
2.7.	Preparación de ácidos nucleicos	80
2.7.1.	Minipreparación de ADN plasmídico	80
2.7.2.	Minipreparación de ADN de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	81
2.7.3.	Minipreparación de ADN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
2.7.4.	Extracción y purificación de ARN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
2.8.	Cuantificación de ácidos nucleicos	82
2.9.	Análisis de ácidos nucleicos	83
2.9.1.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	83
2.9.2.	Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes	83
2.9.3.	Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida	84
2.9.4.	Técnica de Southern blot	84
2.9.5.	Técnica de Northern blot	84
2.9.6.	Transcripción reversa	85
2.9.7.	Hibridización de membranas de nylon	86
2.10.	Marcación de sondas de ADN	86
2.10.1.	Purificación de fragmentos de ADN	86
2.10.2.	Marcado radioactivo de los fragmentos de ADN	87
2.11.	Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
2.11.1.	Método de transformación	87
2.11.2.	Selección de las plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas	89

2.11.3.	Análisis de plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas	89
2.12.	Análisis de la expresión del gen reportero en plantas transformadas	90
2.12.1.	Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa	90
2.12.2.	Análisis fluorométrico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa en plantas transformadas	91
2.12.2.1.	Extracción de proteínas y ensayo fluorométrico de actividad $\beta$ -glucuronidasa	91
2.12.2.2.	Cuantificación de proteínas totales	91
2.13.	Importación de proteínas marcadas radiactivamente a mitocondrias aisladas de tubérculos de papa	92
2.13.1.	Preparación de mitocondrias a partir de tubérculos de papa	92
2.13.2.	Síntesis <i>in vitro</i> y marcación de proteínas	93
2.13.3.	Importación de proteínas a mitocondrias aisladas	93
2.14.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	94
2.15.	Técnica de Western blot	95
2.16.	Análisis histoquímico de las isoenzimas SOD	96
2.17.	Determinación histoquímica de la producción de ROS	96
2.18.	Inspección microscópica de los embriones de <i>Arabidopsis</i>	97
2.19.	Análisis histoquímico de la actividad COX de los embriones de <i>Arabidopsis</i>	97
2.20.	Análisis de la elongación del tubo polínico	97
2.21.	Análisis del contenido de clorofila en hojas de <i>Arabidopsis</i>	98
2.22.	Análisis del contenido de cobre total en plantas de <i>Arabidopsis</i>	98
	ANEXO I	99
	ANEXO II	103
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>108</b>
<b>3.1.</b>	<b>CAPÍTULO I</b>	<b>108</b>
3.1.	Identificación y caracterización de los genes que codifican homólogos a la proteína Cox17p en <i>Arabidopsis thaliana</i>	108
3.1.1.	Introducción	108
3.1.2.	Identificación de los genes que codifican homólogos a la proteína Cox17p	110
3.1.3.	Caracterización del patrón de expresión de <i>AtCOX17</i>	114

3.1.3.1.	Caracterización del patrón de expresión de los genes <i>AtCOX17</i> mediante reacciones histoquímicas	114
3.1.3.2.	Análisis de los niveles de expresión mediante reacciones fluorométricas	117
3.1.4.	Análisis de la incidencia de factores de estrés biótico y abiótico en la expresión de los genes <i>AtCOX17</i>	118
3.1.5.	Análisis de la importancia de la presencia de un intrón en la región 5' no codificante para la expresión de los genes <i>AtCOX17</i>	124
3.1.6.	Análisis de la expresión del gen <i>gus</i> dirigida por una región promotora acotada de los genes <i>AtCOX17</i>	126
3.1.7.	Análisis de la importancia de la presencia de los motivos siteII en la actividad de las regiones promotoras de los genes <i>AtCOX17</i>	130
3.1.8.	Discusión	132
<b>3.2</b>	<b>CAPÍTULO II</b>	<b>137</b>
3.2.	Identificación y caracterización de los genes que codifican homólogos a la proteína Cox19p en <i>Arabidopsis thaliana</i>	137
3.2.1.	Introducción	137
3.2.2.	Identificación de los genes que codifican homólogos a la proteína Cox19p en <i>Arabidopsis thaliana</i>	139
3.2.3.	Importación y evaluación de la localización de las proteínas AtCOX19 en mitocondrias de plantas	142
3.2.4.	Evaluación de la complementación de levaduras mutantes en <i>cox19</i> por las proteínas AtCOX19	146
3.2.5.	Caracterización del patrón de expresión de <i>AtCOX19</i>	148
3.2.6.	Análisis de la incidencia de metales en la expresión de <i>AtCOX19</i>	152
3.2.7.	Análisis de la incidencia de factores de estrés biótico y abiótico en la expresión de los genes <i>AtCOX19</i>	154
3.2.8.	Análisis de la importancia de la presencia de un intrón cercano a la región 5' no codificante del gen <i>AtCOX19-1</i>	159
3.2.9.	Análisis del efecto de deleciones en la región promotora sobre la expresión del gen <i>AtCOX19-1</i>	160
3.2.10.	Análisis de la importancia de los motivos site II para la actividad de la región promotora del gen <i>AtCOX19-1</i>	164
3.2.11.	Discusión	165

<b>3.3</b>	<b>CAPÍTULO III</b>	<b>170</b>
3.3.	Identificación y caracterización del gen que codifica una proteína homóloga a Cox1 lp en <i>Arabidopsis thaliana</i>	170
3.3.1.	Introducción	170
3.3.2.	Identificación del gen que codifica una proteína homóloga a Cox1 lp	171
3.3.3.	Importación y evaluación de la localización de la proteína AtCOX11 en mitocondrias de plantas	175
3.3.4.	Caracterización del patrón de expresión de <i>AtCOX11</i>	177
3.3.5.	Análisis de la incidencia de factores de estrés biótico y abiótico en la expresión del gen <i>AtCOX11</i>	179
3.3.6.	Análisis de la importancia de la presencia de un intrón en la región 5' no codificante del gen <i>AtCOX11</i>	180
3.3.7.	Análisis de la importancia de la presencia de los motivos siteII en la actividad de la región promotora del gen <i>AtCOX11</i>	182
3.3.8.	Discusión	183
<b>3.4.</b>	<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>186</b>
3.4.	Identificación y caracterización de genes que codifican proteínas Sco en <i>Arabidopsis thaliana</i>	186
3.4.1.	Introducción	186
3.4.2.	Identificación de genes que codifican proteínas Sco en <i>Arabidopsis</i>	189
3.4.3.	Caracterización del patrón de expresión de AtSCO1 y evaluación de su función en <i>Arabidopsis thaliana</i>	196
3.4.3.1.	Análisis del patrón de expresión del gen <i>AtSCO1</i>	196
3.4.3.2.	Evaluación de la función de AtSCO1 a través del estudio de plantas con inserciones de T-DNA en el gen de interés	197
3.4.3.2.1.	Análisis de la línea SALK_032461	198
3.4.3.2.2.	Análisis de la línea SALK_057821	199
3.4.3.2.3.	Evaluación de la actividad COX en los embriones de las semillas de plantas de la línea SALK_057821	202
3.4.3.2.4.	Obtención de plantas homocigotas para la inserción de T-DNA a partir de la complementación de las plantas heterocigotas de la línea SALK_057821 con el ADNc de <i>AtSCO1</i>	203
3.4.3.3.	Evaluación de la función de la proteína AtSCO1 mediante	

---

	estudios de sobreexpresión	206
3.4.3.3.1.	Evaluación del contenido de clorofila	206
3.4.3.3.2.	Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de cobre	208
3.4.3.3.3.	Evaluación de la actividad de GUS dirigida por el promotor del miRNA398	210
3.4.3.3.4.	Evaluación de la actividad de las isoformas de SOD	211
3.4.3.3.5.	Evaluación del contenido de ROS	212
3.4.4.	Caracterización del patrón de expresión de AtSCO2 y evaluación de su función en <i>Arabidopsis thaliana</i>	213
3.4.4.1.	Análisis del patrón de expresión del gen <i>AtSCO2</i>	213
3.4.4.1.	Evaluación de la función de <i>AtSCO2</i> a través del estudio de plantas con una inserción de T-DNA en el gen correspondiente	215
3.4.4.2.1.	Análisis de la línea SALK_008313	215
3.4.4.2.1.1.	Evaluación del contenido de clorofila	217
3.4.4.2.1.2.	Evaluación del contenido de ROS	218
3.4.4.2.1.3.	Evaluación de la actividad de las isoformas de SOD	219
3.4.4.2.1.4.	Evaluación de los niveles de transcritos de proteínas relacionadas con el metabolismo redox mitocondrial	220
3.4.5.	Discusión	221
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>227</b>
<b>5.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>231</b>
<b>6.</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>235</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>239</b>

## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
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
CaMV	virus del mosaico de la coliflor
cm	centímetros
col.	colaboradores
COX	citocromo <i>c</i> oxidasa
<i>cytc</i>	citocromo <i>c</i>
da	daltons
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dNTP dGTP, dTTP)	desoxinucleótidos trifosfato(mezcla equimolar de dATP, dCTP,
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
FAD	dinucleótido de flavina-adenina
g	gravedad
GUS	$\beta$ -glucuronidasa
h	hora
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Kda	kilodaltons

kpb	kilopares de bases
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	miliamper/s
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
NAD <sup>+</sup>	dinucleótido de nicotinamida-adenina
MUG	4-metilumbeliferil- $\beta$ ,D-glucurónido
nm	nanómetros
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
ROS	especies reactivas de oxígeno
SA	ácido salicílico
SNP	nitroprusiato de sodio
SOD	superóxido dismutasa
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricarbóxico
TEMED	N,N,N',N',-tetrametilendiamina
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
U	unidad/es
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- $\beta$ -D-glucurónido

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

**Proteínas:** ▪ las proteínas correspondientes a plantas se escriben en mayúscula. Ej: AtCOX17.

▪ las proteínas correspondientes a otros organismos se escriben con la primer letra en mayúscula y el resto en minúscula. En el caso de las proteínas de levaduras, se le ha agregado una letra “p” a continuación del nombre. Ej: Cox17p.

▪ la proteína  $\beta$ -glucuronida se escribe en mayúscula (GUS).

**Genes:** ▪ los genes correspondientes a plantas se escriben en mayúscula e itálica. Ej: *AtCOX17*.

▪ los genes correspondientes a otros organismos se escriben en minúscula e itálica. Ej: *cox17*.

▪ el gen correspondiente a la  $\beta$ -glucuronida se escribe en minúscula e itálica (*gus*).

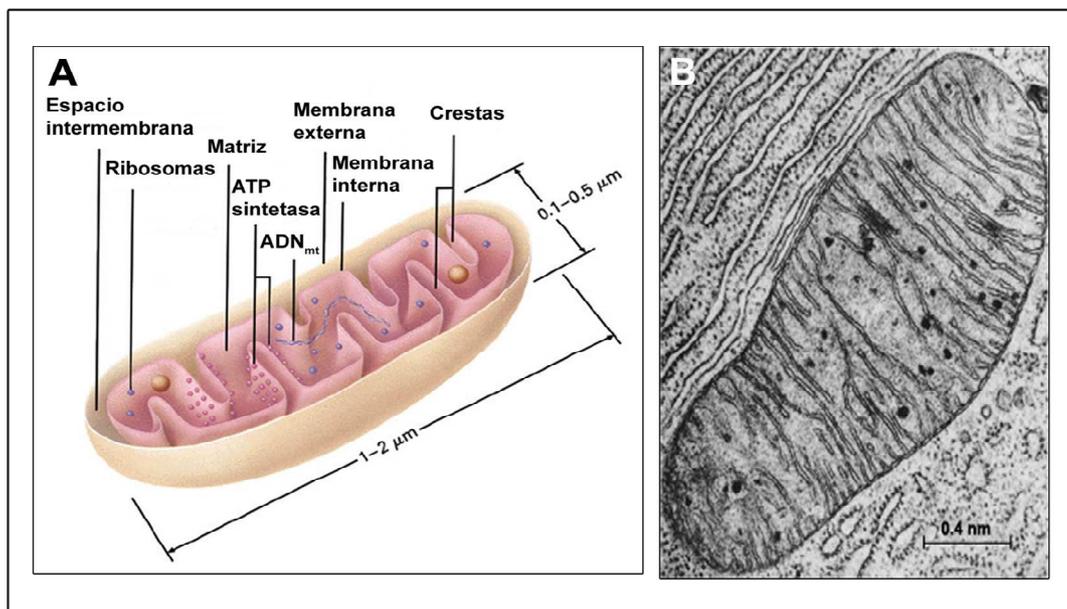
## ***1. Introducción General***

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1. Generalidades de mitocondrias

Las mitocondrias son organelas complejas, propias de los organismos eucariotas, en las cuales se llevan a cabo los procesos energéticos más importantes del metabolismo aeróbico. Estas organelas son las encargadas de liberar la energía disponible en los compuestos orgánicos y transformarla en ATP, utilizable por la maquinaria celular, a expensas de la oxidación de tales compuestos (Alberts y col., 1996).

Las mitocondrias están delimitadas por dos membranas muy diferentes, una externa y una interna, separadas por el espacio intermembrana. La membrana interna define un compartimiento central, denominado matriz mitocondrial (Figura 1).



**Figura 1:** (A) Diagrama tridimensional de un corte longitudinal de una mitocondria. Los complejos ATP sintetasa, encargados de la síntesis de ATP y localizados en la membrana mitocondrial interna, están representados en color rosa. Se visualiza el ADN mitocondrial (ADN<sub>mt</sub>) en azul y los ribosomas como esferas de color azul. (B) Micrografía electrónica de una mitocondria.

Al igual que los cloroplastos, las mitocondrias son organelas semiautónomas debido a que poseen sus propios ribosomas, ARN y ADN, razón por la cual tienen la capacidad de codificar y sintetizar un número limitado de proteínas. Estas organelas proliferan por fisión binaria a partir de mitocondrias preexistentes y no a través de la biogénesis *de novo*, siendo capaces de transmitir su información genética a las organelas hijas (Alberts y col., 1996).

### ***1.1.1. Origen de las mitocondrias***

Las mitocondrias han sido esenciales para la evolución de los organismos pluricelulares. Numerosas líneas de evidencia indican que estas organelas descienden de bacterias captadas por endocitosis a partir de células ancestrales que contenían un núcleo eucarionte, hace aproximadamente 1,5 billones de años (Sicheritz-Pontén y col., 1998). Recientemente, y gracias al análisis de secuencias de ADN, se demostró una similitud sorprendente entre el genoma de mitocondrias y el de la bacteria *Rickettsia prowazekii* (Alberts y col., 1996; Cooper, 2000; Lodish y col. 2002).

A través del tiempo evolutivo, se estrechó la relación entre huésped y endosimbionte, lo cual permitió que la mayoría de los genes bacterianos que codifican los componentes de las organelas actuales se transfirieran al núcleo (Alberts y col., 1996). Este proceso se denomina evolución reductiva, y se evidencia por la pérdida que ha sufrido el genoma mitocondrial de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos, de nucleósidos, glicólisis anaeróbica y aquellos relacionados con la replicación y expresión de la información genética (Gray y col., 1999).

La dependencia que se ha establecido entre el genoma nuclear y el mitocondrial es motivo de estudio de varios grupos de investigación ya que aún no se ha podido dilucidar completamente la compleja relación que existe entre ambos genomas.

### ***1.1.2. Organización mitocondrial***

Las mitocondrias están delimitadas por dos membranas, las cuales desempeñan un papel crucial en el desarrollo de sus funciones. La membrana externa posee numerosas copias de una proteína de transporte llamada porina, la cual forma grandes canales acuosos a través de la bicapa lipídica y, coincidentemente con la teoría endosimbiótica, presenta una estructura similar a la de las porinas bacterianas. La presencia de esta proteína determina la permeabilidad de la membrana externa frente a moléculas relativamente grandes, muchas de las cuales pueden acceder al espacio intermembrana pero no pueden atravesar la membrana interna. En función de la permeabilidad de la membrana externa, la composición bioquímica del espacio intermembrana es similar a la del citosol (Alberts y col., 1996; Lodish y col., 2002).

La membrana interna se encuentra altamente especializada. Presenta una gran cantidad de plegamientos, llamados crestas, que se proyectan hacia el interior de la matriz y aumentan su capacidad para generar ATP. Esta membrana es intrínsecamente impermeable a casi todos los iones y moléculas polares. Su composición proteica es mayor que la detectada en las demás membranas celulares y contiene una elevada proporción de un fosfolípido poco frecuente, la cardiolipina, el cual es responsable de que la membrana sea especialmente impermeable a los protones. En la membrana interna están presentes diversas proteínas de transporte que la hacen permeable selectivamente a las pequeñas moléculas que son metabolizadas por las numerosas enzimas mitocondriales que se encuentran en la matriz (Alberts y col., 1996; Lodish y col., 2002).

La matriz mitocondrial es de carácter gelatinoso en función de que posee un 50% de agua. Contiene una elevada concentración de enzimas solubles que participan en las reacciones centrales del metabolismo oxidativo, así como sustratos, cofactores e iones inorgánicos. La matriz contiene además la maquinaria genética propia de la mitocondria (ADN, ARN y ribosomas) que participa en la síntesis de algunos componentes mitocondriales. El ADN mitocondrial se replica durante la interfase celular. Al parecer, todas las proteínas codificadas por este genoma son sintetizadas en

los ribosomas mitocondriales y los productos de traducción permanecen en las mitocondrias (Lodish y col., 2002).

### ***1.1.3. Funciones metabólicas de las mitocondrias***

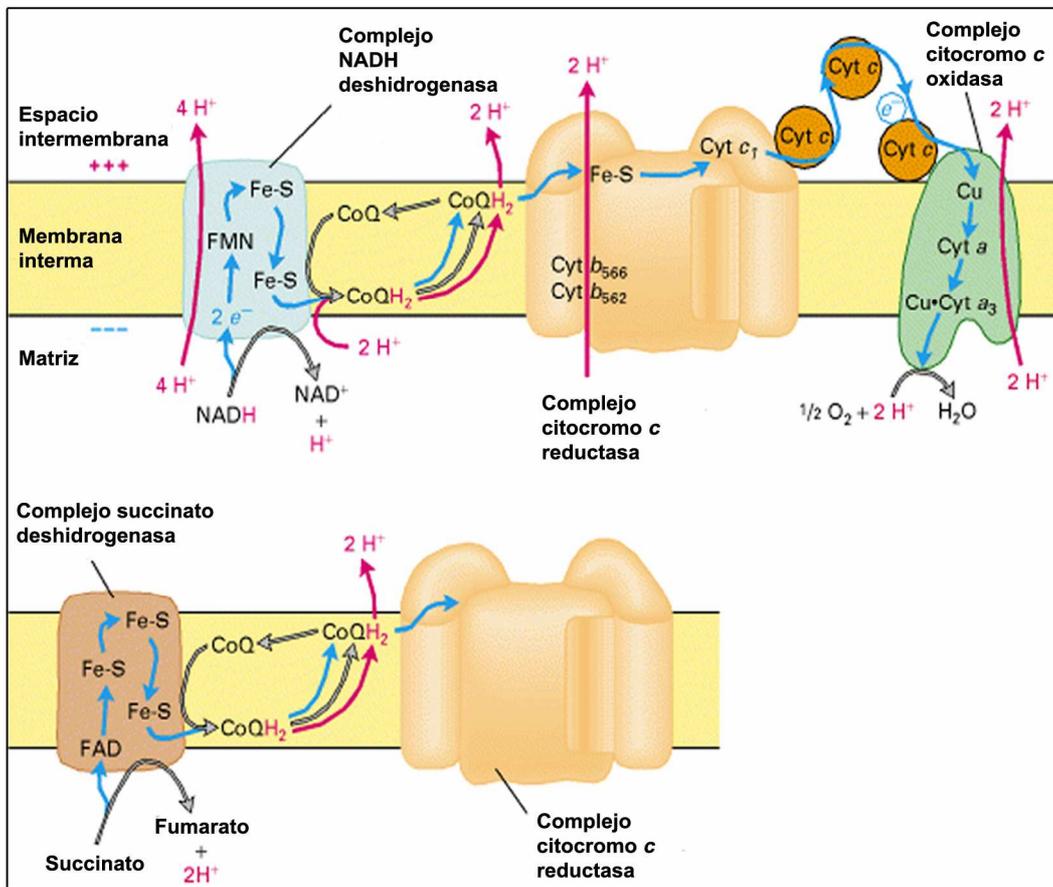
El rol fundamental de las mitocondrias es proporcionar la energía necesaria para que la célula eucariota pueda llevar a cabo todos sus procesos metabólicos. El ATP es la forma de energía utilizable por la maquinaria celular y su síntesis involucra la participación de una serie de complejos multienzimáticos localizados en la membrana interna. Estos complejos conforman la cadena respiratoria y están compuestos por un gran número de subunidades codificadas tanto en el genoma nuclear como en el genoma mitocondrial.

El proceso por el cual se obtiene ATP se denomina oxidación aeróbica y se produce principalmente en la membrana interna y la matriz mitocondrial. Este proceso comprende la oxidación del piruvato y de los ácidos grasos a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Los procesos metabólicos que tienen lugar en las mitocondrias pueden agruparse en tres eventos:

- ♦ Oxidación del piruvato y de los ácidos grasos a  $\text{CO}_2$ , acoplada a la reducción del  $\text{NAD}^+$  (dinucleótido de nicotinamida-adenina) y FAD (dinucleótido de flavina-adenina). Estas reacciones tienen lugar en la matriz mitocondrial o en proteínas de la membrana interna que se proyectan hacia la matriz, a través de un proceso cíclico denominado ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbónicos.

- ♦ Transferencia de los electrones de NADH o  $\text{FADH}_2$  al  $\text{O}_2$ . Estas reacciones ocurren en la membrana interna y están acopladas al bombeo de protones, en contra del gradiente de concentración, desde la matriz hacia el espacio intermembrana, generando una fuerza protón-motriz a través de la membrana interna.

- ♦ Síntesis de ATP a expensas de la energía generada por el gradiente de protones, los cuales retornan a la matriz desde el espacio intermembrana a favor del gradiente de concentración. En este proceso, que tiene lugar en la membrana mitocondrial interna, interviene una ATP sintetasa (Lodish y col., 2002).



**Figura 2:** Transporte de electrones (flechas azules) y de protones (flechas rojas) a través de la membrana mitocondrial interna. Los complejos respiratorios poseen en su estructura grupos prostéticos, los cuales son los encargados del transporte de electrones. El complejo NADH deshidrogenasa acepta los electrones del NADH y, a través del mononucleótido de flavina (FMN) y luego de una proteína de hierro-azufre, los transfiere a la coenzima Q (CoQ). El complejo succinato deshidrogenasa transfiere los electrones del  $\text{FADH}_2$  (generado por la oxidación de succinato a fumarato) primero al dinucleótido de flavina-adenina (FAD), luego a un transportador con hierro-azufre y por último a la CoQ. La  $\text{CoQH}_2$  difunde a través de la membrana y cede los electrones al complejo citocromo c reductasa, en el cual los electrones son transferidos a una proteína con hierro-azufre y a dos citocromos (cyt) de tipo b, y luego al citocromo  $c_1$ . Estos electrones son entonces transferidos a dos moléculas de la forma oxidada del citocromo c (proteína hidrosoluble del espacio intermembrana). El citocromo c transfiere los electrones, de a uno, primero a un par de iones de cobre ( $\text{Cu}_A$ ), luego al citocromo a, después a un complejo de otro ión cobre ( $\text{Cu}_B$ ) y citocromo  $a_3$ , y por último al  $\text{O}_2$ .

Tres de los complejos respiratorios antes mencionados intervienen en la transferencia de electrones desde el NADH al O<sub>2</sub> utilizando la energía liberada en este proceso para bombear protones a través de la membrana interna (Figura 2):

- ♦ **Complejo I: NADH deshidrogenasa.** Acepta los electrones del NADH y los transfiere, a través de la ubiquinona (o coenzima *Q*), al complejo citocromo *c* reductasa.
- ♦ **Complejo III: citocromo *c* reductasa o citocromo *b-c<sub>1</sub>*.** Acepta electrones de la ubiquinona *reducida* y los transfiere al citocromo *c*, que transporta los electrones de a uno al complejo citocromo *c* oxidasa.
- ♦ **Complejo IV: citocromo *c* oxidasa.** Acepta electrones del citocromo *c* y los cede al O<sub>2</sub>.

El **complejo II, succinato deshidrogenasa**, acepta electrones del FADH<sub>2</sub> y los cede a la ubiquinona. Este complejo participa tanto de la cadena de transporte de electrones como del ciclo de Krebs. Durante esta reacción no se libera energía suficiente para la translocación de protones en contra del gradiente de concentración (Figura 2).

El **Complejo V, ATP sintetasa**, permite el regreso de los protones a favor de su gradiente de concentración, con la consiguiente producción de ATP (Lodish y col., 2002).

La mayoría de los complejos respiratorios mencionados contiene grupos prostéticos, como flavinas, hemos, centros de hierro-azufre y cobre (Figura 2). Los centros de hierro-azufre, Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> y Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, son grupos prostéticos no hémicos compuestos por átomos de hierro unidos a átomos de azufre inorgánico y a cuatro átomos de azufre en residuos de cisteínas de la proteína a la cual se asocian. Los citocromos son proteínas que están ligadas a una molécula de hemo, un grupo prostético con contenido de hierro similar al de la hemoglobina o la mioglobina (Lodish y col., 2002).

## **1.2. Características distintivas de las mitocondrias de plantas**

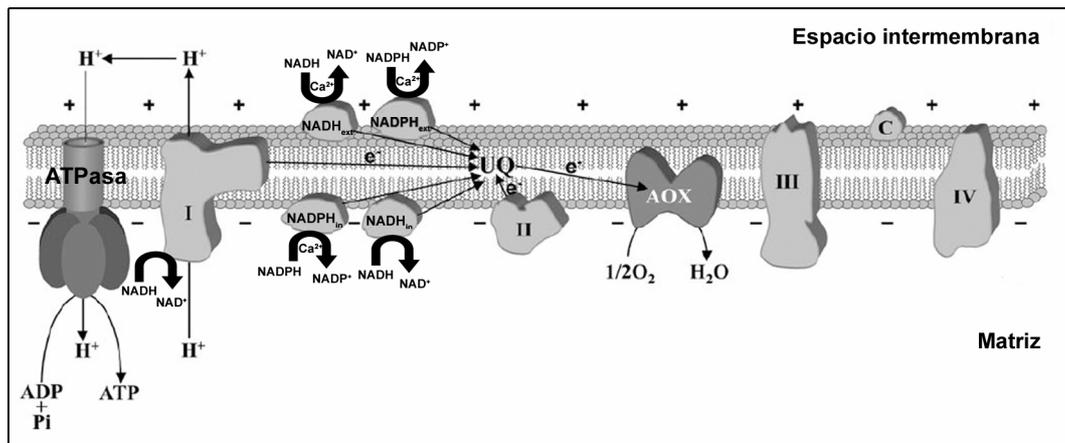
Las mitocondrias de plantas poseen características que las distinguen de las mitocondrias de otras células eucariotas. Muchas de estas características propias constituyen adaptaciones en respuesta a la condición ubicua de las plantas, permitiéndoles a estos organismos resistir condiciones de estrés. Otras de estas características surgieron como resultado de la coordinación de las funciones mitocondriales con las del resto de la célula. Las mitocondrias de plantas: a) coexisten con los cloroplastos, los cuales son capaces de producir ATP y sintetizar sustratos respiratorios, b) producen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios a expensas de cadenas carbonadas, en respuesta a agresiones específicas y c) tienen la facultad de fotorrespirar (Mackenzie y McIntosh, 1999).

En este contexto, las mitocondrias de plantas desarrollaron mecanismos que disipan energía con la finalidad de prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son producidas por la cadena de transporte de electrones durante el metabolismo normal y se incrementan en condiciones de estrés. A bajas concentraciones constituyen las señales que activan la defensa de las plantas y a altos niveles producen daño celular actuando sobre proteínas, lípidos y ADN (Dat y col. 2000; Mittler 2002).

### ***1.2.1. Presencia de una segunda vía respiratoria***

Las mitocondrias de plantas, así como también las de algunos protistas y hongos, poseen una vía oxidativa independiente del citocromo *c*. Esta vía alternativa de respiración está constituida por una oxidasa que recibe electrones de la ubiquinona y los cede al oxígeno para obtener agua como producto final (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). A diferencia de la vía del citocromo *c*, esta vía no involucra los complejos III y IV (Figura 3), por lo que la conservación de energía en la forma de ATP es mucho menor (Taiz y Zeiger, 2006). Cuando la vía de transporte de electrones a través del citocromo *c* se satura se incrementan las relaciones ATP/ADP y NADH/NAD<sup>+</sup>, por lo

cual se ve limitada la producción de esqueletos carbonados a través del ciclo de Krebs. La oxidasa alternativa tiene una función regulatoria, permitiéndole a la planta satisfacer su necesidad de esqueletos carbonados, aún bajo condiciones de saturación de la vía respiratoria principal, para ser utilizados en procesos anabólicos. El ciclo de Krebs no cesa debido al suministro de esqueletos carbonados, en forma de oxalacetato, que ingresan desde el citosol hacia la matriz (Ap Rees y col., 1983).



**Figura 3: Mecanismo de acción de la oxidasa alternativa (AOX).** La cadena de transporte de electrones mitocondrial incluye una oxidasa terminal, oxidasa alternativa, que cataliza la transferencia de electrones desde la ubiquinona directamente al oxígeno molecular, evitando los complejos III y IV. De esta manera, la cantidad de ATP sintetizado durante esta oxidación es menor que el producido por la cadena completa de transporte de electrones. Además de los Complejos I-IV, existen NAD(P)H deshidrogenasas insensibles a rotenona, localizadas en la membrana interna de cara al espacio intermembrana (NAD(P)H<sub>ext</sub>) o hacia la matriz (NAD(P)H<sub>in</sub>). Abreviaturas: UQ, ubiquinona; C, citocromo c; e<sup>-</sup>, electrones u otro equivalente reductor; NAD(P)H<sub>in</sub>, NAD(P)H deshidrogenasa interna; NAD(P)H<sub>ext</sub>, NAD(P)H deshidrogenasa externa. (Extraído de Pastore y col., 2007).

La oxidasa alternativa es una proteína dimérica insensible a cianuro. Esta enzima se induce frente a diferentes tipos de estrés y en esas situaciones la planta necesita el suministro de esqueletos carbonados que provienen del ciclo de Krebs. Esta relación entre la oxidasa alternativa y el ciclo de Krebs parece estar regulada post-traduccionalmente, dependiendo del estado redox del homodímero de la oxidasa alternativa, ya que la forma oxidada es menos activa que la forma reducida (Mackenzie y McIntosh, 1999; Umbach y Siedow, 1993; Umbach y col., 1994). Esta enzima es

inducida por  $\alpha$ -cetoácidos. Se han encontrado evidencias de que la activación se debe a cambios conformacionales causados por repulsión de cargas entre los dímeros (Umbach y col. 2002).

La ausencia de oxidasa alternativa genera una respuesta alterada ante situaciones de estrés ya que las mitocondrias de plantas constituyen uno de los principales productores de ROS. Por otro lado, y en función de lo mencionado, la inducción de la oxidasa alternativa permite mitigar la producción de ROS (Bartoli y col. 2004; Sweetlove y col., 2002; Taylor y col. 2004; Van Aken y col., 2009).

### ***1.2.2. Presencia de NADH/NADPH deshidrogenasas insensibles a rotenona***

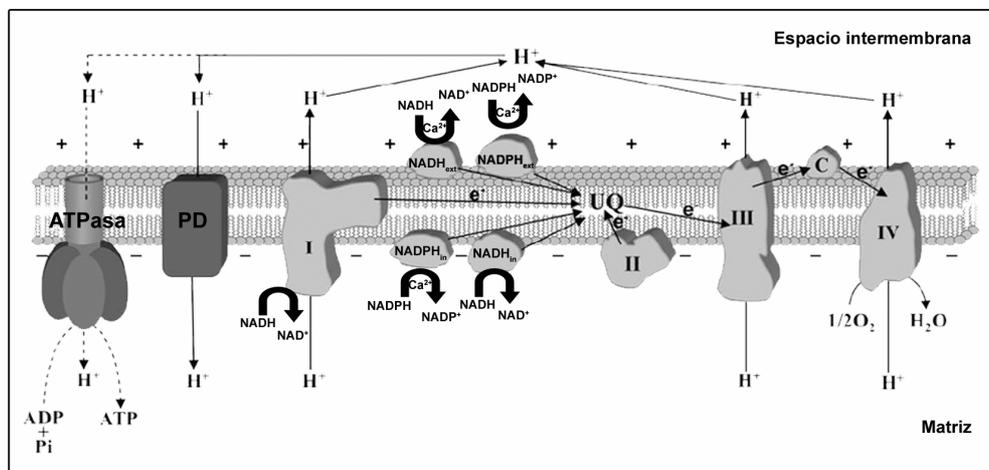
Las mitocondrias de plantas, hongos y protistas poseen NAD(P)H deshidrogenasas (tipo II) que, a diferencia del Complejo I (tipo I), son insensibles a rotenona. Estas enzimas son capaces de oxidar NADH y/o NAD(P)H transportando los electrones a la ubiquinona, sin contribuir al gradiente de protones ni a la síntesis de ATP. Se localizan en la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembrana o hacia la matriz mitocondrial, oxidando NAD(P)H proveniente del citosol o de la matriz, respectivamente (Figura 3) (Kercher 2000; Møller 1997; Møller 2001; Møller y Rasmusson, 1998; Rasmusson y col., 1998; Rasmusson y col., 2004).

Las mitocondrias de mamíferos no disponen de NAD(P)H deshidrogenasas tipo II. En su lugar poseen una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  que utiliza FAD y se encuentra en la superficie de la membrana interna, de cara al espacio intermembrana, y una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  localizada en el citosol. La enzima citosólica reduce dihidroxiacetona fosfato utilizando NADH y generando glicerol-3-fosfato, y la enzima mitocondrial convierte glicerol-3-fosfato en dihidroxiacetona fosfato con la producción de  $\text{FADH}_2$ . La acción coordinada de ambas enzimas resulta en la transferencia de dos equivalentes de reducción del glicerol-3-fosfato a la ubiquinona generando la misma cantidad de ATP que se obtiene por medio del mecanismo de plantas (menos que el producido por la cadena respiratoria

completa). Recientemente, se han encontrado estas enzimas en células vegetales sugiriendo que las plantas cuentan además con este mecanismo (Shen y col., 2003).

### 1.2.3. Presencia de una proteína desacoplante que disipa el gradiente de protones

Las proteínas desacoplantes están localizadas en la membrana interna mitocondrial (Figura 4) y catalizan el paso de protones a través de esta membrana, disipando el gradiente generado por los Complejos I, III y IV de la cadena respiratoria (Krauss y col., 2005). La actividad de estas proteínas es inducida por ácidos grasos, superóxido y productos de la peroxidación lipídica, mientras que el transporte de protones es inhibido por nucleótidos de purina (Borecký y col., 2001; Considine y col., 2003; Jarmuszkiwicz y col., 1998; Jezek y col., 1996; Smith y col., 2004). La formación de superóxido y otras ROS por parte de la cadena respiratoria se incrementa a un alto potencial de membrana, por lo que la activación de la proteína desacoplante en estas condiciones sugiere que la misma tiene un rol moderador de la producción de ROS (Sweetlove y col., 2006).



**Figura 4: Mecanismo de acción de la proteína desacoplante.** La cadena de transporte de electrones de las mitocondrias de plantas presenta una proteína desacoplante (PD), la cual media el transporte de protones ( $H^+$ ) desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial sin la producción de ATP. Este mecanismo disipa la energía generada por el potencial de membrana. Abreviaturas: UQ, ubiquinona; C, citocromo c;  $e^-$ , electrones u otro equivalente reductor;  $NAD(P)H_{in}$ ,  $NAD(P)H$  deshidrogenasa interna;  $NAD(P)H_{ext}$ ,  $NAD(P)H$  deshidrogenasa externa. (Extraído de Pastore y col., 2007).

#### 1.2.4. Generación de ROS en la mitocondria

Los sitios de formación de ROS en la mitocondria son los Complejos III y IV de la cadena de transporte de electrones, los cuales producen aniones superóxido ( $O_2^-$ ) que luego son reducidos por dismutación a  $H_2O_2$  por la actividad de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) (Møller, 2001; Sweetlove y Foyer, 2004). El  $H_2O_2$  es un compuesto de baja toxicidad que tiene la capacidad de reaccionar con iones  $Fe^{2+}$  y  $Cu^+$  produciendo radicales altamente tóxicos y además puede salir de la mitocondria, atravesando las membranas, debido a su neutralidad de cargas. El *pool* de ubiquinona determina la capacidad de reducción de la cadena de transporte de electrones, por lo que constituye una señal primaria en la producción de ROS (Sweetlove y Foyer, 2004). Aunque resulta dificultoso medir los niveles de ROS con precisión, se estima que en mitocondrias dichos niveles son considerablemente menores que en cloroplastos o peroxisomas en condiciones de iluminación, debido a la fotosíntesis y a la fotorrespiración (Foyer y Noctor, 2003). Sin embargo, en oscuridad o en tejidos no fotosintéticos, las mitocondrias constituyen los mayores sitios de producción de ROS (Rhoads y col., 2006). En condiciones normales, las mitocondrias deben controlar sus propios niveles de ROS, detoxificando el exceso, reparando el daño oxidativo producido por las mismas y modulando dicha producción apropiadamente en función del papel que cumplen como moléculas señal (Rhoads y col., 2006).

El daño oxidativo que producen las ROS en las mitocondrias puede describirse en función de sus blancos de acción:

♦ **Daño oxidativo a lípidos mitocondriales.** La peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados de la membrana mitocondrial se inicia por la abstracción de un átomo de hidrógeno debido a la acción de las ROS (especialmente por radicales hidroxilos). Los productos de esta peroxidación lipídica son capaces de causar daño celular ya que pueden reaccionar con proteínas, otros lípidos y ácidos nucleicos (Rhoads y col., 2006).

♦ **Efecto de las ROS sobre proteínas mitocondriales.** Las proteínas pueden ser dañadas y/o inhibidas de diferentes maneras: 1) oxidación directa de aminoácidos por ROS (Berlett y Stadtman, 1997; Dean y col., 1997); 2) oxidación que rompe la estructura principal de péptidos (Dean y col. 1997); 3) reacciones con los productos de peroxidación lipídica; 4) reacciones con especies reactivas de nitrógeno producidas por reacción de óxido nítrico con las ROS (Sakamoto y col. 2003); 5) interacción de ROS con cofactores metálicos (Flint y col., 1993; Verniquet y col, 1991).

El daño oxidativo causado a las proteínas ocurre bajo condiciones de estrés pero también forma parte de procesos normales en las plantas, como en el caso de la maduración de las hojas de *Arabidopsis* (Johansson y col., 2004) y de la oxidación selectiva de proteínas que controlarían el curso de la actividad metabólica durante la germinación de las semillas, siendo el Complejo V uno de los principales blancos de acción (Job y col., 2005).

♦ **Daño oxidativo al ADN mitocondrial.** Los radicales hidroxilos pueden dañar el ADN mitocondrial y nuclear, por lo que la célula intenta reparar dicho daño (Doudican y col., 2005; Roldan-Arjona y col., 2000). Una característica del ADN mitocondrial de plantas, la redundancia de secuencias genómicas en cada mitocondria, es un factor importante en la prevención del efecto de las ROS (Backert y col., 1997; Mackenzie y col., 1994). Otra característica de este genoma que colabora en dicha prevención es la existencia de eventos de recombinación que ayudan a eliminar las mutaciones del genoma mitocondrial, manteniendo su integridad (Barr y col., 2005). Estas estrategias no son suficientes para mitigar las consecuencias del daño al ADN mitocondrial cuando las condiciones de estrés oxidativo son severas (Rhoads y col., 2006).

### **1.3. Genoma mitocondrial de plantas e interconexión génica celular**

Las mitocondrias son organelas semiautónomas, ya que codifican menos de 40 proteínas mitocondriales en comparación con los cerca de 2000 productos génicos

presentes en una organela funcional (Emanuelsson y col., 2000). Se cree que muchos de los genes nucleares requeridos para la función mitocondrial constituyen el resultado de la transferencia génica desde la mitocondria al núcleo durante el curso de la evolución. Los presuntos intermediarios en dicha transferencia son moléculas de ARN (Adams y col., 1999).

En plantas, la función mitocondrial, además de tener un rol fundamental en la célula, depende de la coordinación bioquímica y genética establecida respecto de un segundo sistema generador de energía, los cloroplastos. La mayoría de los componentes necesarios para las funciones de estas dos organelas están codificados en el genoma nuclear. La presencia de información genética dentro de mitocondrias, cloroplastos y núcleo requiere la existencia de mecanismos de regulación altamente coordinados.

### ***1.3.1. Estructura del genoma mitocondrial de plantas***

La mayoría de los genomas mitocondriales de células eucariotas adoptan una estructura circular (Schuster y Brennicke, 1994). La estructura *in vivo* que adoptan las moléculas de ADN mitocondrial de plantas superiores es heterogénea y, llamativamente, en muchas ocasiones adquieren una conformación lineal. Esta característica se relaciona con varias evidencias que demuestran que los genomas mitocondriales de plantas pueden replicarse mediante círculo rodante, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, cuyo genoma mitocondrial se replica en forma bidireccional mediante la formación de estructuras *theta* (Machenzie y col, 1994; Mackenzie y McIntosh, 1999).

El genoma mitocondrial de plantas difiere del de otros eucariotas superiores respecto a la gran diversidad que presenta tanto en tamaño como en estructura. Los genomas mitocondriales de mamíferos son más pequeños y completamente funcionales, es decir que toda la molécula codifica proteínas o participa en la transcripción y replicación (Taiz y Zeiger, 2006). Dentro de una misma familia de plantas se evidencian amplias diferencias en cuanto a la longitud del genoma mitocondrial, lo cual no se ve

reflejado en la capacidad codificante del mismo, ya que las regiones intergénicas son las responsables de dicha variabilidad (Kubo y Mikami, 2007; Machenzie y col, 1994).

El primer análisis completo de un genoma mitocondrial de plantas se realizó en la briófito *Marchantia polymorpha* (Oda y col., 1992). Luego se conocieron los genomas mitocondriales de angiospermas como *Arabidopsis thaliana* (Unselde y col., 1997), *Beta vulgaris* (Kubo y col., 2000; Satoh y col., 2004), *Brassica napus* (Handa 2003), *Nicotiana tabaccum* (Sugiyama y col., 2005), *Oryza sativa* (Notsu y col., 2002), *Zea mays* (Clifton y col., 2004) y *Triticum aestivum* (Ogihara y col., 2005). Del análisis de la composición de estos genomas se determinó que la alta variabilidad en el tamaño de los mismos se debe a la presencia de secuencias redundantes y los cambios en estructura dependen de eventos de recombinación y/o integración de ADN foráneo (Mackenzie y McIntosh, 1999).

Los eventos de recombinación que ocurren entre secuencias repetidas homólogas, así como también entre secuencias no homólogas, responsables de la alta variabilidad del genoma, contribuyen a aumentar la complejidad de la estructura del mismo. La presencia de secuencias repetidas activas resulta en un genoma multipartito generado por eventos de recombinación intermoleculares e intramoleculares. Debido a esta complejidad, resulta interesante la presencia de más de una molécula que pueda replicarse en forma autónoma. La eliminación de mutaciones mitocondriales puede involucrar la correspondiente supresión de cromosomas particulares en la organela durante el desarrollo de las plantas (Janska y Mackenzie, 1993).

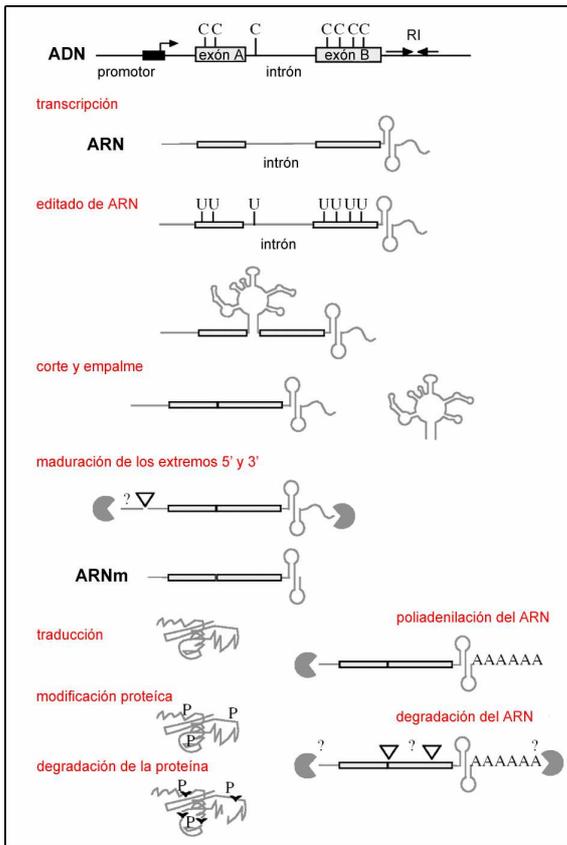
Una característica sorprendente del genoma mitocondrial de angiospermas es la presencia de secuencias homólogas a ADN nuclear y plastídico, razón por la cual se lo denominó ADN promiscuo (Timmis y col., 2004). Es de destacar que la integración y el mantenimiento del ADN promiscuo en el genoma mitocondrial se encuentra bajo una débil presión selectiva (Kubo y Mikami, 2007). Las secuencias nucleares encontradas en el genoma mitocondrial de *Arabidopsis* son en su mayoría derivadas de retrotransposones (Marienfeld y col., 1999). Se encontraron 16 piezas de ADN plastídico (representadas por 6 ARNt funcionales), fragmentos de genes nucleares,

retrotransposones y secuencias similares a ADN de patógenos de plantas (Blanchard y Lynch, 2000).

### ***1.3.2. Información genética contenida en el genoma mitocondrial de plantas***

El genoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana*, de 367 kpb, codifica 57 genes y 26 marcos abiertos de lectura, lo cual constituye menos del diez por ciento del total de los productos de expresión génica encontrados en las mitocondrias. Entre los genes codificados por este genoma 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 (Unsold y col., 1997). También están presentes 22 genes de ARNt, los cuales son insuficientes para decodificar el total de los codones encontrados en el genoma, por lo que el resto de los ARNt son incorporados desde el citosol. Se han encontrado genes de ARNt que muestran una alta homología (más del 90%) con genes de ARNt cloroplásticos (Kubo y Mikami, 2007).

La expresión de los genes mitocondriales es regulada principalmente a nivel post-transcripcional. Se encontraron evidencias de que la abundancia de los transcritos mitocondriales no se correlaciona con la actividad relativa de los promotores de los genes que los codifican (Giegé y col. 2000). Existen mecanismos complejos de procesamiento y maduración que transforman al transcrito primario mitocondrial en un ARN mensajero maduro (Figura 5). Estos pasos incluyen el editado del ARN (cambiando C por U), el corte de las regiones intrónicas y su posterior empalme y la maduración del transcrito mediante el procesamiento de los extremos 5' y 3' (Farré, 2001). Además, el control de la actividad génica puede tener lugar durante la traducción o la degradación del mensajero. A diferencia de lo que sucede con los ARNm codificados en el núcleo, la poliadenilación de los mensajeros mitocondriales constituye un mecanismo para la degradación de los mismos (Gagliardi y col. 2001).



**Figura 5: Mecanismos de control transcripcional y post-transcripcional de la expresión de genes mitocondriales.** La expresión de los genes mitocondriales tiene todos estos puntos de control. Abreviatura: RI, repeticiones invertidas. (Extraído de Binder y Brennicke, 2003).

### 1.3.3. Migración de genes mitocondriales al núcleo

Según la teoría endosimbiótica, a lo largo de la evolución muchos de los genes mitocondriales fueron transferidos al núcleo. Dicha transferencia tuvo lugar principalmente durante los primeros tiempos de la evolución de la célula eucariota, aunque en plantas este proceso continúa activo (Adams y col., 2000).

La incorporación eficiente de un gen mitocondrial en el genoma nuclear supone la presencia de un promotor al comienzo del gen que facilite la transcripción en el núcleo, la presencia de secuencias específicas para la adición de la cola de poli A en el mensajero correspondiente, y la incorporación de una secuencia señal para que la proteína sintetizada en el citosol pueda ser transportada a la mitocondria. Además deben estar presentes los elementos de regulación propios de diferentes tipos de células y bajo diferentes condiciones que garanticen la expresión estable y adecuada de los productos

de expresión del gen que ha sido transferido (Taiz y Zeiger, 2006). Existen eventos de duplicación y recombinación que podrían haber participado en la obtención de estas secuencias (Kadowaki y col., 1996). La transferencia génica a lo largo de la evolución pudo haber ocurrido, en varios casos, con la participación de intermediarios de ARN.

Una hipótesis que intenta explicar por qué no todos los genes han sido transferidos al núcleo de la célula eucariota sostiene que tanto cloroplastos como mitocondrias han retenido los genes cuya expresión es regulada por el estado redox de los productos que codifican o por los transportadores de electrones con los que estos productos interactúan. Esta regulación es indispensable para la aclimatación y respuesta rápida a cambios ambientales como los niveles de oxígeno, luz o dióxido de carbono. Esta hipótesis se denomina “co-localización para la regulación redox de la expresión” (CORR, del inglés *co-location for redox regulation*) (Allen, 2003).

Otras hipótesis que intentan explicar la persistencia de genes dentro de las organelas son: (i) la hipótesis “lock-in” de Bogorad (1975) que sostiene que los componentes que constituyen el “core” o núcleo de los complejos multienzimáticos respiratorios o fotosintéticos deben ser sintetizados *de novo* en el compartimiento celular correcto para impedir que dichos complejos puedan ensamblarse en la membrana equivocada; (ii) desde un punto de vista evolutivo, la hipótesis que interpreta la transferencia de genes de las organelas al núcleo como un proceso activo que aún no ha cesado, es así que la información codificada en el genoma de las organelas está constituida por genes que aún no migraron (Adams y col., 2000; Daley y col., 2002); (iii) la hipótesis de que la migración de genes hacia el núcleo se detuvo debido a algún accidente; (iv) la hipótesis 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 (Allen, 2003). Existen otras hipótesis aún que intentan explicar la persistencia de genes dentro de las organelas. Tal vez todas estas ideas no sean mutuamente excluyentes y el verdadero mecanismo que intentan explicar sea el resultado de la integración de las mismas.

#### 1.3.4. Importación de las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol

Debido a que las mitocondrias codifican sólo una pequeña fracción de las proteínas presentes en esta organela, las mismas desarrollaron una eficiente maquinaria para la importación de las proteínas sintetizadas en el citosol. Esta maquinaria está constituida por receptores de la membrana externa, translocasas localizadas tanto en la membrana externa como en la interna, una variedad de chaperonas presentes en el citosol y en la mitocondria y peptidasas que remueven la porción de la proteína que contiene la información para su localización, presente en muchos de los precursores de proteínas mitocondriales (Neupert, 1997; Pfanner y Geissler, 2001).

La maquinaria de importación ha sido estudiada extensamente en levaduras (Figura 6). En la membrana externa existe una translocasa (TOM, del inglés *translocase of outer membrane*) que contiene siete proteínas con dos receptores primarios. Estos receptores, TOM20 y TOM70, reconocen precursores que poseen el péptido señal en el extremo N-terminal o en una región interna de la proteína, respectivamente (Wiedemann y col., 2004). Luego de dicho reconocimiento, transfieren las proteínas al poro central TOM40 vía TOM22, el cual también puede actuar como receptor para un número pequeño de proteínas. En conjunto con el complejo TOM, SAM (del inglés *sorting and assembly machinery*; también llamada TOB, del inglés *topogenesis of outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*), localizado en la membrana externa, permite insertar en dicha membrana las proteínas con estructura barril  $\beta$  con la colaboración de un complejo de chaperonas del espacio intermembrana. Recientemente se demostró que la inserción en la membrana externa de la mayoría de las proteínas TOM que están ancladas a esta membrana a través de una hélice  $\alpha$  también depende del complejo SAM (Stojanovski y col., 2007; Taylor y Pfanner, 2004).

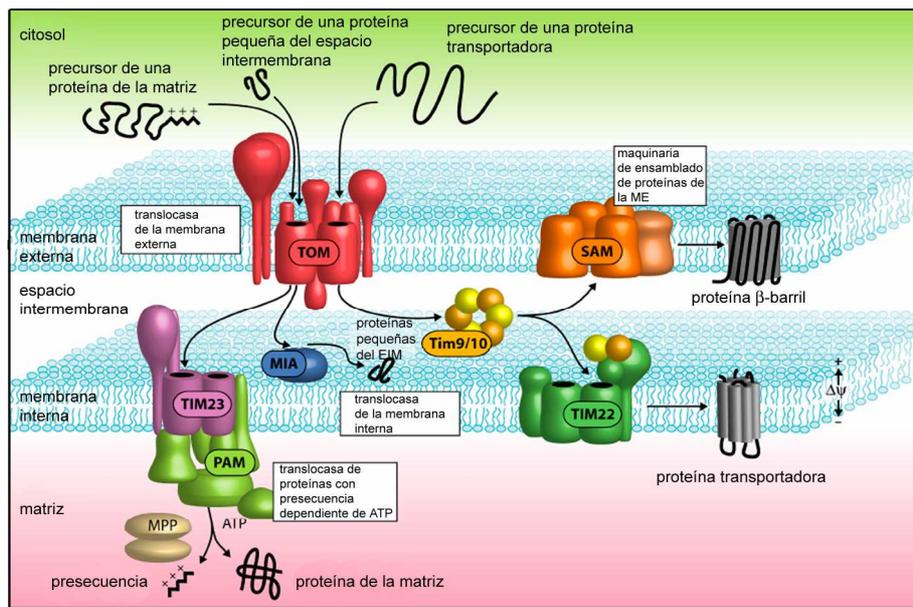
En la membrana interna se encuentran dos translocasas (TIM, del inglés *translocase of inner membrane*), denominadas TIM 17:23 y TIM22, las cuales actúan en la vía general de importación, y en la vía que incorpora proteínas en la membrana interna que están involucradas en funciones metabólicas y de transporte, respectivamente (Pfanner y Geissler, 2001). El complejo TIM17:23 también contiene

una proteína de 50 kDa, TIM50, que se encuentra unida a TIM44 localizada en la matriz (Mokranjac y col, 2003; Yamamoto y col., 2002). El complejo TIM17:23 es responsable de la importación de precursores que contienen un péptido señal en el extremo N-terminal, el cual es generalmente removido luego de la importación por acción de una peptidasa mitocondrial (MPP, del inglés *mitochondrial processing peptidase*) (Neupert, 1997; Pfanner y Geissler, 2001). El complejo TIM22 contiene al menos otras tres proteínas localizadas en la membrana interna, las cuales junto a chaperonas del espacio intermembrana (TIM8, 9, 10 y 13) son las responsables de la importación de las proteínas, insertándolas en la membrana interna (Davis y col., 2007; Koehler, 2000; Rehling y col., 2003; Sirrenberg y col., 1996;).

Una tercera translocasa de la membrana interna es Oxa1p, que consiste en un complejo homo-oligomérico (Luirink y col., 2001) que participa en la incorporación a la membrana interna de proteínas que exponen su dominio N-terminal hacia el espacio intermembrana. Estas proteínas son translocadas a través del complejo TIM17:23 o pueden provenir de la matriz, como en el caso de la subunidad Cox2p de la citocromo *c* oxidasa, la cual se encuentra codificada en el genoma mitocondrial. Además se determinó que Oxa1p también participa en la integración en la membrana interna de otras proteínas codificadas en la mitocondria como Cox1p y Cox3p, subunidades de la citocromo *c* oxidasa, y el citocromo *b* de la citocromo *c* reductasa, aunque estas proteínas presentan el dominio N-terminal retenido en la matriz mitocondrial. Se sugiere que Oxa1p interactúa con los polipéptidos nacientes, que provienen de la matriz, a medida que éstos son traducidos (Hell y col., 2001).

Muchas de las proteínas que ocupan el espacio intermembrana son pequeñas y poseen motivos de cisteína. Recientemente, se ha encontrado una nueva vía de importación para estas proteínas, las cuales una vez que son incorporadas a través del complejo TOM interactúan con una proteína denominada Mia40 (del inglés *mitochondrial intermembrane space assembly system*), la cual se reduce para formar puentes disulfuro en las proteínas importadas (Chacinska y col., 2004). Existe una sulfhidril-oxidasa en el espacio intermembrana, Erv-1, que interactúa con Mia40 a fin

de reoxidarla para que pueda actuar sobre nuevas proteínas importadas al espacio intermembrana (Mesecke y col., 2005). Se ha propuesto que el estado reducido de Mia40 es estabilizado por la unión de metales como zinc y cobre (Terziyska y col., 2005). La mayoría de los sustratos de esta maquinaria contienen dos motivos CX<sub>3</sub>C o dos motivos CX<sub>9</sub>C (Herrmann y Köhl, 2007). Recientemente, se demostró que la reoxidación de Mia40 depende de la presencia de citocromo *c* oxidado, el cual recibe electrones a partir de Erv-1. Es decir que la importación de proteínas a través de este sistema depende del estado energético de la cadena respiratoria. La conexión entre Mia40 y el citocromo *c*, además de facilitar la reoxidación de Mia40, previene la formación de peróxido de hidrógeno en el espacio intermembrana mitocondrial (Bihlmaier y col., 2007).



**Figura 6:** Vía de importación de los precusores de proteínas mitocondriales en levaduras. Las proteínas sintetizadas en el citosol son importadas por el complejo TOM. Las proteínas que presentan presecuencias son importadas a través de TIM17:23 y luego PAM las transporta dentro de la matriz, donde MPP cliva su presecuencia. Las proteínas pequeñas del espacio intermembrana (EIM) son importadas vía MIA. Los precusores de las proteínas barril  $\beta$  de la membrana externa (ME) son transferidos con ayuda de las chaperonas del EIM desde TOM al complejo SAM. Los precusores de las proteínas de transporte de la membrana interna alcanzan TIM22 a través de las chaperonas del EIM y son incorporados a la membrana interna. (Extraído de Kutik y col., 2007)

En plantas, se han encontrado muchas proteínas correspondientes a los componentes de la maquinaria de importación de levaduras (Figura 7). Se han caracterizado los complejos TOM y MPP, y algunos miembros del complejo TIM (Braun y Schmitz, 1999; Glaser y Dessi, 1999; Murcha y col., 2007; Werhahn y col., 2001). No se han encontrado ortólogos de los receptores TOM20, TOM70 y TOM22 presentes en levaduras y mamíferos. Arabidopsis posee una proteína pequeña denominada TOM9 que presenta una región  $\alpha$ -hélice transmembrana y un dominio en el espacio intermembrana (Macasev y col., 2000). TOM22 de levaduras posee dominios similares a TOM9 pero además presenta un dominio expuesto hacia el citosol que actúa como receptor de precursores de proteínas (Yamano y col., 2008). En experimentos de complementación de levaduras mutantes en *tom22*, se demostró que TOM9 puede complementar dicha mutación si es fusionado al dominio receptor de TOM22 (Macasev y col., 2004). Se ha encontrado una proteína TOM20 en plantas, la cual no es ortóloga a la de levaduras y mamíferos. La proteína de plantas está anclada en una orientación opuesta a la de sus contrapartes (Lister y Whelan, 2006; Perry y col., 2006). Estudios estructurales de una isoforma de TOM20 de Arabidopsis reveló una notable similitud con TOM20 de rata, representando un caso de evolución convergente (Perry y col., 2006). No se han encontrado ortólogos de TOM70 (Lister y col., 2005; Chan y col., 2006). Se ha encontrado un homólogo a METAXINA en Arabidopsis (Heazlewood y col., 2004). La proteína homóloga de levaduras es una subunidad del complejo SAM (Bolender y col., 2008). La METAXINA de Arabidopsis podría actuar como receptor de precursores proteicos, además de participar en la incorporación a la membrana interna de las proteínas barril  $\beta$  (Lister y col., 2007).

Respecto de los componentes TIM, éstos muestran una alta similitud con sus contrapartes de otros organismos, aunque presentan algunas características propias de plantas. Los componentes de TIM17:23 están conservados aunque algunos componentes de TIM22 están ausentes (Lister y col., 2003; Murcha y col., 2003).

A diferencia de levaduras, MPP de plantas es un componente integral de membrana relacionado con el supercomplejo citocromo *b-c<sub>1</sub>*/citocromo *c* oxidasa de la

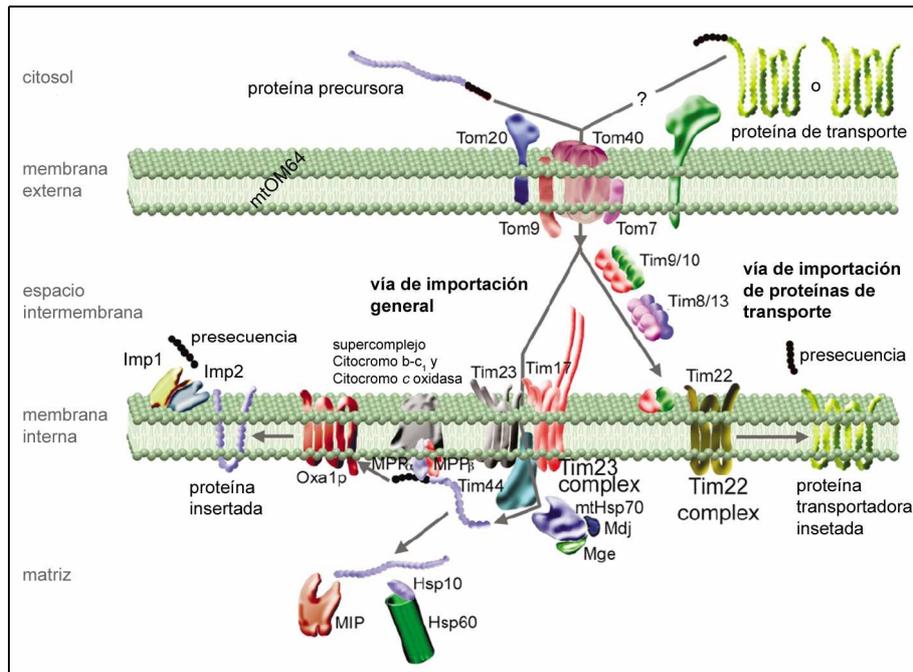
cadena respiratoria y parece existir una actividad específica en la matriz (Braun y Schmitz, 1999; Szigyarto y col., 1998; van der Laan y col., 2006). Se ha encontrado una proteína paróloga al receptor de la envoltura externa de cloroplastos AtTOC64-III (del inglés, *translocase of the outer chloroplast envelope*) anclada a la membrana mitocondrial externa de Arabidopsis (Chew y col., 2004). Esta proteína, mtOM64, interactúa con los precursores proteicos y su expresión se incrementa cuando se inhibe TOM20 (Lister y col., 2007).

En levaduras, las subunidades que conforman los complejos TOM, TIM y SAM están codificadas por genes nucleares únicos. En cambio en plantas y animales, estos componentes están codificados generalmente por pequeñas familias multigénicas. Aún no se conoce el significado de la presencia de dichas familias multigénicas, pero podrían representar diferentes isoformas con funciones específicas (Lister y col., 2007). En Arabidopsis, el análisis detallado de los genes que codifican componentes de la maquinaria de importación de proteínas a la mitocondria indica que existen patrones de expresión génica diferenciales dentro de cada familia (Lister y col., 2004).

Las presecuencias de los precursores de proteínas mitocondriales no presentan una secuencia de aminoácidos conservada pero sí una alta proporción de residuos cargados positivamente y la capacidad de formar hélices  $\alpha$  de baja hidrofobicidad (Roise y col., 1986; von Heijne, 1986). Estas presecuencias presentan un motivo conservado cerca del sitio de clivado compuesto por un residuo de arginina en la posición -2 y/o -3 (Schneider y col., 1998; von Heijne y col., 1989), siendo éste un importante sitio de reconocimiento para MPP (Ogishima y col., 1995; Tanudji y col., 1999). Las señales de localización mitocondrial y cloroplástica poseen algunas características similares, tales como un punto isoeléctrico básico, pero a pesar de ello el complejo TOM puede distinguirlos (Glaser y col., 1998), aparentemente por la presencia de las mencionadas hélices  $\alpha$  de baja hidrofobicidad al comienzo de la presecuencia mitocondrial (Huang y col., 2009).

En condiciones de estrés mitocondrial (como el tratamiento con rotenona), se evidencia un aumento de la expresión de los componentes de la maquinaria de

importación a la mitocondria, así como también de chaperonas mitocondriales, factores de ensamblado de los complejos III, IV y V, productos génicos involucrados posiblemente en la división mitocondrial y proteasas mitocondriales involucradas en la degradación del péptido señal (Lister y col., 2004).



**Figura 7: Modelo de la vía de importación de proteínas a mitocondrias de plantas basado en similitudes con levaduras.** Las proteínas precursoras pueden ser incorporadas por dos vías, la vía general de importación o la vía para importar transportadores. Las proteínas precursoras que siguen la vía general usualmente poseen una presecuencia de localización mitocondrial y se unen al receptor TOM20 de la membrana externa. Éstas son translocadas vía TOM40 a través de la membrana externa y vía TIM17:23 a través de la membrana interna e incorporadas a la mitocondria por medio de la chaperona HSP70. La presecuencia es removida por MPP, luego de lo cual la proteína puede tomar diferentes rutas. Puede adquirir su conformación final por la acción de la chaperona HSP60, para ser procesada luego por MIP, o bien ser redireccionada a la membrana interna vía Oxa1 y ser procesada por los factores Imp1 y/o Imp2. Las proteínas transportadoras que son importadas a la mitocondria pueden o no contener una presecuencia de localización mitocondrial. Son translocadas a la membrana interna vía TIM22 y mediante la colaboración de pequeñas proteínas del espacio intermembrana. La proteína es insertada en la membrana interna y la presecuencia es removida por una proteína desconocida. (Adaptado de Lister y col., 2003).

### ***1.3.5. Interconexión entre organelas***

La identificación de moléculas que medien la comunicación entre organelas es un área de particular interés para los investigadores. Se han encontrado evidencias citológicas que sugieren la interacción física entre mitocondrias y retículo endoplasmático (Staelin, 1997), mitocondrias y cloroplastos (Kohler y col., 1997), y mitocondrias y núcleo (Smart y col., 1994; Southworth y col., 1997), en estadios particulares del desarrollo. Estos contactos podrían estar involucrados 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.

Se ha demostrado que existe una interacción entre cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas durante la fotorrespiración. A pesar de la acentuada interdependencia metabólica entre plástidos y mitocondrias, poco se sabe acerca de las señales que median la comunicación entre estas organelas. La fotosíntesis proporciona los sustratos necesarios para la respiración mitocondrial y, a la vez, depende de algunos compuestos sintetizados por la mitocondria. (Hoefnagel y col., 1998; Raghavendra y Padmasree, 2003). Los genes fotosintéticos codificados en el núcleo son regulados negativamente en respuesta a cambios simultáneos de la traducción en cloroplastos y mitocondrias, sugiriendo un papel sinérgico de las dos organelas en esta regulación (Pesaresi y col., 2006).

El pasaje redox entre organelas puede ocurrir a través del transporte de ácidos orgánicos e interconversiones relacionadas con los mismos, en conjunto con la oxidación y reducción de coenzimas específicas. En este pasaje redox, la mitocondria tiene un papel fundamental pero aún se desconoce el funcionamiento de esta maquinaria de diálogo intracelular (Mackenzie y McIntosh, 1999). Se ha sugerido que las ROS podrían oficiar de moléculas señal entre las organelas y el núcleo (Apel y Hirt, 2004). Un aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la mitocondria, cloroplastos y peroxisomas ha sido asociado con cambios en el transcriptoma nuclear (Pesaresi y col., 2006). Los equivalentes reductores generados por la fotosíntesis tienden a acumularse en el estroma de los cloroplastos causando fotoinhibición debida a la producción de ROS por parte de

la cadena de transporte de electrones fotosintética (Allen, 2002; Foyer y Noctor, 2000). Se ha propuesto que el exceso de equivalentes de reducción puede ser disipado mediante su exportación desde los cloroplastos a la mitocondria vía la lanzadera de malato (Scheibe y col., 2005). En la mitocondria los equivalentes de reducción son utilizados por la cadena de transporte de electrones (Noctor y col., 2007), permitiendo que la fotosíntesis continúe activa. Se han encontrado evidencias de que el ciclo de Krebs, las vías de respiración que involucran al citocromo *c* y a la oxidasa alternativa, y la proteína desacoplante median este diálogo (Nunes-Nesi y col., 2008).

### ***1.3.6. Biogénesis mitocondrial y señalización mitocondria-núcleo***

La biogénesis mitocondrial puede definirse como un aumento del número o masa de mitocondrias. Las señales que estimulan esta biogénesis pueden originarse en el interior de la célula, incluso en la propia organela, o pueden originarse a partir de necesidades metabólicas propias del desarrollo o de cambios en el medio ambiente como por ejemplo variaciones en la disponibilidad de nutrientes (Nunnari y Walter, 1996). Uno de los principales interrogantes en relación a la biogénesis mitocondrial es cómo se logra coordinar la expresión con otras organelas celulares y el núcleo, y cómo es controlado este proceso.

Para explicar la alta regulación que existe en la célula en relación a la expresión génica coordinada, surgieron diferentes hipótesis. Una de ellas se denomina regulación retrógrada de la expresión génica, y se refiere a la regulación de la expresión nuclear por cambios metabólicos o señales originadas en la mitocondria. La incorporación de inhibidores de la cadena de transporte de electrones o la imposición de estrés oxidativo produce la inducción de genes nucleares cuyos productos de expresión se localizan en la mitocondria (Vanlerberghe y McIntosh, 1996). La inducción de dichos genes es bloqueada por proteínas quinasas o inhibidores de fosfatasa, dependiendo de los genes y la señal producida (Djajanegara y col., 2002; Vanlerberghe y McIntosh, 1996; Vanlerberghe y col., 2002). Varias líneas de evidencia postulan que el Complejo I es un

componente potencial de la regulación retrógrada ya que la expresión de muchos componentes de la maquinaria de importación mitocondrial y del ensamblado de los componentes de la cadena respiratoria son inducidos por rotenona (Lister y col., 2004).

Otra hipótesis que intenta explicar la regulación de la biogénesis mitocondrial se basa en la localización dual de proteínas en múltiples organelas. Esta hipótesis constituye un poderoso medio de coordinación ya que actúa como un mecanismo de alimentación por el cual las señales provenientes de una organela pueden inducir la expresión de proteínas en otra organela. La localización dual de proteínas, junto con la señalización retrógrada al núcleo, permite un diálogo fluido entre las organelas. A pesar de que la localización dual ha sido mayormente descripta para mitocondrias y plástidos, existen ejemplos de proteínas localizadas en citosol y mitocondria, mitocondria y retículo endoplasmático, y mitocondria y peroxisomas (Silva-Filho, 2003; Whelan y Schleiff, 2004). Una de las preguntas que se desprenden a partir de estas evidencias es por qué la célula utiliza este mecanismo de translocación simultánea de algunas proteínas hacia múltiples localizaciones si en la mayoría de los casos el mecanismo utilizado es la duplicación de genes originando distintas isoformas que difieren en su presecuencia. Quizás este mecanismo constituye una herramienta más para asegurar una coordinación de la expresión génica (Silva-Filho, 2003).

Otro mecanismo se basa en la coordinación de la síntesis de proteínas en distintas organelas. Esta coordinación constituiría una respuesta común frente a estímulos externos. La regulación de la expresión de genes involucrados en la respiración en respuesta a la luz constituye un ejemplo de este mecanismo (Millar y col., 2008).

Existen evidencias que sustentan cada uno de estos mecanismos y que demuestran que la coordinación de la regulación de la expresión de los genes en la célula vegetal es extremadamente compleja. Esta complejidad se evidencia al estudiar la regulación de la expresión de los complejos respiratorios de la cadena de transporte de electrones. La perturbación del Complejo I por inhibición directa con rotenona o por mutantes *knock-out* produce un incremento de la biogénesis mitocondrial o la

incapacidad de responder al estrés por frío, respectivamente (Lee y col., 2002b; Lister y col., 2004). A su vez, determinadas situaciones que generan disfunción mitocondrial producen un incremento en la expresión de genes nucleares del Complejo I (Gomez-Casati y col., 2002). Los genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales responden también a varias señales metabólicas. Algunos componentes de la cadena respiratoria, como el citocromo *c* y subunidades de la citocromo *c* oxidasa, son inducidos en presencia de sacarosa o luz (Comelli y col., 2009; Curi y col., 2003; Figueroa y col., 2002; Mufarrege y col., 2009; Ohtsu y col., 2001; Welchen y col., 2002; Welchen y col., 2004). Se ha propuesto que elementos denominados site II (5'-TGGGCC/T-3'), presentes en las regiones promotoras de la mayoría de los genes nucleares que codifican proteínas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, podrían participar en la coordinación de la expresión de dichos genes (Welchen y González, 2005; Welchen y González, 2006). El análisis funcional de estos elementos demostró que los mismos son esenciales para la expresión de uno de los genes de oxidasa alternativa (AOXc) (Ho y col., 2007), uno de los genes de citocromo *c* (*Cytc-1*) y genes que codifican subunidades del complejo citocromo *c* oxidasa (Comelli y Gonzalez, 2009; Mufarrege y col., 2009; Welchen y Gonzalez, 2005).

Uno de los complejos de la cadena de transporte de electrones que evidencia la alta complejidad de la biogénesis mitocondrial es el complejo citocromo *c* oxidasa. Este complejo está constituido por subunidades codificadas ya sea en el genoma nuclear o en el genoma mitocondrial y durante su ensamblado convoca además una diversidad de proteínas codificadas en el núcleo. La expresión de cada una de las proteínas involucradas en la biogénesis de este complejo es delicadamente regulada en tiempo y espacio. Además, la citocromo *c* oxidasa es uno de complejos que generan ROS durante la respiración, por lo cual es un blanco de regulación mediada por estas moléculas en condiciones de estrés.

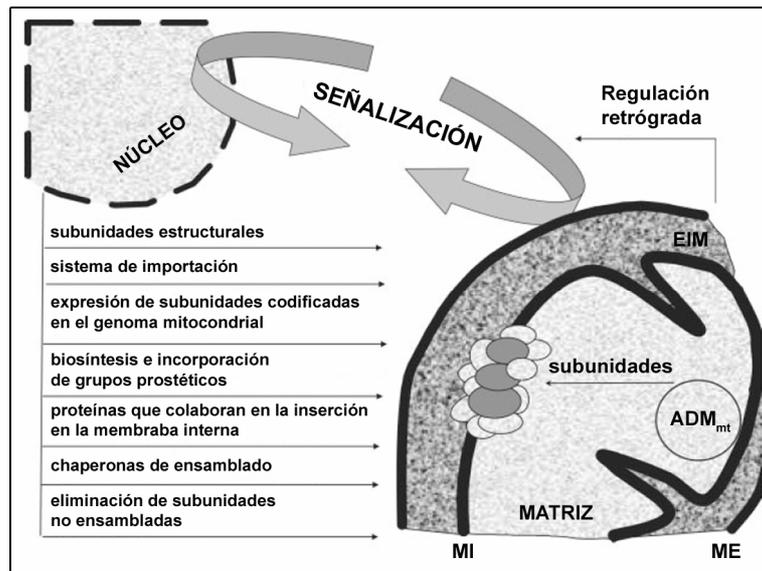
#### 1.4. Biogénesis de la citocromo *c* oxidasa

La citocromo *c* oxidasa (COX) constituye la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones en eucariotas y algunos procariotas. En eucariotas, este complejo está constituido por 11-14 subunidades, dependiendo del organismo. El núcleo enzimático está formado por tres subunidades grandes y altamente hidrofóbicas (Cox1, Cox2 y Cox3) codificadas en el genoma mitocondrial, las cuales son traducidas en los ribosomas de la organela. Estas tres subunidades se encuentran altamente conservadas entre diferentes organismos. En procariotas la organización del complejo es más simple ya que los homólogos de las tres subunidades codificadas en la mitocondria constituyen la enzima funcional. Este núcleo enzimático posee un hemo *a* de bajo spin y un sitio bimetálico compuesto de un hemo *a*<sub>3</sub> de alto spin y un ión de cobre (Cu<sub>B</sub>) en la subunidad Cox1. Este ión de cobre es el responsable de la reducción del oxígeno molecular. En la subunidad Cox2 se encuentra el centro binuclear Cu<sub>A</sub>, el que junto al hemo *a* constituye el sitio de entrada para los electrones que viajan a través de la cadena de transporte de electrones (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Las demás subunidades de COX están codificadas en el genoma nuclear. Estas subunidades son esenciales para el ensamblado y funcionalidad de la enzima y, a diferencia de sus contrapartes codificadas en la mitocondria, presentan un menor nivel de conservación entre los diferentes organismos. Aparentemente, los genes que las codifican se originaron luego de la colonización del huésped endosimbionte ancestral ya que ni *Rickettsia prowazekii* ni eucariotas primitivos como *Reclinomonas americana* o *Giardia sp.* parecen presentar homólogos (Das y col., 2004; Lang y col., 1997).

Además de los centros metálicos ya mencionados, COX contiene iones magnesio, sodio y zinc, aunque aún no se conoce el papel que tienen estos metales sobre la funcionalidad de la enzima. El zinc podría cumplir un papel estructural en la estabilidad del complejo (Coyne y col., 2007) y el magnesio/manganeso, cercano al sitio de formación de agua, podría colaborar en la estabilidad y liberación del agua producida durante la reducción del oxígeno (Schmidt y col., 2003).

La biogénesis de COX es un proceso complejo (Figura 8) por su localización subcelular, el reclutamiento de subunidades codificadas en dos genomas, la naturaleza hidrofóbica de la mayoría de sus componentes y la presencia de grupos prostéticos requeridos para su función (Carr y Winge, 2003).



**Figura 8: Proceso de ensamblado de COX.** Este proceso involucra la coordinación del genoma mitocondrial y el genoma nuclear. Las tres subunidades codificadas en la mitocondria constituyen el corazón catalítico de la enzima. Estas subunidades contienen grupos prostéticos imprescindibles para el funcionamiento de la misma. Las demás subunidades estructurales están codificadas en el genoma nuclear. Además existen más de 20 factores nucleares que participan del proceso de ensamblado del complejo. Este proceso es finamente regulado y dicha regulación se establece de una manera bidireccional. Abreviaturas: ME, membrana externa; MI, membrana interna; EIM, espacio intermembrana; ADN<sub>mt</sub>, ADN mitocondrial. (Extraído de Fontanesi y col., 2006)

### 1.4.1. Organización de COX

El complejo COX se encuentra embebido en la membrana interna mitocondrial, proyectándose tanto hacia la matriz como hacia el espacio intermembrana y actuando como un dímero (Carr y Winge, 2003). COX participa del transporte de electrones catalizando la reducción del oxígeno molecular a agua, con la correspondiente oxidación del citocromo *c*. Este proceso está acoplado a la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial interna, en contra del gradiente de concentración.

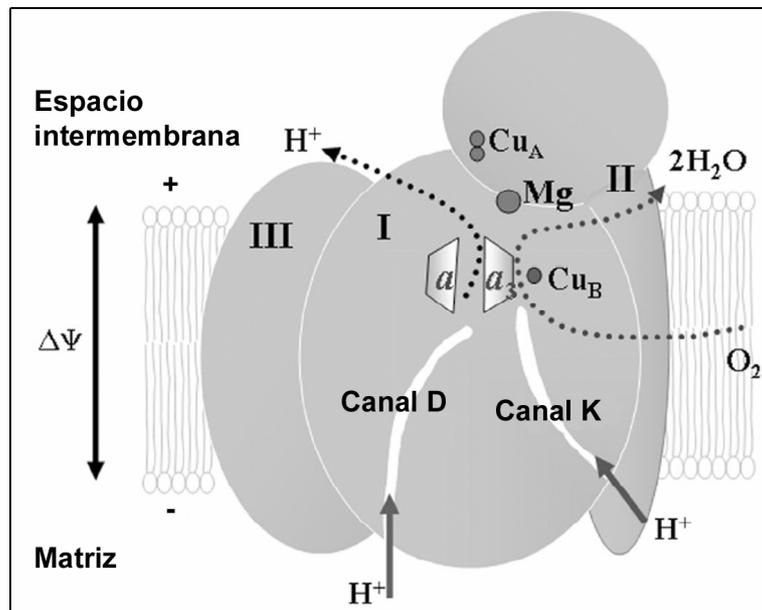
#### **1.4.1.1. Subunidades estructurales codificadas en el genoma mitocondrial**

COX está compuesta por 11 subunidades en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, 13 subunidades en el caso de mamíferos y 12-14 subunidades en el caso de *Arabidopsis thaliana* (Khalimonchuk y Rödel, 2005; Millar y col., 2004). Estas subunidades se encuentran en cantidades equimolares en la enzima ensamblada (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Cox1 es la subunidad más grande e hidrofóbica del corazón enzimático y está compuesta por doce hélices transmembrana conectadas a través de cortos rulos extramembrana (Carr y Winge, 2003). Cox1 participa en la translocación de protones a través de dos canales de tipo D y K (aspartato y lisina). Estos canales están formados por residuos hidrofílicos que parecen estar unidos a una red de moléculas de agua. El canal D guía los protones desde la matriz hacia un residuo glutamato conservado, mientras que el canal K conecta la matriz con el centro Cu<sub>B</sub> (Khalimonchuk y Rodel, 2005) (Figura 9).

La subunidad Cox2 posee un centro binuclear Cu<sub>A</sub> de valencia mixta, el cual está expuesto al espacio intermembrana. Su núcleo hidrofóbico está compuesto sólo por dos dominios transmembrana. Cox2 es el sitio de interacción con el citocromo *c* vía el centro Cu<sub>A</sub> (Poyton y McEwen, 1996).

La subunidad Cox3 es una proteína hidrofóbica que atraviesa siete veces la membrana interna y no posee grupos prostéticos. Aún no se conoce su papel en la función enzimática de COX. Se propone que está involucrada en el ensamblado y/o estabilidad de la enzima (Khalimonchuk y Rodel, 2005). En base a estudios de los homólogos de COX de *Rhodobacter sphaeroides*, se demostró que Cox3 no es requerida para la unión de los centros metálicos (Bratton y col., 2000). RsCox3 parece estar involucrada en mantener un rápido flujo de protones a través del canal D a un pH fisiológico. Otra aparente función de esta subunidad es limitar el número de recambio de la enzima y entonces prevenir la inactivación de COX inducida por dicho recambio (inactivación “suicida”) (Hosler, 2004; Khalimonchuk y Rodel, 2005).



**Figura 9: Núcleo enzimático de COX.** La subunidad I posee un centro binuclear hemo  $a_3$ -Cu<sub>B</sub> y hemo  $a$ . La subunidad II posee un centro Cu<sub>A</sub> que es el aceptor primario de los electrones provenientes del citocromo  $c$ . La subunidad III no posee grupos prostéticos. El magnesio está situado entre Cox1 y Cox2. Los canales D y K son las vías de translocación de protones denominadas de esa manera por la presencia de un aspartato y una lisina conservados. (Extraído de Schmidt y col., 2003).

#### 1.4.1.2. Subunidades estructurales codificadas en el genoma nuclear

El corazón catalítico de COX está rodeado de pequeñas proteínas codificadas en el genoma nuclear, sintetizadas en el citoplasma y luego importadas a la mitocondria. Estas subunidades no son esenciales para la reducción del oxígeno molecular ni para la transferencia de protones. La función específica de estas subunidades aún permanece sin resolver, pero parecen estar involucradas en el ensamblado y la estabilidad de la enzima, así como en su dimerización. Estas subunidades también participan en la protección del corazón catalítico de la enzima frente a ROS y modulan su actividad (Fontanesi y col., 2006). En la Tabla 1 se detallan las diferentes subunidades estructurales de COX en levaduras, mamíferos y plantas.

Las subunidades codificadas en el núcleo de levaduras son Cox4p, las isoformas de Cox5p (Cox5ap/Cox5bp), Cox6p, Cox7p, Cox7ap y Cox8p (Khalimonchuk y Rödel, 2005). También puede purificarse una enzima más compleja de 11 subunidades, la cual contiene dos proteínas adicionales, Cox6ap y Cox6bp (Geier y col., 1995). Estas últimas subunidades no parecen cumplir un papel importante en la actividad catalítica de la enzima ya que las preparaciones de nueve subunidades son igualmente activas (Burke y Poyton, 1998). Se cree que Cox6ap posee un sitio de unión a ATP, lo cual podría ser relevante para la modulación de la actividad enzimática por ATP en respuesta a una alta fuerza iónica externa. Sin embargo, la delección de *cox13*, el gen que codifica Cox6ap, genera deficiencia respiratoria en las levaduras. Es decir que *in vivo* la modulación de la actividad enzimática de COX es esencial o bien Cox6ap posee una función adicional (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

La mayoría de las subunidades codificadas en el genoma nuclear de levaduras presentan un dominio transmembrana y se encuentran firmemente unidas al corazón de la enzima, aunque existen subunidades que no atraviesan la membrana interna (Cox4p y Cox6p) (Carr y Winge, 2003, Khalimonchuk y Rödel, 2005). En mutantes de levaduras en *cox4* se observa una inestabilidad de Cox2p y Cox3p. Un fenotipo similar se evidencia en mutantes de levaduras en *cox6*, *cox7* y *cox9*. En el caso de las mutantes en *cox7* el efecto parece ser más severo ya que resulta en una reducción pronunciada de los niveles de Cox1p (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Es decir que estas subunidades parecen participar de las etapas tempranas del ensamblado de COX. En contraste, las levaduras mutantes en *cox8* presentan un efecto moderado sobre la función de COX. Cox8p aparentemente participa en la formación del dímero activo (Poyton y McEwen, 1996). La isoforma Cox5ap se expresa durante el crecimiento en condiciones de aerobiosis, mientras que Cox5bp aparece en presencia de niveles de oxígeno reducidos. La diferencia radica en las propiedades cinéticas de COX con cada una de las dos isoformas de Cox5p. El dominio transmembrana de Cox5p interactúa con Cox1p y, dependiendo de la isoforma, es capaz de modificar el entorno de la proteína alrededor del centro binuclear de manera de alterar el número de recambio de la misma. Cox5bp

produce un número de recambio más alto y el acceso de los electrones desde el hemo *a* al hemo *a*<sub>3</sub> es tres o cuatro veces más rápido en presencia de esta isoforma. Cuando los niveles de oxígeno se ven reducidos, la síntesis de Cox5bp confiere una ventaja a la célula ya que COX es catalíticamente más eficiente en función de la producción de la energía mitocondrial (Fontanesi y col., 2006). La subunidad Cox5ap posee un dominio de unión a ATP en la región de la proteína que se encuentra en la matriz. Cuando la proporción ATP/ADP intramitocondrial es alta, la unión de ATP causa una disminución en la eficiencia de la actividad de COX. Además, el dominio C-terminal de Cox5p, conservado en ambas isoformas, interactúa con Cox2p oficiando de regulador de la funcionalidad de la enzima, debido a que previene un flujo reverso de agua o protones desde la interfase entre Cox1p y Cox2p (Fontanesi y col., 2006).

Respecto de la oxidasa de mamíferos, la composición es similar a la enzima de levaduras excepto por la presencia de dos subunidades adicionales, Cox7b y Cox8 (no homóloga a Cox8p de levaduras) (Capaldi, 1990). Algunas subunidades como Cox4, Cox6a, Cox7a y Cox8 están representadas por diferentes isoformas específicas de tejido (Poyton y McEwen, 1996). Cox4 presenta un dominio en la matriz que puede intercambiar ADP por ATP y permite una inhibición alostérica de la enzima bovina a una alta tasa de ATP/ADP intramitocondrial (Kadenbach y col., 2000). Las subunidades Cox5a, Cox5b y Cox6b son proteínas hidrofílicas que no atraviesan la membrana interna, mientras que el resto de las subunidades codificadas en el genoma nuclear son hidrofóbicas y atraviesan la membrana una vez. Cox5a no interacciona con ninguna subunidad del núcleo enzimático pero se encuentra relacionada al dominio de Cox4 presente en la matriz y a un segmento de Cox6c (Tsukihara y col., 1996). Las deleciones de las subunidades codificadas en el núcleo de levaduras homólogas a las subunidades de mamíferos Cox4, Cox5a, Cox5b, Cox6c o Cox7a producen una deficiencia respiratoria, producida por deficiencia de COX y la pérdida de hemo *a* y hemo *a*<sub>3</sub> (Taanman y Williams 2001). Se ha sugerido que una de las isoformas de Cox4 corresponde a una forma hipóxica (correspondiente a Cox5p de levaduras) en mamíferos (Burke y Poyton, 1998).

En plantas, se han identificado las subunidades COX5b, COX5c, COX6a y COX6b (Curi y col., 2003; Kadowaki y col., 1996; Nakagawa y col., 1990; Ohtsu y col., 2001). Las subunidades COX5b, COX6a y COX6b se identificaron en función de la comparación de sus secuencias con las de sus contrapartes de levaduras y mamíferos (Curi y col., 2003; Kadowaki y col., 1996; Ohtsu y col., 2001). COX5c ha sido reconocida en estudios de purificación de proteínas (Nakagawa y col., 1990). Existen dos formas diferentes de COX6b, las cuales son similares a Cox6b de mamíferos y levaduras, aunque una de las isoformas posee una región N-terminal extra (Ohtsu y col., 1999; Ohtsu y col., 2001). Se ha observado un aumento en los niveles de expresión de los transcritos de COX5b, COX6a y COX6b frente a la incubación de las plantas en soluciones que contienen azúcares metabolizables y compuestos nitrogenados (Curi y col., 2003; Welchen y col., 2002). Los genes que codifican COX6b se expresan principalmente en anteras y regiones meristemáticas y su expresión es inducida por la etiolación de las plantas, además de la presencia de sacarosa (Mufarrege y col., 2009). Los genes *COX5b* se expresan en tejido meristémico y vascular, además de polen y anteras (Comelli y col., 2009; Comelli y Gonzalez, 2009; Welchen y col., 2004). Los genes *COX5c* de *Arabidopsis* se expresan especialmente en tejido vascular y meristémico, así como en vainas y granos de polen. Los niveles de expresión de *COX5c* son relativamente altos en función de la presencia de un intrón en la región 5' no codificante (Curi y col., 2005). En plantas, en particular en *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado respuestas similares de los genes *COX5b*, *COX6a* y *COX6b*, mientras que *COX5c* parece mostrar un comportamiento diferencial (Curi y col., 2005).

Recientemente, utilizando estudios de electroforesis en geles 2D combinados con espectrometría de masa, se encontraron subunidades adicionales de COX, específicas de plantas (Millar y col., 2004). Poco es lo conocido sobre el papel de estas subunidades.

SUBUNIDADES ESTRUCTURALES DE COX EN DIFERENTES ORGANISMOS					
MAMÍFEROS		LEVADURAS		PLANTAS	
PROTEÍNA	GEN	PROTEÍNA	GEN	PROTEÍNA	GEN
Cox1	<i>cox1</i>	Cox1p	<i>cox1</i>	COX1	AtMg01360
Cox2	<i>cox2</i>	Cox2p	<i>cox2</i>	COX2	AtMg00160
Cox3	<i>cox3</i>	Cox3p	<i>cox3</i>	COX3	AtMg00730
Cox4	<i>cox4</i>	Cox5p (a/b)	<i>cox5a/b</i>	-	-
Cox5a	<i>cox5a</i>	Cox6p	<i>cox6</i>	-	-
Cox5b	<i>cox5b</i>	Cox4p	<i>cox4</i>	COX5b	At3g15640 (1) At1g80230 (2)
Cox6a	<i>cox6a</i>	Cox6ap	<i>cox13</i>	COX6a	At4g37830
Cox6b	<i>cox6b</i>	Cox6bp	<i>cox12</i>	COX6b	At5g57815 (2) At4g28060 (3) At1g22450 (1) At1g32710 (4)
Cox6c	<i>cox6c</i>	Cox7ap	<i>cox9</i>	COX6c	At3g22210
Cox7a	<i>cox7a</i>	Cox7p	<i>cox7</i>	-	-
Cox7b	<i>cox7b</i>	-	-	-	-
Cox7c	<i>cox7c</i>	Cox8p	<i>cox8</i>	-	-
Cox8	<i>cox8</i>	-	-	COX5c	At2g47380 (1) At3g62400 (2) At5g61310 (3)
				COXX1	At5g27760 At3g05550
				COXX2	At4g00860 At1g01170
				COXX3	At1g72020
				COXX4	At4g21105
				COXX5	At3g43410
				COXX6	At2g16460

**Tabla 1:** Subunidades estructurales conocidas de la citocromo *c* oxidasa de mamíferos, levaduras y plantas.

Las subunidades marcadas en color celeste constituyen el núcleo enzimático de COX y están codificadas en el genoma mitocondrial. Las subunidades marcadas en amarillo y verde son las subunidades codificadas en el genoma nuclear. Específicamente, las subunidades marcadas en verde corresponden a proteínas que formarían parte del complejo enzimático identificadas recientemente en *Arabidopsis thaliana*. En rojo están escritas las subunidades codificadas en el núcleo que parecen ser esenciales para el ensamblado y estabilidad de la enzima. En naranja está escrita una subunidad que en estudios *in vitro* puede formar parte o no de COX, pero su delección produce deficiencia respiratoria en las levaduras mutantes (Barrientos y col., 2009; Khalimonchuk y Rödel, 2005). Los genes de plantas que se indican son los correspondientes a *Arabidopsis thaliana*.

### **1.4.1.3. Centros catalíticos de COX**

El centro Cu<sub>A</sub> está localizado en la subunidad Cox2, en el dominio que se proyecta hacia el espacio intermembrana, y constituye el receptor de los electrones que provienen del citocromo *c*. Este centro catalítico debe bombear los electrones a otro centro redox, localizado en Cox1 (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Análisis por espectroscopia EPR revelaron que Cu<sub>A</sub> existe como un complejo de valencia mixta [Cu<sup>2+</sup>/Cu<sup>1+</sup>]. El electrón desapareado se encuentra completamente deslocalizado entre ambos núcleos de cobre, resultando en un centro Cu<sup>1.5+</sup>-Cu<sup>1.5+</sup> (Malmström y Aasa, 1993). Larsson y col. (2005) propusieron que el centro Cu<sub>A</sub> es binuclear para facilitar la transferencia de los electrones desde el citocromo *c*. Se ha demostrado que uno de los residuos de ácido glutámico importante en proporcionar la conformación del centro Cu<sub>A</sub> está involucrado también en la coordinación del ión Mg<sup>2+</sup> (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

El centro Cu<sub>B</sub> es un complejo bimetálico formado por hemo *a*<sub>3</sub> y cobre. Este centro representa el sitio de unión del oxígeno molecular (Tsukihara y col., 1995) y tanto éste como el hemo *a* se encuentran en el interior de Cox1 (Stiburek y col., 2006). Un residuo de tirosina podría estar involucrado en la formación de agua en el canal protónico K, ya que éste suministra protones al centro Cu<sub>B</sub>. El sitio hemo-Cu también puede unir otras moléculas además de oxígeno molecular y agua, como iones cloruro por ejemplo, que podrían modificar la actividad de COX (Fabian y col., 2004a; Fabian y col., 2004b). La asociación de las subunidades Cox1 y Cox2 es necesaria para la coordinación del hemo *a*<sub>3</sub> en la enzima de mamíferos (Rahman y col., 1999).

El hemo *a* (de bajo spin) es un grupo prostético típico de eucariotas y algunas enzimas procariotas. En general, la mayoría de las oxidasas bacterianas son del tipo *ba*<sub>3</sub> y poseen hemo *b*, el cual es un precursor del hemo *a*. La transformación de hemo *b* a hemo *a* procede vía la formación de un hemo *o*. El hemo *a* funciona como un punto de transición en la transferencia del electrón desde el centro Cu<sub>A</sub> al centro hemo *a*<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub> (Tsukihara y col., 1995). Hasta allí, el ciclo catalítico se denomina fase reductiva ya que

se reduce el centro hemo  $a_3$ -Cu<sub>B</sub>, lo cual es un pre-requisito para la unión del oxígeno molecular a este sitio para la subsecuente formación de agua (fase oxidativa) (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Recientemente se ha dilucidado el mecanismo que acopla la transferencia de electrones con la translocación de protones a través de la membrana interna. La transferencia de electrones desde el hemo  $a$  al sitio catalítico se encuentra vectorialmente ligada a la transferencia interna de protones, iniciando el mecanismo de la bomba de protones de la enzima (Belevich y col., 2006).

#### **1.4.1.4. Otros componentes**

Además de los elementos ya mencionados, COX posee otros elementos que influyen la actividad catalítica de la enzima, aunque su acción no es tan evidente. El ión Mg<sup>2+</sup> reside en la interfase de Cox1 y Cox2, del lado del espacio intermembrana, en la proximidad de un grupo propionato del hemo  $a_3$ . El Mg<sup>2+</sup> está coordinado por residuos de histidina y ácido glutámico conservados de Cox1, un ácido glutámico más lejano de Cox2 y una molécula de agua (Tsukihara y col., 1995). Como se mencionó anteriormente, el ácido glutámico de Cox1 también participa en la coordinación del centro Cu<sub>A</sub>. Si se sustituye el Mg<sup>2+</sup> por Mn<sup>2+</sup> no se produce ningún cambio en la actividad catalítica de COX. Sobre la base de estudios de EPR, se sugirió que el Mg<sup>2+</sup> representa uno de los posibles sitios de unión para un ión cloruro, por desplazamiento de una molécula de agua y estabilización por un propionato del hemo  $a$  (Fabian y col., 2004a). Un segundo posible sitio de unión para el ión cloruro es el centro Cu<sub>B</sub> de COX oxidada, en el cual el cloruro puede unirse en forma de HCl. Sin embargo, el papel del ión cloruro sobre la actividad catalítica de la enzima aún permanece sin resolver (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Cox1 también coordina un ión Na<sup>+</sup>, el cual se encuentra unido en la periferia de la proteína (Tsukihara y col., 1995). Aún no se conoce el papel de este ión sobre la funcionalidad de COX. El Na<sup>+</sup> puede ser fácilmente reemplazado por Ca<sup>2+</sup> (Kirichenko

y col., 1998), lo cual causa una distorsión del espectro del hemo *a* (Lee y col., 2002a). Podría especularse que estos metales cumplen una función moderadora pero aún no existen datos que confirmen esta hipótesis (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

En mamíferos, análisis estructurales determinaron la presencia de un ión  $Zn^{2+}$  coordinado por Cox5b (correspondiente a Cox4p de levaduras y COX5b de plantas), en la cara de la proteína correspondiente a la matriz. El rol del zinc en la actividad de COX permanece sin resolver (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

#### **1.4.2. Ensamblado de COX**

El ensamblado de COX es un proceso secuencial que involucra un gran número de proteínas accesorias (Nijtmans y col., 1998) (Tabla 2). Previamente al ensamblado de las subunidades traducidas en la mitocondria, éstas requieren ser procesadas e insertadas dentro de la membrana interna mitocondrial. Las subunidades codificadas en el genoma nuclear deben ser translocadas al sitio de ensamblado en la membrana interna. Únicamente luego de la sucesión de estos procesos puede ocurrir el correcto ensamblado de una COX funcional (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Estas proteínas accesorias han sido estudiadas en mayor detalle en levaduras debido a la menor complejidad de este organismo unicelular (Tabla 2). Sin embargo, en los últimos años se ha profundizado el estudio de estas proteínas en humanos. En plantas, la identidad de las mismas aún permanece sin dilucidar en la mayoría de los casos.

##### **1.4.2.1. Ensamblado de las subunidades codificadas en la mitocondria**

Las tres subunidades codificadas en el genoma mitocondrial son sintetizadas en los ribosomas mitocondriales asociados a la membrana interna (Szyrach y col., 2003). Esta característica es muy importante debido a que las mencionadas subunidades son altamente hidrofóbicas. Los mensajeros correspondientes a estas subunidades son

reclutados en la membrana interna por una serie de activadores traduccionales específicos unidos a dicha membrana, los cuales en levaduras interactúan con la región 5' no codificante del transcripto (UTR, del inglés *untranslated region*). La traducción del mensajero de Cox1p es activada por Mss51p y Pet309p (Perez-Martinez y col., 2003; Manthey y McEwen, 1995), la del mensajero de Cox2p por Pet111p (Mulero y Fox, 1993), y la del mensajero de Cox3p por Pet54p, Pet122p y Pet494p (Brown y col., 1994; Costanzo y Fox, 1988). En el caso de Pet111p, sólo se han identificado homólogos en el reino Fungi (Carr y Winge, 2003).

La traducción de las subunidades de COX sintetizadas en la mitocondria requiere la participación de Oxa1p, la cual interactúa durante la traducción del péptido nascente. Únicamente la traducción de Cox2p depende estrictamente de Oxa1p. En cambio, las otras subunidades mitocondriales pueden insertarse en la membrana interna en ausencia de Oxa1p, aunque de una manera mucho menos eficiente (Hell y col., 2001).

Cox2p es una proteína integral de membrana, la cual atraviesa la membrana interna dos veces, dejando expuestos al espacio intermembrana los extremos N- y C-terminales. Esta proteína es sintetizada como un precursor con el dominio N-terminal extendido, el cual representa una presecuencia de clivaje. La inserción del precursor de Cox2p en la membrana interna depende de la presencia del potencial de membrana mitocondrial (Stuart, 2002). Los extremos N- y C-terminales de Cox2p son translocados con la colaboración de Oxa1p, pero la translocación del extremo C-terminal depende además de Cox18p, Pnt1p y Mss2p. Cox18p (Oxa2p) es un homólogo distante de Oxa1p que actúa post-traduccionalmente y no en forma co-traduccional como lo hace Oxa1p. Cox18p se asocia con Pnt1p y Mss2p, posiblemente para cooperar en la translocación del precursor de Cox2p (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Aparentemente, Mba1p podría estar involucrada en la translocación de las subunidades de COX codificadas en la mitocondria. Esta proteína representaría una vía independiente de Oxa1p para la inserción de proteínas en la membrana interna (Preuss y col., 2001).

Cuando el extremo N-terminal del precursor de Cox2p emerge hacia el espacio intermembrana, ocurre el clivaje de la presecuencia de esta proteína. Imp1p/Imp2p son las proteasas localizadas en la cara externa de la membrana interna responsables de este proceso. Luego de la translocación de Cox2p, esta proteína se asocia a Cox20p, la cual es una chaperona unida a la membrana requerida para el procesamiento de Cox2p (Hell y col., 2000; Khalimonchuk y Rödel, 2005). Por el contrario, en mamíferos no existe una forma precursora de Cox2p, posibilitando la presencia de una vía alternativa para su inserción. Los homólogos de Oxa1p y Cox18p están conservados en eucariotas (Carr y Winge, 2003). También se han identificado los homólogos de Imp1p/Imp2p en mamíferos (Gakh y col., 2002).

La inserción de Cox1p (Figura 10) parece depender de la función de Mss51p, la cual ha sido inicialmente descrita como iniciadora de la traducción. Esta proteína interactúa con el polipéptido naciente y facilita la inserción de Cox1p. Aparentemente Cox1p y Mss51p interactúan con Cox14p, la cual es requerida para la estabilidad de Cox1p (Glerum y col., 1995). Este complejo formado entre Cox1p, Mss51p y Cox14p es importante para el ensamblado de Cox1p. Además se propuso que Shy1p, la cual es necesaria para el ensamblado de COX, podría cooperar con este complejo durante la inserción de Cox1p. Se han encontrado homólogos de Cox14p y Mss51p sólo en el reino Fungi, mientras que Shy1p muestra un alto grado de conservación en eucariotas (Barrientos y col., 2004). Shy1p aparentemente cataliza la liberación de Mss51p del complejo mencionado y su disponibilidad para el ensamblado de otras subunidades Cox1p (Mick y col., 2007).

Recientemente, se ha descrito otro factor, Coa1p, que participa en la síntesis de Cox1p. Coa1p está asociado a la membrana interna y forma parte del complejo Cox1p/Mss51p/Cox14p. Shy1p no forma parte del complejo pero co-precipita con Coa1p (Mick y col., 2007). Pierrel y col. (2007) propusieron que Coa1p estabiliza el complejo Cox1p/Mss51p/Cox14p hasta que Shy1p interactúa con Coa1p en un paso que involucra la inserción del hemo dentro de la subunidad Cox1p, debido a que la sobreexpresión de Cox10p (ver más abajo) suprime la mutación en Coa1p. Además se

ha identificado otra proteína relacionada con la maduración de Cox1p, Coa2p, la cual se encuentra localizada en la matriz y actúa en la estabilización del intermediario de Cox1p

Proteínas involucradas en la biogénesis de COX en levaduras	
Proteína	Descripción
Pet309p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox1</i>
Pet111p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox2</i>
Pet54p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox3</i>
Pet122p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox3</i>
Pet494p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox3</i>
Mss51p	Involucrado en la traducción e inserción de Cox1p
Cox14p	Requerido para la expresión y ensamblado de Cox1p
Coa1p	Requerido para el ensamblado de Cox1p
Coa2p	Requerido para el ensamblado de Cox1p
Pet117p	Requerido para el ensamblado de COX. No se conoce el papel preciso
Pet191p	Requerido para el ensamblado de COX. No se conoce el papel preciso
Oxa1p	Translocasa de la membrana interna que media la inserción de las subunidades de COX codificadas en la mitocondria
Mba1p	Involucrada en la translocación de las subunidades de COX codificadas en la mitocondria
Cox18p	Requerida para la translocación del dominio C-terminal del precursor de Cox2p
Pnt1p	Requerida para la translocación del precursor de Cox2p
Mss2p	Requerida para la translocación del precursor de Cox2p
Cox10p	Farnesiltransferasa. Cataliza el primer paso de la biosíntesis del hemo <i>a</i>
Cox15p	Hemo <i>a</i> sintasa. Cataliza el segundo paso de la biosíntesis del hemo <i>a</i>
Yah1p	Ferredoxina. Requerida para la biosíntesis del hemo <i>a</i>
Arh1p	Ferredoxina reductasa. Requerida para la biosíntesis del hemo <i>a</i>
Shy1p	Facilita la inserción del hemo <i>a</i> dentro de Cox1p
Cox17p	Metalochaperona. Involucrada en la transferencia de cobre a COX
Cox19p	Metalochaperona. Requerida para el ensamblado de COX
Cox23p	Requerida para el ensamblado de COX. Podría estar involucrada en el metabolismo del cobre mitocondrial
Sco1p	Metalochaperona. Provee el cobre a Cox2p
Sco2p	Similar a Sco1p. Puede tener una función redundante
Cox11p	Metalochaperona. Provee cobre a Cox1p
Mia40p	Proteína esencial de unión a metales en el espacio intermembrana (EIM). Involucrada en el transporte y ensamblado de proteínas del EIM
Cmc1p	Proteína relacionada con la expresión de COX y Sod1p mitocondrial

**Tabla 2: Proteínas involucradas en la biogénesis de COX en levaduras.** Las levaduras son los organismos precursores en el estudio de estas proteínas por la mayor facilidad de estudio respecto de los eucariotas superiores. De todos modos, en mamíferos y plantas también se está evaluando la presencia de homólogos y su funcionalidad. En plantas este estudio se encuentra en una etapa primaria.

que contiene Cox5ap y Cox6p, en el paso dependiente de Shy1p (Pierrel y col., 2008). Shy1p y Cox14p se han encontrado en formas parcial o totalmente ensambladas de COX asociadas con la citocromo *c* reductasa, lo cual sugiere que estos factores podrían actuar como chaperonas aún después de las etapas tempranas del ensamblado de COX (Barrientos y col., 2009).

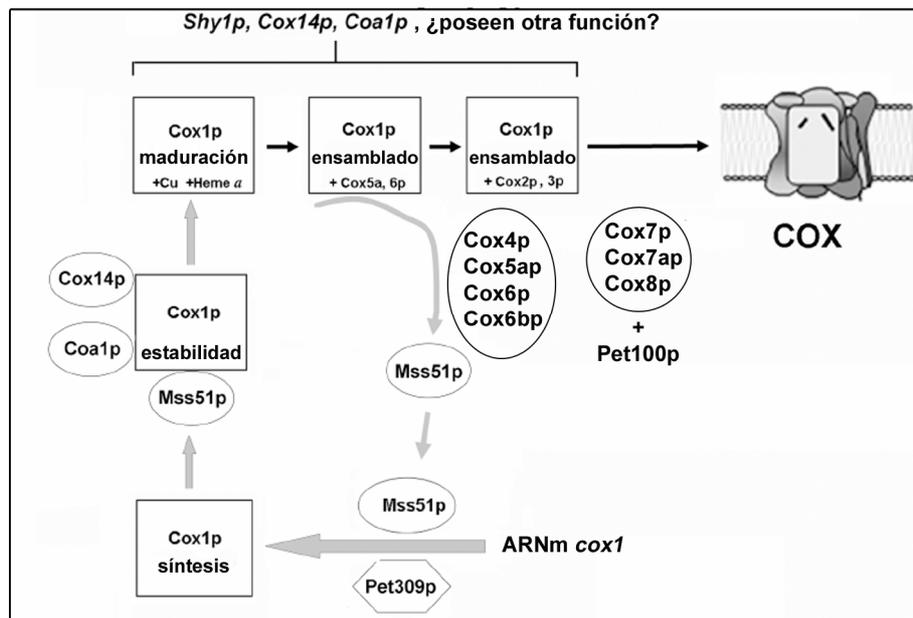
En mutantes de levaduras en *cox2* se detectaron intermediarios del ensamblado de COX formados por Cox1p/Cox3p/Cox5ap/Cox6p y no por Cox4p, Cox6p, Cox7p, Cox7ap, ni Cox8p. Esta evidencia sugiere que Cox2p no es necesaria para la incorporación de Cox3p en el intermediario para el ensamblado de COX en este organismo (Fontanesi y col., 2008).

Nijtmans y col. (1998) determinaron que el ensamblado de COX de mamíferos comienza con la asociación de Cox1 con la subunidad codificada en el núcleo Cox4, lo cual coincide con la estructura de COX debido a que estas proteínas están en estrecho contacto. Esta asociación podría aumentar la estabilidad de Cox1 y luego entonces ocurriría la asociación de Cox2 y Cox3.

En humanos, el homólogo de Shy1p se denomina SURF1 y es responsable del Síndrome de Leigh asociado con la deficiencia de COX y un desorden neurológico severo en la infancia (Zhu y col., 1998). El análisis por electroforesis en geles nativos demostró que en fibroblastos deficientes en SURF1 el ensamblado de COX es bloqueado en un paso temprano, antes de la incorporación de la subunidad Cox2, en el intermediario naciente compuesto de Cox1 o Cox1/Cox4/Cox5a (Barrientos y col., 2009). En el ensamblado de COX, aparentemente Cox1 forma un intermediario con Cox4 y Cox5a. Antes de la formación de dicho intermediario podría insertarse el hemo *a*, estabilizando la unión entre los miembros del intermediario, ya que en mutantes en Cox10 y Cox15 no se produce la acumulación del mismo. Cox4 y Cox5a podrían formar un dímero antes de su incorporación a Cox1 (Stiburek y col., 2005), lo cual también se evidencia en los homólogos de levaduras Cox5p y Cox6p, que se encontraron como dímeros cuando el ensamblado de COX es deficiente en etapas tempranas del proceso. Luego de la formación del complejo Cox1/Cox4/Cox5a se

produce la adición del resto de las subunidades estructurales, excepto Cox6a, Cox7a y Cox7b. Aparentemente antes de la incorporación de estas subunidades estructurales se incorpora Cox2 al complejo. Cox2 puede ser incorporada una vez que posee el cobre debido a la actividad de las chaperonas de cobre Sco1 y Sco2. SURF1 posee ortólogos en algunos procariontes, pero no existen en ellos subunidades homólogas a Cox4 y Cox5a de mamíferos (Barrientos y col., 2009).

La existencia de subcomplejos de ensamblado que contienen subunidades codificadas en el núcleo puede explicar la estabilidad de las mismas en comparación con las subunidades codificadas en la mitocondria, las cuales son rápidamente degradadas cuando el ensamblado de COX se encuentra comprometido. Esta idea es coherente con la existencia de un *pool* no ensamblado de subunidades codificadas en el núcleo en la membrana interna listas para incorporarse al proceso de ensamblado a medida que son requeridas (Fontanesi y col., 2008).



**Figura 10: Primeros pasos en la biogénesis de COX en *Saccharomyces cerevisiae*.** El primer paso implica la síntesis, maduración y ensamblado de Cox1p a través de un proceso regulado por Mss51p y otras proteínas requeridas para el ensamblado de dicha subunidad. (Adaptado de Fontanesi y col., 2008)

#### **1.4.2.2. Ensamblado de las subunidades codificadas en el núcleo**

Las subunidades codificadas en el núcleo son importadas a la mitocondria de la misma manera que otras proteínas de origen nuclear. Atraviesan la membrana externa a través del complejo TOM y una vez en el espacio intermembrana interactúan con TIM17:23, que depende del potencial de membrana. Las proteínas que son incorporadas por este complejo son insertadas en la membrana interna y su presecuencia es removida por las proteasas Imp1p/Imp2p (Gakh y col., 2002). De esta manera, las proteínas importadas a la mitocondria obtienen la conformación necesaria para su ensamblado y función. Además se requiere la asistencia de chaperonas moleculares (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Durante la inserción de las proteínas maduras, éstas pueden arrestarse en el complejo TIM17:23 y moverse lateralmente a través de la membrana hacia el sitio de ensamblado de COX. Este mecanismo se denomina “transferencia detenida”. Algunas proteínas que poseen presecuencias son incorporadas por el mecanismo conservativo, el cual permite la inserción de la proteína desde la matriz. Esta vía involucra un paso de exportación adicional que algunas veces depende del clivaje por parte de MPP (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

La importación de la subunidad Cox5ap se ha caracterizado en detalle. Esta proteína posee el extremo N-terminal hacia la matriz y el C-terminal hacia el espacio intermembrana. Se encuentra anclada a la membrana interna por una hélice transmembrana. Su importación transcurre por el mecanismo de transferencia detenida y el proceso depende de la actividad ATP-hidrolasa de Hsp70p en la matriz (Stuart y Neupert, 1996). La importación de Cox4p ocurre de una manera similar (Hurt y col., 1987).

Algunas subunidades de levaduras pueden ensamblarse independientemente del núcleo catalítico de COX. Cox4p, Cox5ap, Cox6p y Cox6bp pueden formar un complejo independiente (Carr y Winge, 2003). Otro subcomplejo que contiene Cox7p, Cox7ap y Cox8p puede formarse y podría incorporarse a la enzima a través de Pet100p,

una chaperona anclada a la membrana indispensable para el ensamblado de COX (Church y col., 2005).

Existen otras chaperonas con funciones menos evidentes que se han descrito como facilitadoras del ensamblado de COX. Algunas de ellas son Pet117p, Pet191p y Cox16p (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

#### **1.4.2.3. Formación y ensamblado del hemo *a***

El hemo *a* es generado a partir de la conversión del hemo *b*. Cox10p cataliza el primer paso en dicha conversión. Esta proteína es una farnesiltransferasa unida a la membrana interna que muestra un alto grado de conservación entre eucariotas y algunas bacterias (Glerum y Tzagoloff, 1994). Esta proteína produce la farnesilación del grupo vinilo del C2 del anillo de porfirina. El producto de esta farnesilación es el hemo *o*, el cual constituye un intermediario en la biosíntesis de hemo *a*, pero es el cofactor final en algunas oxidasas bacterianas. Luego, el grupo metilo del C8 del hemo *o* es oxidado a aldehído produciendo hemo *a*. Esta oxidación involucra dos pasos de mono-oxigenación catalizados por Cox15p (sintasa de hemo *a* anclada a la membrana), Yah1p (ferredoxina mitocondrial) y Arh1p (ferredoxina reductasa) (Barros y col., 2001; Barros y col., 2002). Yah1p y Arh1p están involucradas aparentemente en suministrar los electrones necesarios a Cox15p. Estas dos proteínas están también involucradas en el ensamblado de grupos hierro-azufre (Alves y col., 2004).

Se han encontrado homólogos de Cox15p en miembros del reino Fungi y mamíferos (Khalimonchuk y Rödel, 2005). En plantas se han encontrado proteínas similares en base a homología de secuencia.

No se sabe demasiado acerca de la inserción del hemo *a* en Cox1p. Por lo expuesto anteriormente, se considera que esta inserción se produce en etapas tempranas del ensamblado, probablemente antes de la asociación con Cox2p y Cox3p. Aunque no se han identificado proteínas específicas para la inserción del hemo *a*, Shy1p parece ser importante en este proceso. De manera interesante, el hemo *a* puede insertarse por sí

mismo en una proteína sintetizada *de novo* que simula a Cox1p (Gibney y col., 2000). Smith y col. (2005) propusieron que la formación de un centro bimetálico puede ser uno de los pasos limitantes en la asociación de Cox1p con Cox2p.

#### **1.4.2.4. Formación de los centros metálicos**

Se han identificado varias proteínas relacionadas con la liberación e inserción de metales para el ensamblado de COX. La ausencia de la mayoría de estas proteínas produce deficiencia respiratoria y, frecuentemente, la falta de ensamblado de las subunidades de COX. Evidentemente, la incorporación de los metales durante el ensamblado de COX es un paso importante para la conformación de la enzima y su funcionalidad (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Las proteínas de unión a cobre involucradas en el ensamblado de COX están siendo estudiadas en levaduras y humanos, pero se han encontrado homólogos también en plantas. En las células, las cantidades de cobre libre son extremadamente bajas (Rae y col., 1999). El cobre presente en las células se encuentra principalmente como  $\text{Cu}^+$ , unido a proteínas o a péptidos solubles en agua, de bajo peso molecular (Harris, 2000). En el último tiempo se han identificado varias proteínas que median el metabolismo del cobre mitocondrial y muchas de ellas están involucradas en el ensamblado de COX.

Tal como se expuso anteriormente, las proteínas pequeñas del espacio intermembrana que presentan dos motivos  $\text{CX}_9\text{C}$  o dos motivos  $\text{CX}_3\text{C}$  son importadas a través de Mia40 en levaduras. Estos motivos pueden unir cobre y por ello algunas de las proteínas relacionadas con el tráfico de cobre en la mitocondria pueden ser incorporadas por esta vía. Cox17p, Cox19p, Cox23p y Pet191p utilizan la vía de Mia40 (Arnesano y col. 2005b; Khalimonchuk y col., 2008).

#### *1.4.2.4.1. Cox17*

Cox17p fue identificada inicialmente en levaduras como una proteína cuya falta produce deficiencia respiratoria (Glerum y col., 1996a). Las mutantes en *cox17* no poseen hemo *a* y presentan niveles disminuidos de Cox2p (Glerum y col., 1996a; Punter y Glerum, 2003). El fenotipo de deficiencia respiratoria de estas mutantes es parcialmente rescatado por el agregado de cobre al medio de cultivo (Glerum y col., 1996a).

Cox17p es una proteína pequeña, hidrofílica, capaz de unir cobre, que presenta una localización dual en el citoplasma y en el espacio intermembrana (Beers y col., 1997). Se han encontrado homólogos a Cox17p en eucariotas pero no en procariotas (Arnesano y col., 2005b). Sin embargo, se ha encontrado una proteína de unión a cobre en algunas bacterias y se ha sugerido que la misma podría ser un homólogo funcional de Cox17p (Banci y col., 2005). En función de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida y espectroscopía se determinó que el motivo CCXC que presenta Cox17p es el responsable de la unión del ión  $\text{Cu}^+$ . Este ión se encuentra unido, en forma lábil, a través de grupos tioles (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

Se han reportado diferentes estequiometrías de unión a cobre para Cox17. La proteína de levadura recombinante puede unir dos (Beers y col., 1997) o tres (Heaton y col., 2000) iones cobre. La proteína nativa purificada de mamíferos coordina cuatro iones cobre (Palumaa y col., 2004). La estructura de la proteína de levaduras está formada por dos hélices  $\alpha$  antiparalelas y una gran región N-terminal desestructurada. Resulta interesante que el sitio de unión a cobre se vuelve más estructurado cuando este metal está unido a la proteína (Abajian y col., 2004).

La localización dual de Cox17p ha sugerido, en principio, que esta proteína podría actuar como una lanzadera de cobre entre el citosol y el espacio intermembrana. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que si se ancla Cox17p a la membrana interna no se produce un defecto en la respiración, lo cual implica que su presencia en el citoplasma no es esencial para su función en el ensamblado de COX (Maxfield y col.,

2004). Además, las mutantes en *cox17* no presentan niveles disminuidos de cobre mitocondrial (Cobine y col., 2004). Arnesano y col. (2005b) demostraron la existencia de al menos dos tipos diferentes de conformeros de Cox17p unidos a cobre. Uno de ellos es Cox17p-Cu<sub>1</sub>, que se forma a través de la isomerización por puentes disulfuro. La otra forma es la de la proteína unida a grupos de cobre coordinados establemente en una estructura oligomérica. Estas dos formas pueden cumplir funciones diferentes, ya que la primera puede participar en la distribución del cobre y la segunda en el almacenamiento del metal en el espacio intermembrana.

Estudios de NMR revelaron que la región C-terminal de la proteína posee un motivo duplicado CX<sub>9</sub>C estabilizado por puentes disulfuro intramoleculares. Este motivo se encuentra en otras proteínas presentes en el espacio intermembrana involucradas también en el ensamblado de COX, como es el caso de Cox19p, Cox23p y Mia40p. Es interesante destacar que este motivo se encuentra presente también en Cox6bp, la cual se encuentra muy cercana al sitio Cu<sub>A</sub> de Cox2p (Arnesano y col., 2005b).

#### *1.4.2.4.2. Proteínas Sco*

La proteína de unión a cobre Sco1p (Schulze y Rödel, 1989) aparentemente coopera con Cox17p en el ensamblado de COX. La falta de Sco1p resulta en la pérdida del espectro del hemo *a* y una rápida degradación de las subunidades Cox1p y Cox2p sintetizadas *de novo* (Krummeck y Rödel, 1990). Sco1p es una proteína anclada a la membrana interna con su dominio N-terminal hacia la matriz y el C-terminal hacia el espacio intermembrana (Beers y col., 2002). La sobreexpresión de Sco1p rescata mutaciones en *cox17*, por lo que se ha sugerido que Sco1p actuaría luego de Cox17p en la transferencia del cobre a COX (Glerum y col., 1996b). Se ha identificado un motivo de unión a metales en Sco1p, CX<sub>3</sub>C, en la región C-terminal expuesta al espacio intermembrana. Se ha demostrado que el Cu<sup>+</sup> es coordinado por dos grupos tioles de las cisteínas del motivo CX<sub>3</sub>C y por un nitrógeno de un residuo de histidina adyacente. Las

mutaciones en cualquiera de estos residuos afectan la unión de cobre y producen deficiencia respiratoria por falta de COX. La solución de la estructura de apo-Sco1 de *Bacillus subtilis*, un homólogo de la proteína de levaduras, reveló que los ligandos de cobre se encuentran en dos regiones flexibles que forman un rulo en la proteína (Balatri y col., 2003). Luego, Horng y col. (2004) demostraron mediante experimentos *in vitro* y un sistema de expresión citosólico en levaduras que Cox17p puede transferir cobre directamente a Sco1p, aunque no ha sido detectada una interacción estable entre ambas proteínas.

Varias líneas de evidencia sostienen que Sco1p determina la formación del centro Cu<sub>A</sub> en Cox2p. En función de estudios genéticos y bioquímicos de la proteína de levaduras se demostró que puede interactuar directamente con Cox2p (Dickinson y col., 2000). El motivo CX<sub>3</sub>C también constituye el sitio de unión a cobre en Cox2p (Coruzzi y Tzagoloff, 1979). Se ha propuesto que Sco1p podría estar involucrada en la reducción de las cisteínas del motivo CX<sub>3</sub>C de Cox2p para permitir la incorporación de Cu<sup>+</sup>. Este postulado se basa en la similitud de Sco1p con una familia de peroxirredoxinas (Chinenov, 2000). Esta idea propone que Sco1p cumple una función redox en la formación del centro Cu<sub>A</sub>. Ye y col. (2005) reportaron que la conformación local en la vecindad del rulo que contiene el motivo CX<sub>3</sub>C cambia en función del estado redox de la proteína Sco1 de *B. subtilis*. La proteína Sco1 de humanos actúa como un sensor redox en el espacio intermembrana (Williams y col., 2005).

El análisis de genomas procariontas reveló que los homólogos a Sco1p pueden estar ligados a una variedad de cuproenzimas, no relacionadas con el ensamblado de COX. Se postuló que Sco1p podría actuar como un conector funcional de procesos biológicos relacionados con el metabolismo del cobre y el estado redox celular (Arnesano y col., 2005a).

Sco1p es un miembro de una familia conservada de proteínas, cuyos representantes están distribuidos entre procariontas y eucariotas. En *Saccharomyces cerevisiae* se identificó un segundo miembro de esta familia (Sco2p) con una identidad del 53,8% respecto de Sco1p. No se conoce la función exacta de Sco2p. En contraste

con la mutación en *sco1*, la falta de Sco2p no afecta la respiración de las levaduras (Lode y col., 2002). Sco2p está anclada a la membrana interna y posiblemente muestre la misma disposición que Sco1p (Glerum y col., 1996b). Es interesante destacar que la sobreexpresión de Sco2p no puede sustituir la función de Sco1p, pero es capaz de rescatar la deficiencia respiratoria generada por mutaciones en *cox17*, aunque menos eficientemente que Sco1p y sólo con el agregado de cobre en el medio de cultivo (Glerum y col., 1996b). Si se reemplaza la porción C-terminal de Sco1p por la respectiva porción de Sco2p la quimera resultante es funcional y capaz de rescatar la deficiencia respiratoria de las levaduras mutantes en *sco1* (Rentzsch y col., 1999). Se ha determinado que la función de Sco2p es indispensable para la presencia de niveles residuales de Cox2p en las mutantes de *sco1* (Lode y col., 2002), sugiriendo que su actividad específica estaría relacionada con el ensamblado de COX o con la estabilización de sus subunidades.

En células humanas, se han identificados dos miembros de esta familia. Contrariamente a la situación respecto de las proteínas de levaduras, ambas proteínas humanas, HsSco1 y HsSco2, son importantes para la funcionalidad de COX. La falta de HsSco1 produce acidosis láctica y daño hepático severo como consecuencia de la deficiencia de COX (Hamza y Gitlin, 2002). Se ha reportado que los fibroblastos deficientes en HsSco1 acumulan intermediarios de las etapas tempranas del ensamblado de COX conteniendo Cox1, Cox4 y Cox5a (Williams y col., 2004). HsSco1 es una proteína integral de la membrana interna con su dominio C-terminal expuesto al espacio intermembrana y el N-terminal hacia la matriz, la cual es capaz de formar un dímero (Leary y col., 2004).

Las mutaciones en HsSco2 parecen ser más frecuentes que en HsSco1. Las mutaciones en HsSco2 están asociadas con encefalopatías y cardiopatías hipertróficas (Papadopoulou y col., 1999). Jaksch y col. (2001) mostraron que los fibroblastos deficientes en HsSco2 presentan un dramático incremento en la captación de cobre y la actividad de COX puede ser completamente restaurada por el agregado de cobre. Sin

embargo no es claro cómo el exceso de cobre puede suplir la mutación o cómo Cox2p puede recibir el cobre.

Se ha propuesto que HsSco1 y HsSco2 poseen funciones independientes y cooperativas en proporcionar el cobre a la enzima COX de mamíferos (Leary y col., 2004). De acuerdo al modelo propuesto, HsSco2 participa en la formación del centro  $\text{Cu}_A$  mientras que HsSco1 actúa como asistente de HsSco2 en su función. Consistentemente con la composición del centro  $\text{Cu}_A$ , las proteínas HsSco pueden unir  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Cu}^{2+}$  (Hornig y col., 2005).

#### *1.4.2.4.3. Cox11*

Existe otra proteína de unión a cobre, Cox11p, la cual parece estar relacionada con la incorporación de cobre en Cox1p. Cox11p en levaduras se identificó como una proteína importante para la respiración y la actividad de COX. Las mutantes en *cox11* muestran defectos en la actividad de COX debido a la degradación de la subunidad Cox1p y la inestabilidad del hemo *a* (Tzagoloff y col., 1990). Cox11p podría estar relacionada con la respuesta ante el estrés oxidativo. Curiosamente, el gen *cox11* fue identificado durante dos búsquedas diferentes, indicando su participación en la biosíntesis de la pared celular (Lussier y col., 1997; Tong y col., 2004). Esta relación entre la función mitocondrial y la biogénesis de la pared celular ya ha sido reportada para algunas otras proteínas con funciones distintas (Lussier y col., 1997; Zhong y col., 2005).

Cox11p atraviesa la membrana interna y presenta el dominio N-terminal hacia la matriz y el C-terminal expuesto hacia el espacio intermembrana. Se han realizado estudios en *R. sphaeroides* y se demostró que la falta de *cox11* produce la ausencia de  $\text{Cu}_B$ , pero no de  $\text{Cu}_A$ . Además se demostró que el entorno del hemo  $a_3$ , pero no el del hemo *a*, se encuentra distorsionado (Hiser y col., 2000). Se realizaron análisis de una forma recombinante de Cox11p de levaduras, en los cuales se utilizó solamente la parte soluble de la proteína y se demostró que la misma es capaz de unir cobre (Carr y col.,

2002). Aparentemente, Cox11p actúa como un dímero y puede unir un  $\text{Cu}^+$  por monómero por medio de un motivo CXC localizado en el dominio C-terminal. Una tercera cisteína conservada, cercana al dominio transmembrana y del lado del espacio intermembrana, no participa en la unión de cobre pero podría estar involucrada en la formación del dímero. La solución de la estructura de la parte soluble del homólogo de Cox11p de *Sinorhizobium meliloti* sugirió que los dos ligandos para un  $\text{Cu}^+$  derivan del motivo CXC de un monómero y que un tercer ligando es donado por una cisteína conservada del motivo CXC del otro monómero (Banci y col., 2004). Al reemplazar cualquiera de estas cisteínas conservadas se modifica la unión de cobre y se produce una deficiencia de COX (Carr y col., 2002).

Se ha demostrado que Cox17p puede transferir el cobre directamente a Cox11p, aunque aún no se pudo demostrar la interacción física entre estas proteínas (Horng y col., 2004).

Se han encontrado homólogos de Cox11p en eucariotas y procariotas. En los genomas procariotas, Cox11 se encuentra frecuentemente codificada en el mismo operón que codifica las subunidades estructurales de COX, lo que sugiere que esta proteína estaría implicada únicamente en el ensamblado de COX (Arnesano y col., 2005a).

Se han detectado dos genes homólogos a Cox11p en el genoma humano, aunque uno de ellos podría ser un pseudogen (Petruzzella y col., 1998). No se han descrito enfermedades asociadas con la falta de HsCox11. Es interesante mencionar que en el protozoo *Reclinomonas americana* el homólogo de Cox11p se encuentra codificado en el genoma mitocondrial (Gray y col., 1998).

#### *1.4.2.4.4. Cox19*

Cox19p es una de las proteínas solubles del espacio intermembrana requerida para el ensamblado de COX, la cual presenta características similares a las de Cox17p. Cox19p posee una localización dual en el citoplasma y el espacio intermembrana

mitocondrial y posee una alta similitud de secuencia respecto de Cox17p en su extremo C-terminal. Recientemente se demostró que Cox19p es funcional cuando está anclada a la membrana interna, por lo que su presencia en el citoplasma no es importante para cumplir su función en el ensamblado de COX (Rigby y col., 2007). Las mutantes de levaduras en *cox19* presentan ausencia de hemo *a* y deficiencia de COX, y este fenotipo no es rescatado por el agregado de cobre al medio de cultivo (Nobrega y col., 2002). Esta proteína no posee el motivo CCXC pero su forma recombinante tiene la capacidad de unir cobre (Cobine y col., 2004). Recientemente se ha demostrado que Cox19p puede unir también  $\text{Cu}^{2+}$ , lo cual es interesante ya que el centro  $\text{Cu}_A$  está conformado por dos átomos de cobre ( $\text{Cu}^+ \text{-Cu}^{2+}$ ), siendo aún más interesante que Cox17p puede unir  $\text{Cu}^+$  y hasta el momento se ha descrito solamente cómo el  $\text{Cu}^+$  es transportado hacia Cox2p para conformar el  $\text{Cu}_A$  (Rigby y col., 2007). Otro hecho interesante es que el contenido de cobre mitocondrial no se modifica en las mutantes en *cox19* ni en las dobles mutantes en *cox17-cox19* (Cobine y col., 2004).

Cox19p y otra proteína denominada Cox23p poseen el motivo duplicado  $\text{CX}_9\text{C}$ , por lo que pueden formar oligómeros como lo hace Cox17p. Se ha sugerido que la transferencia de cobre en el espacio intermembrana puede involucrar la formación de heterodímeros entre estas dos proteínas y Cox17p, y con otras proteínas como Cox6bp o Mia40p (Arnesano y col., 2005b).

Cox23p es otra de las proteínas solubles del espacio intermembrana y ha sido localizada también en el citoplasma. Esta proteína presenta similitud de secuencia en el extremo C-terminal con Cox17p, pero de manera interesante no se encuentra similitud entre Cox19p y Cox23p. Las levaduras mutantes en *cox23* muestran deficiencia respiratoria, como en el caso de las mutantes en *cox17* y *cox19*. Las mutantes en *cox23* pueden ser rescatadas por el agregado de cobre al medio de cultivo, pero con la sobreexpresión conjunta de Cox17p. Esta situación sugiere que Cox17p actúa luego de Cox23p en un pasamanos imaginario, mientras que Cox19p estaría representando otra parte en esta vía de distribución del  $\text{Cu}^+$  (Barros y col., 2004). Se ha demostrado que la falta de Cox23p tampoco afecta el nivel de cobre mitocondrial (Cobine y col., 2006).

### 1.5. ¿Cómo llega el cobre hasta la mitocondria para el ensamblado de COX?

El cobre constituye un cofactor para varias metaloenzimas y es requerido para el normal funcionamiento celular. Las mismas propiedades que hacen de este metal un cofactor biológico ideal, también lo convierten en un potencial productor de radicales libres. Por lo tanto, la célula se ha encargado de generar mecanismos para controlar el contenido de cobre global y distribuir este metal dentro de la misma.

El cobre es esencial en la mitocondria por su papel en la respiración (COX) y protección ante el estrés oxidativo (Cu,Zn-SOD, superóxido dismutasa que contiene un átomo de cobre y uno de zinc en su sitio catalítico). Si bien ambas enzimas mencionadas necesitan cobre para cumplir sus funciones, poco se conoce hasta el momento sobre el camino que lleva a este metal al espacio intermembrana mitocondrial, el cual constituye el sitio de incorporación del cobre a las mismas (Leary y col., 2009).

El cobre ingresa a la célula a través de una familia de transportadores CTR1 (así llamados en levaduras y humanos) (Kim y col., 2008; Prohaska, 2008) (Figura 11A). Estas permeasas se encuentran muy conservadas en eucariotas. En plantas, esta familia se denomina COPT, aunque los miembros de la familia ZIP también complementan las levaduras mutantes en *ctr1* (Sancenon y col., 2003; Wintz y col., 2003) (Figura 11B). En levaduras existen otras permeasas, de baja afinidad, en la membrana plasmática, como Fet4p y Smf1p (Kim y col., 2008). Los transportadores de cobre están asociados a metalorreductasas que convierten el  $\text{Cu}^{2+}$  del medio en  $\text{Cu}^+$ . En Arabidopsis, existe una familia de reductasas férricas denominada FRO que podría participar en la incorporación de cobre a la célula ya que cuando existe un exceso de hierro en el medio la célula posee niveles reducidos de cobre, y viceversa (Chen y col., 2004; Welch y col., 1993).

Una vez dentro de la célula, en levaduras el cobre es transportado a sus sitios de utilización por dos metaloenzimas solubles, Atx1p y Ccs1p, las cuales facilitan la inserción de cobre dentro de las cuproenzimas blanco (Figura 11A). Ccs1p activa a Sod1p a través de la inserción de un  $\text{Cu}^+$  en la apo-proteína recién sintetizada y cataliza

la formación de un puente disulfuro esencial. Atx1p es la encargada de suministrar  $\text{Cu}^+$  a Ccc2p, una ATPasa tipo-P localizada en el Golgi. En el lumen del Golgi, los iones  $\text{Cu}^+$  son incorporados a Fet3p, previamente a ser transportada a la membrana plasmática para participar en la incorporación de hierro a la célula (Leary y col., 2009). En mamíferos, los ortólogos a Ccs1p y Atx1p se denominan CCS y ATOX1, respectivamente. ATOX1 es la chaperona encargada de transportar  $\text{Cu}^+$  a las ATPasas tipo-P de Menkes y Wilson (ATP7A y ATP7B, respectivamente), llamadas así en función de las enfermedades que produce la falta de cada una de ellas. ATP7A transloca el metal al Golgi para ser incorporado en cuproenzimas de secreción y, cuando las concentraciones de cobre celular son muy altas, esta ATPasa y ATP7B tienen la capacidad de migrar a la periferia de la célula para participar de la evacuación de  $\text{Cu}^+$ . ATP7B transloca  $\text{Cu}^+$  al lumen del Golgi de hepatocitos para su incorporación en la ceruloplasmina (Leary y col., 2009; Prohaska, 2008). En plantas, existen dos homólogos a Atx1p de levaduras, CCH y ATX1 (Figura 11B). Ambas proteínas complementan las levaduras mutantes en *atx1* e interactúan con HMA5. Esta última es un miembro de la familia HMA de ATPasas tipo-P. RAN1 (HMA7) es un homólogo de las ATPasas tipo-P de levaduras y mamíferos que translocan cobre a través del sistema de endomembranas. RAN1 es el encargado de transportar cobre al receptor de etileno, el cual necesita de este metal para cumplir su función. El homólogo de Ccs1p en plantas se denomina CCS, el cual está presente en el citosol y cloroplastos de las células vegetales. La forma cloroplástica de CCS transfiere el cobre a CSD2 (SOD presente en cloroplastos) y la forma citosólica de CCS activa a CSD1 (SOD citosólica) y CSD3 (SOD presente en peroxisomas, la cual se importa a los mismos con este cofactor incorporado) (Burkhead y col., 2009).

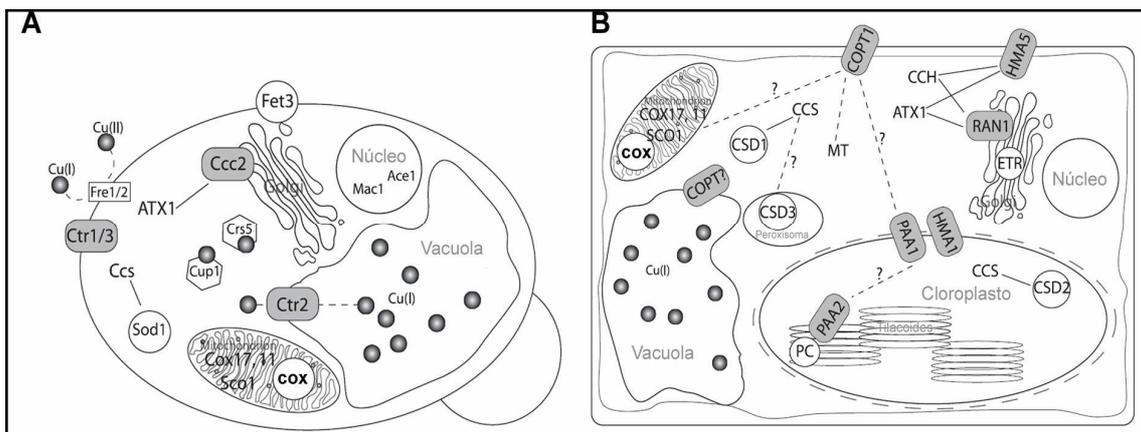
En levaduras existe una proteína que ayuda a eliminar el cobre del citoplasma y lo transloca a la vacuola de la célula: Ctr2p (Figura 11A). Este transportador también puede movilizar este metal en función de una deficiencia de cobre y puede cambiar su localización a la membrana plasmática para facilitar la incorporación de cobre a la célula (Rees y col., 2004). En condiciones de deficiencia de cobre los transcritos

correspondientes a las permeasas de alta afinidad y a las metalorreductasas necesarias para la importación del metal son regulados positivamente. Cuando el cobre está en exceso se induce la transcripción de metalotioneínas (MTs) que pueden actuar como “buffers” para el  $\text{Cu}^+$ , y se internalizan y degradan los transportadores Ctr1p de la membrana plasmática. Las levaduras no poseen una vía definida para la exportación del exceso de cobre. El mecanismo que utilizan es la incorporación de este metal dentro de la vacuola en función de la actividad de Ctr2p (Leary y col., 2009). En mamíferos, la función de ATP7A y ATP7B es crítica para remover el exceso de cobre de la célula ya que la localización subcelular de estas ATPasas es sensible al estado de abundancia del cobre celular. APP es una proteína relacionada con la eliminación del cobre a partir de la corteza cerebral y el hígado, aunque aún no se ha dilucidado el mecanismo de exportación de cobre de la célula mediado por esta proteína. Cuando los niveles de cobre se elevan en la célula, se produce la consecuente disminución de la abundancia de CTR1 de la membrana plasmática a partir de la endocitosis y degradación de este transportador. Existe una gran cantidad de proteínas cuya expresión es regulada por la abundancia de cobre celular (Leary y col., 2009; Prohaska, 2008). En plantas, HMA5, localizada en la membrana plasmática, o bien en un compartimiento tardío de la vía secretoria, participa en la eliminación del exceso de cobre celular (Figura 11B). Tanto mutantes en *hma5* como aquellas en *ran1* muestran fenotipos asociados con la expansión de la pared celular. Es posible que el cobre sea liberado a la región apoplástica donde se encuentran oxidasas y lacasas que lo utilizan como cofactor y al estar alterada esta vía se vea dañada la remodelación y expansión de la pared celular. En el apoplasto de las células vegetales también se encuentra la plantacianina, la cual participa en la elongación del tubo polínico (Burkhead y col., 2009).

En plantas y mamíferos también existen MTs encargadas de unir el cobre que se encuentra en exceso en el citoplasma. Estas proteínas de bajo peso molecular y ricas en cisteínas pueden unir varias moléculas de cobre y son reguladas positivamente en condiciones de exceso de este metal (Burkhead y col., 2009; Prohaska, 2008). Además,

en plantas están presentes las fitoquelatinas, derivadas de glutatión, que actúan como “buffers” de cobre colaborando con la función de las MTs (Burkhead y col., 2009).

En plantas existe un compartimiento adicional que posee proteínas que utilizan cobre como cofactor, el cloroplasto. Como se mencionó anteriormente, una CCS estromática es la encargada de incorporar el cobre en CSD2. Además, en cloroplastos existe otra proteína que posee cobre, la plastocianina, ubicada en el lumen de los tilacoides. PAA1 y PAA2 constituyen ATPasas de tipo-P localizadas en la envoltura interna de los cloroplastos y las membranas tilacoides, respectivamente, que podrían participar en el transporte de cobre. HMA1 constituye un candidato alternativo para el transporte de cobre a los cloroplastos. Hasta el momento, no se conoce ninguna chaperona de cobre citoplasmática que se encargue de transportar este metal hacia los translocadores localizados en la envoltura de los cloroplastos (Burkhead y col., 2009) (Figura 11B).



**Figura 11: A. Transporte de cobre en levaduras.** Los rectángulos blancos representan las reductasas de cobre. Los rectángulos grises representan los transportadores de cobre. Los hexágonos blancos representan las metalotioneínas y los círculos blancos las proteínas que poseen cobre. Las líneas continuas representan interacciones demostradas experimentalmente. Las líneas punteadas representan interacciones hipotéticas. Ace1 y Mac1 son factores de transcripción. Mac1 induce la activación transcripcional de Ctr1, Ctr3 y la reductasa de cobre Fre1 en condiciones de deficiencia de cobre. Cuando el cobre se encuentra en exceso, induce la internalización y degradación de Ctr1, y Ace1 estimula la transcripción de Sod1 y las MT. **B. Transporte de cobre en la célula vegetal.** Las líneas continuas representan interacciones demostradas experimentalmente. Las líneas punteadas representan interacciones hipotéticas. Los rectángulos grises representan transportadores de cobre mientras que los círculos blancos representan proteínas que poseen cobre (Extraído de Burkhead y col., 2009).

Como se mencionó anteriormente, poco se sabe acerca de cómo llega el cobre a la mitocondria. La cantidad de Sod1p presente en las mitocondrias de levaduras representa un 1-5% del total celular. La incorporación de cobre para la activación de Sod1p se produce en el espacio intermembrana mitocondrial y tanto Ccs1p como Sod1p son importadas a la mitocondria como apo-proteínas. Sin embargo, no se conoce cómo Ccs1p incorpora  $\text{Cu}^+$  en el espacio intermembrana. En el caso de COX, ya se han mencionado los factores involucrados en la incorporación de cobre a las subunidades correspondientes. Cox17p transfiere  $\text{Cu}^+$  a Cox11p y Sco1p, las cuales facilitan la inserción del metal en las subunidades Cox1p y Cox2p, respectivamente. Aún resta el estudio de cómo llega el  $\text{Cu}^{2+}$  a Sco1p para luego ser transferido a Cox2p, siendo Cox19p uno de los candidatos en dicho transporte. Y aún permanece sin resolver cómo es que Cox17p obtiene el cobre para poder transferirlo a Sco1p y Cox11p. Recientemente, se han realizado experimentos bioquímicos que determinaron la existencia de un *pool* de cobre biodisponible en la matriz mitocondrial de levaduras y humanos. Aún no se conoce la naturaleza de los ligandos de cobre en la matriz. Se sabe que el  $\text{Cu}^+$  se encuentra formando un complejo con un anión de bajo peso molecular. Este *pool* de cobre es dinámico y responde a los cambios en la abundancia de cobre citosólico (Cobine y col., 2004; Leary y col., 2009). En función de este hallazgo, se sugirió que el cobre del espacio intermembrana tiene su origen en este *pool* localizado en la matriz. En principio, Cox17p y Ccs1p estarían presentes en el espacio intermembrana y el citosol, pero su participación como lanzaderas para el cobre a la mitocondria no es razonable ya que la falta de estas proteínas no modifica el contenido de cobre mitocondrial (Cobine y col., 2004; Leary y col., 2009), además de que la presencia de Cox17p restringida a la mitocondria no produce una deficiencia respiratoria. Otros candidatos podrían ser Cox19p y Cox23p, que también presentan una localización dual, pero la falta de cada una de estas proteínas tampoco modifica los niveles de cobre en la mitocondria. Leary y col. (2009) han postulado que la unión del cobre a su ligando mitocondrial se produce en el citosol, lo cual constituye una señal para la translocación del complejo aniónico a la mitocondria, en función de que encontraron abundante ligando de cobre libre en el citosol. Este modelo es consistente

con la rápida expansión del *pool* mitocondrial en respuesta a un exceso de cobre citosólico. Pero sigue sin resolverse la identidad de los transportadores de cobre a la mitocondria y aquellos encargados de suministrar el cobre a las chaperonas del espacio intermembrana desde la matriz.

Recientemente se ha identificado una proteína, Cmc1p, unida a la membrana interna, proyectándose hacia el espacio intermembrana y presente en un complejo de alto peso molecular, vinculada tanto a COX como a Sod1 (Horn y col., 2008). Esta proteína se encuentra conservada en eucariotas pero no está presente en procariotas. Cmc1p posee el doble motivo CX<sub>9</sub>C característico de las chaperonas del espacio intermembrana relacionadas con el tráfico de cobre. La forma recombinante de esta proteína es capaz de unir Cu<sup>+</sup> a través de grupos tioles. Cmc1p se encuentra relacionada con la expresión de COX y Sod1p mitocondrial ya que la falta de esta proteína provoca la disminución de los niveles de COX funcional y el aumento de los niveles de Sod1p. Estas mutantes en *cmc1* son rescatadas por el agregado de cobre al medio de cultivo, pero no recuperan la actividad respiratoria bajo la sobreexpresión de Cox17p, Cox19p, Cox23p, Cox11p ni Sco1p. Es interesante que la sobreexpresión de Cmc1p en cualquiera de las mutantes en las proteínas mencionadas tampoco rescata la deficiencia respiratoria característica de la falta de las mismas. Es decir que Cmc1p no cumple la misma función que ninguna de estas chaperonas de cobre. La hipótesis que se ha planteado respecto a esta proteína es que podría estar relacionada con otras proteínas de la membrana interna (como lo son transportadores de cobre no identificados aún) con el propósito de facilitar la distribución de cobre desde la matriz a las chaperonas de cobre del espacio intermembrana. Además, la regulación de la actividad de esta proteína en función de la distribución de cobre para el ensamblado de COX podría afectar la liberación de cobre para la activación de Sod1p (Horn y col., 2008).

En función del estudio de las proteínas encargadas del transporte de cobre para el ensamblado de COX, nos interesó conocer la naturaleza de los posibles homólogos de estos factores en plantas. Durante el desarrollo de esta introducción nos propusimos

mostrar la gran cantidad de proteínas involucradas en el ensamblado de esta enzima y la importancia de conocer la identidad de, al menos, algunas de ellas en plantas, debido a que las mitocondrias de estos organismos muestran características propias y únicas gracias al contexto celular que genera la presencia de cloroplastos. Además de la fascinación que nos produce conocer los mecanismos que rigen la expresión génica en la célula vegetal, en particular durante el ensamblado de COX, sumamos el interrogante de cómo llega el cobre hasta estos factores y la potencialidad de la conexión con otras funciones celulares.

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente plan es determinar la estructura y mecanismos de expresión de genes involucrados en la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa de plantas, utilizando como modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*.

### **Objetivos específicos**

1. Obtener y caracterizar clones de ADNc y genómicos codificantes para proteínas de *Arabidopsis* homólogas a las chaperonas de cobre Cox11p, Cox17p, Cox19p y Sco1p de levaduras.
2. Estudiar la funcionalidad de las proteínas codificadas mediante experimentos de transformación de mutantes de levadura.
3. Estudiar la expresión de los respectivos genes y su respuesta a distintos factores (ambientales, nutricionales, hormonales, estrés, presencia de metales pesados).
4. Estudiar los promotores de estos genes, con el objetivo de determinar qué regiones son importantes para la expresión de los mismos y si existen mecanismos o factores comunes involucrados.
5. Analizar el efecto de mutaciones en algunos de estos genes sobre la expresión génica, el metabolismo y el desarrollo vegetal.

## ***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 se realizaron utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Heyhn. ecotipo Columbia (Col-0) fueron provistas por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Las semillas de las líneas SALK con inserciones de T-DNA (Alonso y col., 2003) fueron provistas por el Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University).

##### **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 simularon 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 desciende 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 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

##### **2.1.1.2. Plantas de Arabidopsis utilizadas para agroinfiltración**

La transformación de plantas de Arabidopsis se realizó mediante el método de inmersión floral (“floral dip”) utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998). Para tal fin, se sembraron semillas en macetas con tierra, las cuales

fueron subirrigadas 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.

### **2.1.1.3. Plantas de Arabidopsis utilizadas para estudios de expresión mediante Northern blot**

Se analizaron los niveles de transcriptos correspondientes a los genes *AtCOX19* mediante ensayos de Northern blot (ver punto 2.9.5). Se utilizaron plantas de Arabidopsis de 3 semanas crecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X (Murashige y Skoog, 1962) (ver anexo II) suplementado con vitaminas de Gamborg 1X (Gamborg y col., 1968) (ver anexo II) y 0,8% agar. Las plantas fueron cuidadosamente removidas del agar e incubadas con las raíces sumergidas en soluciones que contenían diferentes metales y compuestos que producen estrés oxidativo. En forma alternativa, se emplearon plantas de 4 semanas crecidas en tierra, a las cuales se les separaron los diferentes órganos u hojas de roseta para el correspondiente análisis de los niveles de transcriptos de los genes en estudio.

### **2.1.1.4. Plantas transformantes de Arabidopsis**

Para la realización de ensayos de medida de la actividad GUS por fluorometría o histoquímica (según el punto 2.12), las plantas transformadas con distintas construcciones de las regiones promotoras en estudio fusionadas al gen reportero *gus* fueron sembradas en placas de Petri con medio MS 0,5X suplementado con vitaminas de Gamborg 1X, 0,8% agar y el antibiótico kanamicina o higromicina (según el plásmido utilizado para incorporar el fragmento de interés) en una concentración de 50 µg/ml o 25 µg/ml, respectivamente. Para el análisis del gen reportero a través de histoquímica las placas fueron incubadas a 4°C durante 3 días y luego transferidas a la cámara de cultivo, realizando un seguimiento de la expresión del gen reportero en las

primeras etapas del desarrollo. Luego de 15 días, las plantas fueron transplantadas a macetas con tierra y se continuó el análisis de los diferentes órganos. Para los ensayos fluorométricos las plantas fueron cosechadas durante su seguimiento, ya sea en placas de Petri o en tierra, con la finalidad de realizar un análisis paralelo al correspondiente análisis histoquímico.

En el caso de la evaluación de la incidencia de metales y condiciones de estrés biótico y abiótico, se utilizaron hojas de roseta de plantas transformantes de *Arabidopsis* crecidas durante 15 días en placas de Petri con medio MS 0,5X suplementado con vitaminas de Gamborg 1X, 0,8% agar y kanamicina, que luego fueron transplantadas a macetas con tierra durante 2 semanas más. Las hojas de estas plantas fueron cuidadosamente escindidas, suspendidas en las diferentes soluciones ensayadas y, en algunos casos, infiltradas por medio de la aplicación de vacío (15 minutos en desecador). A fin de determinar el efecto del estrés biótico sobre la expresión del gen reportero, se expusieron las hojas de las plantas a suspensiones bacterianas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, cepa virulenta Pst DC3000 y cepa avirulenta Pst DC3000 (avrRpm1). Estas hojas fueron analizadas tanto por histoquímica como por ensayos fluorométricos. En otros casos, los ensayos fluorométricos se realizaron en las plantas de 15 días crecidas en el medio MS 0,5X suplementado con vitaminas de Gamborg 1X, 0,8% agar y kanamicina, que fueron transplantadas a macetas conteniendo vermiculita durante 10 días e irrigadas durante 2 días adicionales con las distintas soluciones ensayadas.

Para el análisis de la expresión del gen reportero en presencia de daño mecánico se utilizaron hojas de roseta de las plantas transformantes y se les practicó cortes con tijeras, perforaciones con punzón y dobleces.

#### **2.1.1.5. Plantas mutantes. Líneas SALK con inserción de T-DNA**

Se emplearon diferentes líneas de plantas SALK con inserciones de T-DNA en los genes de interés.

SALK\_057821 presenta una inserción en el segundo exón del gen *AtSCO1* (At3g08950). A fin de evaluar la presencia de la inserción se realizaron reacciones de amplificación por PCR (ver punto 2.3.3) utilizando como molde el ADN genómico extraído de las plantas mutantes, obtenido como se describe en el punto 2.7.3. Se realizaron dos reacciones de PCR. En una de ellas se utilizaron los oligonucleótidos específicos SCO1.1 y SCO1.2 (ver anexo I), los cuales flanquean la inserción de T-DNA; en la otra, se utilizaron los oligonucleótidos SCO1.1 y LBb1, siendo este último específico de la propia inserción.

SALK\_032461 presenta una inserción en la región promotora, a 220 pb del sitio de inicio de la transcripción, del gen *AtSCO1* (At3g08950). En este caso, las reacciones de PCR se realizaron con los oligonucleótidos específicos PSCO1a y PSCO1b (ver anexo I), los cuales flanquean la inserción de T-DNA, y con los oligonucleótidos PSCO1b y LBb1.

SALK\_008313 presenta una inserción en el segundo intrón del gen *AtSCO2* (At4g39740). En este caso, las reacciones de PCR se realizaron con los oligonucleótidos específicos SCO2SALK y SCO2WT (ver anexo I), los cuales flanquean la inserción de T-DNA, y con los oligonucleótidos SCO2SALK y LBb1.

La localización exacta de la inserción se determinó mediante el clonado en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) de los productos obtenidos a partir de los oligonucleótidos correspondientes a cada gen y LBb1, y la posterior secuenciación.

### **2.1.2. Cepas utilizadas**

#### **Cepas de *Escherichia coli* utilizadas**

**DH5 $\alpha$**  (supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (NaI<sup>r</sup>) thi-1 relA1) (Hanahan, 1983)

**SURE** e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>),  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac, recB, recJ, sbcC, umuC:Tn5(kan<sup>r</sup>), uvrC, [F' proAB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10(tet<sup>r</sup>)] (Stratagene).

#### **Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas**

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

**LB4404** 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 estreptomina (300 mg/l)) en la cepa Ach5. Esta cepa además posee el plásmido pTi/pRi pTiAch5 (Ooms y col., 1982).

#### **Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas**

**W303-1A** MATa *ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1* (provista por el Dr. Alexander Tzagoloff, Universidad de Columbia, Nueva York, USA)

**aW303 $\Delta$ COX19H** MATa *ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cox19::HIS3* (provista por el Dr. Alexander Tzagoloff; Nobrega et al. 2002)

**cox11 $\Delta$**  BY4741, MATa *his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 cox11::kanMX4, [rho<sup>+</sup>]* (provista por el Dr. Dennis Winge)

#### **Cepas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato utilizadas**

**Pst DC3000** Esta cepa presenta resistencia cromosómica a rifampicina (50 mg/l) y contiene el plásmido pVSP61 vacío, el cual le confiere resistencia a kanamicina (50

mg/l). Se utilizó una variante avirulenta de esta cepa, la cual contiene el gen *avrRpm1* en el plásmido pVSP61 (ambas variantes, virulenta y avirulenta, fueron provistas por la Dra. María Elena Álvarez, CIQUIBIC, Universidad Nacional de Córdoba).

### **2.1.3. Vectores utilizados**

Para el clonado, secuenciación y obtención de sondas de fragmentos de ADN de *Arabidopsis thaliana* se utilizó el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen).

Para la transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens*, las regiones promotoras fueron clonadas en el vector pBI101.3 (Jefferson y col., 1987). Los cultivos de bacterias así transformadas se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* como se describe más adelante. El vector pBI101.3 es un derivado del vector binario pBIN19 y contiene el gen que codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli* (*gus*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*nos*) clonados tras una secuencia múltiple de clonado en la misma disposición que en el vector pUC119. Dentro de la región de movilización del ADN, necesaria para la transformación de plantas, se encuentra el gen *nptII* que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Incluye además el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano RK2.

En los ensayos fluorométricos que se describen en el punto 2.12.2 se utilizaron como controles plantas transformadas con los plásmidos pBI101.3 y pBI121 (Jefferson y col., 1987). El plásmido pBI121 es un derivado del vector pBI101 que contiene un fragmento de 800 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) frente al gen *gus*.

Para la sobreexpresión de *AtSCO1* bajo el control del promotor 35SCaMV, se obtuvo el ADNc completo a partir del clon RAFL09-74-H16 (ver punto 2.3.1) utilizando los oligonucleótidos SCO1.4 y RAFL3 (ver anexo I), el que se clonó en los sitios *XbaI* y *SacI* del vector binario pBI121. En el caso de la complementación de las líneas de T-DNA, el ADNc de *AtSCO1* fue clonado en el vector pCAMBIA1302. Este

vector es un derivado de los vectores pPZP, contiene el gen que codifica a la GFP (*green fluorescent protein*) y posee una secuencia múltiple de clonado en la misma disposición que en el vector pUC18. Dentro de la región de movilización del ADN, necesaria para la transformación de plantas, se encuentra el gen *hptII* que confiere resistencia al antibiótico higromicina. Incluye además el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación en bacterias del plásmido pBR322.

Para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*, los fragmentos de ADNc de los genes *AtCOX19-1* (en sus variantes *AtCOX19-1.1* y *AtCOX19-1.2*) de *Arabidopsis thaliana* fueron clonados en el vector pYPGE15 (Brunelli y Pall, 1993). Este vector posee el promotor PGK y el terminador transcripcional CYC1. Además posee un origen de replicación en levaduras del plásmido de 2  $\mu$ m y un origen de replicación en bacterias del plásmido pBR322, el marcador de selección en levaduras URA3 y el marcador de selección en *E. coli* de resistencia a ampicilina. En el caso de *AtCOX19-1.1* se utilizaron los oligonucleótidos 19-3 y 19-5 sobre el clon RAFL19-72-F12 (ver punto 2.3.1); en el caso de *AtCOX19-1.2* se utilizaron los oligonucleótidos 19-4 y 19-5 sobre un clon generado en nuestro laboratorio (ver más adelante); y en el caso de *AtCOX11* se utilizaron los oligonucleótidos COX11FB y COX11RE, o COX11FE y COX11RB sobre el clon RAFL19-95-I22 (ver punto 2.3.1), a fin de generar clones con secuencias directas e invertidas (ver anexo I).

## **2.2. Análisis informático de secuencias proteicas**

Las secuencias proteicas completas de Cox17p, Cox19p, Cox11p y Sco1p de levaduras se utilizaron para reconocer secuencias homólogas de *Arabidopsis thaliana* en bancos de datos de secuencias nucleotídicas o proteicas utilizando los Programas blastp o tblastn (Altschul y col., 1990). Para el análisis filogenético se utilizaron programas del grupo PHYLIP (Felsenstein, 1989) sobre un alineamiento de secuencias proteicas generado por ClustalW (Thompson y col., 1994).

## **2.3. Métodos de clonado y análisis de recombinantes**

### ***2.3.1. Clones de ADNc de Arabidopsis thaliana utilizados***

Se utilizaron clones de ADNc de *AtCOX19-1* (RAFL19-72-F12, n° de acceso AK118487) y *AtSCO1* (RAFL09-74-H16, n° de acceso AY070393) a partir del y *AtCOX11* (RAFL19-95-I22, n° de acceso AK118687), obtenidos RIKEN BRC Experimental Plant Division, Japón (Seki y col., 2002).

El clon de ADNc con la secuencia codificante completa de la variante *AtCOX19-1.2* fue obtenido mediante una reacción de transcripción reversa seguida de una amplificación por PCR (según se describe en los puntos 2.9.6 y 2.3.3, respectivamente). Para la reacción de transcripción reversa se utilizó como molde ARN total preparado a partir de plantas de *Arabidopsis* de 15 días y el ADNc obtenido luego de esta reacción fue el molde en la reacción de PCR. En dicha reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos 19-4 y 19-5 (ver anexo I). Utilizando esta misma estrategia se obtuvo el clon de ADNc que contiene la secuencia codificante completa del gen *AtSCO2*, pero en este caso se utilizaron los oligonucleótidos SCO2a y SCO2b (ver anexo I). Los fragmentos de ADN obtenidos, correspondientes a los ADNc de los respectivos genes, fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen).

### ***2.3.2. Aislamiento y clonado de las regiones promotoras de interés de Arabidopsis thaliana***

#### ***2.3.2.1. Clonado de la región promotora del gen AtCOX19-1***

Para el clonado de la región promotora del gen *AtCOX19-1* (At1g66590) se procedió a la preparación de ADN genómico de *Arabidopsis* según se describe en el punto 2.7.3. Utilizando este ADN genómico como molde se efectuó una reacción de PCR usando los oligonucleótidos P191a y P191b (ver anexo I). Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1503 pb ubicado entre las posiciones -965 y +538 (incluyendo el primer intrón) del correspondiente gen. A partir de este fragmento, se

realizaron deleciones sucesivas utilizando los oligonucleótidos P191b en el extremo proximal y P191c, P191d o P191e en el extremo distal 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 gen comprendidas entre las posiciones -157, -260 o -389 y +538, según el orden respectivo de los oligonucleótidos utilizados. Los fragmentos resultantes, que contenían los sitios *Hind*III y *Bgl*II, fueron clonados en los sitios *Hind*III y *Bam*HI del vector pBI101.3.

A partir del fragmento de ADN que abarca desde la posición -157 de la región promotora se mutagenizaron los motivos site II (TGGGC(C/T)) presentes en dicha región, siguiendo el método descrito por Ausubel y col. (1987). Se utilizaron los oligonucleótidos P191c y p19mutIIR o P19mutIIF y P191b, siendo p19mutIIR y P19mutIIF complementarios en sus extremos 3' (ver anexo I). De esta manera, se realizaron dos amplificaciones por PCR y se obtuvieron dos fragmentos complementarios en uno de sus extremos, los cuales además presentaban modificaciones en los motivos site II introducidas por p19mutIIR y P19mutIIF. Estos fragmentos fueron purificados y mezclados en un tubo de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7,2), MgSO<sub>4</sub> 10 mM y DTT 0,1 mM. 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 hibridización entre las regiones complementarias de los dos productos de PCR generados en el paso anterior. Posteriormente, 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 esta reacción fue utilizada directamente para amplificar el fragmento quimérico empleando los oligonucleótidos p191c y p191b. Este fragmento también fue clonado en los sitios *Hind*III y *Bam*HI del vector pBI101.3.

La estrategia descrita para mutagenizar los motivos site II fue utilizada también para delecionar el intrón presente en la región 5' UTR (del inglés, *untranslated region*) del gen. Para tal fin se utilizaron los oligonucleótidos P191a y P19-I o 19-6 y P191b, siendo P19-I y 19-6 complementarios en sus extremos 3' (ver anexo I). La

amplificación por PCR con el primer par de oligonucleótidos se realizó utilizando como molde el fragmento original de 1503 pb. La amplificación por PCR con los oligonucleótidos P19-6 y P191b se realizó sobre un molde de ADNc a fin de obtener un fragmento carente del intrón en cuestión. Se obtuvo un fragmento de 1043 pb que fue clonado en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3.

### **2.3.2.2. Clonado de la región promotora del gen *AtCOX19-2***

Para el clonado de la región promotora del gen *AtCOX19-2* (At1g69750) se utilizó ADN genómico como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos P192a y P191b (ver anexo I). Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1518 pb ubicado entre las posiciones -954 y +564 (incluyendo el primer intrón) del correspondiente gen. El fragmento resultante, que contenía los sitios *HindIII* y *BglII*, fue clonado en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3.

### **2.3.2.3. Clonado de la región promotora del gen *AtCOX17-1***

Para el clonado de la región promotora del gen *AtCOX17-1* (At3g15352) se utilizó ADN genómico como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos P171a y P171b (ver anexo I). Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1719 pb ubicado entre las posiciones -951 y +768 (incluyendo el primer intrón) del correspondiente gen. A partir de este fragmento, se realizó una delección utilizando los oligonucleótidos P171c y P171b (ver anexo I). Como resultado de esto se obtuvo un fragmento de 969 pb que abarca desde la posición -201 a la +768 del gen. El fragmento más largo contenía los sitios *SalI* y *BglII* y el más corto los sitios *HindIII* y *BglII*. De esta manera, los fragmentos fueron clonados en los sitios *SalI* y *BamHI* o *HindIII* y *BamHI*, respectivamente, del vector pBI101.3.

A partir del fragmento de ADN de 969 pb se mutagenizaron los motivos site II presentes en dicha región utilizando los oligonucleótidos P171c y p171mutIIR o P171mutIIF y P171b, siendo p171mutIIR y P171mutIIF complementarios en sus

extremos 3' y los que incorporan mutaciones en los tres motivos site II presentes (ver anexo I). El fragmento obtenido fue clonado en los sitios *Hind*III y *Bam*HI del vector pBI101.3.

A partir del fragmento original (de 1719 pb) se realizó una amplificación por PCR a fin de delecionar el intrón presente en la región 5' UTR del gen. Este intrón deja toda la región 5' UTR cadena arriba del mismo, ya que sólo 1 pb lo separa del sitio de inicio de la traducción. Es así que se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos P171a y P171-I (ver anexo I). A partir de dicha amplificación se obtuvo un fragmento de 1008 pb, cuyos extremos contenían los sitios *Sal*I y *Bgl*II, el cual fue clonado en los sitios *Sal*I y *Bam*HI del vector pBI101.3.

#### **2.3.2.4. Clonado de la región promotora del gen *AtCOX17-2***

Para el clonado de la región promotora del gen *AtCOX17-2* (At1g53030) se utilizó ADN genómico como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos P172a y P172b (ver anexo I). Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1931 pb ubicado entre las posiciones -929 y +1002 (incluyendo el primer intrón) del correspondiente gen. A partir de este fragmento, se realizó una delección utilizando los oligonucleótidos P172c y P172b (ver anexo I). Como resultado de esto se obtuvo un fragmento de 1143 pb que abarca desde la posición -141 a la +1002 del gen. Los fragmentos resultantes, que contenían los sitios *Sal*I y *Bam*HI, fueron clonados en los sitios *Sal*I y *Bam*HI del vector pBI101.3.

A fin de mutagenizar los motivos site II, el fragmento de 1143 pb se empleó como molde en reacciones de PCR con los oligonucleótidos P172c y P172mutIIR o P172mutIIF y P172b, siendo p171mutIIR y P171mutIIF complementarios en sus extremos 3' y los que incorporan cambios en 2 nucleótidos de cada uno de los tres motivos siteII presentes (ver anexo I). El fragmento obtenido fue clonado en los sitios *Sal*I y *Bam*HI del vector pBI101.3.

A partir del fragmento original (de 1931 pb) se realizó una amplificación por PCR a fin de delecionar el intrón presente en la región 5' UTR del gen. Este intrón deja toda la región 5' UTR cadena arriba del mismo, ya que sólo 9 pb lo separan del sitio de inicio de la traducción. Es así que se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos P172a y P172-I. A partir de dicha amplificación se obtuvo un fragmento de 999 pb, cuyos extremos contenían los sitios *SalI* y *BamHI*, que fue clonado en los sitios *SalI* y *BamHI* del vector pBI101.3.

### **2.3.2.5. Clonado de la región promotora del gen *AtCOX11***

Para el clonado de la región promotora del gen *AtCOX11* (At1g02410) se utilizó ADN genómico como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos P11a y P11b (ver anexo I). Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1160 pb ubicado entre las posiciones -780 y +380 (incluyendo el primer intrón) del correspondiente gen. A partir de este fragmento, se realizó una delección utilizando los oligonucleótidos P11c y P11b (ver anexo I). Como resultado de esta reacción de amplificación se obtuvo un fragmento de 598 pb que abarca desde la posición -218 a la +380 del gen *AtCOX11*. Los fragmentos resultantes, que contenían los sitios *HindIII* y *BamHI*, fueron clonados en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3.

A partir del fragmento de ADN de 598 pb, se mutagenizaron los motivos site II presentes en dicha región. Se utilizaron los oligonucleótidos P11c y p11mutIIR o P11mutIIF y P11b, siendo p11mutIIR y P11mutIIF complementarios en sus extremos 3' y los que incorporan cambios en 2 nucleótidos de cada uno de los tres motivos site II presentes (ver anexo I). El fragmento obtenido fue clonado en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3.

La estrategia descrita para mutagenizar los motivos site II fue utilizada también para delecionar el intrón presente en la región 5' del gen *AtCOX11*. Para tal fin se utilizaron los oligonucleótidos P11a y P11-IR o P11-IF y P11b, siendo P11-IR y P11-IF complementarios en sus extremos 3'. Cada uno de los oligonucleótidos presenta un

extremo complementario a las regiones flanqueantes al intrón. De esta manera se amplificaron dos fragmentos con un extremo complementario entre sí correspondiente a la región de unión exón-exón (ver anexo I). Luego se realizó una amplificación final utilizando como molde una mezcla de los dos fragmentos y los oligonucleótidos P11a y P11b. Se obtuvo un fragmento de 933 pb que fue clonado en los sitios *HindIII* y *BamHI* del vector pBI101.3.

#### **2.3.2.6. Clonado de la región promotora del gen *AtSCO1***

Para el clonado de la región promotora del gen *AtSCO1* (At3g08950) se utilizó ADN genómico como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos PSCO1a y PSCO1b (ver anexo I). Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1005 pb ubicado entre las posiciones -935 y +70 del correspondiente gen. A partir de este fragmento, se realizó una delección utilizando los oligonucleótidos PSCO1c y PSCO1b (ver anexo I). Como resultado de esto se obtuvo un fragmento de 290 pb que abarcaba desde la posición -220 a la +70. El fragmento más largo contenía los sitios *HindIII* y *BamHI*, y el más corto los sitios *XbaI* y *BamHI*. De esta manera, los fragmentos fueron clonados en los sitios *HindIII* y *BamHI* o *XbaI* y *BamHI*, respectivamente, del vector pBI101.3.

#### **2.3.2.7. Clonado de la región promotora del gen *AtSCO2***

Para el clonado de la región promotora del gen *AtSCO2* (At4g39740) se utilizó ADN genómico como molde en una reacción de PCR usando los oligonucleótidos PSCO2a y PSCO2b (ver anexo I). Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1047 pb ubicado entre las posiciones -1006 y +41 del correspondiente gen. El fragmento resultante, que contenía los sitios *HindIII* y *SalI*, fue clonado en los sitios *HindIII* y *SalI* del vector pBI101.3.

### ***2.3.3. 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 µl, 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, a la cual se agregó: MgCl<sub>2</sub> 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 procedió 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 2.9.1.

### ***2.3.4. 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 µg/µl.

### ***2.3.5. 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.

## **2.4. Preparación de bacterias patógenas para ensayos de estrés biótico**

Se prepararon células de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, cepa virulenta Pst DC3000 y cepa avirulenta Pst DC3000 (avrRpm1) a fin de utilizarlas para la infección de hojas de plantas transformantes (ver punto 2.1.1.4). Las células se cultivaron durante 12 h en medio King's B (King y col., 1954) (ver anexo II) en presencia de rifampicina 50 mg/l y kanamicina 50 mg/l a 28°C con agitación. Con este cultivo saturado se realizó una dilución 1/50 en medio King's B fresco suplementado con antibióticos y se dejó crecer durante toda la noche. Se cosecharon las células por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min a 4°C y el sedimento se lavó con MgCl<sub>2</sub> 1 mM. El sedimento final fue resuspendido en MgCl<sub>2</sub> 1 mM hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,1 y fue utilizado para los ensayos correspondientes.

## **2.5. Transformación de células**

### **2.5.1. Transformación de bacterias**

#### **2.5.1.1. Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico por electroporación**

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 (ver anexo II) a la suspensión de células y se las incubó durante 1 h a 37°C. Después de centrifugar a 4000 x 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. Luego de crecidas las

colonias, se realizó minipreparación de plásmidos como se detalla en el punto 2.7.1 y los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y/o PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

### **2.5.1.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con ADN plasmídico**

#### *2.5.1.2.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* a través de choque térmico*

Para la preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* y su posterior transformación, se utilizó el método descrito por Höfgen y Willmitzer (1988). Las células bacterianas 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 x g durante 20 min a 4°C y el sedimento se lavó con TE (ver anexo II). El sedimento final fue resuspendido en 20 ml de medio LB con rifampicina 50 µg/ml 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<sub>2</sub> 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 x 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 µg/ml de cada uno. 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 2.7.1 y los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y/o PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

#### *2.5.1.2.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* a través electroporación*

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). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,25 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 2 horas a 28°C. Después de centrifugar a 4000 x g durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri que contenían medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas fueron incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 48 horas). Luego, se realizó minipreparación de plásmidos como se detalla en el punto 2.7.1 y los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y/o PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

#### *2.5.2. Transformación de levaduras*

Para la preparación de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* y su posterior transformación, se utilizó el método de acetato de litio descrito por Ito y col. (1983). Las células se cultivaron 12 h en medio YPD (ver anexo II), a 30°C con agitación. Con este cultivo saturado se realizó una dilución 1/10 en medio YPD fresco y se dejó crecer durante 3 h (hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,5). Luego se cosecharon las células por centrifugación a 1000 x g durante 5 min a 20°C, y el precipitado celular se lavó con TE (ver anexo II). Luego de centrifugar nuevamente, el sedimento fue resuspendido en TE/LiAC 100 mM y se agregaron 100 ng de ADN plasmídico. Se homogenizó la suspensión con la ayuda de un vórtex y luego se adicionó PEG 40% (v/v)/TE/LiAC 100 mM. Esta suspensión fue incubada a 30°C durante 30 minutos, con agitación. Cumplido el tiempo de incubación, se agregó dimetilsulfóxido (DMSO) y se mezcló suavemente por inversión. Las células se sometieron a un choque térmico incubándolas durante 15 min a 42°C. Finalizado el mismo, las células se colocaron

inmediatamente en hielo. Luego se centrifugaron a 4000 x g durante 1 minuto, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de TE y se sembró en placas de Petri con medio Yeast Nitrogen Base (Fluka) (ver anexo II) suplementado con glucosa 20 g/l, el medio Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements, without histidine, leucine, tryptophan and uracil (Sigma) (ver anexo II) y los aminoácidos correspondientes según la auxotrofia de la cepa utilizada (ver anexo II). En el caso de la cepa *cox11Δ* se agregó a los medios utilizados el antibiótico G418 (200 mg/l). Luego de crecidas las colonias, se realizó minipreparación de plásmidos como se detalla en el punto 2.7.2, y los plásmidos obtenidos se analizaron por PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

Los clones positivos fueron crecidos en medio YPD y en medio YEPG (ver anexo II) a fin de evaluar la capacidad de las levaduras complementadas de crecer en presencia de sustratos no fermentables.

## **2.6. 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 como se detalla en el punto 2.9.7.

Las bacterias de las colonias que arrojaron un resultado positivo por hibridación se cultivaron 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%.

## **2.7. Preparación de ácidos nucleicos**

### **2.7.1. Minipreparación de ADN plasmídico**

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* transformadas se realizaron según el protocolo de Birnboim y Dolly (1979). Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado, a 5000 x g durante 5 min. El sedimento celular fue resuspendido en 100 µl de solución de miniprep I (ver anexo II). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 200 µl de solución de miniprep II (ver anexo II). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Se agregaron 150 µl de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 400 µl de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó durante 5 min a 8000 x g a temperatura ambiente 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 12000 x g durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 µl 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.

### **2.7.2. Minipreparación de ADN de *Saccharomyces cerevisiae***

Las preparaciones de ADN a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas se realizaron según el protocolo de Kaiser y Auer (1993). Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo saturado de células cultivadas en medio mínimo, suplementado según corresponda en función de la auxotrofia de la cepa utilizada, a máxima velocidad durante 5 segundos, a temperatura ambiente. El sedimento celular fue resuspendido en 200 µl de solución de lisis (ver anexo II) y se agregaron 200 µl de una mezcla de fenol-cloroformo (1:1) y 0,1 g de esferas de vidrio (212-300 µm de diámetro). Posteriormente se sometió la mezcla a agitación con vórtex durante 2 min y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. A continuación, se precipitó la fase acuosa resultante con el agregado de dos volúmenes de etanol absoluto frío y posterior incubación a -20°C durante 30 min. El ADN fue recuperado por centrifugación a 14000 rpm durante 10 min y lavado con etanol 70% (v/v). Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 µl de una solución de ARNasa a una concentración final de 50 µg/ml.

### **2.7.3. 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 temperatura ambiente durante 15 segundos. Se agregaron 700 µl de solución amortiguadora de extracción (ver anexo II) y se mezcló en vórtex durante 5 segundos. Se centrifugó durante 10 min a 15000 x g y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 600 µl de isopropanol frío y se centrifugó a 15000 x g durante 10 min. El precipitado de ADN se secó y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

#### **2.7.4. 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 N<sub>2</sub> 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 x g a temperatura ambiente. 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 12000 x 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 12000 x g durante 5 min. Se lavó el precipitado con etanol 70% (v/v), se secó y se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.

#### **2.8. Cuantificación de ácidos nucleicos**

La calidad y cantidad del ADN purificado se analizó por lectura espectrofotométrica a 260/280 nm, considerando que  $DO_{260} = 1$  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  $DO_{260} = 1$  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.

## **2.9. Análisis de ácidos nucleicos**

### **2.9.1. 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).

### **2.9.2. Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes**

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

Los geles en condiciones desnaturalizantes se prepararon con agarosa 1,5% (p/v) en solución amortiguadora HEPES 1X (pH 7,8) y formaldehido 6% (p/v) según Ausubel y col. (1987). A cada muestra a sembrar se le agregaron 1/10 vol de solución de siembra (ver anexo II) y 2,5 a 5 µg 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).

### **2.9.3. Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida**

La electroforesis de fragmentos pequeños de ADN fue llevada a cabo en geles de poliacrilamida. En este caso se utilizó una relación de acrilamida:bis-acrilamida de 38:2 (p:p). El gel se preparó en solución TBE 1X (ver anexo II), con una concentración de acrilamida final de 10% (p/v). 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 TBE 1X (ver anexo II) a una intensidad de corriente constante de 10 V/cm de gel y se utilizó *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen) como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ( $\lambda=310$  nm).

### **2.9.4. Técnica de Southern blot**

Para el análisis de hibridización por Southern blot, según Ausubel y col. (1987), se separó el ADN en geles de agarosa de concentración adecuada, según se describe en el punto 2.9.1. Luego de la corrida electroforética, los geles fueron expuestos a una solución de HCl 0,25 M durante 10 min y, luego de dos lavados con H<sub>2</sub>O, se colocaron en una solución de NaOH 0,4 N durante 10 min. Luego de varios lavados con H<sub>2</sub>O, los fragmentos de ADN fueron transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences) mediante una solución de SSC 10X. 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 como se describe en el punto 2.9.7.

### **2.9.5. Técnica de Northern blot**

Los geles de separación de ARN por electroforesis descritos en el punto 2.9.2 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 2.9.7. Para analizar los niveles de ARN transferido, los filtros fueron hibridizados con una sonda de ARNr 25S de *Vicia faba* en condiciones similares a las descritas en el punto 2.9.7, pero a 68°C.

### **2.9.6. Transcripción reversa**

Para esta reacción se utilizó como molde ARN total de *Arabidopsis thaliana*. En un primer paso se agregó 0,1  $\mu$ M del oligonucleótido dT<sub>v</sub> (ver anexo I) junto con 1  $\mu$ g de ARN total, y se incubó a 65°C durante 5 min a fin de desarmar las estructuras secundarias del ARN. Inmediatamente después de pasados los 5 minutos, la mezcla fue colocada en hielo. A continuación se agregaron dNTPs (5 mM de c/u), la solución amortiguadora de la enzima y 200 U de Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega), hasta un volumen final de 30  $\mu$ l. La reacción se dejó transcurrir durante 1,5 horas a 42°C y luego se inactivó la enzima durante 5 min a 80°C más 30 segundos a 94 °C. Una alícuota del ADNc obtenido fue utilizada como molde para una reacción de PCR (según se describe en el punto 2.3.3) con oligonucleótidos específicos de acuerdo al ADNc que se deseó amplificar. Con el propósito de comparar los niveles de ARN total utilizados en cada muestra, se realizó en paralelo una amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de genes de actinas (ACTINA2 y ACTINA8; Charrier y col., 2002), denominados Actin-F y Actin-R (ver anexo I).

Las reacciones de transcriptasa reversa seguida de PCR fueron utilizadas, en algunos casos, para obtener una medida semicuantitativa de los niveles de los ARN de interés en cada muestra. Para este fin, se tomaron diferentes alícuotas de la reacción de PCR a determinados ciclos, luego de lo cual se sembraron las alícuotas en un gel de agarosa al porcentaje correspondiente según los tamaños de los fragmentos a analizar. Posteriormente, se realizó una transferencia e hibridización con la sonda adecuada,

como se describe en los puntos 2.9.4 y 2.9.7, a fin de verificar la identidad de las bandas obtenidas.

A fin de obtener una medida cuantitativa de los niveles de los ARN de interés, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. La misma fue llevada a cabo en un termociclador PTC-200<sup>TM</sup> (MJ Research, Inc.), el cual tiene acoplado un detector de fluorescencia Chromo 4 (MJ Research, Inc.). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl y contenían SYBR green 5 µl (1X), dNTPs 25 µM, 20 pmoles/µl de cada oligonucleótido específico, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 10 µl de una dilución del producto de la transcripción reversa previamente descripta y 0,25 U de la enzima Taq Platinum ADN polimerasa (Invitrogen).

### ***2.9.7. 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 (ver anexo II) y SDS 0,2% (p/v). 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, empleándose 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 volumen de 35 µl de agua a 100°C durante 3-5 min. Luego de transferir la mezcla inmediatamente a hielo, se agregaron 10 µl de solución OLB (ver anexo II), 2 µl de ASB 10 mg/ml; 2 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl, NEN) y 2-3 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (5 U/µl, Promega, Madison, WI, USA). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente entre 3 y 15 h, se diluyó en 200 µl 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 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP no incorporado. La sonda purificada (actividad específica de aproximadamente 10<sup>8</sup> 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 2.9.7.

## **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 a introducir en las plantas. 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 cultivaron en una cámara de temperatura,

humedad y fotoperíodo controlados, según las condiciones de cultivo antes descritas, hasta la floración (aproximadamente 4 semanas). A partir de este momento, 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 2.5.1.2. Se realizó un preinóculo de 30 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml, en el caso de la cepa GV2260, y kanamicina 50 µg/ml y estreptomycin 300 µg/ml para la cepa LBA4404. 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, dejándose crecer los cultivos hasta llegar a la fase estacionaria (12-16 h, a 28°C, con agitación). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5500 x 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 segundos tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. Luego, los potes 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 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 con 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 0,5X, 0,8% agar, suplementado con vitaminas de Gamborg 1X y kanamicina 40 µg/ml o higromicina 25 µg/ml, como agente selectivo. Las placas fueron mantenidas en la heladera durante tres días y luego fueron pasadas a cámara de cultivo, manteniéndose de esta forma 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 hojas 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 2.11.3. 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 2.7.3. El ADN obtenido fue utilizado como molde en una reacción de PCR. Para verificar la presencia de los transgenes en las plantas, se utilizó el oligonucleótido GUSNH<sub>2</sub> (ver anexo I) y

un oligonucleótido específico según la secuencia del fragmento analizado, en el caso del estudio de las regiones promotoras, y oligonucleótidos específicos en el caso de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1*. Las plantas que dieron resultado positivo en la reacción de PCR se dejaron crecer hasta maduración de las vainas, se colectaron las semillas y éstas se sembraron en tierra. Las semillas de estas plantas (T2) y de la generación siguiente (T3), se utilizaron para los estudios realizados.

## **2.12. Análisis de la expresión del gen reportero en plantas transformadas**

### **2.12.1. Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa**

Para analizar la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en forma histoquímica en las plantas transformadas, plántulas u órganos aislados fueron lavados con solución fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) durante algunos minutos para eliminar restos de tierra o medio de cultivo y luego transferidos a una solución de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1% y X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-glucurónido) 2 mM (ver anexo II). A continuación, 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 temperatura ambiente. 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 COOLPIX995 digital de Nikon sobre microscopio óptico y se procesaron con el software Adobe Photoshop 7.0.

El análisis histoquímico se realizó en plántulas de 0 a 15 días, crecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X, 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 $\beta$ -glucuronidasa en plantas transformadas***

#### **2.12.2.1. Extracción de proteínas y ensayo fluorométrico de actividad $\beta$ -glucuronidasa**

Las plantas se procesaron en mortero hasta obtener un polvo fino, agregándose luego 500  $\mu$ l de la solución amortiguadora de extracción (ver anexo II). La mezcla se transfirió a un tubo y se centrifugó a 13000 x 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  $\mu$ l de extracto proteico a 100  $\mu$ l de una solución del sustrato MUG (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido) 1 mM en metanol 40%. Con una alícuota de 25  $\mu$ l se realizó inmediatamente una medida fluorométrica a tiempo = 0. Los 75  $\mu$ l restantes se incubaron a 37°C en baño de agua y a los 10 min se extrajo una alícuota de 25  $\mu$ l y se realizó una segunda medida fluorométrica (tiempo = 10 min). Para detener la reacción enzimática se utilizaron 975  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en pmoles de MU (4-metilumbeliferona).min<sup>-1</sup>.(mg de proteínas totales)<sup>-1</sup> 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.

#### **2.12.2.1. 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  $0,667 \text{ unidades de Abs}_{(280 \text{ nm})} = 1 \text{ mg/ml}$  de ASB en solución.

Las determinaciones se realizaron con 2  $\mu\text{l}$  de extracto proteico en 500  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 500  $\mu\text{l}$  del reactivo de Azul Brillante de Coomasie (Azul brillante de Coomasie 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. Importación de proteínas marcadas a mitocondrias aisladas de tubérculos de papa**

### ***2.13.1. Preparación de mitocondrias a partir de tubérculos de papa***

Las mitocondrias de papa fueron preparadas según la técnica descrita por Duchêne y col. (2001). Los tubérculos de papa fueron lavados, pelados y cortados de manera de ser procesados en un extractor de jugos (Moulinex) junto a una solución amortiguadora de extracción (170 ml por kg de papas; ver anexo II). Luego de la extracción se agregaron 1,7 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 mM a fin de mantener el pH constante y 72  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se dejó sedimentar el almidón durante algunos segundos y luego se procedió a la filtración a través de una membrana de nylon de 45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Todos los procedimientos se realizaron sobre hielo a fin de asegurar la conservación de las mitocondrias.

El filtrado se dividió en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue recuperado y centrifugado a 9000 rpm durante 15 min a 4°C. El precipitado fue resuspendido cuidadosamente en solución de lavado (ver anexo II) con ASB, distribuido en microtubos de 2 ml y centrifugado a 9000 rpm durante 10 min a 4°C. Este precipitado fue resuspendido en el mínimo volumen de la misma solución de lavado con ASB e incorporado a tubos de microcentrífuga con 3 ml de un gradiente de Percoll (ver anexo II), y centrifugado a 25000 rpm durante 20 min a 4°C. Luego de esta centrifugación, se rescató la porción

correspondiente a las mitocondrias, la cual fue lavada cuatro veces con solución de lavado con ASB por medio de centrifugaciones a 11000 rpm durante 10 min a 4°C. El precipitado de mitocondrias obtenido fue lavado en solución de lavado sin ASB y finalmente resuspendido en el mínimo volumen de esta solución.

Finalizada la preparación de las mitocondrias, se determinó la cantidad de proteína presente según el punto 2.12.2.2.

### **2.13.2. Síntesis *in vitro* y marcación de proteínas**

A fin de obtener las proteínas de *Arabidopsis thaliana* marcadas radiactivamente, se sintetizaron las mismas a partir de los correspondientes clones de ADNc por medio de reacciones de transcripción y traducción acopladas, en presencia de [<sup>35</sup>S]metionina. Se utilizó un lisado de reticulocitos (Promega) y las reacciones se realizaron según las instrucciones del proveedor. Luego de realizadas estas reacciones, se analizó el producto de las mismas a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (ver punto 2.14). Las proteínas marcadas fueron precipitadas con sulfato de amonio (66% de saturación) como lo han descrito Diekert y col. (2001).

### **2.13.3. Importación de proteínas a mitocondrias aisladas**

Los experimentos de importación se realizaron según lo describen Duchêne y col. (2001). En las reacciones de importación se utilizaron 50 µg de mitocondrias aisladas de papa (obtenidas según se describe en el punto 2.13.1) en solución de importación (ver anexo II), ADP 4 mM y ATP 100 mM. Para la importación, se incorporó una fracción de las proteínas, marcadas como se describe anteriormente, a las mitocondrias en la solución de importación. Posteriormente, las reacciones de importación fueron tratadas con 100 µg/ml de proteinasa K (PK) durante 10 min a 4°C. Luego del tratamiento con PK se agregó PMSF 1 mM para detener la reacción enzimática. Las organelas fueron recuperadas por centrifugación a través de un colchón de sacarosa al 22% a 15000 x g

durante 15 min. Algunas reacciones de importación se realizaron en presencia de valinomicina 2  $\mu\text{M}$  durante 10 min a 4°C o bien se trataron con Tritón X-100 1% luego de la importación.

A fin de obtener mitoplastos, se resuspendieron las mitocondrias, luego de la importación, en fosfato de potasio 10 mM (pH 7,5) y se incubaron en hielo durante 20 min para permitir la ruptura de la membrana externa. En algunos casos, las mitocondrias fueron resuspendidas en fosfato de potasio 10 mM (pH 7,5) y se logró la ruptura de las membranas por medio de tres ciclos de congelamiento/descongelamiento. Las membranas y la fracción soluble fueron separadas a través de una ultracentrifugación a 100000 x g durante 15 min a 4°C.

Todas las fracciones obtenidas luego de la importación fueron analizadas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (ver punto 2.14) y estos geles fueron expuestos a películas Kodak X-AR.

A fin de analizar la naturaleza de cada una de las fracciones obtenidas y la integridad de las mitocondrias y mitoplastos, se realizaron ensayos de Western blot (ver punto 2.15) con anticuerpos específicos de marcadores de las distintas fracciones mitocondriales (SOD como proteína soluble de la matriz y CCMH como proteína de membrana interna expuesta al espacio intermembrana).

#### **2.14. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida**

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 12-15% (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 mediante incubación durante 3 min a 100°C en solución de siembra de proteínas (ver anexo II). Una vez terminada la corrida electroforética los geles fueron sumergidos en solución colorante de proteínas.

En el caso de realizar una electroforesis de proteínas en condiciones nativas, el gel fue preparado de la manera antes descrita pero obviando el agregado de SDS. La separación electroforética fue llevada a cabo en solución amortiguadora Tris-glicina (ver anexo II), aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel. No se realizó ningún pretratamiento de las muestras antes de sembrarlas en el gel, agregándose sólo solución de siembra (ver anexo II), la cual posee una composición distinta a la empleada en los geles desnaturalizantes.

## **2.15. Técnica de Western blot**

Luego de la separación de las proteínas en un gel de poliacrilamida con SDS tal como se ha descrito anteriormente, éstas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa ECL (Amersham Pharmacia) a través de la generación de un campo eléctrico y en presencia de una solución de transferencia (ver anexo II) durante 1-4 horas a 300 mA y 4°C.

Luego de la transferencia, se bloqueó la membrana durante 1 h en solución bloqueante (ver anexo II). Transcurrido este tiempo, se retiró la solución bloqueante y se incorporó el primer anticuerpo (antiSOD o antiCCMH) en solución bloqueante fresca y se incubó durante 2 h. Luego se realizaron tres lavados con TBS 1X-Tween 0,1% (p/v) (ver anexo II) y se agregó el anticuerpo secundario (antiIgG de conejo conjugado a peroxidasa) en solución bloqueante. Luego de 1 h de incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados con TBS 1X-Tween 0,1% (p/v) y se reveló con SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE) y posterior exposición a películas CL-X Posure™ Film (PIERCE).

## **2.16. Análisis histoquímico de isoenzimas de SOD**

Para la determinación de las isoenzimas de SOD se prepararon extractos proteicos a partir de plántulas de dos semanas crecidas en placas de Petri bajo diferentes condiciones. Las plantas fueron pulverizadas en un mortero con la ayuda de nitrógeno líquido y este material fue resuspendido en solución amortiguadora de extracción (Shikanai y col., 2003) (ver anexo II). La concentración de proteínas fue determinada como se describe en el punto 2.12.2.2. Luego, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas utilizando 30 µg de proteínas de cada muestra, como se describe en 2.14. La detección histoquímica, sobre el gel de poliacrilamida, se realizó según Beauchamp y Fridovich (1971). El gel fue incubado en una solución que contenía NBT 1,23 mM durante 15 min. Luego, dicha solución fue reemplazada por TEMED 28 mM y riboflavina 0,028 mM en solución amortiguadora de fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0) y se incubó nuevamente el gel en oscuridad durante 15 min. Al finalizar el tiempo de incubación, el gel fue lavado con agua e iluminado hasta visualizar las bandas correspondientes a las isoformas de SOD. Una vez identificadas las bandas correspondientes, se detuvo la reacción mediante incubación del gel en ácido acético 6% (v/v).

## **2.17. Determinación histoquímica de la producción de ROS**

El análisis histoquímico de la producción de ROS se realizó en plantas de dos semanas, crecidas en tierra. Estas plantas fueron lavadas cuidadosamente con agua e incubadas en una solución que contenía DAB (diaminobezidina) 1,4 mM o NBT (*nitro blue tetrazolium*) 0,6 mM, durante 16 h o 4 h, respectivamente. Luego de la incubación, las plantas fueron clarificadas con etanol para ser analizadas posteriormente.

### **2.18. Inspección microscópica de embriones de Arabidopsis**

Las semillas o embriones aislados fueron fijados en glutaraldehído 2% y luego clarificados en solución de Hoyer (ver anexo II) durante 2 h. Las semillas o embriones aislados en diferentes estadios de desarrollo fueron observados en un microscopio E800 con óptica de Nomarski y fotografiados con una cámara Nikon DXM1200.

### **2.19. Análisis histoquímico de la actividad COX en embriones de Arabidopsis**

Los embriones fueron aislados a partir de las semillas y fijados inmediatamente en una solución de fijación (ver anexo II) a 4°C durante una hora, según lo descrito por Baud y Graham (2006). Luego de la fijación, se centrifugaron los embriones a baja velocidad y fueron lavados dos veces con agua destilada. Estos embriones fueron incubados en 250 µl de una solución para el análisis histoquímico de la actividad COX (ver anexo II), a 37 °C durante 4h (Wong-Riley 1979).

En algunos casos, se agregó KCN 1 mM a la reacción a fin de inhibir la actividad COX. Luego de la incubación, la reacción fue detenida reemplazando la solución anterior con agua. Los embriones fueron analizados con un microscopio Nikon E200 y fotografiados con una cámara Nikon COOLPIX995.

### **2.20. Análisis de la elongación del tubo polínico**

Los ensayos de germinación de polen se realizaron mediante incubación *in vitro* de granos de polen aislados. Se prepararon portaobjetos con una capa de medio de germinación (ver anexo II) y se “pinceló” el mismo con anteras maduras. Estos portaobjetos fueron incubados en cámara húmeda durante 6 h a 25°C. Pasado este tiempo, se observaron los portaobjetos al microscopio óptico.

### **2.21. Análisis del contenido de clorofila en hojas de Arabidopsis**

A fin de determinar el contenido de clorofila de hojas de Arabidopsis, se pulverizaron dichas hojas en un mortero con la ayuda de nitrógeno líquido y este material fue resuspendido en acetona 80% (v/v). Luego de agitar enérgicamente, se incubó el extracto a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. Pasado este tiempo se centrifugó el extracto a 12000 rpm durante 5 min y se utilizó el sobrenadante para las medidas espectrofotométricas.

Se realizaron mediciones a 645 nm y 663 nm. En el caso de la clorofila total, se utilizó el protocolo descrito por Chory y col. (1994) y la fórmula que se aplicó es la siguiente:  $20,2 (\text{Absorbancia}_{645 \text{ nm}}) + 8,02 (\text{Absorbancia}_{663 \text{ nm}})$ . En el caso de la clorofila a y b, se utilizó el protocolo descrito por Piechulla y col. (1987) y las fórmulas aplicadas fueron las siguientes:  $12,7 (\text{Absorbancia}_{663\text{nm}}) - 2,69 (\text{Absorbancia}_{645\text{nm}})$  para la clorofila a y  $22,9 (\text{Absorbancia}_{645\text{nm}}) - 4,68 (\text{Absorbancia}_{663\text{nm}})$  para la clorofila b.

### **2.22. Análisis del contenido de cobre total en plantas de Arabidopsis**

A fin de medir el cobre total en plantas de Arabidopsis, se utilizaron plantas de 4 semanas crecidas en tierra, según las condiciones descriptas en 2.1.1.1. Se cosecharon las plantas, se lavaron los tejidos en agua durante 5 min y, luego de escurrirlos, se secaron en estufa a 95°C durante 24 horas. Pasado este tiempo, se determinó el peso seco de las muestras y se digirió en HNO<sub>3</sub> concentrado a 115°C durante 12 horas. El precipitado fue disuelto en agua y analizado por medio de un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo AAnalyst 5000 con horno de grafito con muestreador automático serie AS-800.

## ANEXO I

**Tabla de oligonucleótidos utilizados para chequear las distintas líneas de plantas con inserción de T-DNA**

Nombre	5' → 3'	Línea SALK	Dirección <sup>1</sup>	Sitio de clonado
<b>LBb1</b>	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT			
<b>SCO1.1</b>	TCGAAACATGACTCAGGT	057821	directa	
<b>SCO1.2</b>	GTAATAGTAGTCTACTCTA	057821	reversa	
<b>SCO2SALK</b>	GTAAATCAACAAGACAGGG	008313	directa	
<b>SCO2WT</b>	CCACAAAAGTCATTCTCTG	008313	reversa	
<b>PSCO1a</b>	GCGAAGCTTGATTATGCAAACCAACTG	032461	directa	<i>HindIII</i>
<b>PSCO1b</b>	CCGGGATCCACGCCAATGACGACCAAT	032461	reversa	<i>BamHI</i>

<sup>1</sup> Dirección respecto de la orientación de la hebra codificante.

**Tabla de oligonucleótidos utilizados para generar las distintas construcciones para el análisis de las regiones promotoras de los genes en estudio, y para el análisis de las mismas**

Nombre	5' → 3'	Promotor	Dirección <sup>1</sup>	Sitio de clonado
<b>P191a</b>	GGCAAGCTTTTTTCAGGGGATTCCTAA	<i>AtCOX19-1</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>P191b</b>	GCGAGATCTGTCTCTGTTTCCTCCAAA	<i>AtCOX19-1</i>	reversa	<i>BglII</i>
<b>P191c</b>	GGCAAGCTTTGGATCCAGTAAGTACAT	<i>AtCOX19-1</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>P191d</b>	GGCAAGCTTGTCAACCACAAAAGTGT	<i>AtCOX19-1</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>P191e</b>	CCCAAGCTTCGAAACATACACAATCC	<i>AtCOX19-1</i>	directa	<i>HindIII</i>

<b>P19mutIIF</b>	ATGGGCCATTATGGGCCTGAACCAA	<i>AtCOX19-1</i>	directa	
<b>P19mutIR</b>	AGGATCATAATGGTTCATACCTTCG	<i>AtCOX19-1</i>	reversa	
<b>P19-I</b>	CTGTACTCATATCGAGCCT	<i>AtCOX19-1</i>	reversa	
<b>19-6</b>	AGGCTCGATATGAGTACAG	<i>AtCOX19-1</i>	directa	
<b>P192a</b>	GGCAAGCTTAACGGATCCAACACGATG	<i>AtCOX19-2</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>P191b</b>	GCGAGATCTGTCTCTGTTTCTCCAAA	<i>AtCOX19-2</i>	reversa	<i>BglII</i>
<b>P171a</b>	GGCGTCGACTGAATGTCCCAAGCAAGC	<i>AtCOX17-1</i>	directa	<i>SalI</i>
<b>P171b</b>	GGCAGATCTATCCTGTAGACAACGAAAA	<i>AtCOX17-1</i>	reversa	<i>BglII</i>
<b>P171c</b>	GGCAAGCTTGACTCAGTGCTAAAACAAA	<i>AtCOX17-1</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>P171-I</b>	GGCAGATCTATCCTTTGAATGAATTTGCA G	<i>AtCOX17-1</i>	reversa	<i>BglII</i>
<b>P171mutIIF</b>	AACACTTTAGACCAATCAGATGTTCTCGT AGC	<i>AtCOX17-1</i>	directa	
<b>P171mutIIR</b>	TGATTGGTCTAAAGTGTCTAGGTTTCATT TGTT	<i>AtCOX17-1</i>	reversa	
<b>P172a</b>	GGCGTCGACTTAAGTTTTGGTTTTAGATA C	<i>AtCOX17-2</i>	directa	<i>SalI</i>
<b>P172b</b>	GGGGGATCCCTCCGACCTATCAT	<i>AtCOX17-2</i>	reversa	<i>BamHI</i>
<b>P172-I</b>	CGCGGATCCCTTTGATCGGCTTGAA	<i>AtCOX17-2</i>	reversa	<i>BamHI</i>
<b>P172c</b>	CCGGTCGACGTAAAAGAAGAATCAGAGAT	<i>AtCOX17-2</i>	directa	<i>SalI</i>
<b>P172mutIIF</b>	CTGAAAAGAACATCAACAGAACATTA ACT	<i>AtCOX17-2</i>	directa	
<b>P172mutIIR</b>	TGTTGATGTTCTTTTCAGGTTTCATTTACT	<i>AtCOX17-2</i>	reversa	
<b>P11a</b>	GGGAAGCTTTCTACTGCCACA	<i>AtCOX11</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>P11b</b>	GGGGGATCCGAGATGGCCGAAGAGAAAT	<i>AtCOX11</i>	reversa	<i>BamHI</i>
<b>P11c</b>	GGCAAGCTTAAGTATGAAATGACAATA	<i>AtCOX11</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>P11-IF</b>	GGTTTACCTATAAGTGTTTTTGTGTGG	<i>AtCOX11</i>	directa	
<b>P11-IR</b>	AACACTTATAGGTAAACCAGACGGCGT	<i>AtCOX11</i>	reversa	
<b>P11mutIIF</b>	TTATTGAACCAAATAATATGTTCTTACAA T	<i>AtCOX11</i>	directa	
<b>P11mutIIR</b>	TATTATTTGGTTCAATAAAGAACAAATGA A	<i>AtCOX11</i>	reversa	
<b>PSC01a</b>	GCGAAGCTTGATTATGCAAACCAACTG	<i>AtSCO1</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>PSC01b</b>	CCGGGATCCACGCCAATGACGACCAAT	<i>AtSCO1</i>	reversa	<i>BamHI</i>
<b>PSC01c</b>	GCGTCTAGAAAACTGGGGGTGGAAAGCA TA	<i>AtSCO1</i>	directa	<i>XbaI</i>
<b>PSC02a</b>	GGCAAGCTTCCCGGATCGCTATTCTCTG	<i>AtSCO2</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>PSC02b</b>	GGCGTCGACTGAATTTGGTTCTTCTTCTC T	<i>AtSCO2</i>	reversa	<i>SalI</i>
<b>GUSNH<sub>2</sub></b>	TTGGGGTTTCTACAGGAC			

<sup>1</sup> Dirección respecto de la orientación de la hebra codificante.

**Tabla de oligonucleótidos utilizados para generar clones de ADNc de los genes de interés a fin de utilizarlos en la transformación de levaduras y, en el caso de *AtSCO1*, para transformar plantas**

Nombre	5' → 3'	Gen	Dirección <sup>1</sup>	Sitio de clonado
<b>RALF3</b>	CCGGAGCTCAGGATCAGGCCCTTATGG	<i>AtSCO1</i>	reversa	<i>XhoI</i>
<b>SCO1.4</b>	GGCTCTAGATCAGCTCGCAGGAAAGAA	<i>AtSCO1</i>	directa	<i>XbaI</i>
<b>19-3</b>	GGCAAGCTTTTACAAAGATGAGTACAGGTGGAGC A	<i>AtCOX19-1.1</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>19-5</b>	GGCAAGCTTTTCTTTTGTCAACCTTTCA	<i>AtCOX19-1.1</i>	reversa	<i>HindIII</i>
<b>19-4</b>	GGCAAGCTTTTACAAAGATGATCACTATAAAGTT CG	<i>AtCOX19-1.2</i>	directa	<i>HindIII</i>
<b>COX11FB</b>	GGCGGATCCTACAAAGATGTCGTGGTCGAAAGC T	<i>AtCOX11</i>	directa	<i>BamHI</i>
<b>COX11RE</b>	GGCGAATTCTAAAAAACATGGACACTTTTTTTTA	<i>AtCOX11</i>	reversa	<i>EcoRI</i>
<b>COX11FE</b>	GGCGAATTCTACAAAGATGTCGTGGTCGAAAGC T	<i>AtCOX11</i>	directa	<i>EcoRI</i>
<b>COX11RB</b>	GGCGGATCCTAAAAAACATGGACACTTTTTTTTA	<i>AtCOX11</i>	reversa	<i>BamHI</i>

<sup>1</sup> Dirección respecto de la orientación de la hebra codificante.

**Tabla de oligonucleótidos utilizados para realizar transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa o semicuantitativa**

Nombre	5' → 3'	ADNc	Dirección <sup>1</sup>
<b>dT<sub>v</sub></b>	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (V=A, C o G)		
<b>Actin-F</b>	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	<i>ACT2/ACT8</i>	directa
<b>Actin-R</b>	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	<i>ACT2/ACT8</i>	reversa
<b>RTSCO2F</b>	CCCATATAGTAATATTTTATTCTTC	<i>AtSCO2</i>	directa
<b>RTSCO2R</b>	TAATAACTGAAAAGTATGATTATG	<i>AtSCO2</i>	reversa

<b>RTSCO1F</b>	GGAAGCTCATCATTAAATAAGGAT	<i>AtSCO1</i>	directa
<b>RTSCO1R</b>	CCCTTATAGTATGGATACTACCG	<i>AtSCO1</i>	reversa
<b>19-1</b>	CATCAAGTTCTTAGCCATTC	<i>AtCOX19-1/2</i>	reversa
<b>19-2</b>	GCTCGATATGAGTACAG	<i>AtCOX19-1/2</i>	directa

<sup>1</sup> 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<sub>3</sub> 1,9 g/l; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,65 g/l; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,44 g/l; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,37 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 g/l; Na<sub>2</sub>EDTA 37,3 mg/l; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27,8 mg/l; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 22,3 mg/l; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6,2 mg/l; ZnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,25 mg/l; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,025 mg/l; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>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 King's B:** Proteosa peptona N° 3 20 g/l; glicerol 1% (p/v); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,6 g/l. (pH 7,2). Para preparar medio King's B sólido se agrega agar al 1,5% (p/v)

**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)

**TE:** Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,5)

**Medio YPD:** Peptona de carne 20 g/l; dextrosa 20 g/l; extracto de levadura 10 g/l. Para preparar medio YPD sólido se agrega agar al 1,5% (p/v)

**Medio YEPG:** Peptona de carne 20 g/l; extracto de levadura 10 g/l; glicerol 30 ml/l; etanol 20 ml/l. Para preparar medio YEPG sólido se agrega agar al 1,5% (p/v)

**Medio Yeast Nitrogen Base (Fluka):** Ácido p-aminobenzoico 200 µg/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l; biotina 2 µg/l; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 500 µg/l; CaCl<sub>2</sub> 0,1 g/l; pantotenato de calcio 400 µg/l; CuSO<sub>4</sub> 40 µg/l; FeCl<sub>3</sub> 200 µg/l; ácido fólico 2 µg/l; histidina HCl 10 mg/l; inositol 2 mg/l; MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/l; MnSO<sub>4</sub> 400 µg/l; metionina 20 mg/l; niacina 400 µg/l; IK 100 µg/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l; piridoxina HCl 400 µg/l; riboflavina 200 µg/l; NaCl 0,1 g/l;

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 200 µg/l; tiamina HCl 400 µg/l; triptofano 20 mg/l; ZnSO<sub>4</sub> 400 µg/l. (pH 5,4±0,5)

**Medio Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements, without histidine, leucine, tryptophan and uracil (Sigma):** este medio posee todos los aminoácidos que necesita *Saccharomyces cerevisiae* para crecer, excepto histidina, leucina, triptofano y uracilo. Cada aminoácido está presente en una concentración de 76 mg/l. Además contiene adenina 18 mg/l; inositol 76 mg/l; ácido p-aminobenzoico 8 mg/l.

**Aminoácidos utilizados para suplementar el medio selectivo de las transformantes de *Saccharomyces cerevisiae*:** leucina 30 mg/l; triptofano 20 mg/l; histidina 20 mg/l, uracilo 20 mg/l

**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 de lisis de extracción de ADN de *Saccharomyces cerevisiae* por minipreparación:** Tritón X-100 2% (p/v); SDS 1% (p/v); NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); EDTA 1mM (pH 8,0)

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

**Solución TAE 1X:** Tris-acetato 40 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM

**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 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); MgCl<sub>2</sub> 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 (dN<sub>6</sub>)

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); MgCl<sub>2</sub> 0,125 M); 18 μl β – mercaptoetanol; 5 μl dATP; 5 μl dCTP; 5 μl dTTP (0,1M c/u)

*Solución B:* Hepes 2M (pH 6,6)

*Solución C:* Hexanucleótidos de secuencia al azar (dN<sub>6</sub>) de concentración 90 DO/ml

**Solución amortiguadora de extracción de proteínas para prueba fluorométrica de ensayo de actividad β-glucuronidasa:** Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,0); EDTA 10 mM (pH 8,0); SDS 0,1%; β-mercaptoetanol 10 mM; Tritón X-100 1%

**Solución amortiguadora de extracción de mitocondrias:** Manitol 0,3 M; difosfato de sodio 30 mM; EDTA 2mM; ASB 0,3% (p/v); polivinilpirrolidona 25000 0,8% (p/v); cisteína 0,05% (p/v); glicina 5 mM; β-mercaptoetanol 2 mM. (pH 7,5)

**Solución de lavado de extracción de mitocondrias:** Manitol 0,3 M; fosfato de potasio 10 mM (pH 7,5); EDTA 1 mM; glicina 5 mM; ASB 0,1% (p/v)

**Solución gradiente de Percoll:** Sacarosa 0,3 M; fosfato de potasio 10 mM (pH 7,5); EDTA 1 mM; ASB 0,1% (p/v); 28-30% Percoll

**Solución de importación a mitocondrias:** Manitol 600 mM; KCl 40 mM; fosfato de potasio 2 mM (pH 7,5); malato 2 mM; NaOH 2mM; DTT 2 mM; Hepes-KOH 20 mM (pH 7,5)

**LAEMMLI 1X:** Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% (p/v). (pH 8,3).

**Solución de siembra para proteínas en geles desnaturalizantes:** Tris-HCl 10 mM (pH 7,0); EDTA 2 mM (pH 8); SDS 2% (p/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 0,5% (p/v); azul de bromofenol 0,5 mg/ml.

**Solución colorante de geles de proteínas:** Coomassie 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 amortiguadora Tris-glicina:** Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM. (pH 8.3)

**Solución de siembra para proteínas en geles nativos:** Tris-HCl 63 mM (pH 6,8); glicerol 10% (p/v); azul de bromofenol 0,1 mg/ml.

**Solución de transferencia:** Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20% (v/v)

**Solución bloqueante:** leche descremada 5% (p/v) en PBS 1X

**Solución de TBS 1X:** Tris 20 mM (pH 7,6); NaCl 0,9% (p/v)

**Solución de Hoyer:** Goma arábica 11,5% (p/v); hidrato de cloral 9,3 M; glicerol 7,7% (p/v)

**Solución de fijación para embriones:** Paraformaldehido 2% (v/v); polivinilpirrolidona 40 2% (p/v); DTT 1mM. (pH 7,0)

**Solución para análisis histoquímico de actividad COX:** DAB (diamino-benzidina) 1,4 mM; sacarosa 100 mM; fosfato de potasio 0,1 M (pH 7,4)

**Medio de germinación de granos de polen:** Sacarosa 17% (p/v); CaCl<sub>2</sub> 2mM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1,65 mM; agar 0,6% (p/v). (pH 7,0)

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

**Solución amortiguadora de extracción de proteínas para analizar las isoformas de SOD:** Tris-HCl 0,15 M (pH 7,5)

### ***3. Resultados y Discusión***

## **3.1. CAPÍTULO I**

**“Identificación y caracterización de los genes que codifican homólogos a la proteína Cox17p en *Arabidopsis thaliana*”**

## CAPÍTULO I

### 3.1. Identificación y caracterización de genes que codifican homólogos a la proteína Cox17p en *Arabidopsis thaliana*

#### 3.1.1. Introducción

En los últimos años se ha estudiado intensamente la función de los factores que colaboran con el ensamblado de COX en levaduras y mamíferos. Por el contrario, en plantas se desconoce la naturaleza de dichos factores. La búsqueda en bases de datos de secuencias homólogas a las de los factores conocidos permitió la identificación de varios genes de *Arabidopsis* que codifican, al menos, diez proteínas diferentes que participarían en la biogénesis de COX. Dos de estos genes codifican proteínas homólogas a la metalochaperona de cobre Cox17p, involucrada en la transferencia del cobre para su inserción en las subunidades 1 y 2.

Tal como se expuso en la Introducción General, en un primer momento se postuló que Cox17p estaba involucrada en el transporte de cobre desde el citoplasma al espacio intermembrana, donde dos proteínas adicionales de la membrana interna, Cox11p y Sco1p, participan como intermediarios en la inserción del metal en Cox1p y Cox2p, respectivamente (Beers y col., 1997; Glerum y col., 1996a; Herrmann y Funes, 2005; Horng y col., 2004). La participación de esta proteína en el transporte de cobre es sustentada por la doble localización de Cox17p (Beers y col., 1997; Glerum y col., 1996a). Sin embargo, la existencia de un *pool* de cobre en la matriz mitocondrial, independiente de la presencia de Cox17p (Cobine y col., 2004), y la evidencia de que Cox17p participa activamente del ensamblado de COX cuando se restringe su localización al espacio intermembrana (Maxfield y col., 2004), no coinciden con la idea

de un transporte de cobre hacia la mitocondria mediado por esta proteína. En función de estas evidencias, aún se desconoce la función citoplasmática de Cox17p.

Balandin y Castresana (2002) reportaron la presencia de una proteína COX17 en *Arabidopsis* (AtCOX17). Identificaron un ADNc correspondiente a un gen localizado en el cromosoma 3. La proteína AtCOX17 muestra 33% y 51% de identidad respecto de Cox17 de levaduras y humanos, respectivamente (Amaravadi y col., 1997; Beers y col., 1997; Glerum y col., 1996a; Srinivasan y col., 1998).

El nivel de transcritos correspondientes a *AtCOX17* se incrementa durante la infección con la cepa Pst DC3000 avrRpm1, la cual induce respuesta hipersensible, y con la cepa Pst DC3000, que establece una interacción compatible con *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0). Además, la expresión aumenta en presencia de efectores que inducen la generación de ROS. La expresión de *AtCOX17* también se incrementa en presencia de metales como cobre, zinc y cadmio (Balandin y Castresana, 2002). Pontier y col. (1999) demostraron que los tratamientos con cobre inducen muerte celular de manera semejante a la respuesta hipersensible, y en relación a ello, los niveles de *PR-1* (un gen inducible por esta respuesta) se incrementan en los mencionados tratamientos con cobre (Balandin y Castresana, 2002).

Al analizar con más detalle el genoma de *Arabidopsis*, se determinó la existencia de un segundo gen que codifica una proteína similar, aunque no idéntica, a AtCOX17. Este otro gen está localizado en el cromosoma 1. Se han denominado AtCOX17-1 y AtCOX17-2 a las proteínas codificadas en los cromosomas 3 y 1, respectivamente (Wintz y Vulpe, 2002).

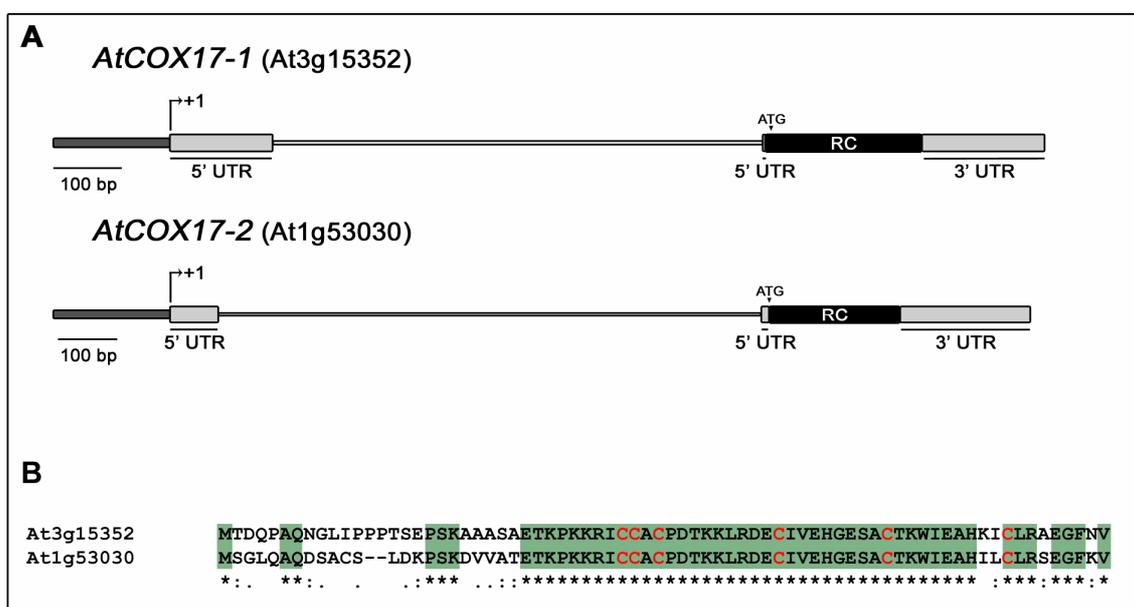
En función de las evidencias previas, las proteínas AtCOX17 no sólo participarían en el ensamblado de COX, sino que también actuarían como efectores de la respuesta a estrés en las plantas. Nos interesó ahondar en este estudio y corroborar esta hipótesis.

### 3.1.2. Identificación de los genes que codifican homólogos a la proteína Cox17p

En el genoma de *Arabidopsis* encontramos dos genes que codifican proteínas similares a la proteína de levaduras Cox17p, localizados en los cromosomas 1 y 3 (At3g15352 y At1g53030). Estos genes fueron incorporados a las bases de datos como *AtCOX17-2* y *AtCOX17-1*, respectivamente (Wintz y Vulpe 2002). Ambos genes presentan un intrón en la región 5' no codificante, cercano al respectivo sitio de inicio de la traducción. Estos intrones poseen un tamaño relativamente grande (709 pb y 922 pb) comparados con el tamaño de los transcritos maduros, los cuales tienen 544 pb en el caso de *AtCOX17-1* y 530 pb en el caso de *AtCOX17-2* (Figura 12A). Estos genes codifican proteínas con una identidad del 69%. La región N-terminal de dichas proteínas es la porción que presenta una marcada diferencia (sólo 25% de aminoácidos idénticos), mientras que el resto de las proteínas presenta una alta conservación (más del 90% de identidad) (Figura 12B). Esta porción C-terminal conservada es la que contiene los residuos de cisteína involucrados en la unión de cobre y en la translocación a la mitocondria vía Mia-40 en la proteína de levaduras (Abajian y col. 2004, Mesecke y col. 2005)

Realizamos una búsqueda en bases de datos a fin de identificar proteínas que codifiquen homólogos a *AtCOX17* en varias especies de plantas (la búsqueda además incluyó otros eucariotas). Las proteínas COX17 de plantas presentan una amplia región C-terminal muy conservada (Figura 13, remarcado), la cual contiene los mencionados residuos involucrados en la unión de cobre y en la translocación a la mitocondria vía Mia-40 en la proteína de levaduras (Abajian y col. 2004, Mesecke y col. 2005). Notablemente, observamos dos diferentes proteínas COX17 tanto en monocotiledóneas como en algunas dicotiledóneas (Figura13). Los datos indican que ocurrió una duplicación de los genes *COX17* luego de la aparición de las monocotiledóneas, antes de la separación de los linajes que originaron arroz, maíz y cebada. En cuanto a las dicotiledóneas, podemos inferir la existencia de una duplicación, independiente de la mencionada anteriormente, antes de la divergencia entre *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus*. Por otro lado, parecen haber ocurrido otras duplicaciones que

originaron los genes de *Glycine max* y *Solanum tuberosum*, mientras que en girasol observamos la existencia de un único gen que codifica un homólogo de COX17. Podemos concluir que las proteínas de Arabidopsis, así como las de otras dicotiledóneas, se han originado en eventos de duplicación génica relativamente recientes.



**Figura 12:** (A) Estructura de los genes *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2*. Las regiones codificantes (RC) se muestran en negro y las regiones no codificantes (UTR) en gris. La línea gris más delgada representa los intrones. (B) Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas *AtCOX17-1* (At3g53030) y *AtCOX17-2* (At1g15352). En verde se destacan los aminoácidos idénticos. En rojo están escritos los residuos de cisteína involucrados en la unión de cobre y en la importación a la mitocondria vía Mia-40 en la proteína de levaduras.

▼▼▼▼

```

Cel17 -----MPAEPQKSTEAGSV-----APEKKLKA CCACPETKRVRDACIIENGEEK-
Dm17  MGNSASQGVAAPSVSAAHPLTTASAATASTTTASAATAS -----GEKPKCKACCACPETKRARDACIVENGEEEN-
Xl17  -----MSSLAAASCESLSPSAES-----QEKKPLKP CCACPETKKARDACIIENGEEK-
Hs17  -----MPGLV----DSNPAPPES-----QEKKPLKP CCACPETKKARDACIIENGEEH-
At17-1 -----MTDQPA-----QNGLIPPTSEPSKAAAS-----AETKPKKKRI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Bn17-1 -----MSNQPA-----KDGAVPLPVSD-SKAAA-----AETKPKKKRI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
At17-2 -----MSGLQA-----QDSACSL--DKPSKDVA-----TETKPKKKRI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Bn17-2 -----MSGLQA-----QESACSL--SQPSKDVA-----TETKPKKKRI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Gm17-1 -----MSGAQL-----RSASPALIIQGSQKNEGSVAVATAAESKPKKKI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Gm17-2 -----MSGAQL-----QSASPALTIQGSQKNVGSVAVATAAESKPKKKI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Ha17  -----MSGLQT-----QDFPSALRLTKAQKQDGS----TESETKPKKKI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Os17-1 -----MGSTEHPIPA----QSPACPTVSEGGSAAPAP----ATDSKPKKKI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Hv17-1 -----MGSTESPAPV----QTPAAACSIIV--NQAPAP----ATDSKPKKKI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Zm17-1 -----MSCAELPLPVTVTLPEPAPVNGEGSSAATAAAP----GAGSKPKKKI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
St17-1 -----MGASSQLGDG-LSKENTSTATSSQLPKDEKPAPATVPADS KPKKKI CCACPETKKVRDECIVEHGESA-
St17-2 -----MGG-----LPIANTSTTISLSKLPKDKQSAASTMP-DSKPKKKI CCACPETKKLRDECIVEHGESA-
Os17-2 -----MGNTASG-----ATEASDSTEKTEQ-APPAD-----TKPKKKI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Hv17-2 -----MGNASASP-----TAVAPVAEEKTGQ-APAPD-----TKPKKKI CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Zm17-2 -----MGNTTSV-----QAEASDSAQKPATAPAPG-----SKPKK-I CCACPDTKKLRDECIVEHGESA-
Dd17  -----MSIAETNTTTEVA-----PKKKM CCACPETKKVRDECIVANGEEK-
Cr17  -----MGASGS-----KPEGAGPGPALPTSPAPPVPIGPDGPKPK-I CCSCPDTKKLRDECIVANGEEHA-
Sp17  -----MSSSTEPSTATKVEPAPI-----ASEEKPKP CCACPETKQARDACMLQSSNGPI-
Sc17  -----MTETDKKQEQENHAE-----CEDKPKP CCVCKPEKKEERLTCILFNGQDSE-

```

\* \* \* \* \*

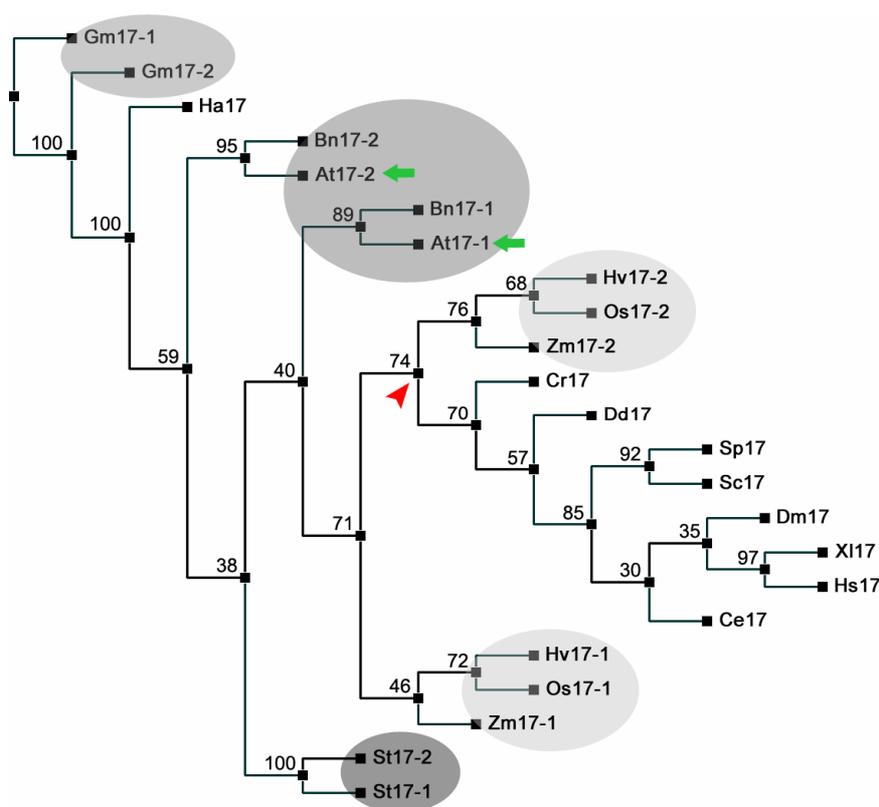
▼▼

```

Cel17 -CGKLEAHKACMRAAGFNI----
Dm17  -CLALIEAHKKCMRDAGFNI----
Xl17  -CQHLEAHKECMRSLGFKV----
Hs17  -CGHLEAHKECMRALGFKI----
At17-1 -CTKWIEAHKICLRAEGFNV----
Bn17-1 -CAKWIEAHKMCLRAEGFNV----
At17-2 -CTKWIEAHILCLRSEGFKV----
Bn17-2 -CTKWIEAHLMCLRSEGFKV----
Gm17-1 -CTKWIEAHLCLRRAEGFNV----
Gm17-2 -CTKWIEAHLCLRRAEGLNV----
Ha17  -CEKWIEAHLCLRRAEGFNV----
Os17-1 -CTKWIEAHRKCLRRAEGFNV----
Hv17-1 -CTKWIEAHKQCLRRAEGFKV----
Zm17-1 -CTKWIEAHRKCLRRAEGFNV----
St17-1 -CEKWIEAHLKCLRRAEGFNV----
St17-2 -CEKWIEAHRKCLRRAEGFKV----
Os17-2 -CGKWIEAHRQCLRRAEGFNV----
Hv17-2 -CGKWIEAHRQCLRRAEGFNV----
Zm17-2 -CGKLEAHLKCLRRAEGFSV----
Dd17  -CAALIEHLHKVCLRKEGFDV----
Cr17  -YQALIEAHKACL RVEGFKV----
Sp17  -EAKLIEAHKKCMAQYGYEV----
Sc17  -KCKEFIEKYKECMKGYGFVPSAN-

```

\* \*\* : \* : \* :



**Figura 13: (A) Alineamiento de secuencias de proteínas COX17.** Las secuencias proteicas fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994). Las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos están señaladas con un asterisco, aquellas ocupadas por aminoácidos relacionados están identificadas con uno o dos puntos de acuerdo al grado de conservación. Los residuos conservados están remarcados en verde. Las cisteínas conservadas, involucradas en la unión de cobre y en la translocación a la mitocondria vía Mia-40 en la proteína de levaduras, están señaladas con flechas. En amarillo están remarcados los residuos que se encuentran conservados sólo entre las especies de plantas. **(B) Árbol filogenético derivado de las secuencias proteicas de COX17.** Este árbol consenso fue derivado del alineamiento anterior. Los números indican el valor de *bootstrap* de cada grupo. La flecha roja señala el punto en donde se separan las proteínas COX17 de plantas. En gris oscuro están señaladas las proteínas duplicadas de dicotiledóneas y en círculos gris claro las de monocotiledóneas. Con flechas verdes se indican las proteínas de Arabidopsis. Se analizaron secuencias de *Caenorhabditis elegans* (Ce17, NM\_0497175), *Drosophila melanogaster* (Dm17, NM\_572998), *Xenopus laevis* (XI17, AAH84847), *Homo sapiens* (Hs17, NM\_005685), *Arabidopsis thaliana* (At17-1, NP\_566508; At17-2, AAK73497), *Brassica napus* (Bn17-1, FG573109; Bn17-2, GR447520), *Glycine max* (Gm17-1, AW569190; Gm17-2, ACU16002), *Helianthus annuus* (Ha17, CD846302), *Oryza sativa* (Os17-1, BAF10292; Os17-2, BAF25112), *Hordeum vulgare* (Hv17-1, CA014768; Hv17-2, CA011631), *Zea mays* (Zm17-1, ACG35110; Zm17-2, ACG26346), *Solanum tuberosum* (St17-1, CK640859; St17-2; EG014020), *Dictyostelium discoideum* (Dd17, XP\_636547), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr17, AAF82382), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp17, NM\_596649), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc17, NP\_013092).

### 3.1.3. Caracterización del patrón de expresión de *AtCOX17*

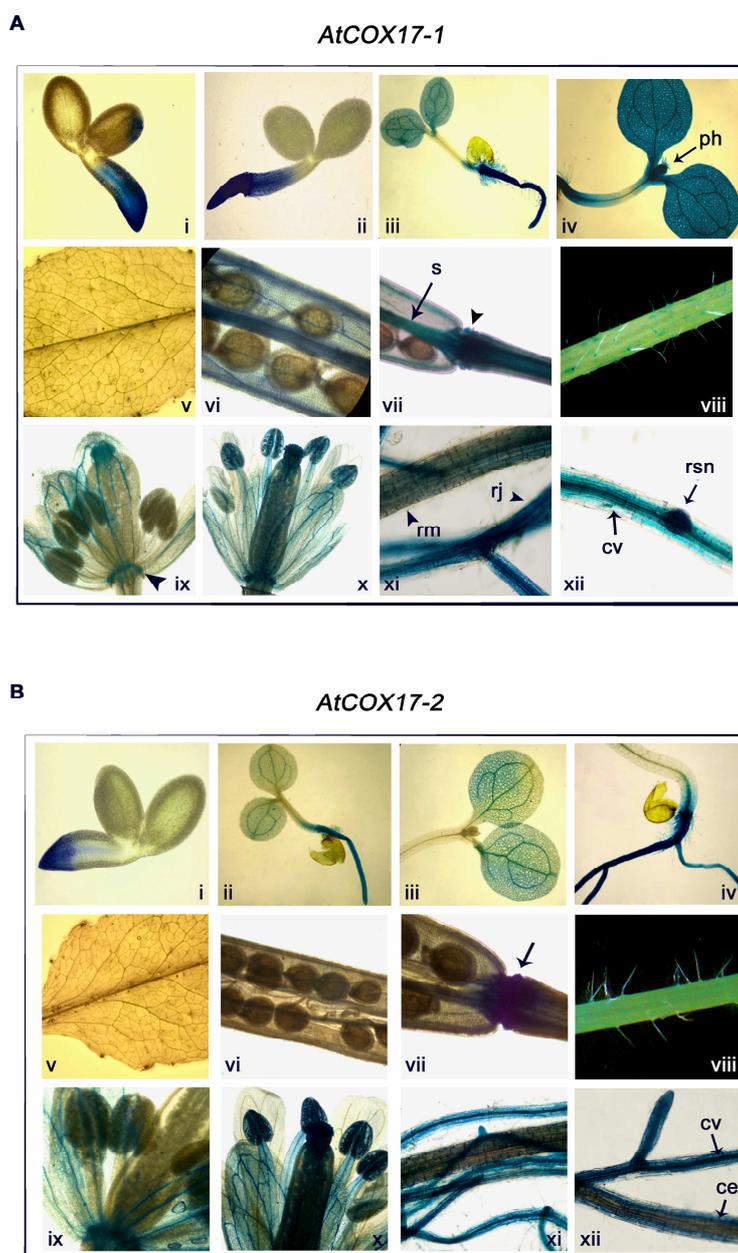
La duplicación de genes es una herramienta que permite la especialización de la función de un gen mediante la generación de isoformas de una proteína, las cuales presentan diferentes propiedades o diferentes patrones de expresión. En lo que respecta a las proteínas *AtCOX17*, presentan una alta conservación en las regiones consideradas funcionales en las mismas, lo cual nos sugiere que los cambios ocurridos luego de la duplicación pueden haber generado una alteración de los patrones de expresión. A fin de analizar los correspondientes patrones de expresión de los genes *AtCOX17*, aislamos las regiones promotoras de cada uno de ellos a partir de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*. Estos fragmentos, de 1719 pb y 1931 pb, correspondientes a *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2*, respectivamente, están compuestos por una región de aproximadamente 1 Kpb ubicada cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción y abarcan hasta el nucleótido -1 respecto del sitio de inicio de la traducción, incluyendo un intrón localizado en la región 5' no codificante. Dichos fragmentos fueron clonados en el vector binario pBI101.3 fusionados a la región codificante del gen reportero *gus*. Con los clones obtenidos, obtuvimos plantas transgénicas mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transformadas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina. Estas plantas fueron analizadas también a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3).

#### 3.1.3.1. Caracterización del patrón de expresión de genes *AtCOX17* mediante reacciones histoquímicas

A fin de analizar la expresión en diferentes tejidos del gen reportero *gus* dirigida por las regiones promotoras de los genes *AtCOX17*, realizamos un seguimiento de los patrones de expresión de 10 líneas independientes para cada construcción. Para tal fin

realizamos reacciones histoquímicas sobre las plantas, utilizando el sustrato X-gluc, y determinamos las zonas de expresión de GUS en distintos estadios de desarrollo.

En primer lugar, analizamos el patrón de expresión de GUS generado por la región promotora de *AtCOX17-1*. En la figura 14A se puede observar actividad GUS en las raíces de plántulas de 2, 3, 5 y 8 días, crecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X (Figura 14A, i, ii, iii y iv). Observamos esta actividad en las raíces desde etapas tempranas del desarrollo, localizándose en todos los tejidos que componen la raíz. En los cotiledones también observamos signos de actividad GUS, principalmente en el tejido vascular, y también en la lámina de los mismos (Figura 14A, iii y iv). Además observamos actividad GUS en los primordios de las hojas (14A iv). Debemos destacar que la actividad en estos órganos se evidencia luego de una incubación más prolongada con el sustrato cromogénico respecto de la coloración evidenciada en las raíces, lo cual nos sugiere que la actividad GUS es mayor en estas últimas. En los hipocótilos observamos una tinción parcial, quizás debido a la difusión del colorante desde las raíces, ya que el patrón que observamos no es uniforme y la tinción se restringe a la zona cercana a las raíces. En plantas adultas, crecidas en tierra, observamos actividad GUS en raíces, flores y vainas, mientras que tallos y hojas no presentan signos de coloración (Figura 14A, v-xii). El patrón de expresión en las raíces cambia durante el desarrollo. En raíces jóvenes la actividad GUS es particularmente evidente en el cilindro vascular y en las raíces secundarias nacientes (Figura 14A, xi y xii). En las raíces maduras se observa tinción especialmente en el tejido epidérmico (Figura 14A xi). En flores, detectamos una expresión fuerte en anteras maduras, especialmente en los granos de polen (Figura 14A, ix y x). Además, observamos actividad GUS en el estigma, el receptáculo y las venas de los sépalos. (Figura 14A, ix y x). En vainas se evidencia actividad en el septum, en las valvas que conforman la vaina y en las venas de las mismas (Figura 14A, vi y vii).

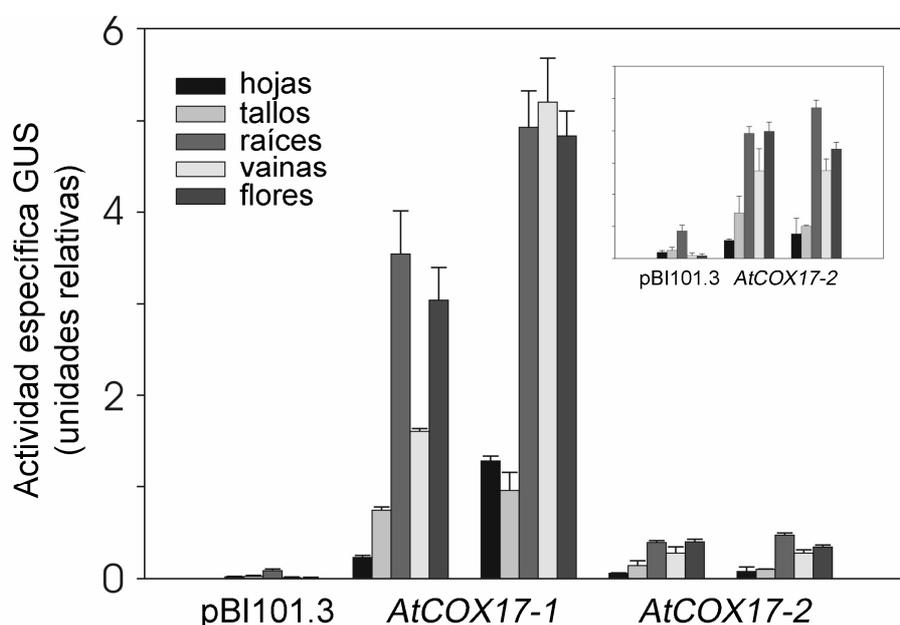


**Figura 14:** Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con las regiones promotoras de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* fusionadas al gen reportero *gus*. (A) *AtCOX17-1*: plantas de 2 (i), 3 (ii), 5 (iii) y 8 (iv) días; hojas (v), vainas (vi y vii), tallos (viii), flores (ix y x) y raíces (xi y xii) de plantas adultas. (B) *AtCOX17-2*: plantas de 2 (i), 5 (ii), 8 (iii) y 12 (iv) días; hojas (v), vainas (vi y vii), tallos (viii), flores (ix y x) y raíces (xi y xii) de plantas adultas. Abreviaturas: ph: primordios de hojas, s: septum, rj: raíces jóvenes, rm: raíces maduras, cv: cilindro vascular, rsn: raíz secundaria naciente, ce: células epidérmicas.

Luego, y a fin de realizar un análisis comparativo, analizamos el patrón de expresión de GUS generado por la región promotora de *AtCOX17-2*. En la figura 14B podemos observar que dicho patrón de expresión es esencialmente semejante al obtenido en el caso anterior. Debemos destacar que la incubación con el sustrato cromogénico debió prolongarse por más tiempo a fin de obtener niveles de tinción semejantes a los observados para *AtCOX17-1*, lo que nos sugiere que esta construcción produce menores niveles de expresión. Además, en el caso de *AtCOX17-2* se observaron muy bajos niveles de tinción en la lámina de los cotiledones y en los primordios de las hojas (Figura 14B, ii y iii). Esta característica diferencial puede deberse a la menor actividad de esta región promotora.

### **3.1.3.2. Análisis de los niveles de expresión mediante reacciones fluorométricas**

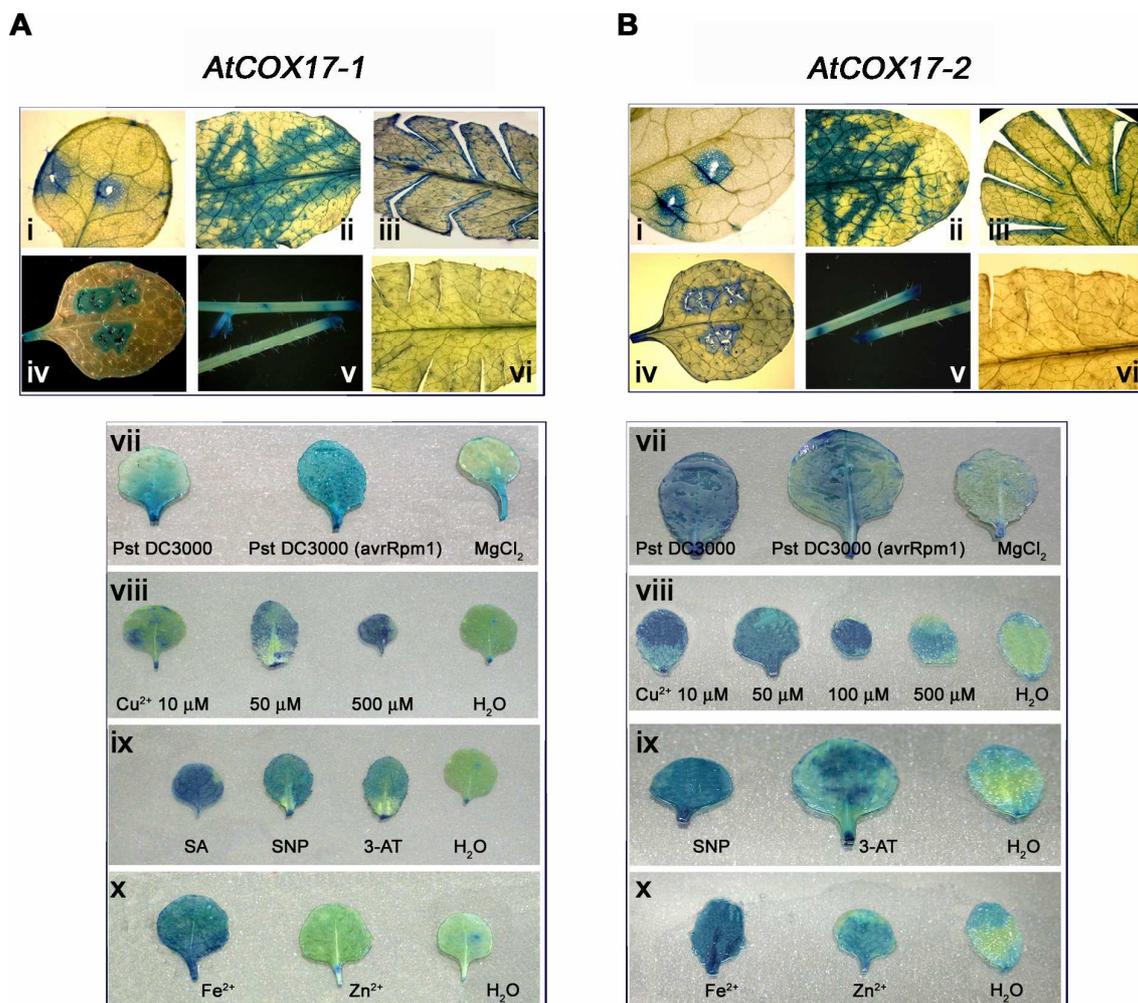
Con la finalidad de estimar los niveles de expresión relativa producidos por las regiones promotoras de los genes *AtCOX17*, realizamos ensayos fluorométricos de la actividad GUS. Para este análisis, preparamos extractos proteicos totales de diferentes órganos y procedimos como se detalla en Materiales y Métodos 2.12.2. Determinamos que ambos fragmentos promotores producen una baja expresión en hojas y tallos, en relación a la expresión en raíces, flores y vainas (Figura 15). Estos resultados coinciden con los ensayos histoquímicos de actividad GUS descritos anteriormente. Las reacciones fluorométricas nos permitieron cuantificar la mayor expresión dirigida por la región promotora de *AtCOX17-1* respecto de *AtCOX17-2*. De esta manera, determinamos que el fragmento promotor de *AtCOX17-1* genera de 7 a 10 veces mayor actividad GUS en ensayos realizados con 5 líneas independientes.



**Figura 15:** Análisis de la actividad GUS en extractos proteicos totales de diferentes órganos de plantas transformadas con las regiones promotoras de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* fusionadas al gen reportero *gus*. Se analizaron extractos proteicos de dos líneas independientes. Además, se determinó la actividad GUS en extractos de plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (pBI101.3). Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes. Se obtuvieron resultados similares utilizando diez líneas diferentes de cada construcción. El recuadro muestra los valores de actividad producidos por la región promotora de *AtCOX17-2* en relación a la actividad generada por la construcción que carece de promotor.

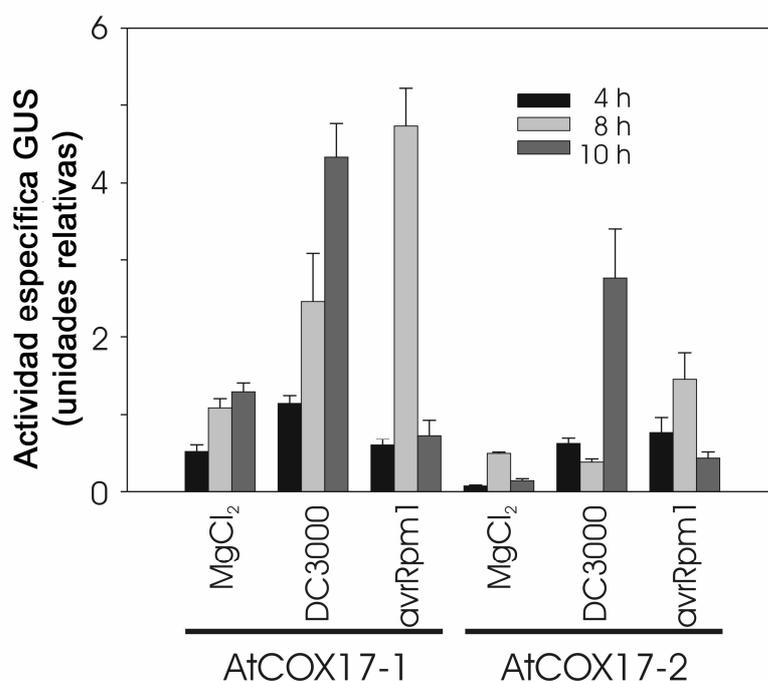
### 3.1.4. Análisis de la incidencia de factores de estrés biótico y abiótico en la expresión de los genes *AtCOX17*

Al realizar las reacciones histoquímicas, notamos la existencia de zonas intensamente teñidas en los órganos aislados. Estas zonas corresponden a los sitios en los cuales practicamos los cortes a fin de separar los órganos, o bien, en algunos casos, a zonas que se habían dañado durante la manipulación. En función de esta evidencia decidimos estudiar el efecto del daño mecánico sobre la expresión de los genes *AtCOX17*.



**Figura 16: Inducción del gen *gus* dirigida por las regiones promotoras de los genes *AtCOX17* en presencia de factores de estrés biótico y abiótico.** Se utilizaron órganos de plantas transformadas con las regiones promotoras de *AtCOX17-1* (A) o *AtCOX17-2* (B) fusionadas a *gus*. Dos horas antes del ensayo histoquímico, se practicaron punciones (i y iv), dobleces (ii) o cortes (iii, v y vi) en los respectivos órganos. Como control de este experimento se utilizaron plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX6b-1* fusionada a *gus* (vi). En la parte inferior de la figura se muestran hojas de plantas transformadas infiltradas con distintos reactivos o con suspensiones de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst DC3000: cepa virulenta; Pst DC3000 (avrRpm1): cepa avirulenta) ( $4 \times 10^8$  ufc/ml). Pasadas las 4 horas después de la infiltración, se sumergieron las hojas en una solución con el sustrato de GUS y se infiltraron durante 5 min. Luego de ello, se incubaron en dicha solución hasta observar el desarrollo de color. Como control de la infiltración con las cepas bacterianas se utilizó MgCl<sub>2</sub> 1 mM. En la infiltración de las hojas con los diferentes reactivos se emplearon: CuSO<sub>4</sub> a diferentes concentraciones, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, FeSO<sub>4</sub> 1 mM, 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) 4 mM, SNP (nitroprusiato de sodio) 1 mM o SA (ácido salicílico) 1 mM.

En la figura 16A y B (i-vi) podemos observar las zonas de expresión de GUS en hojas y tallos de las plantas a las cuales se les ha practicado algún tipo de injuria. Observamos un teñido intenso de las zonas localizadas en forma contigua a las zonas dañadas en los órganos de las plantas transformadas con las regiones promotoras de *AtCOX17-1* (Figura 16A, i-vi) y *AtCOX17-2* (Figura 16B, i-vi). Por el contrario, al utilizar como control del experimento plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX6b-1*, que codifica una subunidad de COX, no observamos actividad GUS en las cercanías de las zonas dañadas. Esto sugiere que el efecto es específico de los genes *AtCOX17*. Este resultado nos permite concluir que los genes *AtCOX17* se inducen en respuesta al daño en hojas y tallos.



**Figura 17: Inducción del gen *gus* dirigida por las regiones promotoras de *AtCOX17* frente al tratamiento con patógenos.** Se midió la actividad GUS en hojas de plantas transformadas con las regiones promotoras de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* luego de diferentes tiempos de exposición a las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato ( $4 \times 10^8$  ufc/ml) virulenta (DC3000) y avirulenta (avrRpm1). Como control de la infiltración se utilizó una solución de MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

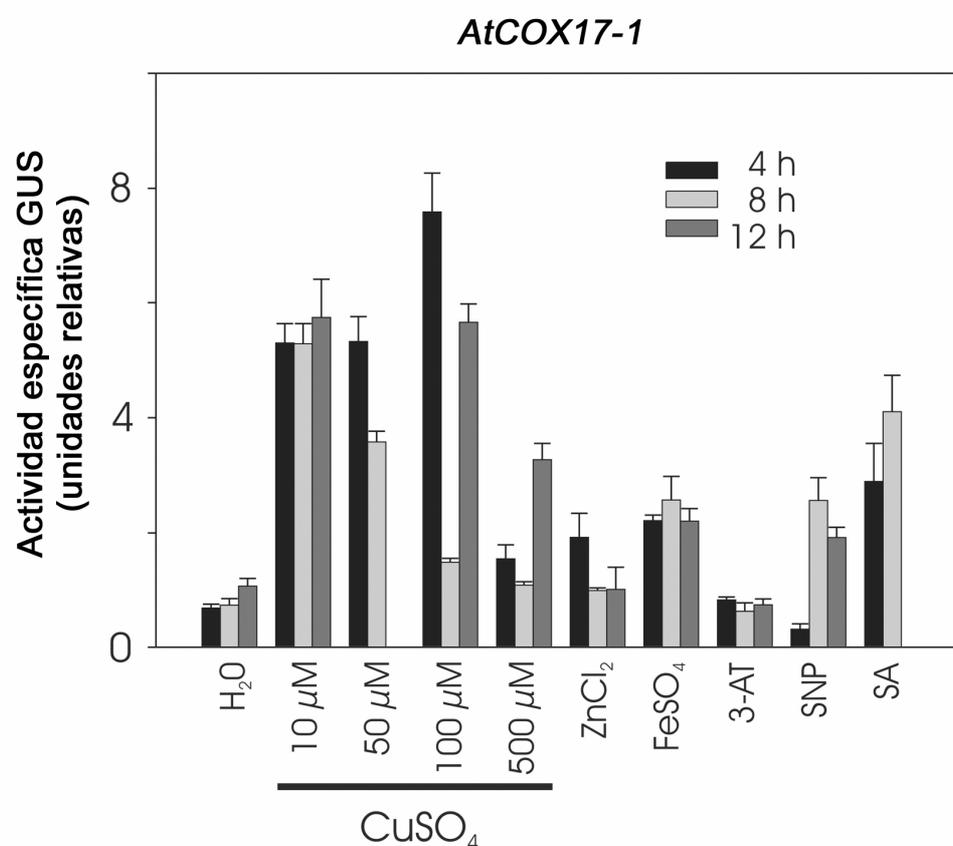
También evaluamos el efecto producido por la infección con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pv. tomato, observando un incremento de la actividad GUS en las hojas correspondientes a ambas construcciones (Figura 16A y B, vii). Luego de 4 horas de infección, observamos la inducción de la expresión del gen *gus* tanto en presencia de la cepa virulenta como de la avirulenta (esta cepa posee el gen *avrRpm1*) respecto de las hojas infiltradas con  $MgCl_2$  1 mM (Figura 17). Nuestros resultados indican que la actividad GUS, en ambos casos, es inducida de manera similar por las dos cepas utilizadas. Debemos destacar que la mayor inducción la observamos en etapas tempranas de la infección con la cepa avirulenta (Figura 17), lo cual nos sugiere la existencia de una relación entre la expresión de *AtCOX17* y la inducción de la respuesta hipersensible. De todos modos, observamos un incremento de la actividad GUS con ambas cepas a tiempos relativamente cortos.

Estas evidencias nos sugieren que la expresión de ambos genes *AtCOX17* se induce en las hojas de las plantas afectadas por factores de estrés biótico y abiótico, los cuales provocan daño a órganos o estructuras celulares. Estos factores provocan una rápida inducción de la expresión de *AtCOX17*, por lo que estas proteínas podrían participar de la respuesta primaria ante factores de estrés o estar asociadas directamente con la misma.

La inducción de *AtCOX17* podría estar asociada con el incremento de las ROS, las cuales participan activamente de la respuesta celular ante factores de estrés, actuando como mediadores. Por esta razón, analizamos el efecto del tratamiento de las hojas de las plantas transformadas con reactivos que provocan estrés oxidativo, como ácido salicílico (SA), nitroprusiato de sodio (SNP, el cual genera óxido nítrico) y 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT, un inhibidor de la catalasa). Realizamos reacciones histoquímicas sobre las hojas de las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX17-1* fusionada a *gus*. Luego de 4 horas post-infiltración con SA 1 mM (Figura 16A ix) observamos signos de la inducción del gen *gus*. Observamos un resultado similar en el caso de las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX17-2*, mientras que las hojas infiltradas con agua carecen de coloración o presentan una

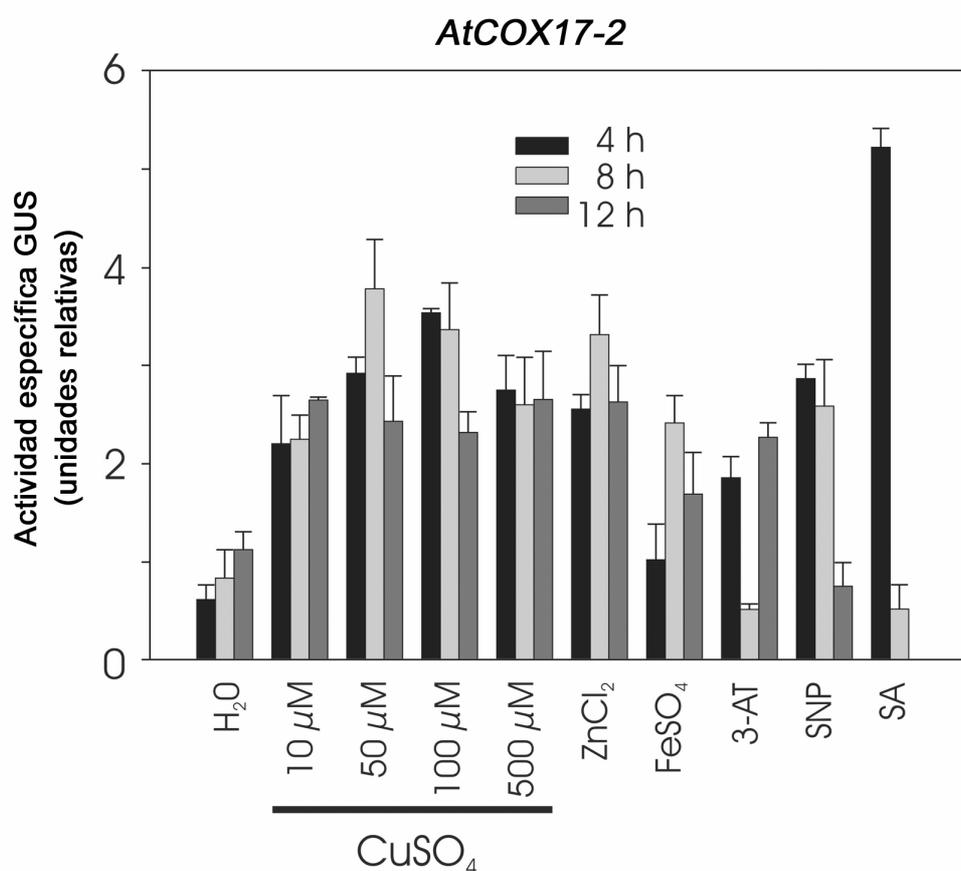
coloración tenue. Además, en ambos casos, observamos la inducción de la actividad GUS en las hojas tratadas con SNP y 3-AT (Figura 16A ix).

En los ensayos fluorométricos sobre las hojas de las plantas que contienen la región promotora de *AtCOX17-1* fusionada a *gus* observamos un incremento de 3 a 4 veces en la expresión cuando dichas hojas son tratadas con SNP y SA, mientras que el efecto del 3-AT no es evidente por este método (Figura 18).



**Figura 18:** Inducción de la expresión del gen *gus* dirigida por el promotor de *AtCOX17-1* en presencia de metales y compuestos que producen estrés oxidativo. Los extractos proteicos fueron preparados a diferentes tiempos luego de la infiltración con los correspondientes reactivos. Las hojas se infiltraron con H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> a diferentes concentraciones, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, FeSO<sub>4</sub> 1 mM, 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) 4 mM, SNP (nitroprusiato de sodio) 1 mM o SA (ácido salicílico) 1 mM. Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

En el caso de las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX17-2*, observamos inducción de GUS en las hojas tratadas tanto con SA como con SNP o 3-AT (Figura 19). En estas plantas la respuesta que observamos es más rápida en comparación con las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX17-1*, ya que antes de las 4 horas observamos inducción. Las regiones promotoras de ambos genes producen un incremento mayor de la actividad GUS en presencia de SA en relación con los otros compuestos ensayados.



**Figura 19: Inducción de la expresión del gen *gus* dirigida por el promotor de *AtCOX17-2* en presencia de metales y compuestos que producen estrés oxidativo.** Los extractos proteicos fueron preparados a diferentes tiempos luego de la infiltración con los correspondientes reactivos. Las hojas se infiltraron con H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> a diferentes concentraciones, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, FeSO<sub>4</sub> 1 mM, 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol) 4 mM, SNP (nitroprusiato de sodio) 1 mM o SA (ácido salicílico) 1 mM. Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

Además, observamos inducción del gen *gus* al tratar las hojas con una solución de cobre a distintas concentraciones (Figura 16A y B, viii). En el caso de las plantas que contienen la región promotora de *AtCOX17-1*, observamos un aumento de la actividad GUS, de seis a ocho veces, al tratar las hojas con  $\text{CuSO}_4$  10-100  $\mu\text{M}$  (Figura 18), mientras que el tratamiento con  $\text{CuSO}_4$  500  $\mu\text{M}$  resultó menos efectivo. Las plantas que contienen la región promotora de *AtCOX17-2* mostraron una respuesta más uniforme frente al tratamiento con las distintas concentraciones de cobre (Figura 19). Además, el tratamiento de las hojas con soluciones de hierro y zinc produjo un incremento similar de la actividad GUS (Figura 19). En el caso de las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX17-1*, el tratamiento con zinc o hierro produjo menor inducción que el tratamiento con cobre (Figura 18).

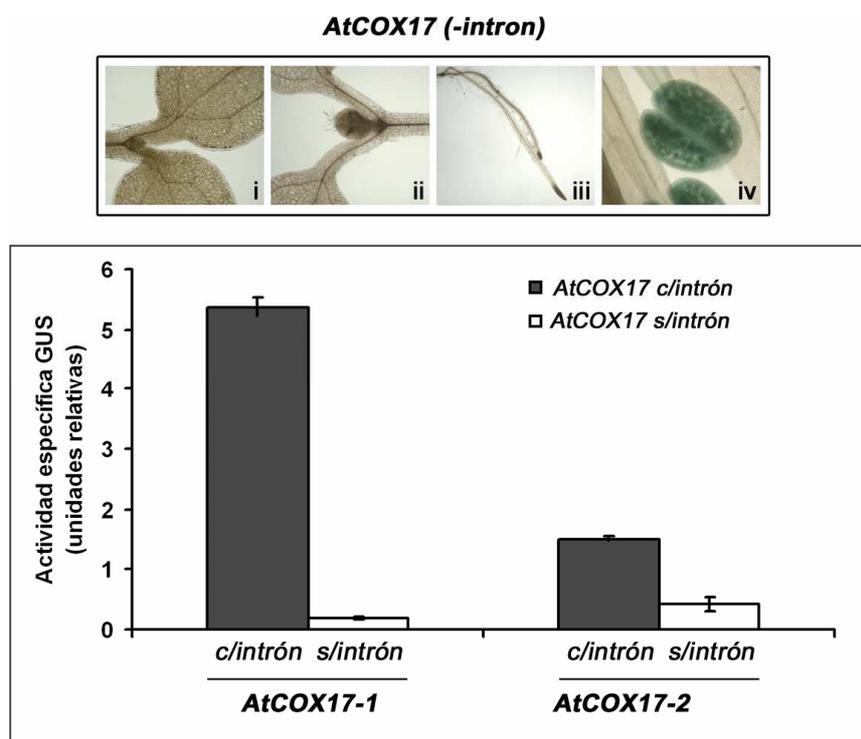
Al analizar los resultados obtenidos, observamos que las regiones promotoras de los genes *AtCOX17* responden a factores que provocan estrés biótico y abiótico de manera similar, aunque existen algunas diferencias puntuales. En el caso de la región promotora de *AtCOX17-1*, observamos una inducción preferencial en presencia de bajas concentraciones de cobre (10-100  $\mu\text{M}$ ), mientras que esta respuesta es menor en presencia de otros metales o factores de estrés oxidativo. En cambio, la región promotora de *AtCOX17-2* presenta una respuesta más homogénea frente a todos los compuestos ensayados.

### ***3.1.5. Análisis de la importancia de la presencia de un intrón en la región 5' no codificante para la expresión de los genes AtCOX17***

La presencia de intrones en la región 5' no codificante de los genes suele estar asociada a la expresión de los mismos (Chee y col., 1986; Gasser y col., 1982; Mascarenhas y col., 1990). Evidencias previas obtenidas en nuestro laboratorio indicaron que un intrón conservado en la región 5' no codificante de los genes *COX5c* es requerido para dirigir la expresión de los mismos (Curi y col., 2005). En nuestro caso, observamos que ambos genes *AtCOX17* poseen un intrón en la región 5' no

codificante, hecho que también ocurre en los genes *AtCOX19* y *AtCOX11*, que codifican otras chaperonas de cobre supuestamente involucradas en la biogénesis de COX. Además, los genes *COX17* de arroz también poseen intrones en posiciones similares. Estos hechos nos motivaron a analizar el papel de los intrones de los genes *AtCOX17* en la expresión de los mismos. Para tal fin, realizamos la delección de cada intrón a partir de los fragmentos de 1719 pb y 1931 pb, correspondientes a *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2*, respectivamente (Materiales y Métodos, 2.3.2.3 y 2.3.2.4). Dichos fragmentos fueron clonados en el vector binario pBI101.3 y fusionados a la región codificante del gen reportero *gus*. Con los clones obtenidos, obtuvimos plantas transgénicas mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transgénicas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina. Estas plantas fueron analizadas a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3).

Al analizar los niveles de expresión en plántulas, observamos para ambos genes una importante disminución de la actividad GUS, a niveles basales, como resultado de la remoción del intrón (Figura 20). Un análisis histoquímico reveló actividad sólo en anteras (Figura 20, iv de la parte superior). Es notorio que una observación similar fue efectuada en el caso de los genes *AtCOX5c* (Curi y col., 2005). Concluimos que los intrones ubicados en las regiones 5' no codificantes de los genes *COX17* son importantes para la expresión de los mismos.



**Figura 20:** Evaluación de la expresión del gen *gus* dirigida por las regiones promotoras de los genes *AtCOX17* carentes del intrón ubicado en la región 5' no codificante. En la parte superior se muestra el patrón de expresión dirigido por la región promotora sin intrón de *AtCOX17-1*, analizado a través de reacciones histoquímicas. En el caso de *AtCOX17-2* se obtuvieron resultados similares. En la parte inferior se muestra una cuantificación de la actividad GUS obtenida a partir de extractos de plántulas de 15 días. Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

### 3.1.6. Análisis de la expresión del gen *gus* dirigida por una región promotora acotada de los genes *AtCOX17*

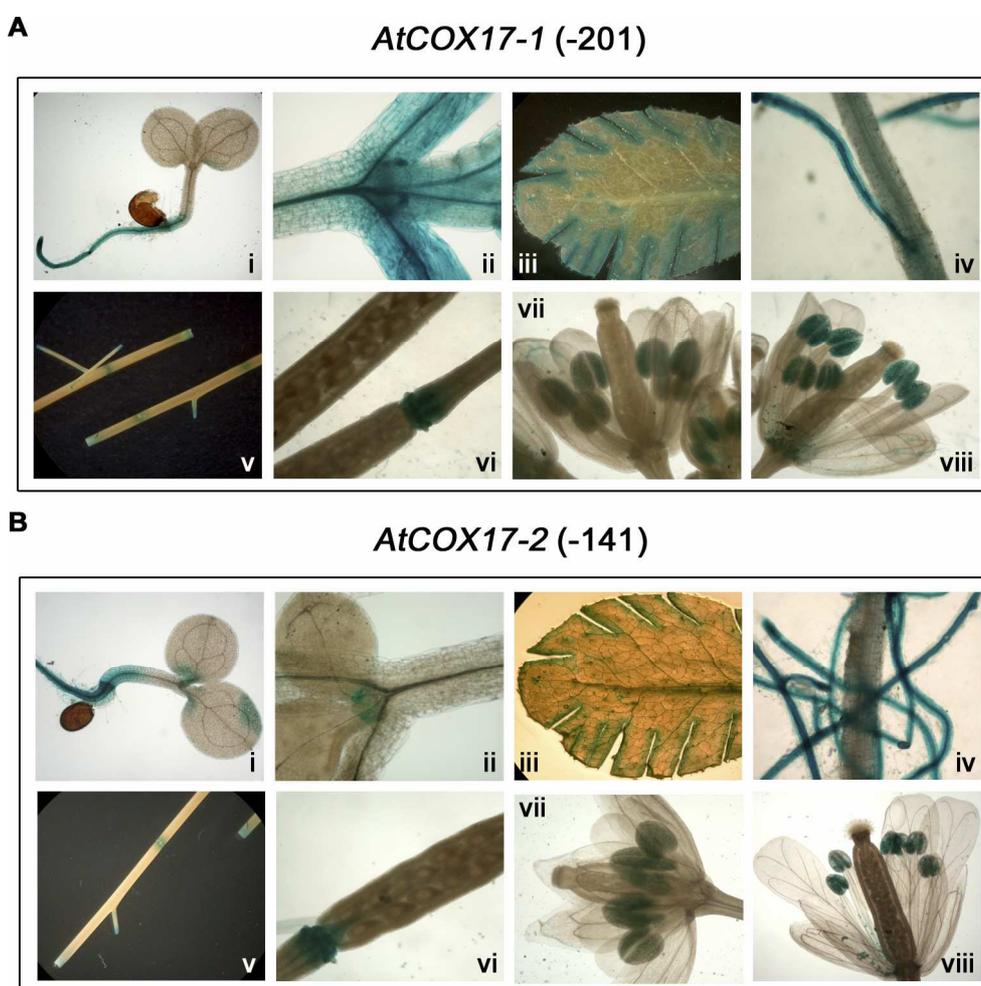
Otra característica conservada en las regiones promotoras de los genes *AtCOX17* (y también en *AtCOX19* y *AtCOX11*) es la presencia de motivos denominados site II cercanos al sitio de inicio de la transcripción. Se ha descrito que la mayoría de los genes nucleares que codifican proteínas que participan en la fosforilación oxidativa mitocondrial en *Arabidopsis* y arroz contienen estos motivos en las regiones proximales de sus promotores (Welchen y González, 2006). Previamente, en nuestro laboratorio se

demonstró que los elementos site II son funcionales en, al menos, uno de los genes codificantes para citocromo *c* (Welchen y González, 2005). Para analizar el papel de los elementos site II en la expresión de los genes en estudio, decidimos evaluar los patrones de expresión conferidos por versiones acortadas, que contienen los elementos site II, de las respectivas regiones promotoras, para luego evaluar el efecto sobre éstos de la mutación de los elementos mencionados.

A partir de los fragmentos de 1719 pb y 1931 pb, correspondientes a *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2*, obtuvimos fragmentos de 969 pb y 1143 pb, respectivamente (Materiales y Métodos, 2.3.2.3 y 2.3.2.4). Dichos fragmentos abarcan 201 pb y 141 pb, respectivamente, de las correspondientes regiones no transcritas y toda la región 5' no codificante, incluyendo los respectivos intrones. Estos fragmentos fueron clonados en el vector binario pBI101.3, fusionados a la región codificante del gen reportero *gus*. Con los clones obtenidos, obtuvimos plantas transgénicas mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina. Estas plantas fueron analizadas a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3).

Al analizar la expresión mediante reacciones histoquímicas, observamos que para ambos genes el patrón de expresión de GUS se encuentra conservado al emplear las regiones promotoras acortadas (Figura 21). Debemos destacar sin embargo que la intensidad de la expresión es menor, ya que logramos una coloración comparable a la obtenida con las regiones promotoras más grandes, luego de períodos más prolongados de incubación. En el caso de *AtCOX17-1* (-201) no observamos la tinción del septum, las valvas y las venas de las vainas (Figura 21A vi). En las flores, desaparece la actividad GUS en el estigma, en las venas de los sépalos y en el receptáculo de las flores inmaduras (Figura 21A, vii y viii). Resulta interesante que la inducción de la actividad GUS mediante la aplicación de daño mecánico es comparable con la inducción obtenida

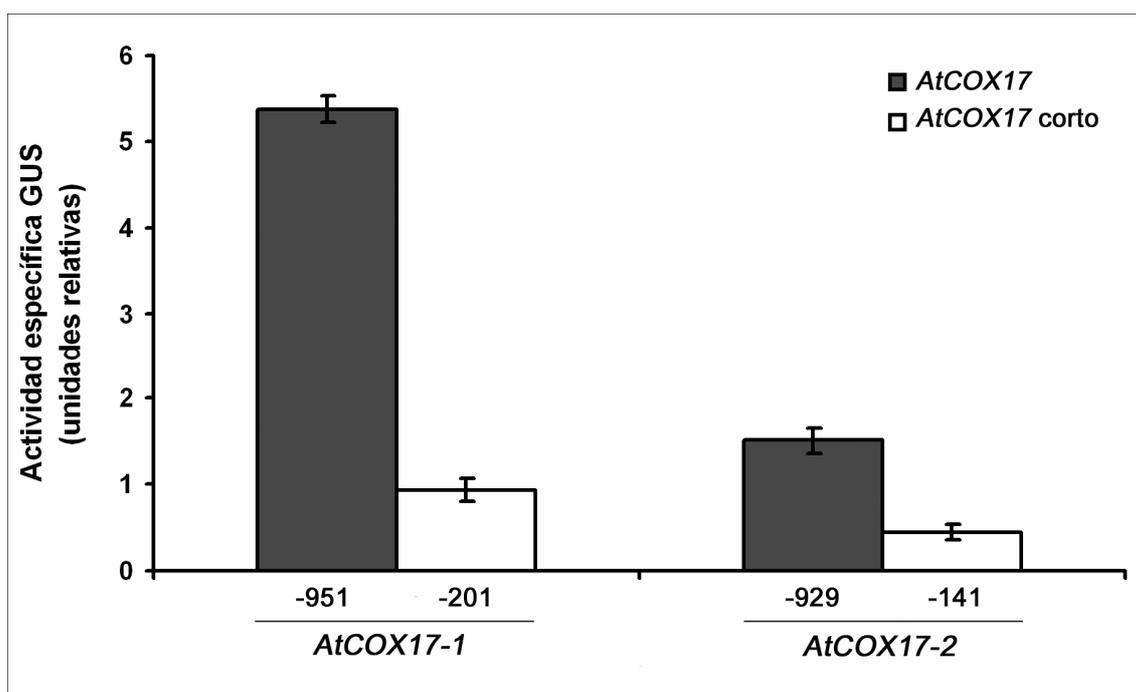
al utilizar plantas transformadas con la región promotora más grande (Figura 21A, iii y v).



**Figura 21:** Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con las regiones promotoras de (A) *AtCOX17-1 (-201)* y (B) *AtCOX17-2 (-141)* fusionadas al gen reportero *gus*. Analizamos plantas de 4 (i) y 8 (ii) días. Además, analizamos hojas (iii), raíces (iv), tallos (v), vainas (vi) y flores (vii y viii) de plantas adultas.

En la Figura 21B podemos observar que el patrón de expresión de GUS generado por la región promotora de *AtCOX17-2 (-141)* es esencialmente similar al obtenido en el caso anterior. La región promotora de *AtCOX17-2 (-141)* no produce

tinción en la lámina de los cotiledones, y en los primordios de las hojas se observa una tinción débil (Figura 21B, i y ii). Esta característica diferencial puede deberse a la menor actividad de esta región promotora.



**Figura 22:** Evaluación de la expresión del gen *gus* dirigida por las regiones promotoras más cortas de los genes *AtCOX17* en comparación con las analizadas anteriormente. Se realizaron reacciones fluorométricas a fin de cuantificar la actividad GUS obtenida a partir de la expresión dirigida por dichas regiones promotoras en plántulas de 15 días. Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

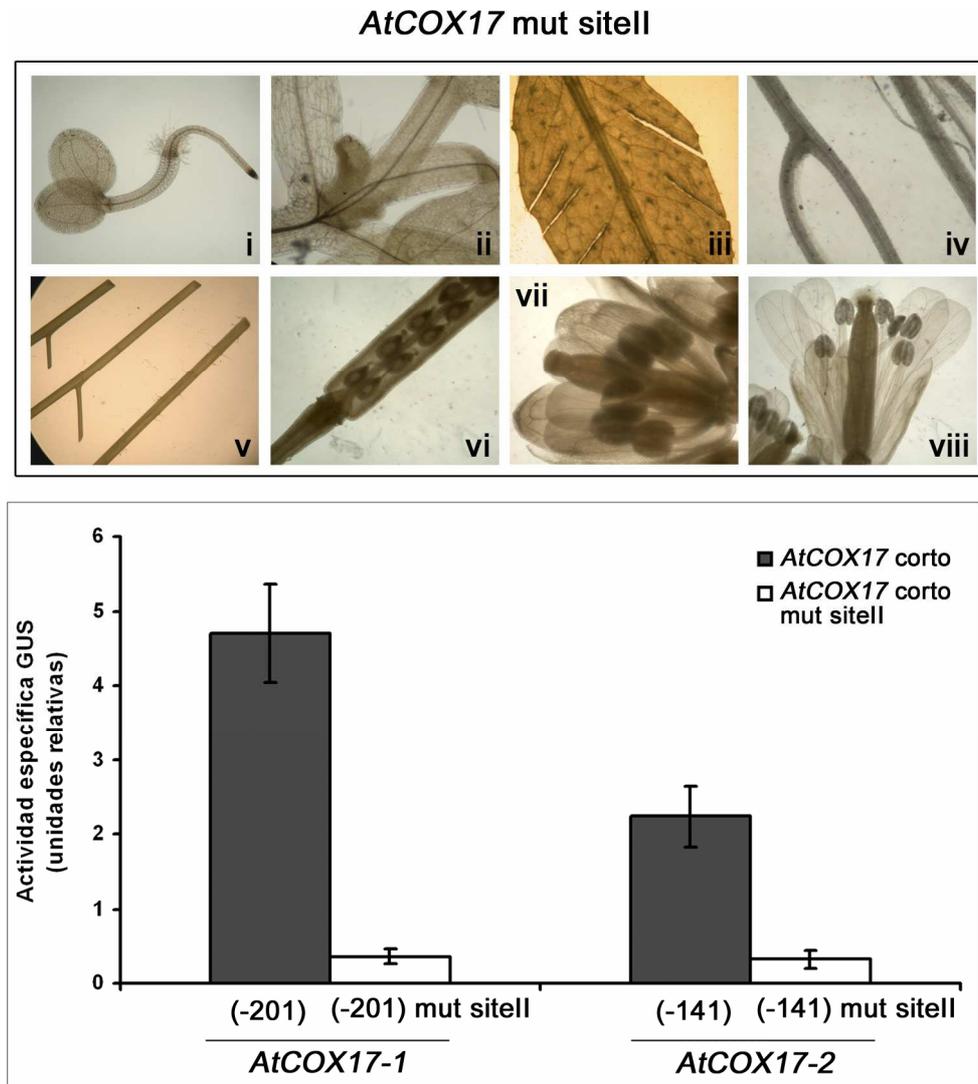
Al cuantificar los niveles de expresión de las regiones promotoras acortadas en plántulas de 15 días (Figura 22), observamos que la remoción de las regiones ubicadas corriente arriba de los elementos site II produce una disminución de 3 a 5 veces en los niveles de actividad.

En estas construcciones, evaluamos el efecto de la infección con patógenos y de compuestos que promueven la inducción del promotor de ambos genes *AtCOX17* (SA, SNP, 3-AT y CuSO<sub>4</sub>), en concentraciones y períodos de tiempo apropiados según lo determinado anteriormente, y no observamos cambios significativos de la expresión de GUS (datos no mostrados). Esta evidencia nos permite sugerir que los elementos responsables de la respuesta a estos factores se encuentran cadena arriba de las posiciones -201 y -141 pb desde el sitio de inicio de la transcripción para *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2*, respectivamente.

### ***3.1.7. Análisis de la importancia de los motivos site II en la actividad de las regiones promotoras de los genes AtCOX17***

Como expusimos anteriormente, decidimos evaluar el efecto de la mutación de los elementos site II en las versiones acortadas de las respectivas regiones promotoras. Al analizar la expresión del gen reportero *gus* dirigida por las regiones promotoras de ambos genes *AtCOX17* con los motivos site II mutados observamos que la misma desaparece totalmente (Figura 23, parte superior). Este resultado es consistente con la importancia asignada a la presencia de estos motivos en la expresión de genes relacionados con la fosforilación oxidativa mitocondrial.

A fin de obtener una medida cuantitativa de la expresión del gen *gus* dirigida por las regiones promotoras con los motivos site II mutados, realizamos medidas de actividad empleando extractos proteicos totales de plantas de 15 días transformadas con las regiones en estudio, y las correspondientes regiones sin los motivos site II mutados, fusionadas al gen *gus*. La mutación de los motivos site II produce una notoria disminución de la actividad, a valores cercanos a los observados en plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (Figura 23, parte inferior).



**Figura 23:** Análisis de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con las regiones promotoras de *AtCOX17-1* (-201) y *AtCOX17-2* (-141) con los motivos site II mutados. En la parte superior se muestran reacciones histoquímicas en plantas de 4 (i) y 8 (ii) días. Además, analizamos hojas (iii), raíces (iv), tallos (v), vainas (vi) y flores (vii y viii) de plantas adultas. En la parte inferior se muestra una cuantificación de la actividad GUS en extractos de plántulas de 15 días. Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

### 3.1.8. Discusión

Hemos analizado la estructura de los genes de Arabidopsis homólogos a la metalochaperona COX17, la cual está involucrada en el transporte de cobre para el ensamblado de COX. Los dos genes de Arabidopsis muestran una estructura similar exón-intrón, con un intrón localizado en la región 5' no codificante. Un intrón en una posición semejante también se encuentra en los correspondientes genes de arroz, lo cual sugiere que la presencia de estos intrones podría ser una característica conservada en los genes *COX17* de plantas. Existen evidencias de que los intrones influyen la expresión a diferentes niveles (Le Hir y col., 2003; Rose, 2004). Previamente, en nuestro laboratorio se demostró que los intrones conservados en las regiones 5' no codificantes de los genes *AtCOX5c*, los cuales codifican una subunidad de COX, influyen positivamente la expresión de dichos genes (Curi y col., 2005). En los genes *AtCOX17*, la remoción de los intrones provoca una considerable disminución de la expresión, pudiendo observarse ésta sólo en anteras. Es notorio que otros genes de Arabidopsis que han sido identificados por presentar similitud de secuencia con genes relacionados con la biogénesis de COX presentan también un intrón en la región 5' no codificante. Esta evidencia nos hace pensar que los intrones localizados en la región 5' no codificante no sólo son importantes elementos reguladores de la expresión de los genes *AtCOX17*, sino que podrían representar elementos significativos para la coordinación de la expresión de algunos de los genes relacionados con la biogénesis de COX.

En este trabajo, hemos demostrado que las regiones promotoras de ambos genes *AtCOX17* producen un patrón de expresión similar, con niveles de expresión significativamente más altos en el caso de *AtCOX17-1*. No resulta evidente la necesidad de la presencia de dos genes con características de expresión similares en el genoma de Arabidopsis, si las proteínas que codifican no poseen funciones diferenciales. Lister y col. (2004) reportaron diferencias de expresión en genes que componen una familia que codifica componentes del aparato de importación de proteínas mitocondriales, ya que algunos de ellos presentan alta expresión mientras que otros se inducen en respuesta a factores de estrés. Se postuló que esto podía deberse a que, en estas condiciones,

existiría una mayor demanda de proteínas involucradas en la biogénesis mitocondrial a fin de reemplazar las proteínas dañadas. En el caso de los genes *AtCOX17*, si bien ambos responden a factores de estrés, la expresión de *AtCOX17-2* evidencia una marcada respuesta frente a todos los factores de estrés ensayados, mientras que *AtCOX17-1* se induce preferentemente ante la presencia de concentraciones de cobre relativamente bajas. De acuerdo a esto, la respuesta de *AtCOX17-1* al cobre parece constituir el resultado de factores adicionales, además del estrés oxidativo. Quizás uno de estos genes, *AtCOX17-1*, es el responsable principal de la actividad biosintética de COX en condiciones normales y *AtCOX17-2* es el encargado de colaborar cuando la célula vegetal ha sufrido estrés y requiere de una mayor capacidad de biosíntesis de sus componentes. Estudios utilizando mutantes permitirán evaluar este postulado.

Además, se debe tener en cuenta la doble localización asignada a Cox17p en levaduras (Beers y col., 1997). Por este motivo, existe la posibilidad de que uno de los genes de *Arabidopsis* codifique una isoforma mitocondrial mientras que el otro codifique una isoforma citoplasmática, o que se produzca un cambio en la localización en condiciones de estrés. La utilización de programas predictivos de localización intracelular no resultó informativa, lo cual no es sorprendente ya que Cox17p es importada a la mitocondria de levaduras a través de Mia-40 y no a través de la vía tradicional de importación utilizada por la mayoría de las proteínas mitocondriales (Mesecke y col., 2005). Se debe tener presente que ambas proteínas *AtCOX17* tienen la capacidad de complementar las levaduras mutantes en *cox17* (Wintz y Vulpe, 2002), lo cual nos sugiere que estas proteínas pueden alcanzar el espacio intermembrana mitocondrial en levaduras. Se están llevando a cabo estudios de localización intracelular en plantas transformadas con construcciones que expresan ambas proteínas fusionadas a GFP.

En etapas tempranas del desarrollo, observamos la localización de GUS principalmente en raíces. Esta localización preferencial en raíces coincide con estudios de expresión realizados previamente, en los cuales se utilizaron anticuerpos específicos (Wintz y Vulpe, 2002). En las plantas maduras, la tinción histoquímica se evidencia

especialmente en anteras y vainas. Notablemente, esta expresión preferencial en anteras es una característica de la mayoría de los genes que codifican componentes mitocondriales (Elorza y col., 2004; Mufarrege y col., 2009; Welchen y col., 2004; Welchen y Gonzalez, 2005; Zabaleta y col., 1998) y podría estar relacionada con la activa biogénesis mitocondrial que tiene lugar en dichos órganos (Huang y col., 1994; Lee y Warmke, 1979). Respecto de la expresión en raíces, podemos decir que la mayoría de los genes que codifican componentes de la cadena respiratoria se expresan en el meristema radicular y/o en el cilindro vascular (Elorza y col., 2004; Welchen y col., 2004; Welchen y Gonzalez, 2005). En el caso de *AtCOX17*, la alta expresión en raíces podría reflejar su participación en otros procesos, como la distribución de cobre en la planta. Notablemente, otros transportadores metálicos también presentan expresión preferencial en raíces (Andrés-Colás y col., 2006; Burkhead y col., 2009; Eckhardt y col., 2001; Mills y col., 2003). Además, la expresión en células epidérmicas de la raíz puede relacionarse con la incorporación del cobre desde el medio. Estas potenciales funciones de las proteínas *AtCOX17* en las raíces de las plantas no estarían relacionadas directamente con el ensamblado de COX.

Las regiones promotoras de los genes *AtCOX17* poseen varios elementos (tres en el caso de *AtCOX17-1* y cuatro en el caso de *AtCOX17-2*) conocidos como site II (Kosugi y col., 1995; Trémousaygue y col., 2003) localizados en la región proximal al sitio de inicio de la transcripción. Estos elementos poseen la secuencia consenso TGGGCC/T y se encuentran presentes en genes que se expresan preferentemente en tejidos en proliferación. Un par de motivos site II se encuentra presente en una posición similar en *OsCOX17-1*, siendo este gen *COX17* de arroz el que presenta una mayor similitud a los de Arabidopsis. En muchos genes los elementos site II se encuentran relacionados con un segundo motivo, el cual se denomina telo box (AAACCCTA) y está involucrado en el aumento de la expresión (Trémousaygue y col., 2003). Interesantemente, motivos telo box se encuentran presentes en los intrones localizados en la región 5' no codificante de ambos *AtCOX17*. En este trabajo demostramos que los motivos site II son funcionales en estos genes. Como ya mencionamos, en nuestro

laboratorio se demostró que estos elementos son responsables de la expresión en anteras y regiones meristemáticas de uno de los genes que codifican citocromo *c* en Arabidopsis (*Cytc-1*) (Welchen y González, 2005). Los elementos site II se encuentran presentes en la mayoría de los promotores de genes que codifican componentes de la cadena respiratoria en Arabidopsis, lo que permitiría relacionar la expresión de los genes *AtCOX17* con la de otros componentes de esta vía. Los elementos site II parecen regir la expresión basal de estos genes, ya que en las construcciones más pequeñas que conservan dichos elementos la expresión disminuye pero el patrón se mantiene. Los elementos relacionados con la respuesta a los diferentes tipos de estrés que evaluamos en este trabajo podrían encontrarse cadena arriba de los motivos site II.

Balandin y Castresana (2002) mostraron que existe un incremento en los niveles de transcriptos correspondientes a *AtCOX17-1* en presencia de factores de estrés biótico y abiótico. Debido a que estos autores utilizaron una sonda preparada a partir del ADNc completo de *AtCOX17-1*, no resulta claro si los datos aportados por este trabajo están relacionados con uno o ambos genes de Arabidopsis. En nuestro trabajo se muestra que ambas regiones promotoras de *AtCOX17* responden positivamente ante la presencia de factores de estrés o compuestos relacionados con el mismo. Un efecto común de estos factores podría ser la generación de ROS, las cuales provocan daño celular (Alvarez y col., 1998; Drazkiewicz y col., 2004; Orozco-Cardenas y Ryan, 1999; Rao y col., 1997). Observamos altos niveles de inducción de GUS luego de períodos cortos de tratamiento, lo cual sugiere que esta respuesta se produce en reflejo de una acumulación de ROS y no como un efecto secundario asociado con la toxicidad de estos compuestos o la muerte celular. Podemos pensar que las regiones promotoras de *AtCOX17* responden a factores que producen daño o inactivación de COX, a fin de incrementar el transporte de cobre para la biogénesis *de novo* de esta enzima. Se ha reportado que el SA y el SNP, los cuales inducen la expresión de *AtCOX17*, actúan como inhibidores de la cadena respiratoria (Norman y col., 2004; Zottini y col., 2002). Además, experimentos de microarreglos muestran una inducción de *ACOX17-1* y *AtCOX17-2* en presencia de rotenona, un inhibidor del Complejo I (Lister y col., 2004). Debemos

recordar que una inhibición de la cadena de transporte de electrones produce un incremento en la producción de ROS en la mitocondria (Maxwell y col., 1999). La inducción por estrés que observamos al estudiar las regiones promotoras de los genes *AtCOX17* se evidencia especialmente en las hojas, donde la expresión basal es muy baja. Ya que la expresión de las subunidades de COX no se incrementa ante los mismos tratamientos, *AtCOX17* podría constituir un factor limitante en el ensamblado de COX o bien podría participar en la reparación de la enzima dañada. Las respuestas observadas para *AtCOX17* son similares a las informadas para el gen *AOX1a*, que codifica una oxidasa alternativa (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Se asume que este gen responde a situaciones en las cuales la vía respiratoria sensible a cianuro se encuentra comprometida, para permitir el paso de los electrones hacia el oxígeno. La existencia de un comportamiento similar en genes involucrados en la biogénesis de COX parece indicar que otra respuesta a la misma situación es el incremento de la biogénesis de los complejos respiratorios. Futuros análisis de los promotores de genes *AtCOX17* y *AOX1a* podrán demostrar si ambos tipos de genes son blancos de vías regulatorias similares.

## **3.2. CAPÍTULO II**

**“Identificación y caracterización de los genes que codifican homólogos a la proteína Cox19p en *Arabidopsis thaliana*”**

## CAPÍTULO II

### 3.2. Identificación y caracterización de genes que codifican homólogos a la proteína Cox19p en *Arabidopsis thaliana*

#### 3.2.1. Introducción

Estudios con mutantes de levaduras con defectos específicos en COX revelaron la existencia de una proteína requerida para la funcionalidad de esta enzima, la cual se denominó Cox19p (Nobrega y col., 2002). Las mutantes de levaduras en *cox19* presentan ausencia de hemo *a* y deficiencia de COX (Nobrega y col., 2002). La proteína Cox19p presenta una serie de residuos de cisteína conservados, presentes también en Cox17p. En función de esta evidencia, se postuló que Cox19p podría actuar como un transportador de metales. Aunque Cox17p y Cox19p presentan grandes similitudes, estas proteínas no son redundantes en levaduras ya que las mutantes en cada uno de los correspondientes genes presentan defectos en la respiración, y al complementar cada una de ellas con la otra proteína, no se restablece la actividad respiratoria, a pesar de utilizar un plásmido multicopia (Glerum y col., 1996a; Nobrega y col., 2002). Además, en el caso de *cox19* la deficiencia de COX no es subsanada por el agregado de cobre al medio de cultivo, a diferencia de lo que sucede con las mutantes en *cox17*.

Como expusimos en la Introducción General, Cox19p posee una localización dual en el citoplasma y el espacio intermembrana mitocondrial, y posee una alta similitud de secuencia respecto de Cox17p en su extremo C-terminal. Recientemente se demostró que Cox19p, de la misma manera que Cox17p, es funcional cuando está anclada a la membrana interna, por lo que su presencia en el citoplasma no es importante para cumplir su función en el ensamblado de COX (Maxfield y col., 2004; Rigby y col., 2007). Se especula con otra función para estas proteínas que presentan una

doble localización, la cual puede ser ejercida por la porción presente en el citoplasma. En el caso de la proteína de humanos HsCox19, la cual se ha identificado en virtud de una alta similitud (60%) con su contraparte de levaduras, al evaluar la localización subcelular mediante su fusión a una proteína fluorescente (GFP), se encontró que el patrón de fluorescencia se corresponde más con una proteína citosólica que con una proteína mitocondrial (Sacconi y col., 2005). No se puede descartar que, aunque Cox19p actúa como un factor de ensamblado de COX, su papel en la célula sea más general en cuanto al transporte de metales. En este sentido, una forma recombinante de Cox19p de levaduras ha sido aislada como una proteína de unión a  $Zn^{2+}$  cuando se suministra este metal en el medio de cultivo (Rigby y col., 2007).

Cox19p no posee el motivo CCXC, importante para la unión de  $Cu^{1+}$  en Cox17p, pero su forma recombinante tiene la capacidad de unir  $Cu^{1+}$  (Cobine y col., 2004). Recientemente se ha demostrado que Cox19p puede unir también  $Cu^{2+}$ , lo cual es interesante ya que el centro  $Cu_A$  está conformado por dos átomos de cobre ( $Cu^+ - Cu^{2+}$ ). Un escenario interesante sería la posibilidad de que Cox17p y Cox19p colaboren con el transporte de los iones  $Cu^+$  y  $Cu^{2+}$ , respectivamente, a fin de contribuir a la formación del centro  $Cu_A$  (Rigby y col., 2007). Otro hecho interesante es que el contenido de cobre, hierro y zinc mitocondrial no se modifica en las mutantes en *cox19*, *cox17*, ni en las dobles mutantes en *cox17-cox19*, lo cual sugiere que estas proteínas no participan en la regulación de los niveles mitocondriales de estos metales (Rigby y col., 2007).

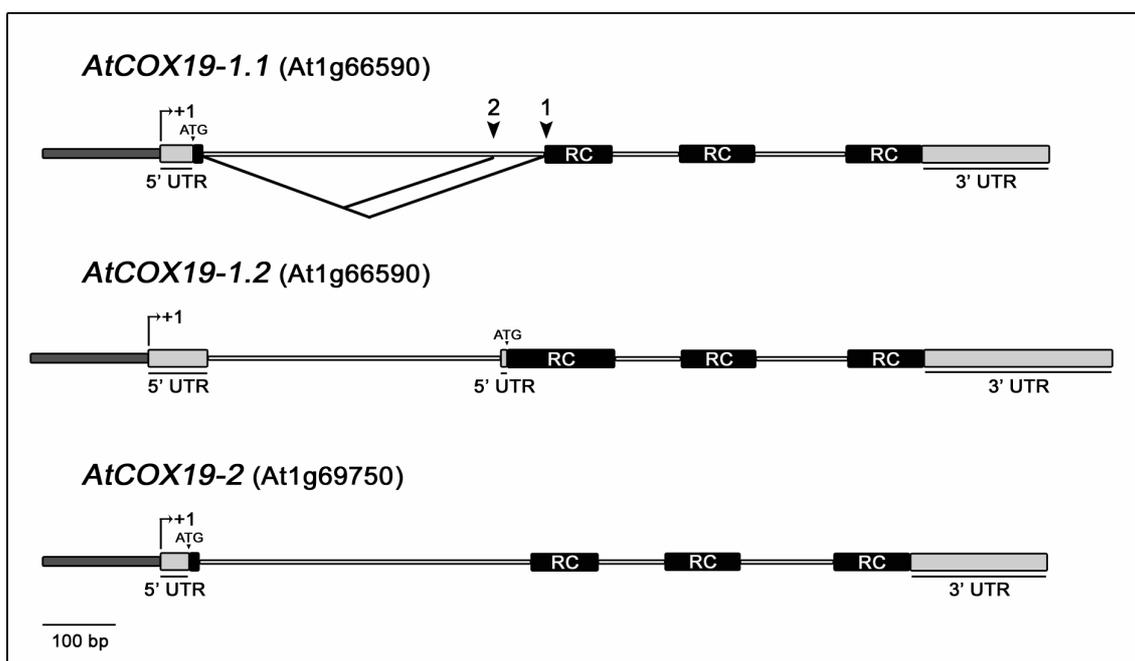
Cox23p es otra de las proteínas solubles del espacio intermembrana y ha sido localizada también en el citoplasma. Esta proteína presenta similitud de secuencia en el extremo C-terminal con Cox17p, pero de manera interesante no se encuentra similitud entre Cox19p y Cox23p. Las levaduras mutantes en *cox23* muestran deficiencia respiratoria, como en el caso de las mutantes en *cox17* y *cox19*. Las mutantes en *cox23* pueden ser rescatadas por el agregado de cobre al medio de cultivo, pero con la sobreexpresión conjunta de Cox17p. Esta situación sugiere que Cox17p actúa luego de Cox23p en un pasamanos imaginario, mientras que Cox19p estaría representando otra parte en esta vía de distribución del cobre. La sobreexpresión de Cox19p, Cox11p,

Sco1p o Sco2p no permite la restitución de la actividad respiratoria de las mutantes en *cox23* (Barros y col., 2004). Se ha demostrado que la falta de Cox23p tampoco afecta el nivel de cobre mitocondrial (Cobine y col., 2006). No existe información respecto de la relación de Cox23p con la homeostasis de otros metales en la mitocondria.

En función de estas evidencias y de la homología funcional entre Cox17p de levaduras y ambas AtCOX17 de *Arabidopsis* (Wintz y Vulpe, 2002), nos resultó interesante estudiar las proteínas homólogas a Cox19p de levaduras en plantas. Aunque se conocen muchos factores de ensamblado de COX en levaduras, poco se sabe de los homólogos en otros organismos. Suponemos que en otros eucariotas deben existir proteínas que cumplan, al menos, la misma función que en levaduras ya que estamos estudiando un proceso de relevante importancia para la célula. Para nosotros, el desafío mayor es estudiar dichas proteínas homólogas en plantas y dilucidar, si existen, otras funciones que poseen las mismas en el marco de procesos evolutivos que, a priori, desconocemos.

### ***3.2.2. Identificación de los genes que codifican homólogos a la proteína Cox19p en *Arabidopsis thaliana****

En el genoma de *Arabidopsis* encontramos dos genes que codifican proteínas similares a la proteína de levaduras Cox19p, ambos localizados en el cromosoma 1. Los dos genes se expresan en *Arabidopsis* ya que hemos encontrado clones de ADNc (ESTs o clones de secuencia completa) para cada uno de ellos. Estos genes fueron nombrados *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2* (para At1g66590 y At1g69750, respectivamente). *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2* están compuestos por cuatro exones y codifican proteínas idénticas (Figura 24). Dentro de las regiones no codificantes presentan un alto nivel de identidad, ya que poseen sólo 18 modificaciones dentro de las regiones intrónicas y 4 cambios dentro de las regiones no codificantes (UTR) de los exones. Esta evidencia nos sugiere que estos dos genes se originaron a partir de un evento de duplicación reciente en el genoma de *Arabidopsis*.

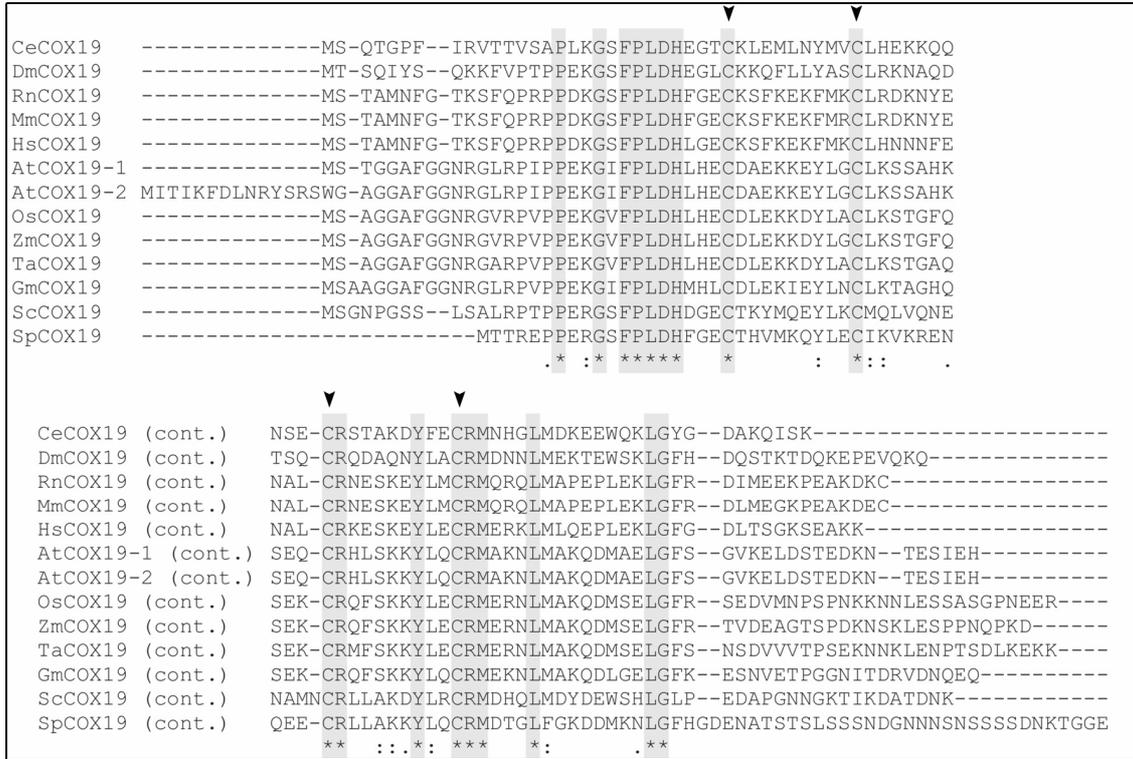


**Figura 24:** Esquema de los genes *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2*. En la parte superior se muestra un esquema del gen *AtCOX19-1*, que da origen a dos isoformas. Las flechas indican los sitios de *splicing* alternativo para cada una de estas isoformas: *AtCOX19-1.1* y *AtCOX19-1.2* (el esquema de esta última se muestra abajo). En la parte inferior se muestra un esquema correspondiente a *AtCOX19-2*, que origina una proteína idéntica a la codificada por *AtCOX19-1.1*. Las regiones codificantes (RC) se muestran en negro y las regiones no codificantes (UTR) en gris. La línea gris más delgada representa los intrones.

Para el gen *AtCOX19-1*, identificamos dos ADNc que difieren en el extremo 5' y que aparentemente se originan a partir de un *splicing* alternativo que utiliza dos diferentes sitios aceptores en el intrón 1 (Figura 24). Como consecuencia de ello, un codón de inicio se encuentra fuera del marco de lectura en una de las variantes de *splicing*, y un ATG ubicado cadena abajo del anterior es utilizado como inicio de la traducción. Esto genera proteínas que difieren en sus extremos N-terminales. En función de estas dos variantes de *splicing*, denominadas *AtCOX19-1.1* y *AtCOX19-1.2*, este gen codifica proteínas de 98 y 113 aminoácidos, respectivamente. Sorprendentemente, no hemos detectado variantes de *splicing* correspondientes al segundo gen, *AtCOX19-2*, a pesar de la alta similitud que presenta respecto de *AtCOX19-1*. Una explicación que

encontramos para esto es que una segunda variante de *splicing* en el caso de *AtCOX19-2* contendría una deleción de dos nucleótidos, lo cual generaría un corrimiento del marco de lectura luego del sitio de inicio de la traducción. Por lo tanto, si esta variante se produce, la misma podría ser rápidamente degradada por la vía que produce el decaimiento de los ARNm sin sentido (Baker y Parker, 2004).

Comparamos las secuencias de las proteínas codificadas por los genes *AtCOX19* y sus homólogos de otras especies, e identificamos la presencia de residuos conservados en la región central de las mismas, mientras que los extremos N- y C-terminales presentan regiones variables (Figura 25). Todas las proteínas COX19 presentan cuatro residuos de cisteína conservados que forman dos motivos CX<sub>9</sub>C. Se ha demostrado que estas cisteínas, también presentes en la chaperona de cobre Cox17p, participan en la unión de cobre (Rigby y col., 2007). Además, estos motivos participan en el transporte de Cox19p a la mitocondria vía Mia40 (Mesecke y col., 2005). Dentro del reino vegetal, encontramos varias especies que poseen secuencias de ADNc que codifican proteínas con homología a COX19 (Figura 25). Estas proteínas de plantas presentan regiones N-terminales altamente conservadas pero difieren en las porciones C-terminales. Las proteínas COX19 de monocotiledóneas presentan una región C-terminal más corta. La única proteína con una diferencia significativa en la región N-terminal es la segunda variante de *splicing* de *AtCOX19-1*, por lo que esta forma podría resultar de características particulares del gen que la codifica. Como sucede con la proteína de levaduras Cox19p, las predicciones de localización subcelular de las diferentes formas de *AtCOX19* no sugieren la presencia de las mismas en mitocondrias, a excepción de *AtCOX19-1.2*, la cual presenta una probabilidad de 0,7 de localizarse en esta organela únicamente cuando se utiliza el programa MitoProt.

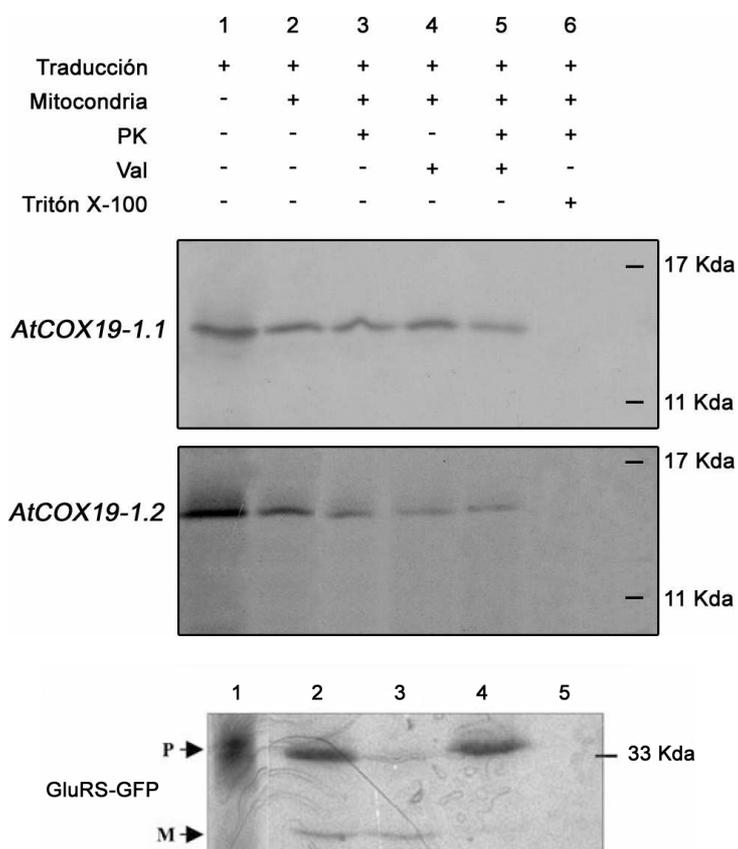


**Figura 25: Alineamiento de las proteínas COX19 de diferentes organismos.** Las secuencias que codifican homólogos de la proteína de levaduras Cox19p fueron obtenidas de bases de datos utilizando el programa t-blastn. Las secuencias proteicas fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994). Las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos están señaladas con un asterisco, aquellas ocupadas por aminoácidos relacionados están identificadas con uno o dos puntos, de acuerdo al grado de conservación. Las cisteínas conservadas están señaladas con flechas negras. Se analizaron secuencias de *Caenorhabditis elegans* (CeCOX19, NM\_060318), *Drosophila melanogaster* (DmCOX19, AY102691), *Rattus norvegicus* (RnCOX19, XM\_221972), *Mus musculus* (MmCOX19, NM\_197980), *Homo sapiens* (HsCOX19, AY957566), *Arabidopsis thaliana* (AtCOX19-1.1, At1g66590.1; AtCOX19-1.2, At1g66590.2), *Oryza sativa* (OsCOX19, AK120143), *Zea mays* (ZmCOX19, BI675181), *Triticum aestivum* (TaCOX19, BQ579224), *Glycine max* (GmCOX19, BE658914), *Saccharomyces cerevisiae* (ScCOX19, Z73123) y *Schizosaccharomyces pombe* (SpCOX19, NM\_001022867).

### 3.2.3. Importación y evaluación de la localización de las proteínas AtCOX19 en mitocondrias de plantas

Nos propusimos determinar si las proteínas AtCOX19 son capaces de ser importadas a las mitocondrias de plantas, para lo cual realizamos un ensayo de importación *in vitro* (Materiales y Métodos 2.13). Mediante traducción *in vitro* de

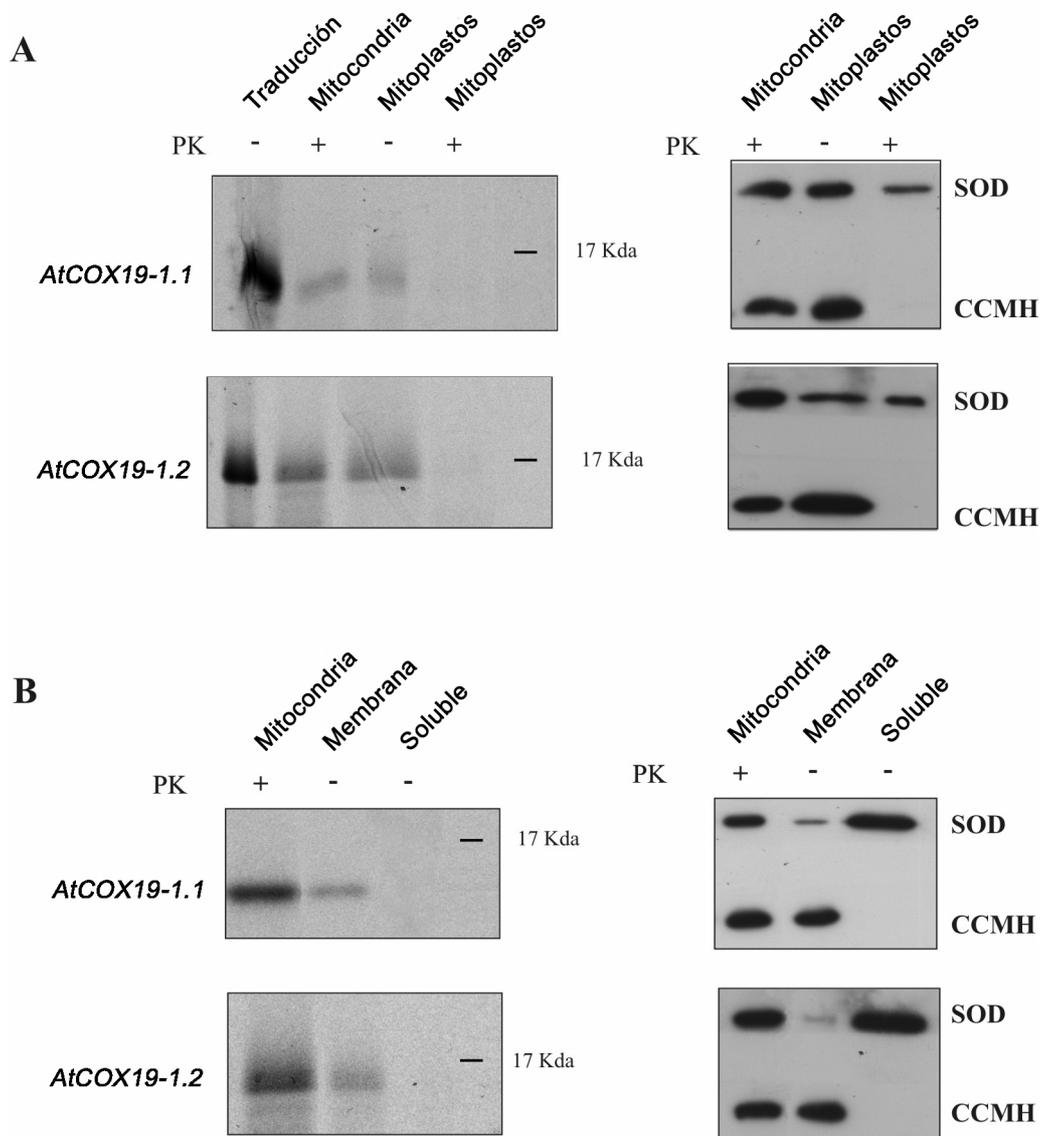
AtCOX19-1.1 y AtCOX19-1.2 obtuvimos productos de un peso molecular aparente de 13 y 15 KDa, respectivamente (Figura 26, calle 1 de la parte superior).



**Figura 26: Importación de las isoformas de AtCOX19 (parte superior) y del precursor de GluRS-GFP (parte inferior) a mitocondrias de plantas.** En la calle 1 se observa la señal de 1  $\mu$ l del producto de traducción. La importación se realizó con 50  $\mu$ g de mitocondrias de papa y 5  $\mu$ l del producto de traducción (calles 2-6). Antes de la importación, las mitocondrias fueron tratadas con valinomicina (Val, calles 4 y 5). Luego de la importación las organelas fueron expuestas a Tritón X-100 (calle 6) y/o tratadas con proteinasa K (PK, calles 3, 5 y 6). En la parte inferior se observan la proteína precursora (P) y la proteína madura (M) correspondientes a GluRS-GFP, constituyendo éste el control de la acción de la PK y la Val.

Luego de la importación observamos una banda correspondiente a una forma no procesada de estas proteínas en las mitocondrias de papa (Figura 26, calle 2 de la parte superior). Corroboramos que dichas proteínas se encuentran dentro de las mitocondrias

realizando un tratamiento post-importación con proteínasa K (PK) (Figura 26, calle 3 de la parte superior). Al solubilizar las membranas mitocondriales con Tritón X-100 antes del tratamiento con PK (Figura 26, calle 6 de la parte superior), no observamos la banda correspondiente. Este resultado nos permite concluir que la protección observada en el caso anterior se debe a que las proteínas se incorporan a las mitocondrias. Las evidencias indican que ambas proteínas son incorporadas a las mitocondrias sin el procesamiento de una presecuencia. Obtuvimos resultados similares al emplear mitocondrias de *Arabidopsis* para realizar la experiencia. Además, la importación de AtCOX19 no es inhibida por el ionóforo valinomicina (Val), lo cual indica que dicha importación no requiere del potencial de membrana (Figura 26, calle 5 de la parte superior). Como control, utilizamos la secuencia de la proteína de fusión GluRS-GFP (Duchêne y col., 2005). Esta proteína sufre un procesamiento dependiente del potencial de membrana para ser importada a la matriz mitocondrial, por lo que la importación de la misma nos permitió corroborar la competencia de las mitocondrias que preparamos y la eficiencia de los tratamientos con Val y PK (Figura 26, parte inferior). Podemos observar que la proteína madura es resistente a la PK por encontrarse dentro de las mitocondrias y que el tratamiento con Val anula la formación de la proteína madura y la resistencia a PK (Figura 26, parte inferior), ya que el precursor no es incorporado a la mitocondria.



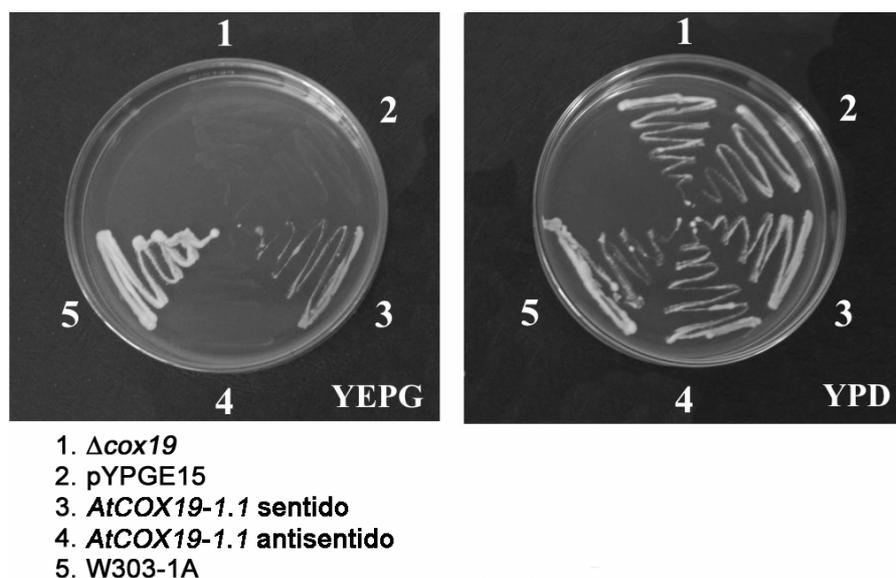
**Figura 27: Localización submitocondrial de las proteínas AtCOX19 que han sido importadas.** La importación se realizó como se describe en la Figura 26. **(A)** Luego de la importación, las mitocondrias fueron colocadas en un buffer hipotónico para producir la ruptura de la membrana externa (mitoplastos) (Materiales y Métodos 2.13.3). Las mitocondrias intactas o los mitoplastos fueron tratados con PK. **(B)** Luego de la importación, se produjo la ruptura de las mitocondrias a través de tres ciclos de congelamiento/descongelamiento y se separaron las fracciones soluble y de membrana. Todos los ensayos fueron divididos en dos y analizados por autorradiografía (izquierda) y por Western blot (derecha). Para el Western blot, como control del experimento, se utilizaron anticuerpos contra MnSOD, una proteína soluble de la matriz, y contra CCMH, una proteína de la membrana interna expuesta al espacio intermembrana.

Decidimos analizar la localización submitocondrial de AtCOX19 una vez importada. Para esto, luego del tratamiento con PK, colocamos las mitocondrias en un buffer hipotónico para romper la membrana externa y tratamos una fracción de los mitoplastos obtenidos con PK. Observamos que las proteínas importadas permanecen unidas a mitoplastos pero desaparecen al ser tratados éstos con PK (Figura 27A). Este comportamiento es típico de una proteína unida a membrana pero expuesta al espacio intermembrana. De hecho, CCMH, la cual es una proteína anclada a la membrana interna expuesta al espacio intermembrana (Meyer y col., 2005), tiene un comportamiento similar. La proteína de la matriz MnSOD, por el contrario, no es digerida por PK, lo cual nos indica que el tratamiento realizado rompe la membrana externa pero la membrana interna permanece intacta. También separamos las mitocondrias en una fracción soluble y otra de membrana. En ausencia de sales y detergente, observamos que ambas isoformas de AtCOX19 se localizan en la fracción de membrana (Figura 27B).

Estos experimentos nos permiten concluir que ambas isoformas de AtCOX19 se importan a mitocondrias a través de un proceso que no requiere del potencial de membrana y que no hay clivaje de una presecuencia. Una vez en la mitocondria, estas proteínas se localizan en el espacio intermembrana, unidas a la membrana interna.

#### ***3.2.4. Evaluación de la complementación de levaduras mutantes en *cox19* por las proteínas AtCOX19***

A fin de evaluar la funcionalidad de las proteínas AtCOX19, nos propusimos complementar las levaduras mutantes en *cox19*, las cuales presentan deficiencia respiratoria, con las proteínas de Arabidopsis. Las levaduras mutantes no pueden crecer en un sustrato no fermentable, como etanol, mientras que su capacidad de crecer en un medio con glucosa no se ve alterada (Nobrega y col., 2002).



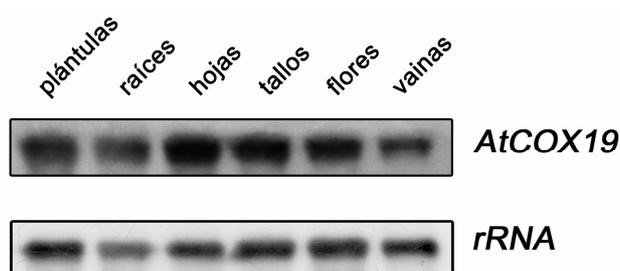
**Figura 28:** Complementación de levaduras mutantes en *cox19* con *AtCOX19-1.1*. Se empleó el plásmido pYPGE15 sin inserto (2), o el mismo plásmido conteniendo un ADNc de la isoforma *AtCOX19-1.1* clonado de forma de expresar el ARNm correspondiente (3) o un ARN complementario al mismo (4). Las levaduras transformantes se estriaron en un medio con glucosa (YPD) o con fuentes de carbono no fermentables (YEPG). Además, se estriaron las levaduras mutantes no transformadas (1) y la cepa salvaje W303-1A (5).

Utilizamos el plásmido pYPGE15 (Brunelli y Pall, 1993) (Materiales y Métodos 2.1.3) para clonar los ADNc de ambas variantes del *splicing* de *AtCOX19-1*, cada una en la orientación sentido y antisentido con respecto al promotor. En la Figura 28 podemos apreciar que la variante *AtCOX19-1.1* es capaz de restaurar el crecimiento de las levaduras mutantes en un medio no fermentable cuando el ADNc se halla en la orientación correcta. Las levaduras transformadas con el plásmido sin inserto o con el inserto en la orientación inversa no son capaces de crecer en el medio no fermentable. Respecto de la segunda variante del *splicing*, *AtCOX19-1.2*, no observamos la restauración de la respiración en las levaduras mutantes transformadas con un plásmido que expresa esta especie. Estos resultados indican que *AtCOX19-1.1* es capaz de reemplazar la función de la proteína de levaduras Cox19p, la cual ha sido involucrada en la biogénesis de COX, sugiriendo que *AtCOX19-1.1* es un homólogo funcional de Cox19p. Además, podemos decir que *AtCOX19-2* cumple la misma función, ya que es

idéntica a AtCOX19-1.1. La isoforma que no es capaz de restaurar la respiración de las levaduras mutantes es aquella que posee un extremo N-terminal extra con respecto a otras proteínas COX19 de plantas.

### 3.2.5. Caracterización del patrón de expresión de *AtCOX19*

Nos propusimos determinar el patrón de expresión de *AtCOX19*, para lo cual realizamos experimentos de Northern blot (Materiales y Métodos 2.9.5) utilizando ARN total obtenido a partir de diferentes órganos de plantas maduras. Observamos que los transcritos correspondientes a *AtCOX19* se encuentran presentes en todos los órganos ensayados (Figura 29).

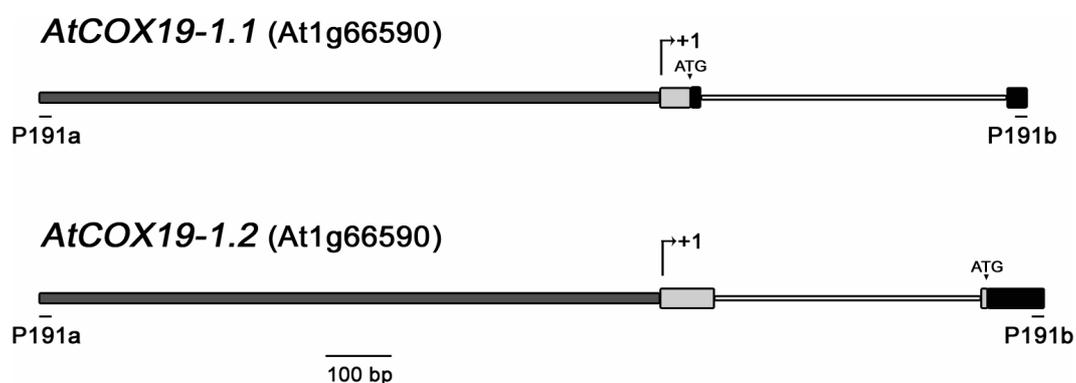


**Figura 29: Expresión de los genes *AtCOX19* en diferentes órganos.** Se realizó un ensayo de Northern blot con 15 µg de ARN total en cada calle. El ARN total se extrajo de diferentes órganos de plantas de *Arabidopsis* de 4 semanas. En la parte superior, se muestra la hibridización realizada con una sonda que corresponde al ADNc completo de *AtCOX19-1.1*. En la parte inferior, se muestra la hibridización de la misma membrana con una sonda de *ARNr* que se utiliza como referencia, para comparar la cantidad de ARN total sembrado en cada calle.

Mediante experimentos de RT-PCR, analizamos los niveles relativos de ambas variantes de *splicing* de *AtCOX19-1* en diferentes órganos, utilizando oligonucleótidos que amplifican ambas isoformas pero generan fragmentos de distinto tamaño. Determinamos que la variante 1 es mucho más abundante, en todas las condiciones ensayadas, que la variante 2. En base a nuestros resultados, no podemos diferenciar si los productos de PCR corresponden a la variante 1 de *AtCOX19-1*, o a *AtCOX19-2*, ya

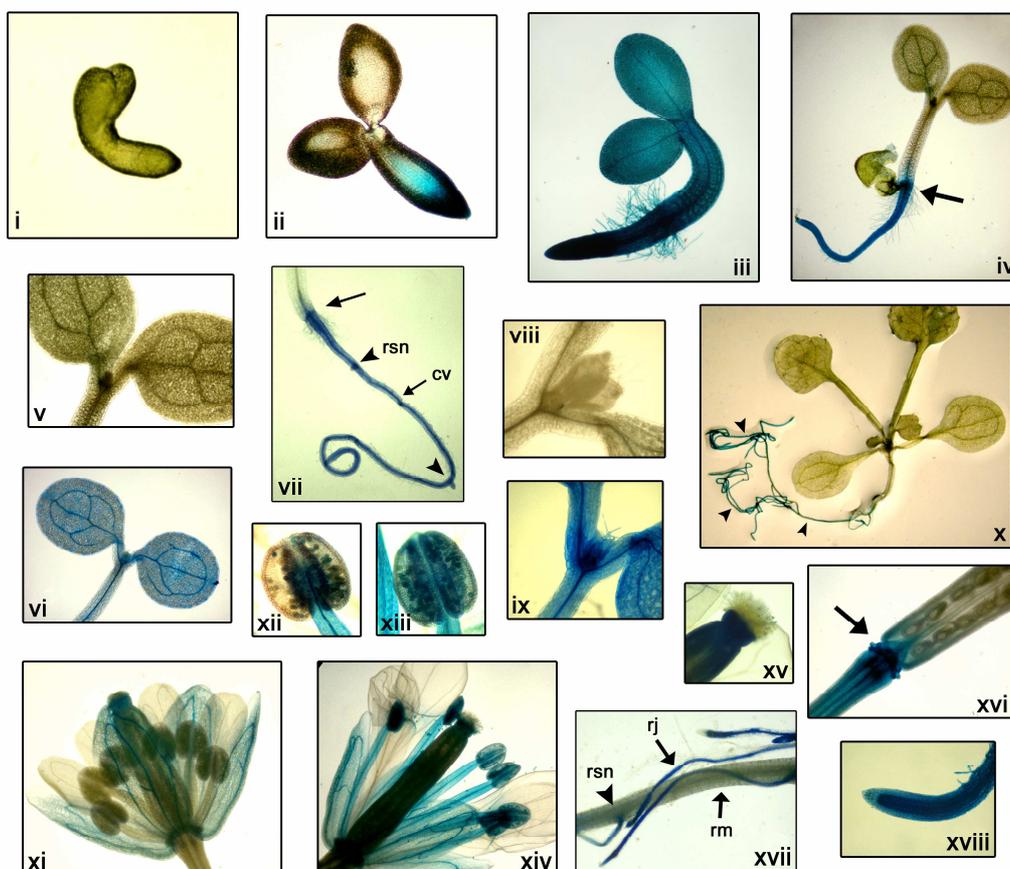
que ambos transcritos presentan una identidad cercana al 100%. Al buscar la frecuencia de anotaciones de ADNc para cada uno de estos genes en las bases de datos, observamos que *AtCOX19-1* se expresa a niveles similares que *AtCOX19-2*. Es decir que en nuestros experimentos determinaríamos los niveles de ambos transcritos.

Para analizar la expresión de los genes *AtCOX19*, aislamos las regiones promotoras de ambos genes a partir de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*. Estos fragmentos, de 1503 pb y 1518 pb para *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2*, respectivamente, están compuestos por una región de aproximadamente 1 Kpb cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción y alrededor de 500 pb de la región transcrita. La región transcrita incluida abarca completamente el primer exón e intrón y comprende los primeros 40 nucleótidos del segundo exón en el caso de *AtCOX19-1.1* y *AtCOX19-2*. En el caso de *AtCOX19-1.2*, el primer intrón está localizado dentro de la región 5' no codificante, mientras que en los otros casos se ubica en la región codificante, 10 nucleótidos hacia el 3' del ATG (Figura 30). Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector binario pBI101.3, fusionados traduccionalmente a la región codificante del gen reportero *gus*. Con los clones obtenidos, obtuvimos plantas transgénicas a través del método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina y analizadas a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3).



**Figura 30: Estructura del fragmento utilizado para estudiar la expresión de *AtCOX19-1*.** El fragmento clonado contiene una región que posee funciones diferentes en ambas variantes de *AtCOX19-1*. Para *AtCOX19-1.2* el primer intrón se encuentra en la región 5' no codificante, mientras que para *AtCOX19-1.1* dicho intrón está dentro de la región codificante. Para *AtCOX19-2*, la estructura del fragmento analizado es idéntica a la de *AtCOX19-1.1*, aunque existe una secuencia diferente corriente arriba del nucleótido -389 con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Las regiones codificantes se muestran en negro y las regiones no codificantes en gris. La línea gris más delgada representa los intrones. En gris oscuro se muestra la región no transcrita.

A fin de analizar la expresión del gen reportero *gus* dirigida por las regiones promotoras de los genes *AtCOX19*, realizamos un seguimiento de los patrones de expresión en 10 líneas independientes para cada construcción.



**Figura 31:** Patrón de expresión de GUS dirigido por la región promotora de *AtCOX19-1*. (i) Embrión en fase torpedo tardía. Plántulas de 1 (ii), 2 (iii), 3 (iv), 4 (v, vi y vii), 6 (viii y ix), y 13 (x) días. En el caso de i, ii, iv, v, vii, viii y x, las plántulas fueron incubadas durante 1,5 horas con el sustrato cromogénico. En el caso de iii, vi y ix, fueron incubadas durante 16 h con el sustrato de la reacción. (xi y xiv) Flores y (xvii y xviii) raíces de plantas adultas. (xii y xiii) Se muestra el detalle de las anteras de xi y xiv, respectivamente. (xv y xvi) Estigma y receptáculo. Abreviaturas: rsn, raíz secundaria naciente; cv, cilindro vascular; rj, raíz joven; rm, raíz madura.

En primer lugar, analizamos el patrón de expresión de GUS generado por la región promotora de *AtCOX19-1*. En la Figura 31 (ii-iv, vii y x) se puede observar actividad GUS en las raíces de las plántulas crecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X. Observamos actividad GUS en las raíces en etapas tempranas del desarrollo (1-2 días luego de la imbibición), aunque no observamos tinción en etapas tardías de la

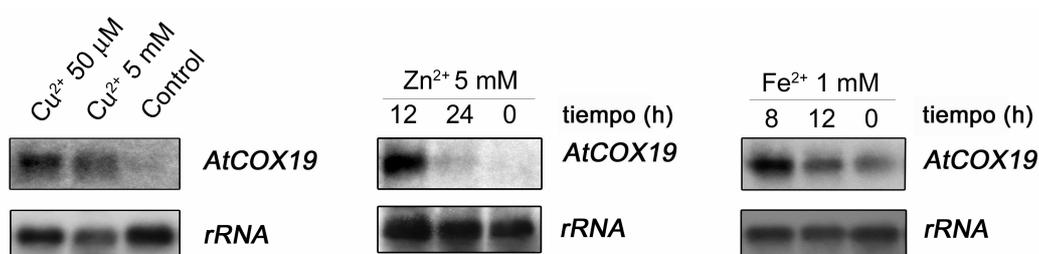
embriogénesis (Figura 31 i). Podemos observar expresión de GUS en el meristema radicular, el cilindro vascular de la raíz y las raíces secundarias nacientes. Al prolongar la incubación de las plantas con el reactivo cromogénico durante toda la noche, observamos también tinción de hipocótilos y cotiledones, principalmente en el tejido vascular y los primordios de hojas (Figura 31, iii, vi y ix). En plantas adultas observamos actividad GUS en raíces, flores y vainas, pero no en tallos ni hojas (Figura 31, xi-xviii). El patrón de expresión en las raíces cambia durante el desarrollo. En las raíces jóvenes observamos actividad GUS especialmente en el meristema radicular, en el cilindro vascular y en las raíces secundarias nacientes, mientras que en las raíces maduras no observamos signos de tinción (Figura 31, xvii y xviii). En flores, observamos expresión de GUS en las venas de los sépalos y en los filamentos de las anteras (Figura 31, xi y xiv). En polen también observamos actividad GUS, pero sólo luego de la antesis (Figura 31, xii y xiii). Además, observamos expresión de GUS en el receptáculo de flores y vainas (Figura 31, xi y xvi).

Al analizar el patrón de expresión de GUS dirigido por la región promotora de *AtCOX19-2* no encontramos diferencias respecto del patrón observado para *AtCOX19-1*. Este resultado no nos sorprende, debido a que ambas regiones promotoras presentan un 100% de identidad en los primeros 430 pb a partir del sitio de inicio de la traducción y, como veremos más adelante, la remoción de secuencias ubicadas por arriba de esta posición no produce cambios en el patrón de expresión de GUS.

### ***3.2.6. Análisis de la incidencia de metales en la expresión de AtCOX19***

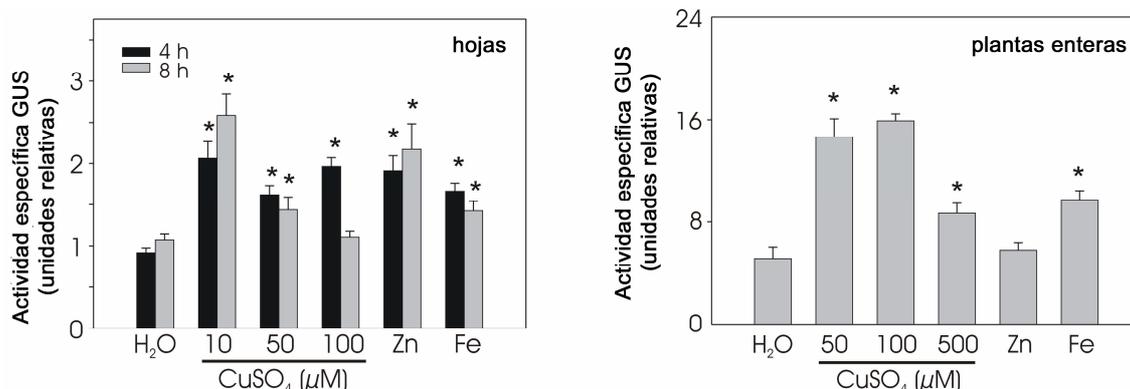
En función de que la proteína Cox19p de levaduras puede unir metales, y se la ha involucrado en su transporte (Rigby y col., 2007), nos decidimos a estudiar el efecto que produce sobre la expresión de *AtCOX19* la incubación en presencia de algunos metales. Específicamente evaluamos, por Northern blot, el efecto de sales de cobre, hierro y zinc en plántulas de 15 días incubadas en hidroponía en cada una de las soluciones ensayadas. En la Figura 32, observamos un incremento del nivel de

transcriptos correspondientes a *AtCOX19* luego de 8 horas de incubación con  $\text{CuSO}_4$  50  $\mu\text{M}$  y 5 mM. Al incubar las plantas en presencia de  $\text{ZnCl}_2$  5 mM o  $\text{FeSO}_4$  1 mM, también observamos un aumento en el nivel de transcriptos.



**Figura 32: Inducción de los genes *AtCOX19* en presencia de metales.** Se incubaron plantas de *Arabidopsis* de 15 días en  $\text{CuSO}_4$  50  $\mu\text{M}$  o 5 mM (izquierda) durante 8 horas, y en  $\text{ZnCl}_2$  5 mM (centro) o  $\text{FeSO}_4$  1 mM (derecha), durante diferentes tiempos. Luego de la incubación, se extrajo ARN total y se realizó un Northern blot con la sonda correspondiente al ADNc completo de *AtCOX19-1.1*. Se realizó una hibridización con la sonda de *ARNr* como control de la cantidad de ARN total sembrado en cada calle.

Además, evaluamos el efecto de estos metales en las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX19-1*. Para realizar este ensayo, infiltramos hojas de dichas plantas, de 4 semanas, con las distintas soluciones. En la Figura 33 (izquierda) podemos observar que se produce un incremento significativo en la actividad GUS al utilizar  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  o  $\text{FeSO}_4$ . También se observó inducción en plantas enteras crecidas en vermiculita e irrigadas con distintas soluciones de los metales ensayados durante 2 días (Figura 33, derecha), salvo en el caso del  $\text{ZnCl}_2$ , donde el efecto observado no fue significativo.



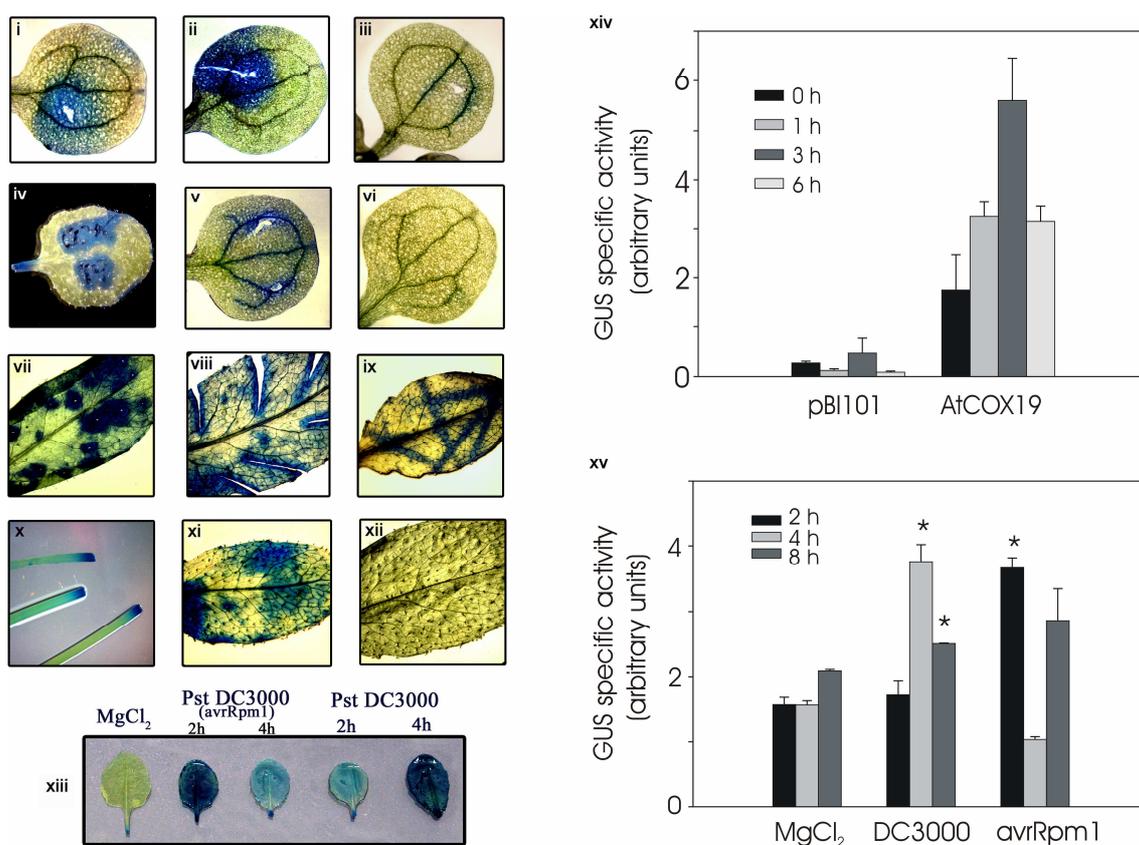
**Figura 33:** Actividad GUS dirigida por la región promotora de *AtCOX19-1* en presencia de metales. Se infiltraron hojas de plantas transformadas de 4 semanas con H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> a diferentes concentraciones, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM o FeSO<sub>4</sub> 1 mM (izquierda). Además, se crecieron plantas en vermiculita durante 10 días y luego fueron irrigadas durante 2 días más con soluciones que contenían CuSO<sub>4</sub> a diferentes concentraciones, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM o FeSO<sub>4</sub> 1 mM. Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS. Los asteriscos indican cambios significativos en la expresión respecto del control ( $P < 0,05$ ), según el test de Student.

### 3.2.7. Análisis de la incidencia de factores de estrés biótico y abiótico en la expresión de los genes *AtCOX19*

Encontramos muchas similitudes entre los genes *AtCOX17* y *AtCOX19*, ya que todos ellos presentan patrones de expresión semejantes. Al analizar sus regiones promotoras encontramos en todas ellas sitios site II e intrones cercanos a la región 5' no codificante. Además, las proteínas que codifican estos genes poseen similitudes estructurales y participarían en procesos relacionados. Todo esto nos llevó a efectuar para *AtCOX19* un análisis similar al que realizamos para los genes *AtCOX17*. Al producir cortes en hojas o tallos, observamos un aumento de la actividad GUS en forma localizada, en las regiones adyacentes a las zonas dañadas (Figura 34, i, ii, iv, y vii-x), lo cual nos indica que *AtCOX19-1* se induce por daño o herida. A fin de descartar la posibilidad de un aumento de la tinción debido a una mayor accesibilidad del sustrato en las regiones dañadas, realizamos un experimento similar con plantas transformadas

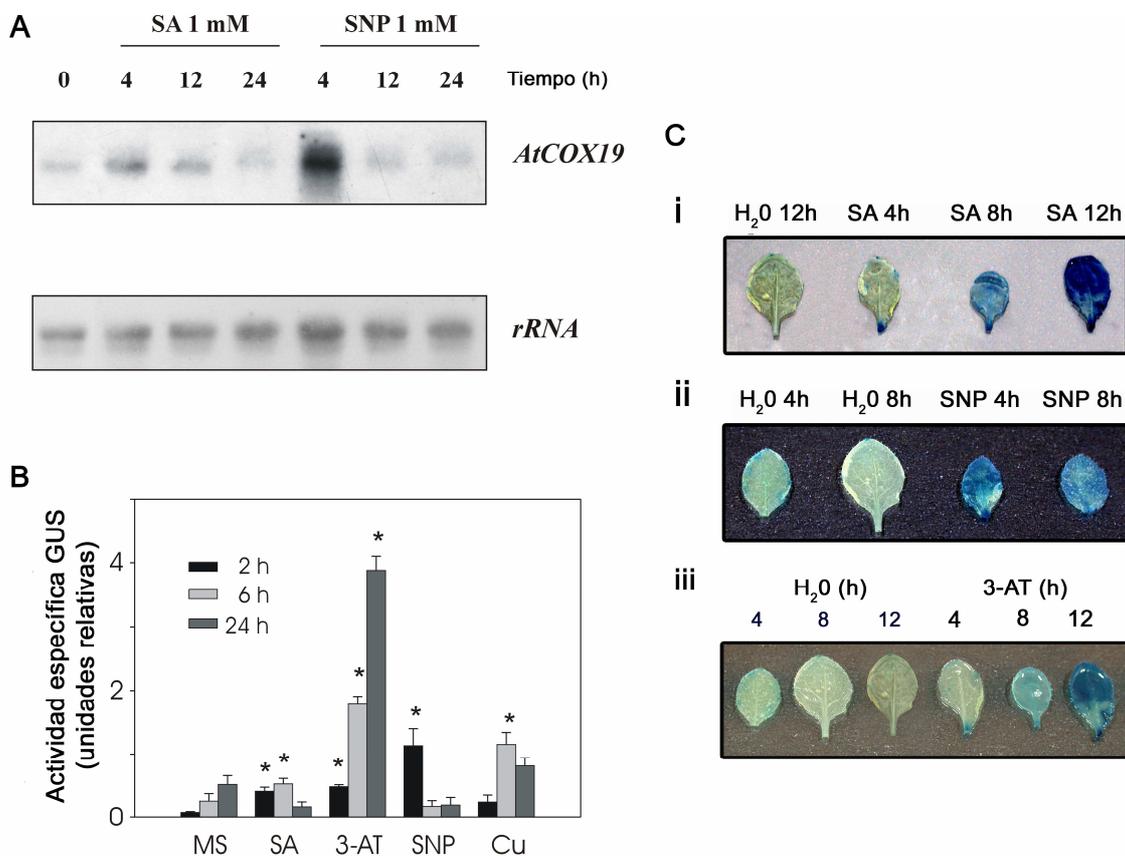
con las regiones promotoras de otros genes, como *AtCytC-2* (Welchen y González, 2005) y *AtCOX5c-2* (Curi y col., 2005), fusionadas a *gus*. No observamos inducción de GUS al dañar los órganos de dichas plantas (Figura 34, iii y v), lo cual nos permite afirmar que el efecto que observamos en las plantas que contienen la región promotora de *AtCOX19-1* es específico. Además, observamos un aumento de la actividad GUS en hojas senescentes (Figura 34, xi).

En la Figura 34 (xiv), podemos observar una cuantificación de la actividad GUS en extractos proteicos de hojas dañadas. Luego de un corto período de tiempo después de dañar las hojas, observamos un aumento de dos o tres veces en la actividad GUS. El aumento del nivel de transcritos correspondientes a *AtCOX19* también fue observado mediante ensayos de Northern blot en hojas dañadas de plantas salvajes (datos no mostrados).



**Figura 34: Actividad GUS dirigida por la región promotora de *AtCOX19-1* frente a injuria y patógenos.** (i-xiii) Análisis histoquímico de la expresión de GUS. Se dañaron los órganos de las plantas transformadas de diferentes maneras, mediante punciones (i, iv y vii), cortes (ii, viii y x), o dobleces (ix), 2 horas antes de la incubación con el sustrato cromogénico. Se realizaron controles de los experimentos con plantas transformadas con las regiones promotoras de *AtCytc-2* (iii) o *AtCOX5c-2* (v) tratadas de manera similar. (vi y xii) Hojas sin tratar. (xi) Hojas senescentes de plantas que contienen la región promotora de *AtCOX19-1*. (xiii) Reacción histoquímica en hojas infiltradas con suspensiones de las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato ( $4 \times 10^8$  ufc/ml) virulenta (DC3000) y avirulenta (avrRpm1). Como control de la infiltración se utilizó una solución de MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Las hojas se infiltraron y se mantuvieron en la suspensión de bacterias o MgCl<sub>2</sub> durante 2 o 4 horas y luego fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con el sustrato de la reacción histoquímica. (xiv y xv) Reacciones fluorométricas para medir la actividad GUS en las hojas de las plantas transformadas, a diferentes tiempos luego de haber sido dañadas (xiv) o expuestas a las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato ( $4 \times 10^8$  ufc/ml) virulenta (DC3000) y avirulenta (avrRpm1) (xv). Como control del experimento se utilizaron plantas transformadas con una construcción que posee el gen *gus* sin promotor (pBI101.3) (xiv). Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS. Los asteriscos indican cambios significativos en la expresión respecto del control ( $P < 0,05$ ), según el test de Student.

Evaluamos también el efecto de la infección con suspensiones de las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato virulenta (DC3000) y avirulenta (avrRpm1). En este caso, también observamos la inducción de la actividad GUS mediante reacciones histoquímicas (Figura 34 xiii) y por ensayos fluorométricos (Figura 34 xv). Considerando que la respuesta a injuria y a patógenos está relacionada con las ROS producidas durante estos tratamientos (Orozco-Cardenas y Ryan, 1999), evaluamos el efecto sobre la expresión de *AtCOX19* del SA, el cual actúa como intermediario en la respuesta frente a patógenos (Rao y col., 1997). Además, analizamos el efecto del SNP, el cual genera óxido nítrico y actúa como intermediario en la respuesta a algunas formas de estrés (Grun y col., 2006). En la Figura 35A podemos observar ensayos de Northern blot, en los que se evidencia un pequeño aumento de los transcritos correspondientes a *AtCOX19* en presencia de SA, luego de unas pocas horas de incubación. En cambio, en presencia de SNP, observamos un mayor aumento en la expresión de *AtCOX19* luego de 4 horas de tratamiento y, al prolongar la incubación por más tiempo, la expresión vuelve a niveles basales (Figura 35A). Evaluamos el efecto de estos compuestos en las hojas de las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX19-1* (Figura 35B y C). En las hojas de estas plantas también ensayamos el efecto de 3-AT, otro compuesto que produce un incremento de las ROS (Wang y col., 1999). En el caso de las hojas infiltradas con 3-AT, observamos una inducción de la actividad GUS considerablemente mayor en relación a las hojas infiltradas con MS 0,5X (Figura 35B y C, iii). En el caso de SA y SNP observamos una inducción de la actividad GUS comparable a la inducción de *AtCOX19* obtenida mediante ensayos de Northern blot (Figura 35B y C, i y ii).



**Figura 35: (A) Análisis del efecto de compuestos que producen estrés oxidativo sobre los niveles de transcritos de *AtCOX19*.** Se analizó el efecto de SA 1 mM y SNP 1 mM, incubando plantas de *Arabidopsis* durante diferentes períodos de tiempo. Se extrajo ARN total y se realizaron ensayos de Northern blot con una sonda correspondiente al ADNc completo de *AtCOX19-1.1*. Se realizó una hibridización con la sonda de *ARNr* como control de la cantidad de ARN total sembrado en cada calle. **(B y C) Análisis del efecto de compuestos que producen estrés oxidativo sobre la actividad GUS de plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX19-1*.** Se realizaron tratamientos con SA 1 mM (B y C, i), SNP 1 mM (B y C, ii), 3-AT 4 mM (B y C, iii), o CuSO<sub>4</sub> 10 μM (B), durante diferentes períodos de tiempo. Como control del experimento se incubaron las hojas en MS 0,5X. En el caso de las hojas que se muestran en C, en cada panel se detuvo la reacción histoquímica al mismo tiempo. Las mediciones se realizaron a partir de un *pool* de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS. Los asteriscos indican cambios significativos en la expresión respecto del control (P<0,05), según el test de Student.

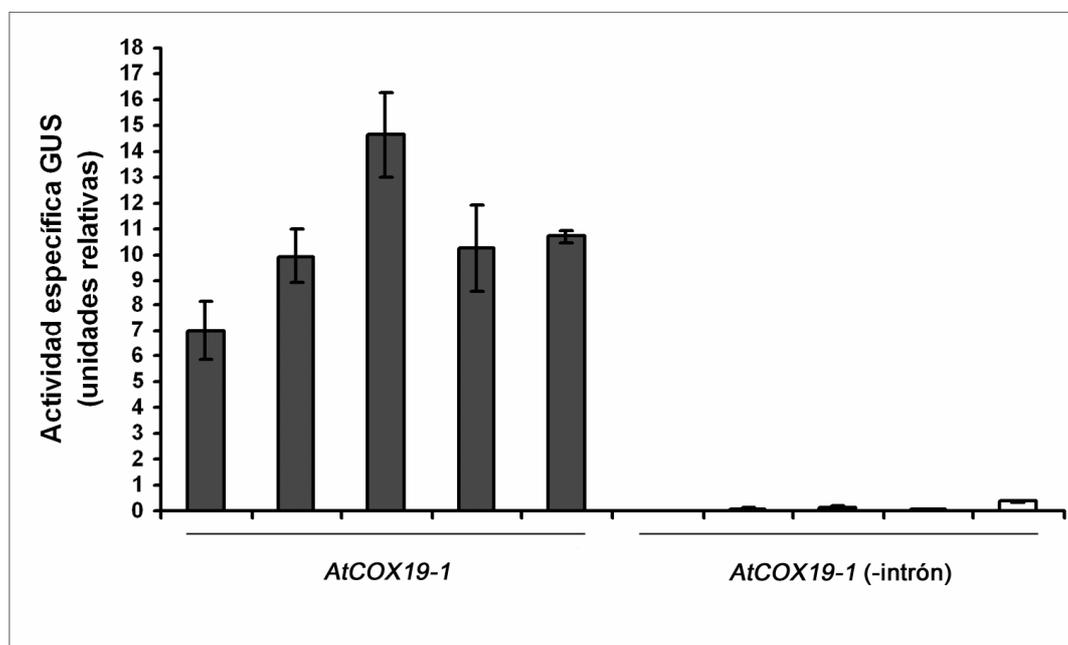
En relación con los resultados que obtuvimos, podemos concluir que los genes *AtCOX19* se inducen frente a varios factores que provocan estrés e incremento de las ROS. En relación a la respuesta que observamos en presencia de metales, ésta podría constituir una consecuencia del aumento de las ROS originadas por el exceso de estos compuestos. Estas respuestas podrían estar relacionadas con las altas demandas de *AtCOX19* necesarias para reemplazar la COX inactiva o dañada.

### ***3.2.8. Análisis de la importancia de la presencia de un intrón cercano a la región 5' no codificante del gen AtCOX19-1***

Como expusimos más arriba, los genes *AtCOX19* presentan un intrón cercano a la región 5' no codificante. En función de los resultados obtenidos con los genes *AtCOX17* y la similitud observada en los patrones de expresión de estos genes y *AtCOX19*, decidimos evaluar la importancia de la presencia de este intrón para la expresión de *AtCOX19-1*. Para tal fin, realizamos la delección del intrón a partir del fragmento de 1503 pb (Materiales y Métodos 2.3.2.1). El fragmento obtenido fue clonado en el vector binario pBI101.3, fusionado a la región codificante del gen reportero *gus*. El clon obtenido fue utilizado para obtener plantas transgénicas mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transformadas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina y analizadas a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3).

Para analizar la expresión del gen reportero *gus* dirigida por la región promotora de *AtCOX19-1* sin el correspondiente intrón realizamos un seguimiento de 10 líneas independientes. En forma similar a lo observado para los genes *AtCOX17*, sólo observamos actividad GUS en anteras al analizar la misma mediante tinción histoquímica (datos no mostrados). Ensayos cuantitativos en extractos de plántulas de

15 días indicaron que la remoción del intrón produce plantas con niveles casi indetectables de actividad GUS (Figura 36).



**Figura 36:** Evaluación del efecto de la remoción del primer intrón sobre la expresión del gen *gus* dirigida por la región promotora del gen *AtCOX19-1*. Se realizaron ensayos fluorométricos para cuantificar la actividad GUS dirigida por la región promotora de *AtCOX19-1* y la correspondiente construcción sin el intrón (-intrón), en plántulas de 15 días. Las mediciones indican los valores de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

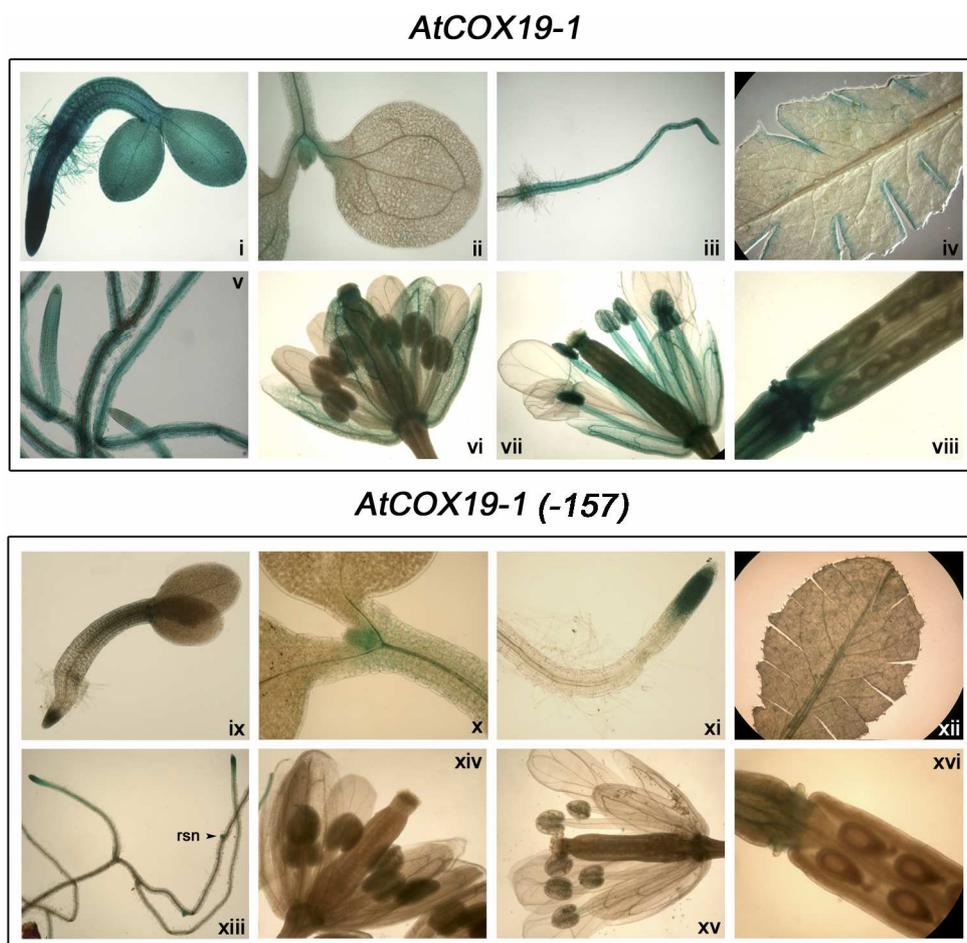
### 3.2.9. Análisis del efecto de deleciones en la región promotora sobre la expresión del gen *AtCOX19-1*

A fin de evaluar qué regiones del promotor de *AtCOX19-1* son importantes para la expresión, a partir del fragmento original de 1503 pb obtuvimos fracciones que abarcan regiones del gen comprendidas entre las posiciones -157, -260 o -389 y +538 (Materiales y Métodos 2.3.2.1). Estos fragmentos fueron clonados en el vector binario pBI101.3, fusionados a la región codificante del gen reportero *gus*. Con los clones obtenidos, obtuvimos plantas transgénicas mediante el método de transformación

mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transgénicas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina y analizadas a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3). Realizamos un seguimiento de los patrones de expresión de 10 líneas independientes.

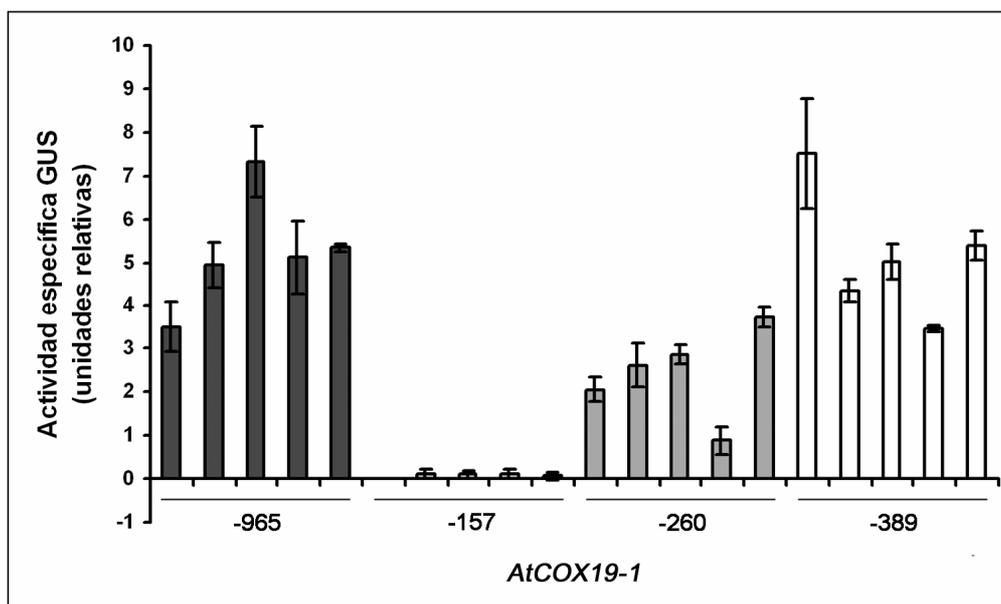
Observamos que el patrón de expresión de GUS se encuentra conservado al emplear las regiones promotoras que abarcan desde -389 o -260 a partir del sitio de inicio de la transcripción. Debemos destacar que la intensidad de la expresión es menor en la segunda de ellas, ya que logramos una coloración comparable a la obtenida con las regiones promotoras más grandes luego de una incubación más prolongada. En el caso de la región que abarca desde -389, la intensidad de la expresión es comparable a la de la región promotora evaluada inicialmente. Ambas construcciones mostraron inducción de la actividad GUS mediante la aplicación de daño mecánico (datos no mostrados), lo cual indica que las regiones necesarias para esta respuesta están corriente abajo de -260.

En el caso de la región promotora que abarca desde -157 a partir del sitio de inicio de la transcripción, observamos un cambio en el patrón de expresión respecto de la región promotora utilizada originalmente (Figura 37, ix-xvi), ya que el fragmento más corto dirige la expresión de GUS sólo en regiones meristemáticas y en las raíces secundarias nacientes (Figura 37, x, xi y xiii). No observamos actividad GUS en ningún órgano floral (Figura 37, xiv-xvi). Tampoco observamos actividad GUS al dañar los tejidos de las plantas transformadas (Figura 37 xii).



**Figura 37:** Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con la región promotora original de *AtCOX19-1* (parte superior) y con una región acortada (-157; parte inferior), fusionadas al gen reportero *gus*. Analizamos plantas de 2 (i y ix), 5 (ii, iii, x y xi) y 15 (v y xiii) días. Además, analizamos hojas (iv y xii), vainas (viii y xvi) y flores (vi, vii, xiv y xv) de plantas adultas. Abreviatura: rsn, raíz secundaria naciente.

A fin de cuantificar la disminución de la expresión de GUS originada por la delección de la región promotora ubicada por encima de -157, realizamos ensayos de actividad con extractos proteicos de plantas de 15 días. En la Figura 38 podemos observar que dicha delección causa una gran disminución en los niveles de expresión.



**Figura 38:** Evaluación de la expresión del gen *gus* dirigida por las regiones promotoras que abarcan desde -157, -260 o -389 a partir del sitio de inicio de la transcripción del gen *AtCOX19-1*, en comparación con la región promotora original (-965). Se realizaron ensayos fluorométricos a fin de cuantificar la actividad GUS en extractos de plántulas de 15 días. Las mediciones se realizaron a partir de cinco líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

Del análisis de los datos anteriores, nos resulta interesante destacar que la región que abarca desde -389 a partir del sitio de inicio de la transcripción genera un patrón de expresión semejante al que obtuvimos al estudiar la región promotora más grande del gen *AtCOX19-1*. Este resultado es consistente con nuestra observación de que la expresión producida por la región promotora de *AtCOX19-2* es similar a la de *AtCOX19-1*, dado que ambas regiones son idénticas por debajo de -389 pero se diferencian más arriba de esta posición. Esto indicaría que los elementos que determinan el patrón de expresión de los genes *AtCOX19* se hallan corriente abajo de -389. Buena parte de estos elementos estarían ubicados entre -260 y -157. Por otro lado, en cuanto a la respuesta frente a patógenos y compuestos que generan un aumento de las ROS, la misma parece estar determinada por elementos ubicados corriente arriba de -

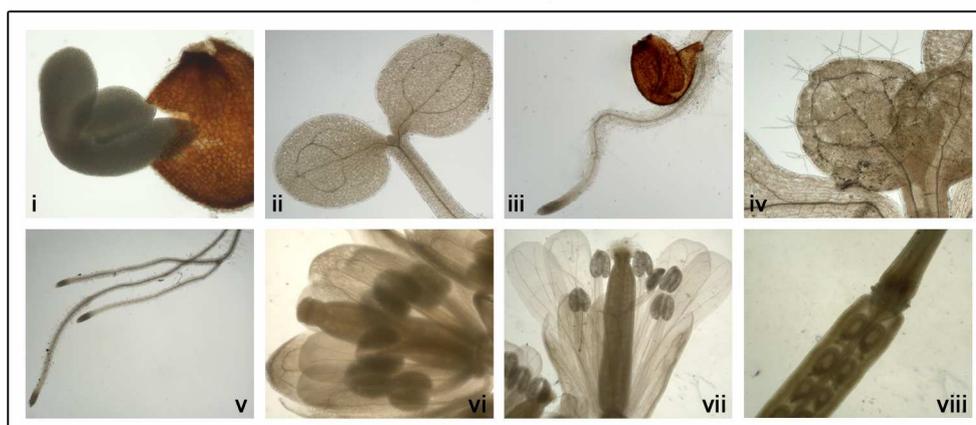
389, ya que no obtuvimos un aumento de la expresión de GUS al emplear las regiones promotoras más cortas (datos no mostrados).

Es interesante destacar que la región más corta, que abarca desde -157 a partir del sitio de inicio de la transcripción, contiene elementos site II, como los descriptos anteriormente para el caso de los genes *AtCOX17*.

### ***3.2.10. Análisis de la importancia de los motivos site II para la actividad de la región promotora del gen *AtCOX19-1****

Las regiones promotoras de los genes *AtCOX19* poseen motivos site II cercanos al sitio de inicio de la transcripción. Al analizar la importancia de la presencia de estos motivos en las regiones promotoras de ambos genes *AtCOX17*, observamos una marcada disminución de la actividad GUS en ausencia de los mismos. A fin de evaluar el papel de los elementos site II en la expresión de los genes *AtCOX19*, generamos un promotor mutante a partir del fragmento -157 (Materiales y Métodos 2.3.2.1).

Analizamos la expresión del gen reportero *gus* dirigida por la mencionada región promotora, con los motivos site II mutados, realizando un seguimiento de 10 líneas independientes. La expresión desaparece totalmente en la construcción carente de los motivos site II (Figura 39), lo cual nos sugiere que los mismos son esenciales para la expresión de los genes *AtCOX19*. Es interesante destacar que en la construcción que abarca hasta la posición -157 sólo observamos expresión en las regiones meristemáticas. Este resultado es consistente con la importancia asignada a la presencia de estos motivos en genes relacionados con la fosforilación oxidativa mitocondrial y con la expresión de los mismos en regiones meristemáticas y/o células en activa proliferación (Kosugi y col., 1991; Kosugi y col., 1995; Trémousaygue y col., 2003). Elementos ubicados corriente arriba de los site II serían los responsables de incrementar los niveles de expresión en otros tejidos.

*AtCOX19-1 (-157) mut sitell*

**Figura 39:** Análisis de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con la región promotora de *AtCOX19-1 (-157)* con los motivos site II mutados. Se muestran ensayos histoquímicas en plantas de 1 (i), 4 (ii y iii) y 13 (iv y v) días. Además, analizamos vainas (viii) y flores (vi y vii) de plantas adultas. Como control, se realizaron en paralelo ensayos con plantas transformadas con la misma construcción sin mutaciones, los que dieron los resultados descritos más arriba.

### 3.2.11. Discusión

Hemos identificado dos genes en *Arabidopsis thaliana* que codifican proteínas homólogas a Cox19p de levaduras, la cual ha sido involucrada en el transporte de metales para el ensamblado de COX, en forma directa o a través de un intermediario proteico (Nobrega y col., 2002; Rigby y col., 2007). Ambos genes codifican proteínas idénticas, pero uno de ellos (*AtCOX19-1*) sufre un *splicing* alternativo por el cual se generan dos isoformas, *AtCOX19-1.1* y *AtCOX19-1.2*. La segunda variante de *splicing* presenta una región N-terminal extra y esta proteína constituye una particularidad de *Arabidopsis*. En función de nuestros resultados de complementación de levaduras mutantes en *cox19*, pudimos determinar que la proteína codificada por *AtCOX19-1.1* (o por *AtCOX19-2*) constituye un homólogo funcional de Cox19p, ya que es capaz de restituir la respiración en las mencionadas mutantes y, por consiguiente, estaría actuando como una metalochaperona en estos organismos. La funcionalidad de

AtCOX19 en un sistema heterólogo nos sugiere que la vía de transporte de cobre hacia COX está conservada entre levaduras y plantas.

Mediante experimentos *in vitro*, demostramos que AtCOX19 es importada a las mitocondrias vegetales. Ambas isoformas de estas proteínas se encuentran interaccionando con la membrana interna, orientadas hacia el espacio intermembrana. Debemos recordar que Cox19p, en levaduras, es importada a la mitocondria a través de una vía que involucra a Mia40 (Mesecke y col., 2005; Rissler y col., 2005), mediante un proceso que requiere la presencia de motivos de cisteína característicos. AtCOX19 posee dichos residuos de cisteína y, al igual que la proteína de levaduras, no necesita el potencial de membrana para que se lleve a cabo la importación. En plantas no se conoce una vía de importación semejante a la de Mia40 pero, a fin de encontrar alguna similitud, evaluamos el efecto de un agente reductor sobre la importación de AtCOX19, ya que en levaduras este tratamiento inhibe la vía mencionada (Mesecke y col., 2005). En nuestro caso, no observamos la inhibición de la importación de AtCOX19 luego del tratamiento de las mitocondrias de plantas con DTT 20 mM. Esto podría indicar que existen diferencias entre los mecanismos de importación de levaduras y plantas.

A pesar de que la segunda isoforma es importada a las mitocondrias de plantas, ésta no es capaz de revertir el fenotipo de deficiencia respiratoria que presentan las levaduras mutantes en *cox19*. Esto podría deberse a que esta proteína no es funcional, a que no se ha importado a la mitocondria de levaduras, o bien a que no se ha expresado eficientemente en dicho organismo. Esta última posibilidad es algo improbable ya que se utilizó el mismo promotor para expresar ambas isoformas y se modificó el contexto del codón ATG de cada una de ellas para que sea idéntico (TACAAAGATGA). Además, la posibilidad de que esta isoforma no se dirija a la mitocondria de levaduras también es algo improbable ya que dicha proteína es capaz de ser importada a mitocondrias de plantas. En función de estas consideraciones, la explicación más consistente es que AtCOX19-1.2 parece no ser funcional en levaduras. Recordemos que ésta es la única proteína COX19 que presenta una porción N-terminal extra, lo cual

podría significar que la misma posee una función aún desconocida en Arabidopsis o bien que es un producto no funcional.

A partir de la función que se le ha asignado a COX19, relacionada con el transporte intracelular de los iones metálicos requeridos para el ensamblado de COX, especulamos que las proteínas de Arabidopsis se expresan en tejidos o células con una activa biogénesis mitocondrial. La expresión preferencial en anteras y raíces está de acuerdo con esto, ya que en estos tejidos el número de mitocondrias por célula es mayor (Fujie y col., 1993; Lee y Warmke, 1979). Los promotores de varios genes que codifican componentes de la cadena respiratoria dirigen la expresión de genes reporteros en los mismos tejidos (Curi y col., 2005; Elorza y col., 2004; Mufarrege y col., 2009; Welchen y col., 2004; Welchen y González, 2005; Zabaleta y col., 1998). Por otra parte, nos resulta interesante la semejanza en los patrones de expresión de los genes *AtCOX19* y *AtCOX17*, lo que sugiere que las proteínas codificadas por los mismos tienen funciones altamente relacionadas.

Mediante experimentos de localización en levaduras, se determinó que Cox19p está presente tanto en el citosol como en el espacio intermembrana mitocondrial (Nobrega y col., 2002). Estudios más recientes sugieren que únicamente la localización mitocondrial es necesaria para el ensamblado de COX, ya que la función respiratoria se mantiene intacta cuando Cox19p se encuentra anclada a la membrana interna (Rigby y col., 2007). Si no es necesaria para la biogénesis de COX, la existencia de una forma citosólica de Cox19p sugiere la posibilidad de alguna función adicional para esta proteína. Al analizar la expresión de las proteínas COX19 en organismos pluricelulares, como Arabidopsis, podríamos obtener mayores evidencias para argumentar a favor de dicha hipótesis. La fuerte expresión en las raíces jóvenes de las plantas puede indicar que *AtCOX19* posee un papel a nivel tisular en el transporte de metales, los cuales son incorporados a través de las raíces (Burkhead y col., 2009). Los transcritos correspondientes a *AtCOX19-1* se incrementan al incubar las plantas en soluciones con cobre, hierro y zinc. Aunque dicha respuesta podría reflejar la actuación de *AtCOX19* en el transporte de metales, probablemente la inducción en la expresión de *AtCOX19-1*

es una consecuencia del daño producido en las plantas por la acumulación de altos niveles de los mismos, quizás a través de un incremento de los niveles de ROS (Drazkiewicz y col., 2004). Consistentemente con esta hipótesis, *AtCOX19-1* también se induce en presencia de agentes que participan en la generación de ROS, tales como 3-AT, SNP y SA, y por la infección con patógenos y el daño a las hojas. Se sabe que diferentes tipos de estrés inducen la vía respiratoria alternativa (Møller, 2001). Dicha inducción permite mitigar la producción de ROS (Bartoli y col. 2004; Sweetlove y col., 2002; Taylor y col. 2004; Van Aken y col., 2009). Nuestros resultados sugieren que un aumento en la producción de ROS, además de inducir la vía respiratoria alternativa, provoca un aumento de proteínas involucradas en la biogénesis de la vía del citocromo *c*, quizás para reemplazar los componentes inactivos o dañados. Los resultados que expusimos en el capítulo anterior relacionados con *AtCOX17* se corresponden con los resultados obtenidos para *AtCOX19-1* en relación a la respuesta frente a factores de estrés. Además, del análisis de los datos disponibles de microarreglos observamos que COX15, SCO1 y un grupo no caracterizado de subunidades específicas de COX de plantas (COXX1, COXX6; Millar y col., 2004) se inducen frente a la infección con patógenos y otros factores de estrés. Esta respuesta no constituye una particularidad de la mayoría de los genes que codifican subunidades de COX. Quizás esto es un reflejo de que los factores de ensamblado, y no los componentes estructurales, son un factor limitante en condiciones de estrés. No resulta claro, en función de nuestros resultados, si la inducción de *AtCOX19-1* es debida a las ROS o al daño producido en la mitocondria (una clase de regulación retrógrada) o en otro compartimiento celular. La idea de la existencia de una señal mitocondrial que induzca la expresión de *AtCOX19* es avalada por datos provenientes de microarreglos, en los cuales se observa una inducción de esta proteína por el tratamiento con rotenona, un inhibidor de la cadena de transporte de electrones a nivel del Complejo I (Lister y col., 2004).

En función de las características de expresión, podríamos especular con una función adicional para *AtCOX19*, además de su participación en el ensamblado de COX, como podría ser el transporte de metales y/o la protección contra el estrés

oxidativo. Sería interesante dilucidar el mecanismo de transducción de señales que provoca la inducción de *AtCOX19* y analizar mutantes en los correspondientes genes a fin de obtener mayor información acerca del papel de esta proteína en plantas.

### **3.3. CAPÍTULO III**

**“Identificación y caracterización del gen que codifica una proteína homóloga a Cox11p en *Arabidopsis thaliana*”**

## CAPÍTULO III

### 3.3. Identificación y caracterización del gen que codifica una proteína homóloga a Cox11p en *Arabidopsis thaliana*

#### 3.3.1. Introducción

Cox11p de levaduras se identificó como una proteína importante para la respiración y la actividad de COX. Las mutantes en *cox11* muestran defectos en la actividad de COX debido a la degradación de la subunidad Cox1p y la inestabilidad del hemo *a* (Tzagoloff y col., 1990). Se ha demostrado que Cox17p puede transferir el cobre directamente a Cox11p, aunque aún no se pudo demostrar la interacción física entre estas proteínas (Horng y col., 2004), y luego Cox11p transferiría el cobre a la subunidad Cox1p.

Cox11p podría estar relacionada con la respuesta ante el estrés oxidativo, ya que las levaduras mutantes en *cox11* son sensibles al peróxido de hidrógeno (Banting y Glerum, 2006). Además, como expusimos en la Introducción General, el gen *cox11* fue identificado durante dos búsquedas diferentes de genes que participan en la biosíntesis de la pared celular (Lussier y col., 1997; Tong y col., 2004). Las levaduras mutantes en *sco1* también muestran un fenotipo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno (Williams et al. 2005), mientras que las levaduras mutantes en *cox17* no (Banting y Glerum, 2006). Es interesante destacar que existen otras mutantes de levaduras en genes que codifican componentes de COX que no presentan sensibilidad al peróxido de hidrógeno, lo cual sugiere que la pérdida de actividad de COX no es determinante para generar el fenotipo de sensibilidad al mencionado compuesto. Se ha propuesto que la sensibilidad al peróxido de hidrógeno de las levaduras mutantes en *cox11* y *sco1* se debe a la producción y acumulación de intermediarios pro-oxidantes Cox1p-hemo durante el ensamblado de COX (Khalimonchuk et al. 2007). Además, se ha sugerido que Cox11p

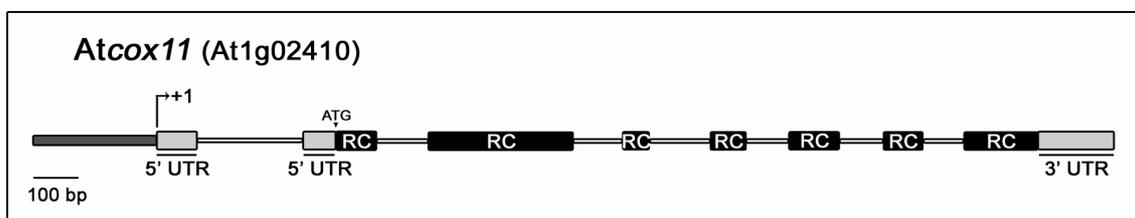
podría actuar como una peroxidasa mitocondrial, pero la sobreexpresión de esta proteína no confiere un incremento en la resistencia al peróxido de hidrógeno en levaduras. Quizás participa en la respuesta al daño producido por el peróxido de hidrógeno sobre COX (Banting y Glerum, 2006).

Se demostró que una forma recombinante de Cox11p de levaduras es capaz de unir cobre (Carr y col., 2002). Aparentemente, Cox11p actúa como un dímero y puede unir un  $\text{Cu}^+$  por monómero por medio de un motivo CXC localizado en el dominio C-terminal. Una tercera cisteína conservada, cercana al dominio transmembrana y del lado del espacio intermembrana, no participa en la unión de cobre pero podría estar involucrada en la formación del dímero. Al reemplazar cualquiera de estas cisteínas conservadas se modifica la unión de cobre y se produce una deficiencia de COX (Carr y col., 2002).

En los capítulos anteriores estudiamos las proteínas de Arabidopsis homólogas a Cox17p y Cox19p, las cuales están involucradas con el ensamblado de COX. Nos resulta interesante estudiar posibles homólogos en plantas de las proteínas de levaduras que actúan corriente abajo de, al menos, Cox17p. En este capítulo describimos nuestros resultados sobre *AtCOX11*, un gen de Arabidopsis que codifica una proteína que presenta una alta similitud de secuencia con Cox11p de levaduras.

### **3.3.2. Identificación del gen que codifica una proteína homóloga a Cox11p**

En el genoma de Arabidopsis se encontró un gen que codifica una proteína similar a la proteína de levaduras Cox11p, el cual se localiza en el cromosoma 1. Este gen fue denominado *AtCOX11* (At1g02410). *AtCOX11* presenta un intrón en la región 5' no codificante (Figura 40), de la misma manera que los genes *AtCOX17* y *AtCOX19-1*.



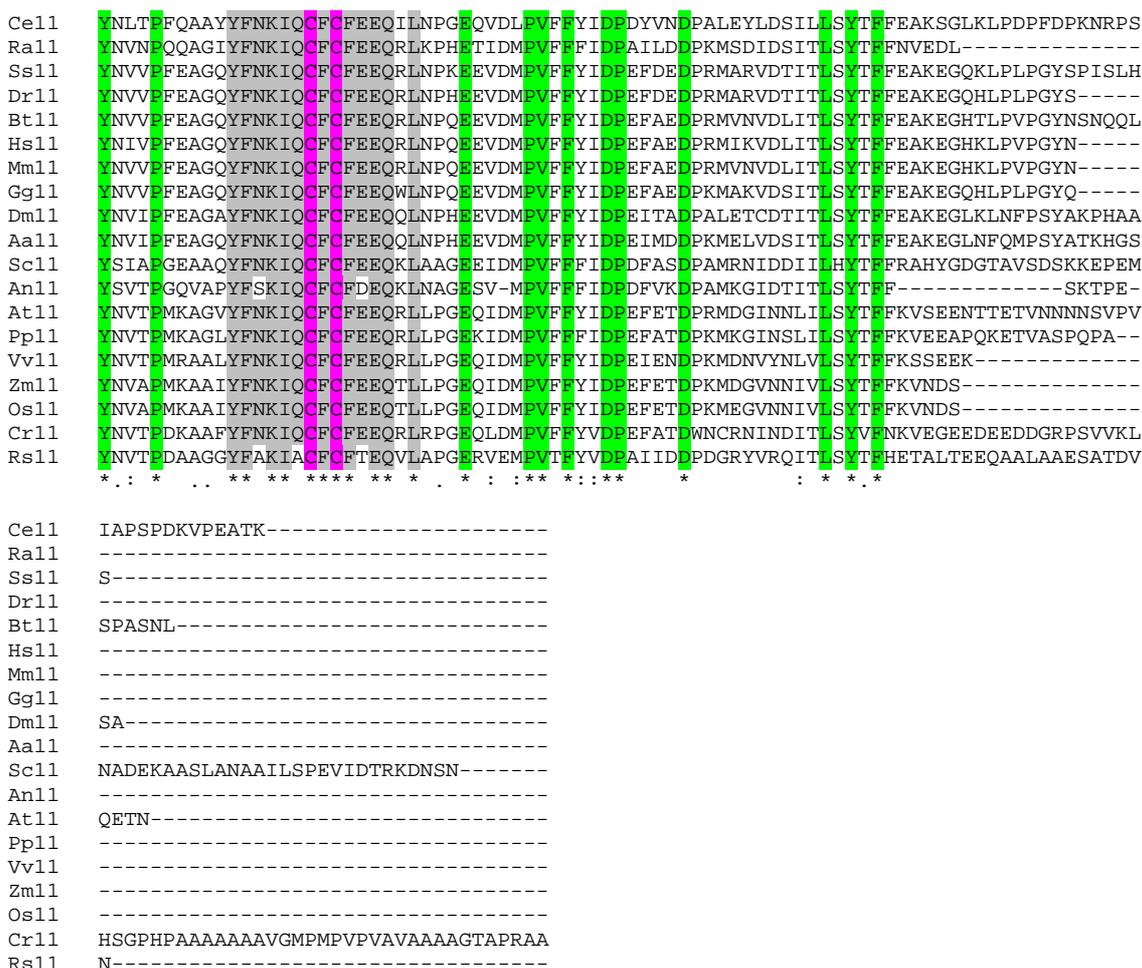
**Figura 40:** Esquema del gen *AtCOX11*. Las regiones codificantes (RC) se muestran en negro y las regiones no codificantes (UTR) en gris. La línea gris más delgada representa los intrones.

La región C-terminal de AtCOX11 presenta el motivo CXC que ha sido involucrado en la unión al cobre en la proteína de levaduras, e incluso presenta la tercera cisteína conservada que se ha relacionado con la formación del dímero (Carr y col., 2002). Realizamos una búsqueda en bases de datos a fin de identificar proteínas homólogas a AtCOX11 en otros organismos. Las secuencias proteicas encontradas presentan una gran similitud en las regiones centrales y C-terminales de las respectivas proteínas. Esta similitud es sorprendentemente alta entre los residuos que componen el motivo de unión a cobre y su entorno, ya que en realidad podemos encontrar un gran motivo conservado en dicha región: YFNKIQ**CF**CFEEQXL (Figura 41). Las letras sin resaltar corresponden a los residuos que, si bien están conservados en las proteínas analizadas, en las proteínas COX11 de *Rhodobacter sphaeroides* y *Arpergillus niger* presentan diferencias. Se debe destacar que en el protozoo *Reclinomonas americana* COX11 se encuentra codificada en el genoma mitocondrial (Gray y col., 1998).

Ce11 -----MSLSRLWGPARSACYSFATKSPLATLSSLQRNSN-----  
Ra11 -----MFKNRK-----  
Ss11 -----MLLPILVRESLCCSKNSVLLTSSNIQTCIRGLQEGEGARGFHSYAQW  
Dr11 -----MLSSFLLRG-CTAKHYIQALSS-TRLCDICT---IRRLATSSSQ  
Bt11 -----MGGLWRPAWRRVFCGWSWSHLGRPTRAERAEPCLRPGRSGPAGTEQQ  
Hs11 -----MGGLWRPGWRCVFCGWRWIHPGSPTRAERVEFPLRPEWSGTGGAERG  
Mm11 -----MGGLWCPGWRLVASCGRGWRQPGWSGRTVVYAEVLVLRPGWDGLGGAERG  
Gg11 -----MG-QGPGPRLQLCAG-----ALRALALGRAVSRPCRGG-----  
Dm11 -----MMRSLCALRGQCQQLF-----RSSIRPQNSV-----  
Aa11 -----MLLP SLARIAHLCSG-----KSLLRIPRSL-----  
Sc11 -----MIRICPIVRSKVPLLGTFLRSDSWLAPHALALRAICKNVALRSYSVNSEQPKHTFD-----  
An11 -----MTNTRCVDSG---RRFFT-----  
At11 MSWSKACRGRTRISSYLENLHRTSQYPRITILCSRYTHGA-CKSNEHYLRSK-RVFWGSSSSWSLSNSHS-----  
Pp11 -----  
Vv11 -----MQK-CEFHSGFLDKR-RQFSPVDLRYSGRPSY-----  
Zm11 -----MAMR---SLARLHRQLSP-SLLHRHSTRRGWPPASDAAFLWRGLASS-----  
Os11 -----MPPPPPSLARLHQRLSL-SLLGRS-----PPAAADAFLLRGLASS-----  
Cr11 -----MSLRAATLFARSFAESASSLPVEAGVGARLCTGASTSGRQAWPGAAAGVYARGPV-----  
Rs11 -----

Ce11 -----VISFQIARGFSKKNRNVVDKADTRNYTYVMSLVIVAIGCTFAAIFAYRIFCEQTSFGGLT  
Ra11 -----SIALIA-----AVSITMIGFSYGSVLYRIFCQVTFGFGCTT  
Ss11 FLCRRVPSRLN-----TQIRGVKSRKSQTKQEQEDEWRKRNKTVLTYIVAAGVGMIGMSYAAVLYRLYCQASGLGTA  
Dr11 QFLRRTTQRL-----NQSRGAKTHKRKHQSQADDWKKKNTILTYIAAAGVGMIGMSYAAVLYRLYCQATGLGGA  
Bt11 LRLGLTWRPS-----PAEQPARPKSTNPYTRSQEEDWRRRNKTVLTYMAAAVGMGLGASYAAVLYRLYCQTTGLGSA  
Hs11 LRWLGTWKRCSLRARHPALQPPRRPKSSNPFTRAQEEERRRQNKTTLYVAAVAVGMGLGASYAAVLYRLYCQTTGLGSA  
Mm11 LRLGLTWKRPS-GSRGPAAQPPRRRPSNPFTRAQEEDEWRRNKTVLTYVAAAAGVGMGLGASYAAVLYRLYCQTTGLGSA  
Gg11 -----WTSPR-----LQARGLRSSNPFTRRQEEWRRRNRTALTYIAAAGVGMVGMMSYAAVLYRLYCQATGLGCTT  
Dm11 -----HKSQQFWRMKSSTDSPEDAARKLAKSTLYYITAGGVLIVGLSYAAVLYSIFCQAYSYGCTT  
Aa11 -----PAP---VRFIGRDQNADAARRHRIRTTIYVAAAGVLTVMGMSYAAVLYRMFCQAYSYGCTT  
Sc11 -----ISKLTRNEIQQLRELKRAREKFKDRTVAFYFSSVAVLFLGLAYAAYVLYRAICARTGFGCIP  
An11 -----RSSCLRQINAPFNTPOSQKR---NASTMYAASLILGTVALAYGSVLYRMI CQQTGWNCQP  
At11 -----ATAKSM LDSAHRQYSTHSPSETKSQKMLYLTAVVFGMVGLTYAAVLYRFTFCQATGYGCTV  
Pp11 -----KSEAMLMYLAVMTAMVGIITYAAVLYRKF CQATGYGCTV  
Vv11 -----CSVLD FRR---HYVVDASAEQARKSKKMLMYLTAVVFAMVAGSYAAVLYRQFCQATGYGCTV  
Zm11 -----SPS-----AAGREKSSRRTLGLYLLGVAVAMVAGSYAAVLYRFF CQATGYGCTV  
Os11 -----ASSSSSAAAAA AVAAAAGREKSSRRTLAYLLGVAAAMVAGSYAAVLYRFF CQATGYGCTV  
Cr11 -----AWSAGPAAAGTRSASRSSTKYTPAELGLYWGAAAVFMVGVSYASVLYKLF CAATGYGCTV  
Rs11 -----MSLSPHQKTAGGLVLLVAVMGAASFAAVFYNWF CRTVGFACCT  
. . . . . \* \* \* \* \*

Ce11 QVAKD--FDKIANMK-----KCEDRLIRVQENSDVPSSMRNEFKPQOHEIYVHPGETALAFYTAENPTDKPIIGIST  
Ra11 QVADL--ESDILTLKDE-----QQENRIITVRENGDVSDTMPKFFHIQOEIKVMVGETALAFYSAENPTDSSIIGIST  
Ss11 VAGHD--AEQVETMT-----PVMDRIIKITFNADTHASMQWNNFRQOQSEIYVVPGETALAFYRAKNPTDKPVIIGIST  
Dr11 VAGHD--TEQVATMK-----PVRDRIIKVTFNADTHASIQWNNFRQOQSEIYVVPGETALAFYRARNPTDKPVIIGIST  
Bt11 VAGHA--SDQIENMV-----PVKDRIIKITFNADVHASLQWNNFRQOQTEIYVVPGETALAFYKAKNPTDKPVIIGIST  
Hs11 VAGHA--SDKIENMV-----PVKDRIIKISFNADVHASLQWNNFRQOQTEIYVVPGETALAFYRAKNPTDKPVIIGIST  
Mm11 VAGHS--SDQIENMV-----PVKDRVIKVTFNADVHASLQWNNFRQOQTEIYVVPGETALAFYKAKNPTDKPVIIGIST  
Gg11 GAGRG--AERLEEMR-----PVREVLKVTFNADVHAGLQWNNFRQOQSEIYVVPGETALAFYKAKNPTDKPIIGIST  
Dm11 TQGH--AEKVEHMK-----KIEDRVLIKIRFNADIGSSMRNFKPQOQYEIKVAPGETALAFYTAENPTDKPVIIGIST  
Aa11 SQGH--AEKVETMQ-----RFKDRVIKIRFNADLGAAMRNFKPQOQPEINVVPGETALAFYTAENPTDQPVIGIST  
Sc11 ITDR--KFTDDKLIP-----VDTEKRIRISFTSEVSQILPKFFVQOQREVYVLPGETALAFYKAKNYSDDKIIIGMAT  
An11 VLTHRGDNDTSSRVTP-----VTDSRRLRITFNAGSVDVLPWKFFTPQOQREVYVLPGETALAFYTAENPTDKPIIGIST  
At11 QRKET-VEEKIARHSES-----GTVTEREIVVQFNADVADGMQWNNFRQOQREVYVLPGETALAFYTAENPTDQPVIGIST  
Pp11 QRKET-VEEKIARHKGE-----EAESSRELVVQFNADVADGMQWNNFRQOQREVYVLPGETALAFYTAENPTDQPVIGIST  
Vv11 HRRET-VEEKIARHDED-----GTASLREIVVQFNADVADGMQWNNFRQOQREVYVLPGETALAFYTAENPTDQPVIGIST  
Zm11 QRRES-VEEKISRHARD-----GTTTSREIIVQFNADVADGMQWNNFRQOQREVYVLPGETALAFYTAENPTDQPVIGIST  
Os11 QRRES-VEEKISRHARD-----GTTTSREIIVQFNADVADGMQWNNFRQOQREVYVLPGETALAFYTAENPTDQPVIGIST  
Cr11 RAGES-VEEKLQRRRDAPNAKVEEAASKRELRVFNADVADDMQWNNFRQOQREVYVLPGETALAFYTAENPTDQPVIGIST  
Rs11 AVATE-APAEVLD-----RTVKVRE DASREAGMNEERELQREMMLKIETGLAFYEAENPTDQPVIGIST  
: : \* . . : \* \* \* \* : : \* : \* \* \* \* \* : :

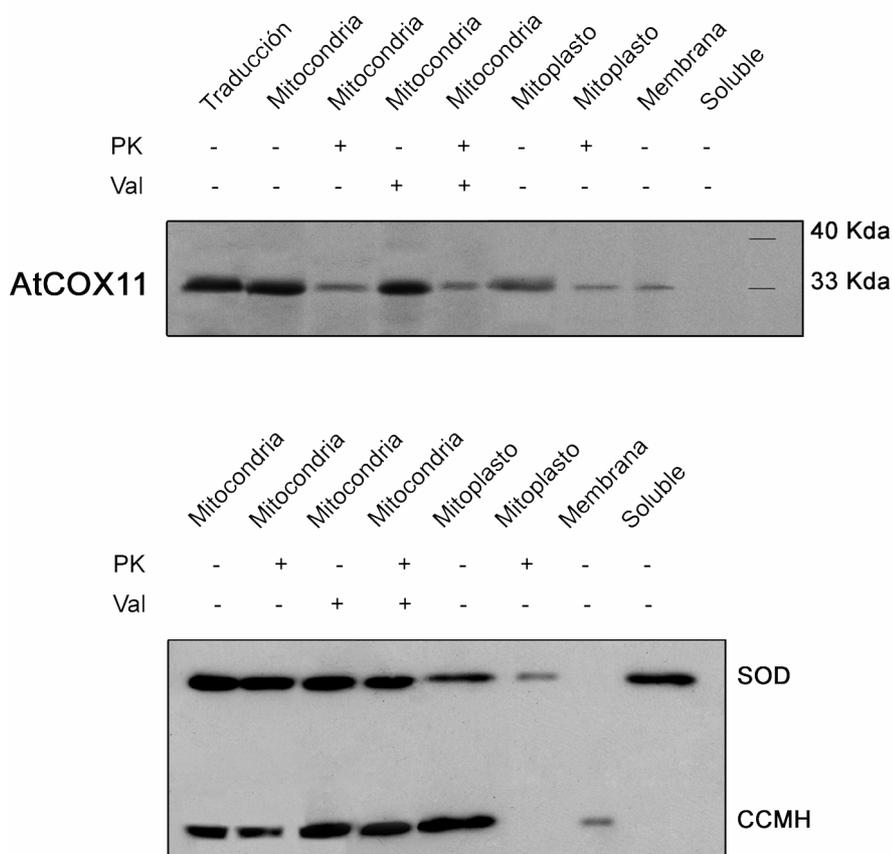


**Figura 41: Alineamiento de las proteínas COX11 de diferentes organismos.** Las secuencias que codifican homólogos de AtCOX11 fueron obtenidas de bases de datos utilizando el programa blastp. Las secuencias proteicas fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994). Las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos están señaladas con un asterisco, aquellas ocupadas por aminoácidos relacionados están identificadas con uno o dos puntos, de acuerdo al grado de conservación. Las cisteínas conservadas están remarcadas en fucsia y los demás residuos conservados están remarcados en verde. El motivo conservado **YFNKIQCFCFEEQXL** está remarcado en gris. Se analizaron secuencias de *Caenorhabditis elegans* (Ce11, NM\_060318), *Reclinomonas americana* (Ra11, NP\_044755), *Salmo salar* (Ss11, ACI69748), *Danio rerio* (Dr11, NP\_001076427), *Bos taurus* (Bt11, NP\_001076872), *Homo sapiens* (Hs11, NP\_004366), *Mus musculus* (Mm11, EDL15888), *Gallus gallus* (Gg11, XP\_001233973), *Drosophila melanogaster* (Dm11, NP\_723086), *Aedes aegypti* (Aa11, XP\_001658032), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc11, NP\_015193), *Aspergillus niger* (An11, XP\_001399569), *Arabidopsis thaliana* (At11, At1g02410), *Physcomitrella patens* (Pp11, XP\_001771985), *Vitis vinifera* (Vv11, XP\_002277478), *Zea mays* (Zm11, ACG32461), *Oryza sativa* (Os11, NP\_001051089), *Zea mays* (ZmCOX19, BI675181), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr11, XP\_001700235), *Rhodobacter sphaeroides* (Rs11, YP\_351878).

### ***3.3.3. Importación y evaluación de la localización de la proteína AtCOX11 en mitocondrias de plantas***

Nos propusimos determinar si la proteína AtCOX11 se localiza en las mitocondrias de plantas, para lo cual realizamos un ensayo de importación *in vitro* (Materiales y Métodos 2.13). A partir de la traducción *in vitro* de AtCOX11, obtuvimos un producto de un peso molecular aparente de 33 KDa, el cual coincide aproximadamente con el tamaño calculado (32 KDa) (Figura 42, calle 1 de la parte superior).

Luego de la importación observamos una banda correspondiente a una forma no procesada de esta proteína en las mitocondrias de papa (Figura 42, calle 2 de la parte superior). Corroboramos que una fracción de dicha proteína se encuentra dentro de la mitocondria realizando un tratamiento post-importación con proteinasa K (PK) (Figura 42, calle 3 de la parte superior). Estas evidencias indican que esta proteína es incorporada a las mitocondrias de Arabidopsis sin el procesamiento de una presecuencia. Obtuvimos resultados similares al emplear mitocondrias de Arabidopsis para realizar la experiencia. La importación de AtCOX11 no es inhibida por el ionóforo valinomicina (Val), lo cual evidencia que dicha importación no requiere del potencial de membrana (Figura 42, calles 4 y 5 de la parte superior).



**Figura 42: Importación de AtCOX11 a mitocondrias de plantas y análisis de la localización submitocondrial.**

En la parte superior, en la calle 1 se observa la señal producida por 1  $\mu$ l del producto de traducción. La importación se realizó con 50  $\mu$ g de mitocondrias de papa y 5  $\mu$ l del producto de traducción (calles 2-7). Antes de la importación, las mitocondrias fueron tratadas con valinomicina (Val, calles 4 y 5). Luego de la importación las organelas fueron expuestas a proteinasa K (PK, calles 3 y 5). Para corroborar la localización submitocondrial de AtCOX11, luego de la importación las mitocondrias fueron colocadas en un buffer hipotónico para producir la ruptura de la membrana externa (mitoplastos; calle 6) (Materiales y Métodos 2.13.3). En algunos casos, los mitoplastos fueron tratados con PK (calle 7). Además, luego de la importación se produjo la ruptura de las mitocondrias a través de tres ciclos de congelamiento/descongelamiento y se separaron las fracciones soluble y de membrana (calles 8 y 9). Todos los ensayos fueron divididos en dos y analizados por autorradiografía (parte superior) y por Western blot (parte inferior), utilizando anticuerpos contra MnSOD, una proteína soluble de la matriz, y contra CCMH, una proteína de la membrana interna expuesta al espacio intermembrana

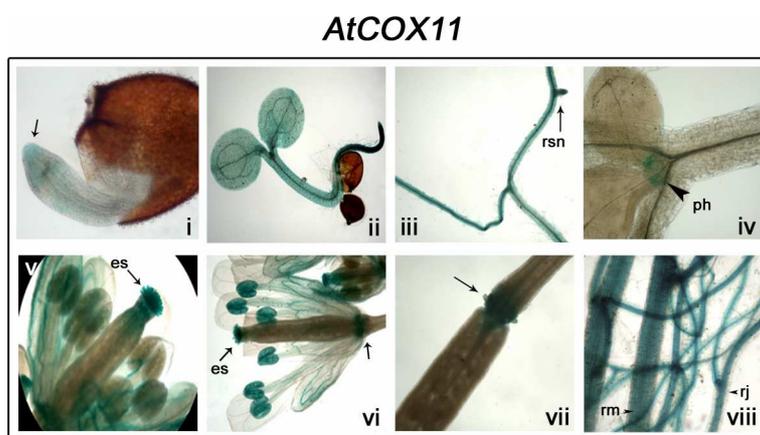
Decidimos analizar la localización submitocondrial de AtCOX11 luego de la importación, para lo cual separamos las mitocondrias en una fracción soluble y otra de membrana. En ausencia de sales y detergente, observamos que AtCOX11 se localiza en la fracción de membrana (Figura 42, parte superior). Realizamos un ensayo de Western blot (Materiales y Métodos 2.15) a fin de evaluar la calidad de las fracciones obtenidas, para lo cual utilizamos anticuerpos contra la proteína soluble MnSOD y la proteína de membrana CCMH, observando que el proceso de ruptura ocurrió correctamente (Figura 42, parte inferior). Otra fracción, luego de la importación, fue colocada en un buffer hipotónico para romper la membrana externa. Observamos que la proteína importada queda unida a mitoplastos. El tratamiento de los mitoplastos con PK produce una disminución en la cantidad de AtCOX11 presente, pero no su desaparición total, como sí ocurre con CCMH usada como control (Figura 42).

Los experimentos de importación nos permiten concluir que AtCOX11 se importa a mitocondrias a través de un proceso que no requiere el potencial de membrana y que no hay clivado de una presecuencia. Una vez en la mitocondria, esta proteína se localiza en la membrana interna. No sabemos la razón por la cual parte de la proteína importada es protegida de la digestión con PK. Quizás esta fracción se inserta íntimamente en la membrana interna, o bien forma algún complejo resistente a la PK. En forma similar, en mitoplastos, la proteína Cox11p de levaduras es protegida de la digestión con tripsina (Carr y col., 2005).

#### **3.3.4. Caracterización del patrón de expresión de AtCOX11**

En vista de los resultados obtenidos con los genes *AtCOX17* y *AtCOX19*, también nos propusimos analizar el patrón de expresión de *AtCOX11*. Para este fin, aislamos la región promotora de este gen a partir de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*. Obtuvimos un fragmento de 1160 pb, el cual está compuesto por una región de 780 pb ubicada cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción e incluye el primer intrón y toda la región 5' no codificante (Figura 40). Dicho fragmento fue clonado en el

vector binario pBI101.3, fusionado a la región codificante del gen reportero *gus*. El clon obtenido fue utilizado para transformar plantas a través del método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transformadas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina y analizadas a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3).



**Figura 43: Patrón de expresión de GUS dirigido por la región promotora de *AtCOX11*.** Plántulas de 1 (i), 4 (ii), 6 (iii) y 13 (iv) días. En el caso de i y iv, las plántulas fueron incubadas durante 6 horas con el sustrato cromogénico. En el caso de ii y iii, fueron incubadas durante toda la noche con el sustrato de la reacción. Flores (v y vi), vainas (vii) y raíces (viii) de plantas adultas. Abreviaturas: rsn, raíz secundaria naciente; ph, primordios de hojas; es: estigma; rj, raíz joven; rm, raíz madura.

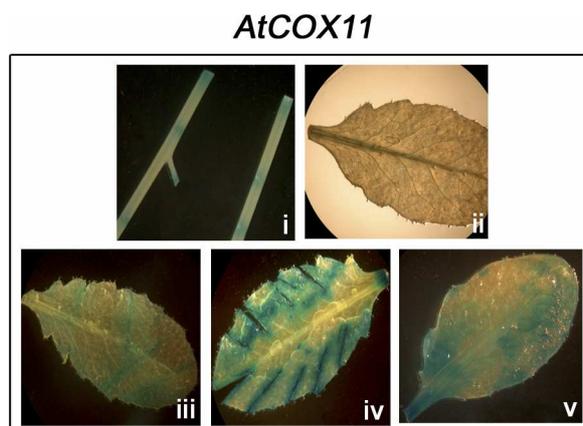
En la Figura 43, podemos observar actividad GUS principalmente en las raíces de las plántulas crecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X (Figura 43, i-iii). Observamos actividad GUS en la punta de la raíz en etapas tempranas del desarrollo (1 día luego de la imbibición, Figura 45 i). La expresión de GUS se localiza en el meristema radicular, el cilindro vascular de la raíz y las raíces secundarias nacentes. Al prolongar la incubación de las plantas con el reactivo cromogénico durante toda la noche, observamos también tinción de hipocótilos y cotiledones (Figura 45 ii). Cuando incubamos las plántulas durante 6 horas con el sustrato de la reacción, observamos

actividad GUS en los primordios de las hojas, pero los cotiledones y las hojas verdaderas más antiguas no presentan coloración (Figura 45 iv). En plantas adultas, observamos actividad GUS en raíces, flores y vainas, pero no en tallo y hojas. El patrón de expresión en las raíces cambia durante el desarrollo, ya que en las raíces de plantas adultas sólo observamos tinción en el tejido epidérmico (Figura 43 viii). En flores, observamos expresión de GUS en las venas de los sépalos (Figura 43, v y vi), en los filamentos de las anteras maduras (Figura 43 vi) y en polen luego de la antesis (Figura 43, v y vi). Además, observamos expresión de GUS en el receptáculo de flores y vainas (Figura 43, vi y vii).

### ***3.3.5. Análisis de la incidencia de factores de estrés biótico y abiótico en la expresión del gen *AtCOX11****

También decidimos estudiar la incidencia de factores de estrés biótico y abiótico en la expresión de *gus* dirigida por la región promotora de *AtCOX11*, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los genes *AtCOX17* y *AtCOX19* y el hecho de que Cox11p de levaduras participa en la respuesta al daño producido por peróxido de hidrógeno (Banting y Glerum, 2006).

En la Figura 44 (i y iv), podemos observar que al practicar cortes en tallos y hojas, observamos una inducción en la expresión de *gus* en las regiones adyacentes a los mismos. Además, al realizar pliegues en las hojas a fin de dañarlas, también observamos un aumento de la actividad GUS (Figura 44 iii). Este aumento también es evidente en las hojas senescentes (Figura 44 v). Como en los casos anteriores, corroboramos la especificidad de esta tinción realizando el mismo tratamiento en hojas y tallos de plantas transformadas con otras construcciones (datos no mostrados).



**Figura 44:** Patrón de expresión de GUS dirigido por la región promotora de *AtCOX11* frente a injuria. Se dañaron los órganos de las plantas transformantes de diferentes maneras, mediante cortes (i y iv) o dobleces (iii), 2 horas antes de la incubación con el sustrato cromogénico. Se muestran hojas sin tratar (ii) y hojas senescentes de plantas conteniendo la región promotora de *AtCOX11* (v).

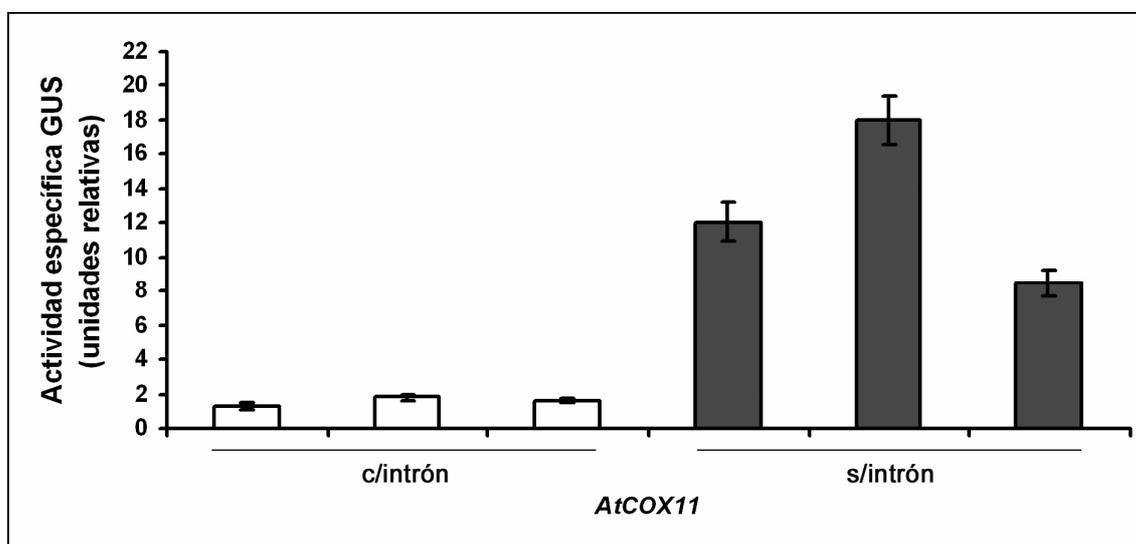
Evaluamos también el efecto de la infección de las hojas de plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX11* con suspensiones de las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. tomato virulenta y avirulenta, de compuestos relacionados con estrés oxidativo, como SA, SNP y 3-AT, y de metales. En estos casos, observamos sólo una leve inducción de la actividad GUS en presencia de la cepa virulenta de *P. syringae*, pero ningún efecto de las otras condiciones ensayadas. Concluimos que *AtCOX11* tiene un comportamiento diferente al observado para los genes *AtCOX17* y *AtCOX19*.

### ***3.3.6. Análisis de la importancia de la presencia de un intrón en la región 5' no codificante del gen AtCOX11***

Los genes *AtCOX17*, *AtCOX19* y *AtCOX11* presentan patrones de expresión semejantes. Al analizar las regiones promotoras de estos genes, encontramos intrones cercanos a la región 5' no codificante y motivos site II en la región proximal del

promotor. En función de los resultados obtenidos para *AtCOX17* y *AtCOX19*, decidimos evaluar la importancia del intrón de *AtCOX11* en la expresión. Para tal fin, realizamos la delección del intrón a partir del fragmento de 1160 pb (Materiales y Métodos 2.3.2.5). Este fragmento fue clonado en el vector binario pBI101.3, fusionado a la región codificante del gen reportero *gus*. El clon obtenido fue utilizado para obtener plantas transgénicas mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina y analizadas a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3).

Al remover el intrón presente en la región 5' no codificante de *AtCOX11*, no observamos cambios en los patrones de expresión pero, sorprendentemente, se produjo un importante aumento de la actividad GUS (Figura 45).

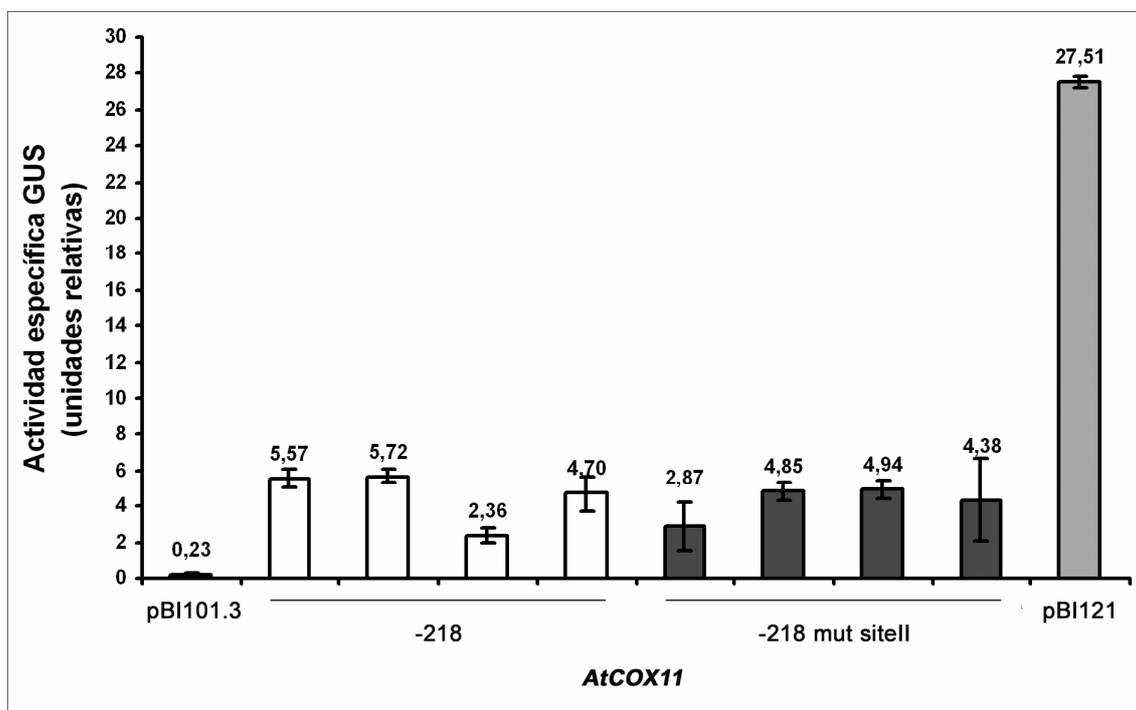


**Figura 45:** Evaluación de la expresión del gen *gus* dirigida por la región promotora del gen *AtCOX11* en presencia o en ausencia del intrón ubicado en la región 5' no codificante. Se muestran los valores de actividad en extractos de plántulas de 15 días. Las mediciones se realizaron en tres líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

### ***3.3.7. Análisis de la importancia de la presencia de los motivos siteII en la actividad de la región promotora del gen AtCOX11***

La región promotora del gen *AtCOX11* posee motivos site II cercanos al sitio de inicio de la transcripción, tal como ocurre en los genes *AtCOX17* y *AtCOX19*. En función de realizar un análisis comparativo, decidimos estudiar el efecto de generar mutaciones en los correspondientes motivos site II en la región promotora que abarca hasta 218 pb desde el sitio de inicio de la transcripción. Debemos destacar que el acortamiento del promotor hasta la posición -218 no produce cambios apreciables en los patrones ni en los niveles de expresión.

En la Figura 46 podemos observar que la mutación de los motivos site II no produce cambios en la actividad GUS en extractos de plantas de 15 días. Mediante un análisis histoquímico determinamos que el patrón de expresión tampoco cambia en las plantas que contienen la región promotora de *AtCOX11* con mutaciones en los motivos site II (datos no mostrados).



**Figura 46:** Efecto de la mutación de los motivos site II sobre la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con la región promotora de *AtCOX11* (-218). Se muestran ensayos de actividad en extractos de plántulas de 15 días. Las mediciones se realizaron en cuatro líneas independientes para cada construcción. Las barras de error representan la desviación estándar de tres mediciones independientes de la actividad GUS.

### 3.3.8. Discusión

Hemos identificado un gen de *Arabidopsis thaliana* que codifica una proteína con homología de secuencia respecto de Cox11p de levaduras, la cual ha sido involucrada en el transporte de cobre para conformar el centro  $\text{Cu}_B$  de la subunidad Cox1p (Carr y Winge, 2003). La proteína de *Arabidopsis* posee el motivo CXC que ha sido involucrado en la unión a  $\text{Cu}^+$ , y la cisteína que participaría en la formación del dímero (Carr y col., 2002). La localización de estos residuos se encuentra conservada no sólo entre las proteínas de levaduras y *Arabidopsis*, sino también en todas las secuencias analizadas, aún las que fueron tomadas de organismos procariotas, en los que COX11

está frecuentemente codificada en el mismo operón que codifica las subunidades estructurales de COX (Arnesano y col., 2005a).

AtCOX11 se localiza en mitocondrias. Esta evidencia alimenta nuestra hipótesis de que la proteína de Arabidopsis constituye el homólogo funcional de Cox11p de levaduras. Además, determinamos que AtCOX11 se ubica en la membrana mitocondrial interna, lo cual es consistente con la localización de Cox11p. La importación de AtCOX11 a la mitocondria no parece depender del potencial de membrana y tampoco se evidencia el clivaje de una presecuencia durante la importación. En este sentido, la mayoría de los programas predictivos sugieren la ausencia de una presecuencia, tanto para la proteína AtCOX11 de Arabidopsis como para Cox11p de levaduras. No conocemos exactamente la vía de importación hacia la mitocondria de AtCOX11, pero podemos conjeturar que la vía general de importación (a través del complejo TIM 17:23) no se encuentra involucrada, ya que la misma depende de un potencial de membrana que le permite translocar las presecuencias cargadas positivamente (Kutik y col., 2007).

Mediante el estudio de la región promotora de *AtCOX11* fusionada a *gus*, determinamos que el patrón de expresión generado es similar al patrón de expresión que describimos en los capítulos anteriores para *AtCOX17* y *AtCOX19*. Sin embargo, no observamos inducción por factores que producen estrés biótico o abiótico. Respecto de esto, debemos considerar que *AtCOX17* y *AtCOX19* son dos proteínas solubles y pequeñas, que podrían tener ubicaciones variables dentro de la célula, mientras que *AtCOX11* es una proteína de membrana, lo que podría justificar las diferencias observadas.

Tampoco observamos un comportamiento similar al de los genes mencionados al remover el intrón de la región 5' no codificante. Si bien existen antecedentes en los cuales la expresión de algunos genes disminuye cuando se incluyen intrones (Maas y col., 1991; Rathus y col., 1993; Wilmink y col., 1995), nosotros no esperábamos este resultado pensando en una coordinación en la expresión de los genes relacionados con un mismo proceso. Sin embargo, al analizar detenidamente los primeros intrones de los

genes *AtCOX17*, *AtCOX19* y *AtCOX11*, observamos una notable diferencia en tamaño entre los correspondientes a *AtCOX17* y *AtCOX19* y el intrón de *AtCOX11*. Existen evidencias de que el primer intrón de un gen, especialmente si se encuentra en la región 5' no codificante, en promedio es más largo que el resto de los intrones. La longitud de los intrones ubicados en la región 5' no codificante se ha relacionado positivamente con la capacidad que poseen de inducir la expresión (Bradnam y Korp., 2008).

Debemos destacar que, además de ser más largos, en el primer intrón de *AtCOX17* y *AtCOX19* encontramos una secuencia telo box (AAACCCTA), la cual generalmente se encuentra asociada a los elementos site II. En el caso de *AtCOX11*, este primer intrón no posee el elemento telo box y, llamativamente, la mutación de los motivos site II localizados en la región proximal al sitio de inicio de la transcripción no produce cambios en el patrón de expresión. Este resultado también nos sorprendió ya que prácticamente en todos los genes que se han estudiado en nuestro laboratorio los motivos site II son importantes para la expresión (Comelli y col., 2009; Mufarrege y col., 2009; Welchen y González, 2005). Evidentemente, los mecanismos de expresión de *AtCOX11* son diferentes a los de otros genes que participan en procesos relacionados.

Debemos continuar el estudio de *AtCOX11* a fin de dilucidar su función en *Arabidopsis*. *AtCOX11* es incapaz de complementar levaduras mutantes en el gen correspondiente de estos organismos (resultados no mostrados), lo cual no es sorprendente porque tampoco se ha logrado la complementación con el gen de humanos (Carr y col., 2005). El análisis de plantas que sobreexpresen o tengan niveles disminuidos de esta proteína permitirá comprender la función que cumple la misma en plantas con mayor grado de detalle.

### **3.4. CAPÍTULO IV**

**“Identificación y caracterización de genes que codifican proteínas Sco en *Arabidopsis thaliana*”**

## CAPÍTULO IV

### 3. 4. Identificación y caracterización de genes que codifican proteínas Sco en *Arabidopsis thaliana*

#### 3.4.1. Introducción

Durante el desarrollo de la Introducción General de esta tesis presentamos a las proteínas Sco como miembros de la maquinaria de ensamblado de COX. La incorporación de cobre en COX ocurre dentro de las mitocondrias, lo cual implica la existencia de una vía específica de transporte de dicho metal a las organelas. Como ya se mencionó, experimentos bioquímicos demostraron que en la matriz mitocondrial de levaduras existe un *pool* de cobre biodisponible esencial para la incorporación de cobre en las metaloproteínas del espacio intermembrana (Cobine y col., 2004). Cuando se administra cobre en forma exógena, se produce una expansión de este *pool*, lo cual es consistente con el modelo de translocación del cobre unido a un ligando, y con los niveles altos de ligando presentes en el citosol. En células que carecen de una de las proteínas que actúan como *buffers* en el citosol, se ve favorecido el tráfico de cobre hacia la mitocondria, lo cual sugiere alguna competencia por el cobre entre el ligando y otros componentes citosólicos. El modelo de translocación del ligando de cobre predice una movilización desde y hacia la matriz mitocondrial. El cobre puede difundir a través de canales de la membrana externa, pero aún no se conoce la naturaleza de las proteínas que actúan como translocadores desde el espacio intermembrana hacia la matriz y viceversa (Leary y col., 2009). La regulación de la translocación del cobre podría estar mediada por proteínas, ya que se ha observado que la delección de Coa1p y Shy1p, dos factores que participan en la maduración de Cox1p, atenúan los niveles de cobre en la matriz (Pierrel y col., 2007). La salida del cobre de la mitocondria podría estar regulada

por un conjunto de proteínas que participan en el ensamblado de COX o la activación de Sod1p, lo cual limitaría las cantidades de cobre libre dentro del espacio intermembrana (Leary y col., 2009). En este sentido, uno de los candidatos para tal regulación es Cmc1p, ya que se ha postulado que esta proteína facilitaría la distribución de cobre desde la matriz a las chaperonas del espacio intermembrana (Horn y col., 2008). El cobre está presente en un exceso molar en relación a las proteínas que necesitan de este metal, lo cual sugiere que el *pool* de cobre de la matriz tendría, al menos, una función adicional. Este *pool* puede expandirse o contraerse en respuesta a cambios en los niveles de cobre celular (Cobine y col., 2004; Leary y col., 2009). Aparentemente, el *pool* de cobre de la matriz podría actuar como un reóstato dinámico que responde a cambios en el estado del cobre celular. Este papel como reóstato podría permitirle a la organela asegurar la presencia del cobre en la mitocondria para la incorporación en sus moléculas blanco bajo condiciones fisiológicas, y mantener una reserva del mismo (Leary y col., 2009). Este *pool* posee una mayor capacidad de expandirse que de reducirse (Cobine y col., 2004), lo cual sostiene la idea de que la prioridad de la organela es retener suficiente cobre para la incorporación en COX y Sod1p. La membrana interna es impermeable, por lo que esta actividad del *pool* de cobre de la matriz de actuar como reóstato está representada por una vía de señalización que comunica la información desde varios compartimientos mitocondriales a blancos extramitocondriales, lo cual requiere que proteínas de la membrana interna con dominios funcionales en la matriz y el espacio intermembrana sean capaces de sensor los estímulos y transducir apropiadamente las señales. Los candidatos más atractivos que podrían participar en esta función son proteínas de unión a cobre. Los sitios de unión a cobre de 3 proteínas de membrana (Cox11p, Sco1p y Sco2p) y 4 proteínas solubles ricas en cisteínas, (Cox17p, Cox19p, Cox23p y Pet191p) están localizados en el espacio intermembrana. Cambios en su abundancia, el estado redox de sus grupos tioles o el estado de incorporación del cobre, son mecanismos potenciales a través de los cuales las señales mitocondriales podrían generarse o ser decodificadas (Leary y col., 2009). La química redox dentro del espacio intermembrana mitocondrial ha sido relacionada, además, con

la importación de proteínas (Mesecke y col., 2005) y con la regulación de la actividad de la cadena de transporte de electrones (Bihlmaier y col., 2007).

Consistentemente con el papel de alguna proteína de unión a cobre en la regulación en la homeostasis del cobre celular, se demostró que los tejidos de los pacientes que poseen proteínas HsSco defectuosas presentan una deficiencia de cobre (Leary y col., 2007). En estos pacientes, el fenotipo de deficiencia de cobre y de COX son dissociables. Estudios cinéticos utilizando  $\text{Cu}^{64}$  demostraron que la deficiencia en el cobre celular que presentan los pacientes con proteínas HsSco defectuosas no es causada por su incapacidad de adquirir el cobre, sino por la incapacidad de retención celular del mismo. En dicho trabajo se argumenta que HsSco1 y HsSco2 son proteínas bifuncionales, ya que HsSco2 actuaría modificando un aspecto de la funcionalidad de HsSco1, crucial en la generación de señales que modulan la velocidad de salida del cobre de la célula (Leary y col., 2009). Para tratar de explicar cómo los cambios en el estado funcional de las proteínas Sco dirigen las señales que son relevantes para la regulación de la homeostasis de cobre, se propuso que los cambios en el estado redox de los grupos tioles de las proteínas Sco son los que tienen el efecto modulador (Leary y col., 2007). De acuerdo con ello, se observó que los grupos tioles de HsSco1, pero no los de otros factores de ensamblado de COX, están desproporcionadamente reducidos en pacientes deficientes en Cox10, Cox15 y HsSco2.

Sin embargo, se desconocen las proteínas responsables de mantener o alterar el estado redox de los grupos tioles de las proteínas HsSco de humanos. Estudios recientes muestran que HsSco2 también puede modificar el estado redox de los grupos tioles de HsSco1 y que un cambio en la población total de HsSco1 con los tioles reducidos conduce a la generación de una señal que incrementa la salida de cobre de la célula (Leary y col., 2009).

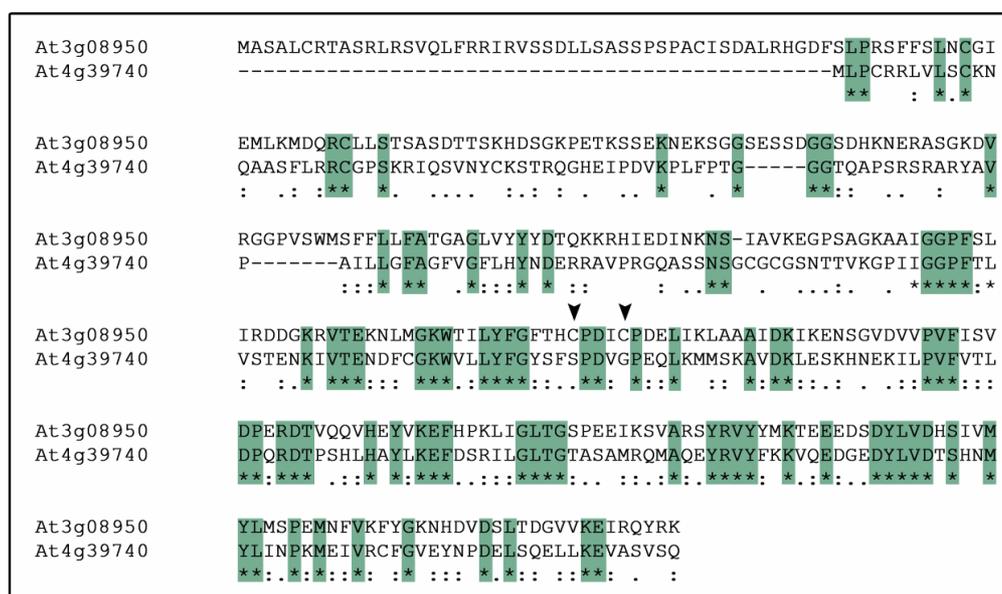
En la organela se desconocen los mecanismos que sensan y transducen las señales dependientes de Sco basados en el estado redox de los grupos tioles de Sco1. En levaduras, el contenido de cobre mitocondrial no es afectado por la delección de Cox17p,

Cox19p o ambos genes (Cobine y col., 2004). Esto podría deberse a la gran capacidad *buffer* del sistema, de tal manera que todos los componentes del mismo deben faltar para observar un fenotipo.

Además de lo expuesto, las proteínas Sco presentan similitud con una familia de peroxirredoxinas y esta evidencia sugiere la idea de que podrían actuar como moléculas señalizadoras. Cuando el  $\text{Cu}^+$  es oxidado a  $\text{Cu}^{2+}$ , Sco pierde el cobre y el sitio de unión al mismo se encuentra disponible para actuar en reacciones de tipo redox. Por lo tanto, el estado redox mitocondrial podría afectar la funcionalidad de Sco y su participación en el ensamblado de COX (Williams y col., 2005). Llamativamente, las mutantes en Cox17p no presentan el fenotipo de sensibilidad al peróxido de hidrógeno que sí presentan las mutantes en Sco1p, lo cual es consistente con el papel fundamental asignado a Sco en la señalización del estado redox mitocondrial (Banting y Glerum, 2006). La presencia de homólogos de Sco en procariotas que no poseen centro  $\text{Cu}_A$  también sugiere la participación de Sco en otros procesos además del ensamblado de COX (Banci y col., 2007).

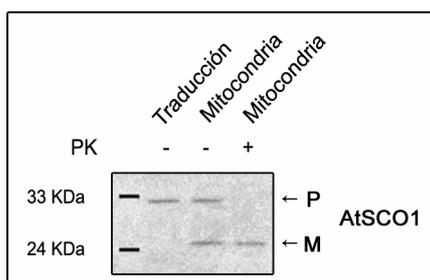
### ***3.4.2. Identificación de genes que codifican proteínas Sco en Arabidopsis***

En el genoma de Arabidopsis encontramos dos genes (At3g08950 y At4g39740) que codifican proteínas con secuencias similares a las proteínas Sco de *Saccharomyces cerevisiae* y humanos. Las proteínas codificadas por estos genes presentan entre ellas un 37% de identidad en los 200 aminoácidos que conforman la región C-terminal de las mismas (Figura 47). Asimismo, presentan alrededor de un 44% y un 35% de identidad con las proteínas de levaduras (para las proteínas codificadas en los cromosomas 3 y 4, respectivamente). De acuerdo a esto, decidimos nombrar en forma arbitraria *AtSCO1* al gen presente en el cromosoma 3 y *AtSCO2* al del cromosoma 4. Esta denominación no establece ninguna correspondencia funcional entre las proteínas AtSCO1 y AtSCO2 de Arabidopsis y las proteínas homónimas de levaduras y humanos.



**Figura 47: Alineamiento de las proteínas Sco de *Arabidopsis thaliana*.** Las secuencias proteicas fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994). Las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos están señaladas con un asterisco y remarcadas en verde, aquellas ocupadas por aminoácidos relacionados están identificadas con uno o dos puntos, de acuerdo al grado de similitud. Las cisteínas conservadas en la proteína codificada en el cromosoma 3 respecto de las proteínas de levaduras y humanos están señaladas con flechas negras.

La mayoría de los Métodos informáticos disponibles (iPSORT, MitoPred, Mitoprot 2, Predotar, TargetP y WoLFPSORT; <http://www.plantenergy.uwa.edu.au/ampdb/>) predicen una localización mitocondrial para ambas proteínas. En el caso de AtSCO1, realizamos un experimento de importación a mitocondrias con la proteína de interés marcada radiactivamente (Materiales y Métodos 2.13), a fin de corroborar la predicción subcelular que obtuvimos mediante el análisis informático. En la Figura 48 podemos observar que AtSCO1 es importada a mitocondrias. El agregado de proteinasa K (PK) una vez efectuada la importación, indica que AtSCO1 es importada con la remoción de una presecuencia, ya que se observa una banda de aproximadamente 25 KDa protegida de la digestión.



**Figura 48: Importación de la proteína AtSCO1 a mitocondrias.**

Se muestra un gel de SDS-PAGE en el que se sembraron distintas fracciones que contenían AtSCO1 marcada radiactivamente. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular. Luego se muestra la proteína traducida *in vitro*, la importación a mitocondrias de la misma y la misma reacción tratada con proteinasa K (PK) luego de la importación. P: precursor, M: proteína madura.

Resulta sorprendente que la proteína AtSCO2, a pesar de presentar un alto grado de conservación, no posee el motivo CXXXC que es esencial para la función de Sco1p de levaduras y se encuentra altamente conservado (Rentzsch y col., 1999; Nittis y col., 2001) (Figura 47). AtSCO2 presenta una serina y una glicina en lugar de estas dos cisteínas que han sido involucradas en la unión a cobre (Balatri y col., 2003). Esta observación nos indujo a buscar homólogos de las proteínas Sco en otras especies de plantas. Encontramos que en otras angiospermas, así como en la gimnosperma *Picea glauca*, existe un par de proteínas Sco, una de las cuales carece de al menos una de las cisteínas conservadas. En la briófito *Physcomitrella patens* y en el alga *Chlamydomonas reinhardtii*, por el contrario, encontramos sólo una proteína con homología a las proteínas Sco y con ambas cisteínas presentes. Por extensión, llamamos proteínas SCO1 y SCO2 de plantas a aquellas que poseen ambas cisteínas conservadas o carecen de ellas, respectivamente.

```

cSC01 -----MLKLSR----S-ANLRLVQLPAARLSGN
ScSC02 -----MLNSSRKYACR-SLFRQANVSIKGLFYN
NcSC0  -----MSHAIA-----PMRTFSSVLSRTPARQ
SpSC0  -----MFRRLGLVFS----RH
HsSC02 -----
HsSC01 -----MAMLVLVPGRVMRPLGGQLWRFLPRGLEFW
RnSC0  -----MAALVRLAVVRSQCRQLWHLFPRGHGLR
DmSC0  -----
OsSC01 MR-RAPRLHALPSRALAFGGLPPPPLPRAQLQGITEPGAASRLGAAFLARALATTGLPAPRRPRALQVQRITTEPGAASR
ZmSC01 MRGRASHLRALLSRALSP-SLPPP-----G-----RALP-----QVTR---PGASP-
PgSC01 -----
AtSC01 ---MASALCRTASRLRSVQLFRIRVS-----SDLLSASSPSPACISDALRHG---DFSLPR---SFFSLN
PpSC0  -----
OsSC02 -----MLTPRVLKLKSLLRLL
ZmSC02 -----MLTPRVLKASLLRCL
AtSC02 -----MLPCRRLVLS---CK
PgSC02 -----

```

```

ScSC01 GAKL-----LTQRGFFTVTRLWQS-----NGKKPLSRVPG---GTPIKDNGKVVREGSIEFSTGKA-IALFL
ScSC02 GG-----AYRRGFSTGCCLRSD-----NKEPSARQPLDRLQLGDEINEPEPIRTRFFQFSRWKATIALLL
NcSC0  CQR-----FISTATTTTRPTVP-----RLQAQLHQFVAQRRTYKTVEEAKSKYRS---GPFVSWKAGLLFVL
SpSC0  CH-----YSLIRPRFP-----LNRTCLARFADGRKNLATDNRQT-QYSW-RGMISIRALLLAAA
HsSC02 -----MLLLTRSPATAHRLSQLKPPVLPGLTGGQALHLRSWLLSRQGPAAETGGQGGPQGGPGLRTRLLITGL
HsSC01 GPAEGTARVL--LRQFCARQAEAWRASGRPGYCLGTRPLSTARPPPPWS---QKGGDSTRPSK-PGPVSWKSLAITFA
RnSC0  GMAE-----RPRPEEARCS-----LGSRNFS-ARPPPPGAGPEPKGSQAGSHRPK-LGPVSWKSLALTFA
DmSC0  -----MSRSLQRLVG-----SCRWA--QPAIRH---YAAPADSTKKG---GPISWRSLAVIGA
OsSC01 FGAAFLARG----GFSTDASAAAQDSAKP-----AAATGGEGGDG-KSGKSEQDAGKSVRGGPVSWSLFLLLL
ZmSC01 FGAGFVGRAR---FFSIDASAAATQGGSKPPAPP---AGTAGGEGGGGQSGKSEQADAGKAVRGGPVSWSLFLLLL
PgSC01 -----I
AtSC01 CGIEMLKMDQRCLLSTASDSTSADTTSKHDSGKPKETKSSEKNEKSGGSESSDGGSDHKNERAS-GKDVRRGGPVSWSMFFLLFA
PpSC0  -----
OsSC02 GAASA-----AAAERPPPCRPRVFPAR---SNHSRGYSSEGGSKYNRPMRQFAEENEANPQLIYYVVPVALLVF
ZmSC02 RAT-----AELPPLRRPRILPVR---VYHSRGYSSGGSSKYDRPMRQFSEQNESTSQPLIYYIAPALLAF
AtSC02 NQA-----ASFLRRCGPKRIQS---VNYCKSTRQGHEIPDVKPLFPTGGGTQAPSRSRARYAVPAILLGF
PgSC02 -----GRGLQNGLRSLAFLRLGIVPTALLVL

```

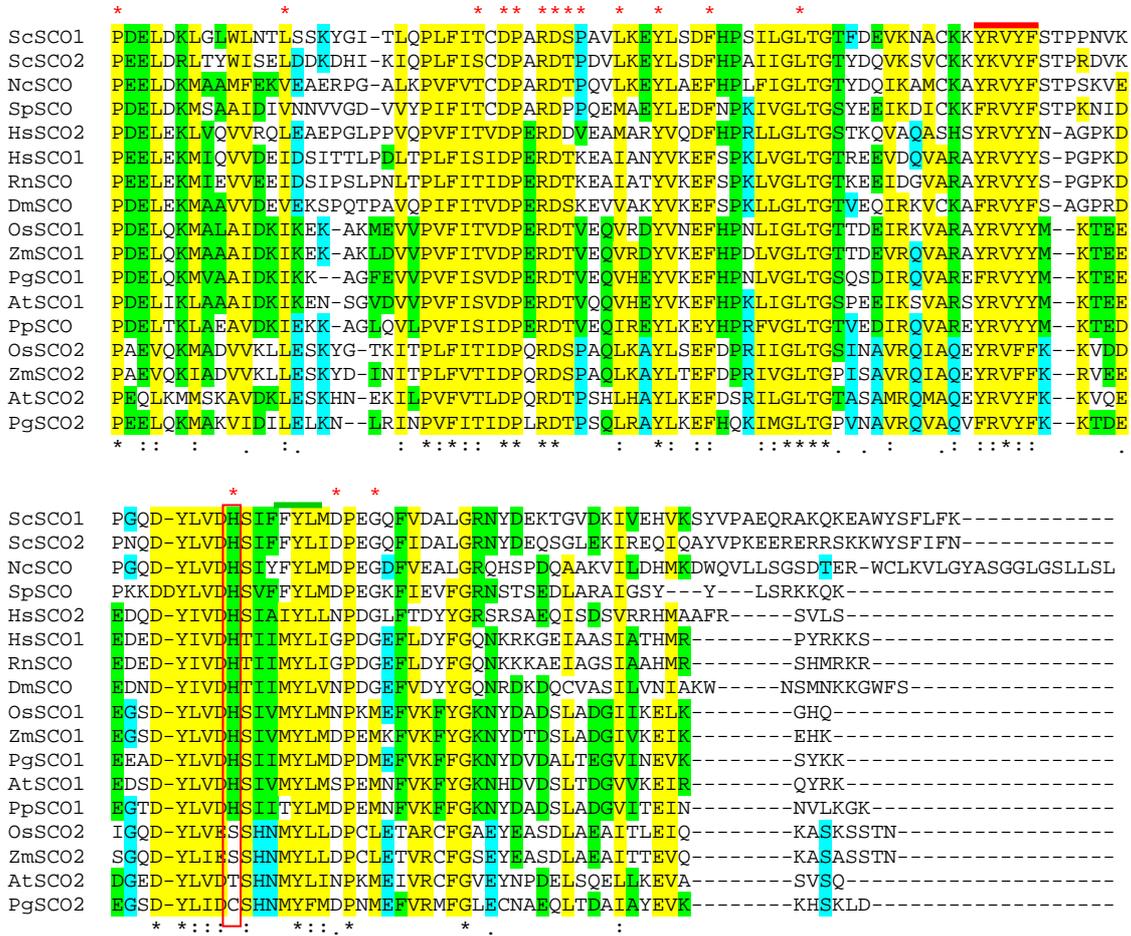
```

ScSC01 AVGGALSFFFNREKRRLETKQEA---EANRGYCK---PSLGGPFHLEDMYGNEFTEKNLLGKFSIIYFGFSNCPDIC
ScSC02 LSGGTYAYLS-RKRRLLTEKEA---DANRAYCS---VALGGPFNLTFDNGKPFTEENLKGKFSIYFGFSHCPDIC
NcSC0  TGAGLLWYFE-HEKQRMQRKRIA---DATKGVGR---PKVGGPFELTDQNGKPVTEKDLKGRYSLVYFGFSHCPDIC
SpSC0  LSVGLYAYFQ-HEKKKVLERQND---VLAITIGR---PQLGGAFSLIDHHNVRTDNDFKKGFSLIYFGFTRCPDIC
HsSC02 FCAGLGGAWLALRAEERLQQKRTELRQAAVQ---GD---FHLLDHRGRARCKADFRGQVWLMYFGFTHCPDIC
HsSC01 ICGALLAGMK-HVKKKEAKLEK---ERQRHIGK---PLGGPFSLTHTTGERKTDKDYLGQWLLIYFGFTHCPDVC
RnSC0  ICGSLLAGMK-YFKKEKIEKLEK---QRHRSIGK---PLGGPFSLTHTNGEPKTDKDFLGQVWLIYFGFTHCPDIC
DmSC0  LGAGGVGFML-YVSEKDEARMK---ERQRQLGK---AAIGGSWELVDSQAVRKSDFLGLWLLIYFGFTHCPDIC
OsSC01 TCGGIIVVYDKKRRHIEELKNRTSAVKQEPVSGT---AAIGGPFNLLNHDGKPVTDKDFDFGKWTLLYFGFTHCPDIC
ZmSC01 TCGGIIVVYDKKRRHIEELKNRTSAVKPGQVSGT---AAIGGPFKLLNHDGKPVTEKDFLGLKWTLLYFGFTHCPDIC
PgSC01 TGVGLIIVYDFREKRRHIEEIKNLPAQVKEGVSAGK---AAIGGPFNLVNHGKPVTDKDFDFTGKWSLIYFGFTHCPDIC
AtSC01 TGAGLVVYVYDTQKKRHIEDINKNSIAVKKEGVSAGK---AAIGGPFSLIRDDGKRVTEKNLMGKWTLLYFGFTHCPDIC
PpSC0  -----ARTGPGVVK---AAIGGPFKLLNQGKVVTDKDFVGNWTLIYFGFTYCPDIC
OsSC02 AGLVTFVHYNDEKRAV--TQEAQQTSVPKRCTINR---PAIGGPFKLYDTENKEVTESKLRGNWTLMYFGYTSCPDIG
ZmSC02 AGIATFVHYNDEERRAVPFAKVPQGTNVPKRCITNR---PAIGGPFKLYDTENSEVTESKLRGNWLMYFGYTSCPDVG
AtSC02 AGFVGLHYNDEERRAVP--RQASSNSGCGCSNTTVKGPVIGGPFLLVSTENKIVTENDFCCKWVLLYFGYSHSPDYG
PgSC02 ISAGLLHYNDEERRAIP---K-ASQQGSANITSK---PSIGGPFLLTDYDGLITDRREFLGHWTLLIYFGYTSPPDID

```

\* \* \* \* \*

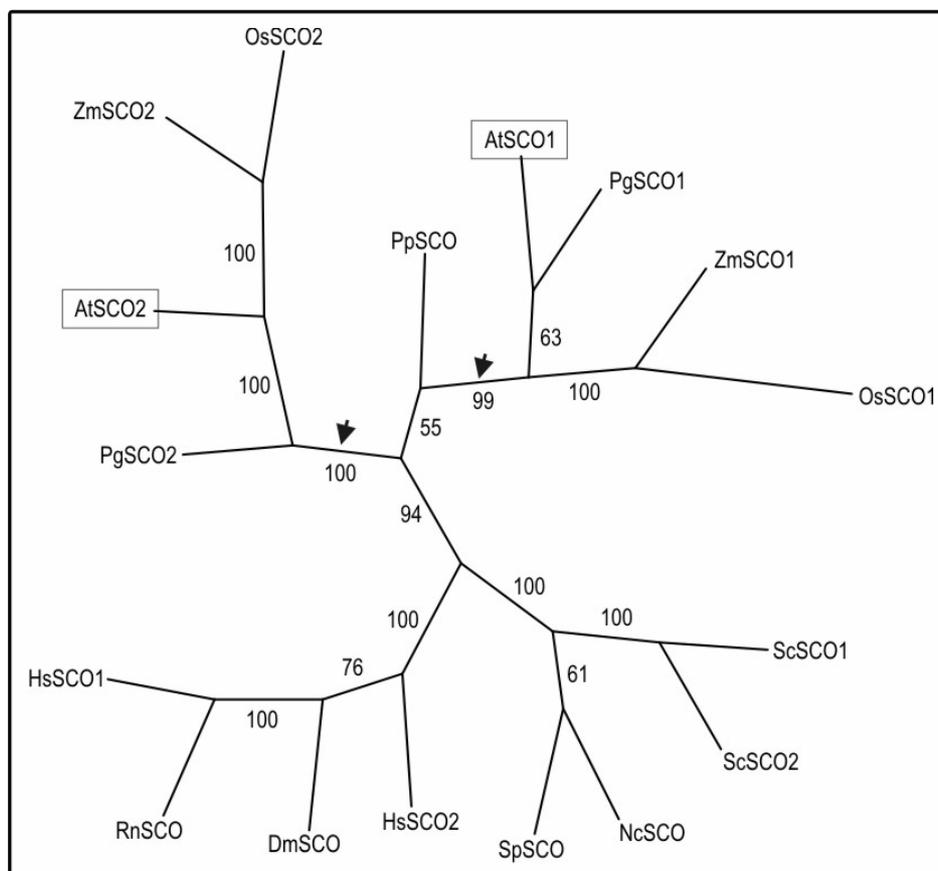
: \* . . \* : : \* \* : \*



**Figura 49:** Alineamiento de secuencias de proteínas Sco de diferentes organismos eucariotas. Las secuencias proteicas fueron alineadas utilizando el programa ClustalW (Thompson y col., 1994). Las posiciones ocupadas por aminoácidos idénticos están señaladas con un asterisco; aquellas ocupadas por aminoácidos relacionados están identificadas con dos puntos. Las posiciones conservadas parcialmente se señalan con un punto. Las posiciones conservadas en las proteínas SCO de plantas se muestran en verde o azul, respectivamente. Los asteriscos rojos indican posiciones altamente conservadas en proteínas Sco de procariontes (Banci y col., 2007). El motivo CXXXC y la histidina que han sido involucradas en la unión al cobre están indicadas con rectángulos rojos. La línea roja indica la región que interaccionaría con Cox2 (Rigby y col. 2008).

Realizamos un alineamiento de las secuencias de proteínas Sco provenientes de diferentes organismos (Figura 49). A partir del mismo, identificamos 25 posiciones aminoacídicas idénticas en todas las proteínas analizadas, mientras que 33 posiciones adicionales están ocupadas por aminoácidos relacionados. Además pudimos determinar que 13 posiciones que están conservadas en las proteínas SCO1 de plantas y proteínas pertenecientes a otros organismos presentan sustituciones no conservativas en, al menos, una de las proteínas SCO2 de plantas. En función del estudio del modelo tridimensional de proteínas Sco (<http://swissmodel.expasy.org/repository/>), se puede deducir que 8 de los residuos no conservados estarían localizados en el entorno del sitio de unión de cobre, incluyendo las dos cisteínas mencionadas y un residuo de histidina también involucrado en la coordinación de dicho metal (Nittis y col., 2001). La mayoría de los residuos conservados parecen estar localizados en el interior de la proteína, sugiriendo que la estructura terciaria de las proteínas SCO2 de plantas sería similar a la de las otras proteínas Sco. Por otra parte, de las casi 40 posiciones que contienen residuos idénticos o similares en más del 90% de las proteínas Sco de eucariotas y procariotas (Balatri y col., 2003), únicamente los aminoácidos que coordinan el metal y una isoleucina del motivo CXXXC no están conservados en las proteínas SCO2.

Las secuencias de las proteínas Sco de diferentes organismos eucariotas fueron utilizadas para construir un árbol filogenético (Figura 50). Las proteínas Sco de animales, hongos y plantas forman grupos diferentes, indicando que las dos proteínas Sco de humanos, *Saccharomyces cerevisiae* y plantas surgieron a partir de duplicaciones independientes, las cuales tuvieron lugar luego de la separación de los respectivos linajes. En el caso de la briófito *P. patens*, encontramos sólo una proteína SCO, la cual aparece junto a las proteínas SCO1 de plantas, aunque este posicionamiento no tiene un soporte fuerte desde el punto de vista estadístico. La evidencia nos lleva a pensar que las proteínas SCO1 y SCO2 de plantas surgieron en algún momento durante la evolución de las plantas vasculares antes de la emergencia de las angiospermas.



**Figura 50:** Las proteínas SCO1 y SCO2 de plantas divergieron antes de la aparición de las plantas con flores.

Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de proteínas Sco obtenidas de diferentes organismos eucariotas, utilizando el grupo de programas PHYLIP (Felsenstein, 1989). Para la construcción del árbol se utilizó un alineamiento de secuencias de proteínas Sco obtenido mediante el uso del programa ClustalW (Thompson y col., 1994). Se construyó un árbol consenso, generado por análisis *bootstrap* de 100 árboles construidos con ProtDist (con una matriz de Dayhoff) seguido de Neighbor (usando el método de *neighbor joining*). Los números indican los valores de *bootstrap* para cada una de las ramas. Las flechas indican las ramas que separan las proteínas SCO1 y SCO2 de plantas. Las secuencias analizadas provienen de *Drosophila melanogaster* (DmSCO; NM\_135040), *Homo sapiens* (HsSCO1 y 2; NM\_004589 y NM\_005138, respectivamente), *Rattus norvegicus* (RnSCO; XM\_001078805), *Oryza sativa* (OsSCO1 y 2; NM\_001052499 y NM\_001069552, respectivamente), *Zea mays* (ZmSCO1 y 2; NM\_001136584 y NM\_001155590, respectivamente), *Arabidopsis thaliana* (AtSCO1 y 2), *Picea glauca* (PgSCO1 y 2; CO242007 y EX374405, respectivamente), *Physcomitrella patens* (PpSCO; XM\_001769529), *Schizosaccharomyces pombe* (SpSCO; NM\_001021194), *Neurospora crassa* (NcSCO; BX842636) y *Saccharomyces cerevisiae* (ScSCO1 y 2; Z35906 y Z35893, respectivamente).

### **3.4.3. Caracterización del patrón de expresión de *AtSCO1* y evaluación de su función en *Arabidopsis thaliana***

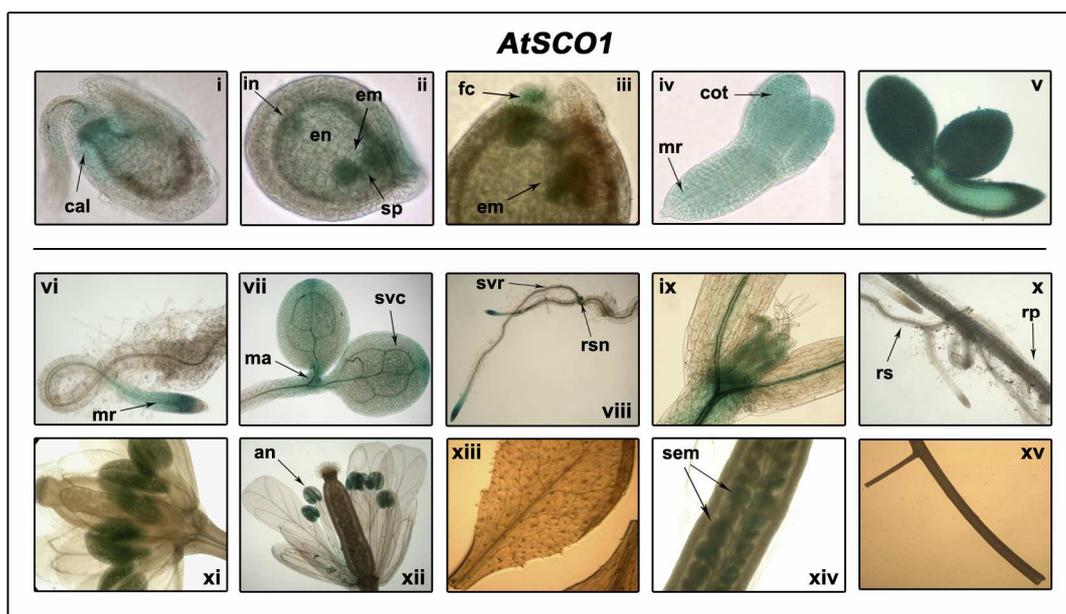
#### **3.4.3.1. Análisis del patrón de expresión del gen *AtSCO1***

Analizamos el patrón de expresión de *AtSCO1* mediante datos disponibles en los sitios BAR Expression Browser (Toufighi y col., 2005; <http://bbc.botany.utoronto.ca/>) y Genevestigator (Hruz y col., 2008; <https://www.genevestigator.com>). A partir de estos datos, determinamos que *AtSCO1* parece expresarse en la mayoría de los órganos pero presenta mayores niveles de transcritos en semillas imbibidas, embriones, endosperma y meristema de la raíz. En polen, se expresa predominantemente en los estadios unicelular y bicelular.

Para complementar estos datos, clonamos un fragmento de 1005 pb de la región promotora de *AtSCO1* en el vector binario pBI101.3, fusionado a la región codificante del gen reportero *gus*. El clon obtenido fue utilizado para transformar plantas a través del método mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transformadas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia del antibiótico kanamicina. Estas plantas fueron analizadas también a través de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la región promotora en estudio y del gen reportero *gus* (ver Materiales y Métodos 2.11.3).

A fin de analizar la expresión del gen reportero *gus* dirigida por la región promotora de *AtSCO1*, realizamos un seguimiento de los patrones de expresión de 10 líneas independientes mediante reacciones histoquímicas, utilizando el sustrato X-gluc. En la Figura 51 se puede observar que se detecta actividad  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) en distintas etapas de la embriogénesis, puntualmente en el embrión propiamente dicho y en el suspensor (Figura 51 ii), en la zona de unión del funículo con la semilla (Figura 51 iii) y en la zona de la calaza (Figura 51 i). Se pueden visualizar los embriones en etapa globular, corazón, torpedo y en el estadio más avanzado, en el cual se logran diferenciar los cotiledones y la radícula (Figura 51, ii-v). Al prolongar la incubación por más tiempo también observamos actividad GUS en el endosperma e integumento (Figura 51

ii). En las plántulas, observamos actividad GUS en las regiones meristemáticas del tallo y la raíz, en el ápice de los cotiledones y en las raíces secundarias nacientes (Figura 51, vi-ix). En plantas adultas sólo se observa actividad GUS en anteras (Figura 51, x-xv).



**Figura 51:** Análisis histoquímico de la expresión del gen *gus* dirigida por la región promotora de *AtSCO1*.

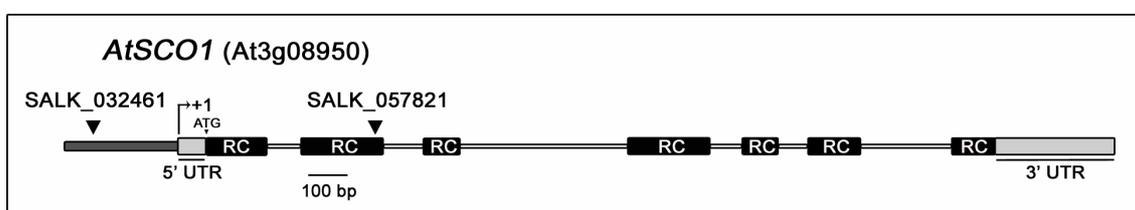
Detección histoquímica de la actividad GUS en plantas transformadas con la región promotora de *AtSCO1* fusionada al gen reportero *gus*. (i-iii) Semillas en diferentes estadios del desarrollo. (iv y v) Embriones. (vi y vii) Raíz y cotiledones correspondientes a plántulas de 4 días. (viii y ix) Raíz y meristema apical correspondientes a plantas de 12 días. (x-xv) Raíz, flor inmadura, flor madura, hoja, vaina y tallo correspondientes a plantas de 28 días. Abreviaturas: cal, calaza; em, embrión; en, endosperma; in, integumento; sp, suspensor; fc, funículo; cot, cotiledón; mr, meristema radicular; ma, meristema apical; svc, sistema vascular de los cotiledones; rsn, raíz secundaria naciente; svr, sistema vascular de la raíz; rp, raíz primaria; rs, raíz secundaria; an, antera; sem, semillas.

### 3.4.3.2. Evaluación de la función de *AtSCO1* a través del estudio de plantas con inserciones de T-DNA en el gen de interés

A fin de obtener información que nos permita dilucidar la función de la proteína *AtSCO1* en plantas, caracterizamos dos líneas SALK (Alonso y col., 2003) que

presentan inserciones de T-DNA en el gen correspondiente (ver Materiales y Métodos 2.1.1.5).

Mediante amplificación por PCR, clonado y posterior secuenciación de los productos obtenidos, determinamos la presencia y localización exacta de las inserciones de T-DNA utilizando oligonucleótidos específicos del gen y de la propia inserción. De esta manera, corroboramos que la línea SALK\_057821 presenta una inserción en el segundo exón del gen *AtSCO1*, mientras que la línea SALK\_032461 presenta la inserción en la región promotora, cercana al sitio de inicio de la transcripción (a 220 pb del mismo) (Figura 52).



**Figura 52:** Esquema del gen *AtSCO1*. Las regiones negras representan las regiones codificantes (RC). En gris están representadas las regiones 5' y 3' UTR. En líneas más delgadas están representados los intrones. El sitio de inicio de la transcripción se indica a través del +1. Las flechas muestran los sitios de inserción de T-DNA en las líneas de plantas SALK analizadas.

#### 3.4.3.2.1. Análisis de la línea SALK\_032461

En el caso de las plantas que presentan la inserción en la región promotora, obtuvimos plantas homocigotas para la misma, las que no evidenciaron ningún fenotipo característico que las diferencie de las plantas salvajes de *Arabidopsis*. Mediante ensayos de transcripción reversa seguida de una amplificación por PCR (RT-PCR) en forma semicuantitativa determinamos que los niveles de ARNm correspondientes a *AtSCO1* son similares a los de las plantas salvajes.

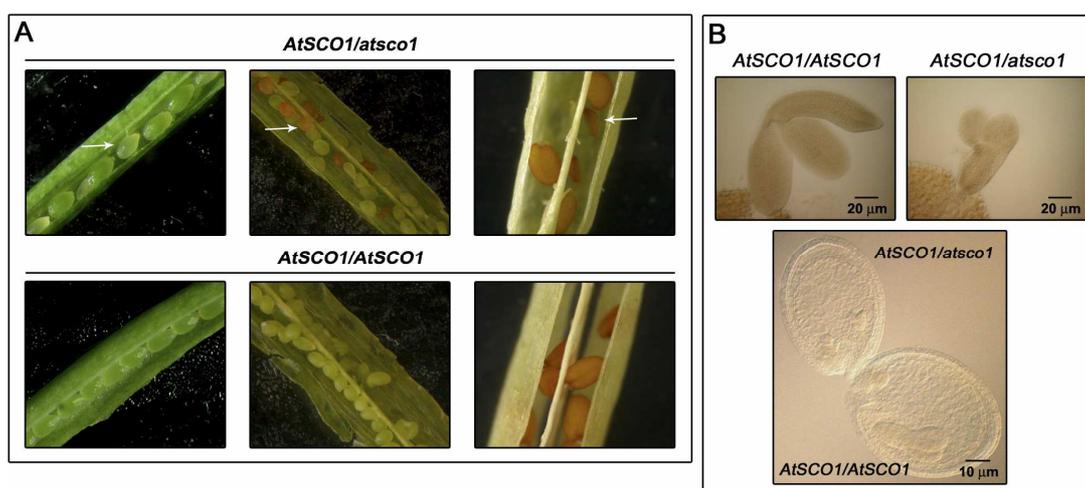
En función de este resultado nos propusimos determinar si la región promotora de 220 pb que se mantiene cadena abajo de la inserción de T-DNA es capaz de dirigir la

expresión como lo hace el fragmento de mayor tamaño. Entonces, analizamos el patrón de expresión del gen reportero *gus* dirigido por dicha región promotora, observando que, en efecto, la expresión no presentó diferencias respecto del patrón obtenido para el fragmento de mayor tamaño. Este resultado sugiere que la región de 220 pb ubicada cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción contiene la mayoría de los elementos relevantes para la expresión de *AtSCO1* y explica la falta de un fenotipo observable en esta línea en comparación con las plantas salvajes.

#### *3.4.3.2.2. Análisis de la línea SALK\_057821*

En el caso de las plantas que presentan la inserción en el segundo exón del gen *AtSCO1*, no pudimos identificar plantas homocigotas para la misma. Al analizar fenotípicamente las plantas heterocigotas para dicha inserción, encontramos que sus vainas presentan semillas con una morfología anormal. En particular, en las vainas inmaduras observamos aproximadamente un 25% de semillas de color blanco en comparación con el resto de las semillas, de color verde. En un estadio posterior, estas semillas anormales presentan una coloración marrón oscura, e incluso en algunos casos se ven secas y colapsadas en torno a lo que suponemos es el embrión, mientras que el resto de las semillas aún se encuentran verdes. Finalmente, en las vainas completamente maduras, las semillas anormales están colapsadas y secas, y el resto de las semillas presenta un aspecto normal (Figura 53A). Las semillas colapsadas no son capaces de germinar en medio MS. Al analizar el desarrollo de los embriones de las semillas anormales como se describe en Materiales y Métodos 2.18, observamos diferencias respecto de las semillas normales de la misma vaina y de semillas normales provenientes de plantas salvajes en el mismo estadio de desarrollo. A través del uso de microscopía óptica de Nomarski determinamos que, ni bien son detectables las diferencias, las semillas anormales contienen embriones en un estadio más temprano que el de sus contrapartes normales. Estos embriones proliferan hasta la etapa corazón o torpedo y luego detienen su desarrollo, mientras que los embriones normales de la

misma vaina ya se encuentran en las etapas finales de la embriogénesis (Figura 53B). Luego de la maduración de las semillas, no logramos distinguir los embriones en las semillas anormales, lo cual sugiere que se produce la degeneración de los mismos.



**Figura 53:** (A) Vainas de plantas heterocigotas para la inserción de T-DNA presente en el segundo exón del gen *AtSCO1*. Se muestran vainas de plantas heterocigotas (*AtSCO1/atsco1*, panel superior) y salvajes (*AtSCO1/AtSCO1*, panel inferior) en distintas etapas de la maduración. Las flechas señalan las semillas anormales presentes en las plantas *AtSCO1/atsco1*. (B) Embriones correspondientes a las semillas anormales de las plantas *AtSCO1/atsco1* que presentan un retardo en el desarrollo. Las semillas fueron escindidas de plantas salvajes (*AtSCO1/AtSCO1*) o heterocigotas para la inserción de T-DNA (*AtSCO1/atsco1*) en diferentes etapas del desarrollo y analizadas luego de ser clarificadas con solución de Hoyer (ver Materiales y Métodos 2.18). Las semillas anormales provenientes de plantas heterocigotas contienen embriones en un estadio de desarrollo más temprano que las provenientes de plantas salvajes o de semillas normales presentes en la misma vaina (panel inferior). Los embriones de las semillas anormales se desarrollan sólo hasta la fase corazón o torpedo (panel superior, derecha).

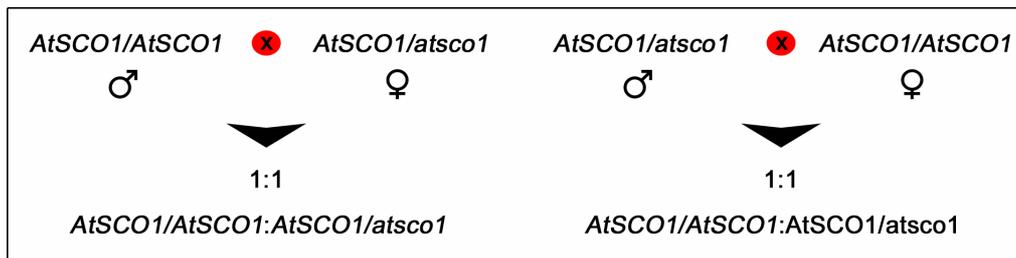
Como mencionamos anteriormente, la proporción de semillas anormales en las vainas de las plantas heterocigotas para la inserción de T-DNA es de aproximadamente un 25% (113/463, Tabla 3). En el caso de las plantas salvajes, la proporción de semillas anormales es de sólo un 1%. La proporción 3:1 (normal:anormal) en las semillas de las plantas heterocigotas y la ausencia de plantas homocigotas para la inserción de T-DNA

en la progenie, sugiere la existencia de un defecto en el desarrollo de las semillas por la falta de una copia funcional del gen *AtSCO1*. Consistentemente con esta hipótesis, al determinar el genotipo de la progenie de las plantas heterocigotas mediante reacciones de PCR, obtuvimos una proporción de plantas heterocigotas de aproximadamente 2:1 respecto de las salvajes, lo cual refuerza la idea de que las semillas anormales contienen embriones homocigotas y que la muerte de dichos embriones está asociada a la ausencia de una copia funcional del gen *AtSCO1*.

Línea Parental	Fenotipo de la semilla		$\chi^2$ (N:A = 3:1)	Genotipo de la progenie		$\chi^2$ (H:S= 2:1)
	Normal (N)	Abnormal (A)		Heterocigota (H)	Salvaje (S)	
<i>AtSCO1/AtSCO1</i> (salvaje)	544	6	166 ( $P < 0,0001$ )	N.A.	N.A.	N.A.
<i>AtSCO1/atsco1</i> (heterocigota)	350	113	0,104 ( $P = 0,75$ )	94	43	0,295 ( $P = 0,59$ )

**Tabla 3: Análisis de la segregación de la inserción de T-DNA en las plantas heterocigotas de la línea SALK\_057821 en comparación con las plantas salvajes.** Se analizó la presencia de semillas normales (N) o anormales (A) en las vainas. Se consideraron semillas anormales aquellas que contenían embriones arrestados o las que estaban colapsadas y presentaban en forma temprana una coloración marrón. Un valor de  $\chi^2$  de 0,104 indica que la proporción de semillas normales y anormales en plantas heterocigotas no es significativamente diferente del valor esperado de 3:1, asumiendo que las semillas anormales contienen los embriones homocigotas. La progenie de las plantas heterocigotas fue analizada en función de la presencia de la inserción de T-DNA y/o la copia salvaje del gen *AtSCO1*, siendo clasificadas en heterocigotas (H) o salvajes (S), según corresponda. Un valor de  $\chi^2$  de 0,295 indica que la proporción de plantas heterocigotas y salvajes no es significativamente diferente de 2:1, como se espera en el caso de una mutación letal recesiva. No hemos encontrado plantas homocigotas para la inserción de T-DNA en la progenie de las plantas heterocigotas. N.A.: no aplicable.

Realizamos cruza recíprocas de las plantas heterocigotas con plantas salvajes (Figura 54) a fin de corroborar que la transmisión del alelo que contiene la inserción de T-DNA a través de cada una de las gametas no se encuentra comprometida. Al analizar la progenie de dichas cruza mediante reacciones de PCR obtuvimos la proporción esperada de 1:1 (heterocigotas:salvajes).

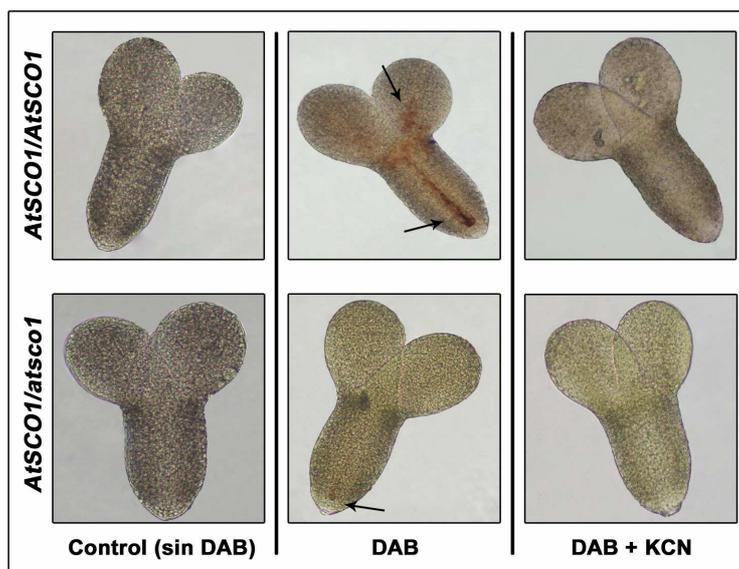


**Figura 54:** Esquema de las cruza recíprocas entre plantas heterocigotas para la inserción de T-DNA (*AtSCO1/atsco1*) y plantas salvajes (*AtSCO1/AtSCO1*). La proporción esperada es 1:1 (*AtSCO1/AtSCO1:AtSCO1/atsco1*) si no existen problemas en la transmisión del T-DNA a través de las gametas.

#### 3.4.3.2.3. Evaluación de la actividad COX en los embriones de las semillas de plantas de la línea *SALK\_057821*

Debido a que asumimos que las semillas anormales contienen los embriones homocigotas para la inserción de T-DNA, y teniendo en cuenta el papel propuesto para las proteínas Sco en la biogénesis de COX, nos propusimos evaluar la actividad de esta enzima en dichos embriones. Para tal fin, realizamos una detección histoquímica usando DAB como sustrato, de acuerdo al método descrito por Wong-Riley (1979), en embriones provenientes de semillas normales y anormales de plantas heterocigotas y en embriones de plantas salvajes en el mismo estadio de desarrollo. En presencia de DAB, los embriones provenientes de las semillas normales producen un precipitado marrón en el sistema vascular en desarrollo de las raíces y los cotiledones debido a la oxidación del DAB (Figura 55). Esta oxidación es notoriamente inhibida al incluir en la reacción KCN, lo cual nos indica que la actividad de COX es necesaria para la obtención del precipitado marrón (Figura 55). Al ensayar la oxidación de DAB en los embriones provenientes de semillas anormales observamos una débil formación del correspondiente precipitado, lo cual nos sugiere que los mismos presentan una baja actividad respiratoria (Figura 55). Aunque este resultado podría deberse a la inminente muerte de los embriones anormales, realizamos este ensayo en etapas anteriores de la embriogénesis y siempre observamos una menor actividad de COX en estos embriones.

Esta evidencia nos permite hipotetizar que AtSCO1 estaría involucrada en la biogénesis de COX, como su homólogo de levaduras, y que su ausencia es letal durante la embriogénesis de Arabidopsis, probablemente porque la actividad de COX es requerida para la producción de energía durante el desarrollo y proliferación embrionarios.

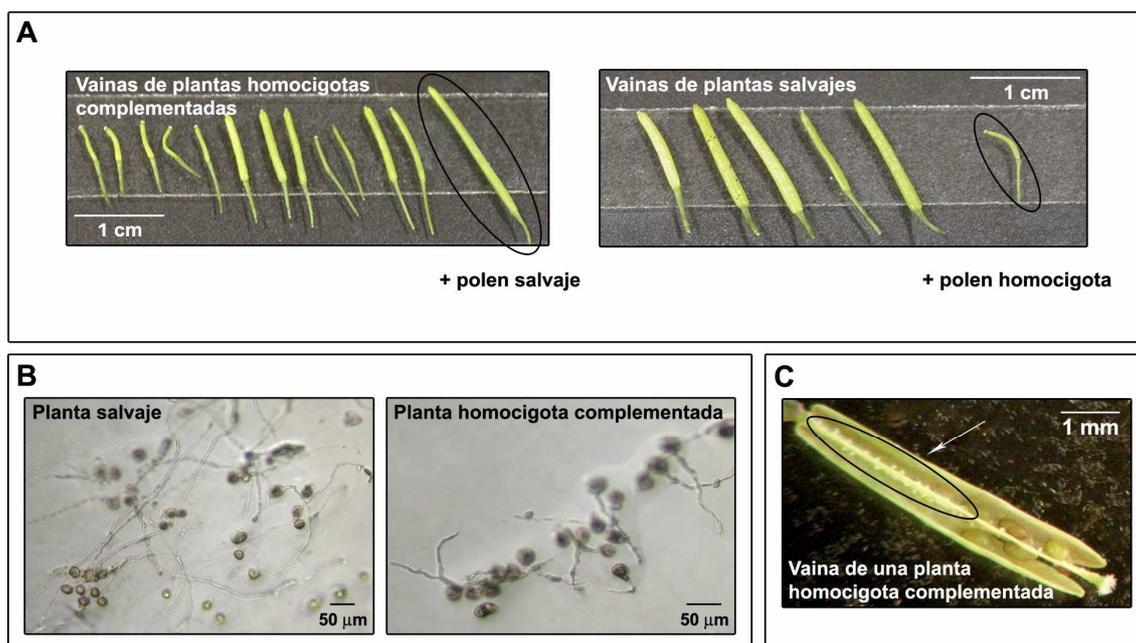


**Figura 55:** Evaluación de la actividad COX en embriones mediante la oxidación de DAB. Las plantas heterocigotas (*AtSCO1/atSCO1*) para la inserción de T-DNA en el gen *AtSCO1* producen embriones con una baja actividad de oxidación de DAB (panel inferior). Los embriones que provienen de semillas normales (*AtSCO1/AtSCO1*) en el mismo estadio presentan una alta actividad de oxidación de DAB, la cual puede ser inhibida por KCN (panel superior).

#### 3.4.3.2.4. Obtención de plantas homocigotas para la inserción de T-DNA mediante la transformación de plantas heterocigotas de la línea SALK\_057821 con el ADNc de *AtSCO1*

Con la finalidad de corroborar que el fenotipo de los embriones provenientes de las semillas anormales de las plantas heterocigotas para la inserción de T-DNA se corresponde con la ausencia de una copia funcional de *AtSCO1*, realizamos un

experimento de complementación de dichas plantas con el ADNc de *AtSCO1*. Para ello, insertamos este ADNc en el vector binario pCAMBIA1302, bajo el control del promotor constitutivo 35SCaMV, y transformamos plantas heterocigotas de la línea SALK\_057821 como se describe en Materiales y Métodos 2.11. Las plantas transformadas fueron seleccionadas en función de su resistencia al antibiótico higromicina y luego analizadas mediante reacciones de PCR, a fin de corroborar la presencia del ADNc de *AtSCO1* y la inserción de T-DNA en el gen endógeno *AtSCO1*. La introducción del ADNc de *AtSCO1* nos permitió obtener plantas con inserciones de T-DNA en ambas copias del gen en estudio, lo cual sugiere que la expresión de *AtSCO1* es capaz de promover el desarrollo de embriones mutantes homocigotas. Las plantas homocigotas para la inserción de T-DNA que expresan *AtSCO1* bajo el control del promotor 35SCaMV se desarrollan normalmente, aunque sus vainas son más cortas (Figura 56A) y presentan un número reducido de semillas en relación a las vainas de las plantas salvajes. Estas vainas presentan además un gran número de óvulos no fecundados que se disponen de manera agrupada en la base de las mismas (Figura 56C). Este fenotipo es típico de plantas que poseen polen con defectos en la elongación del tubo polínico. En función de esta hipótesis, realizamos cruza recíprocas con plantas salvajes a fin de analizar el fenotipo de las vainas obtenidas. Las vainas resultantes de la cruce de plantas homocigotas complementadas con polen de plantas salvajes presentan un fenotipo normal, mientras que las vainas resultantes de la cruce de plantas salvajes con polen de plantas homocigotas complementadas presentan el fenotipo característico de estas últimas (Figura 56A).



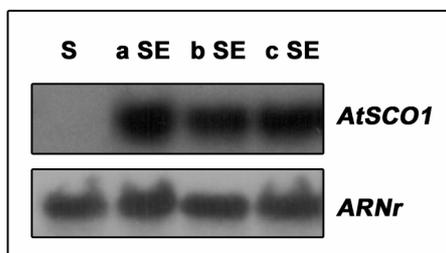
**Figura 56: Fenotipo de las plantas homocigotas para la inserción de T-DNA en el gen *AtSCO1* que fueron obtenidas por complementación con el ADNc de *AtSCO1*.** (A) Se muestran las vainas correspondientes a plantas homocigotas complementadas y a plantas salvajes. La vaina encerrada en un círculo fue obtenida por polinización de las respectivas plantas con el polen de plantas salvajes (panel de la izquierda) o polen de plantas homocigotas complementadas (panel de la derecha). (B) Ensayo de germinación de polen extraído de plantas salvajes (panel de la izquierda) o de plantas homocigotas complementadas (panel de la derecha). (C) Se muestra la disposición de las semillas en una vaina de una planta homocigota complementada, a fin de mostrar la presencia de óvulos no fecundados en la base de la vaina.

En función de este resultado, y de la presencia de óvulos no fecundados en la parte inferior de las vainas, decidimos evaluar la germinación *in vitro* de los granos de polen provenientes de las plantas homocigotas complementadas. En la Figura 56B se puede observar que el polen de estas plantas presenta una menor elongación del tubo polínico en comparación con el polen que proviene de plantas salvajes. Las plantas salvajes que sobreexpresan *AtSCO1* (ver más adelante) no presentan defectos en la germinación de polen, lo que nos sugiere que este defecto no se debe a la expresión de *AtSCO1* dirigida por el promotor 35SCaMV. Postulamos que el fenotipo observado

podría deberse a que la expresión de *AtSCO1* es crítica en determinados tipos de células o en etapas definidas del desarrollo de polen y a que el promotor 35SCaMV no es capaz de promover la expresión de *AtSCO1* según estos requerimientos.

### 3.4.3.3. Evaluación de la función de la proteína *AtSCO1* mediante estudios de sobreexpresión

Nos propusimos estudiar el impacto de la sobreexpresión de *AtSCO1* en las plantas con la finalidad de entender otros aspectos de la función de la proteína correspondiente. Con este propósito, clonamos el ADNc completo de *AtSCO1* bajo el control del promotor 35SCaMV en el vector pBI121 y utilizamos dicha construcción para transformar plantas de *Arabidopsis*, como se describe en Materiales y Métodos 2.11. Analizamos los niveles de ARNm correspondientes a *AtSCO1* en varias líneas transformantes independientes y tres de ellas, con niveles de expresión relativamente altos, fueron reproducidas hasta obtener homocigotas para futuros análisis (Figura 57).

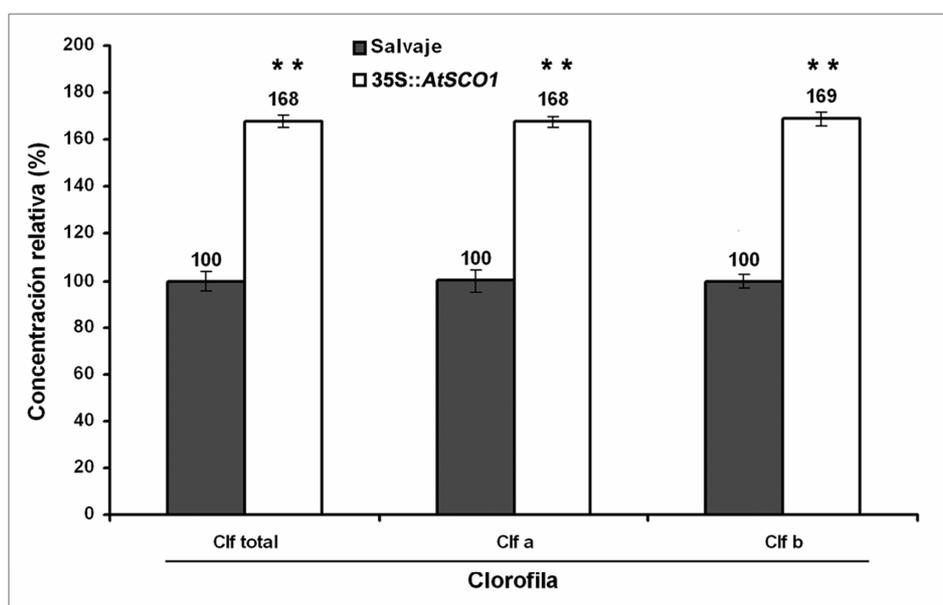


**Figura 57: Análisis por northern blot de los niveles de transcripto de *AtSCO1*.** Se determinaron los niveles de transcripto de *AtSCO1* en plantas salvajes (S) y tres líneas independientes transformadas con el ADNc de *AtSCO1* bajo el control del promotor 35SCaMV (a SE, b SE y c SE). Como control de la cantidad de ARN total en cada muestra, se analizaron los niveles de ARNr.

#### 3.4.3.3.1. Evaluación del contenido de clorofila

Evaluamos el crecimiento de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* y observamos que presentan un fenotipo similar al de las plantas salvajes, tanto en tierra como en placas de Petri. Sin embargo, cuando mantuvimos las plantas sobreexpresantes

durante un largo período en tierra, pudimos observar que las mismas producen flores y vainas aún después de que las plantas salvajes detienen su crecimiento. Al comparar hojas de roseta provenientes de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* con las de plantas salvajes observamos que las primeras permanecen verdes aún luego de un período de crecimiento en el que las hojas de plantas salvajes muestran signos claros de senescencia. Además, al determinar el contenido de clorofila (Figura 58) pudimos determinar que las plantas de 7 semanas que sobreexpresan *AtSCO1* presentan mayores niveles de clorofilas a y b que las plantas salvajes. Esto sugiere que las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* presentan un retraso en la senescencia.



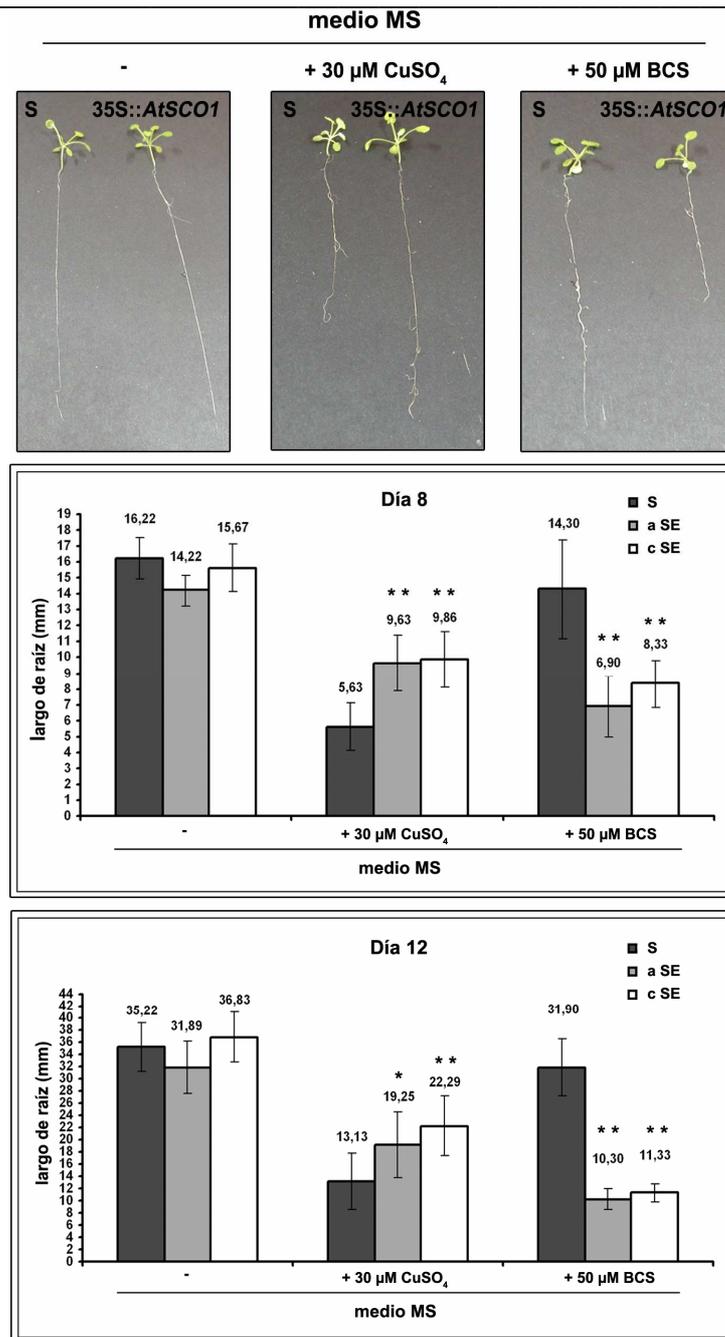
**Figura 58:** Análisis del contenido de clorofila de hojas de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1*. Realizamos mediciones espectrofotométricas de clorofila total, clorofila a (Clf a) y clorofila b (Clf b) en hojas de plantas salvajes (S) y de plantas que sobreexpresan *AtSCO1* (35S::*AtSCO1*) (panel de la izquierda). En el panel de la derecha se

muestran las hojas de roseta de las plantas salvajes y de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* crecidas en las mismas condiciones, durante 7 semanas.

#### *3.4.3.3.2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de cobre*

Debido a que las proteínas Sco han sido involucradas en el metabolismo de cobre nos propusimos evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cobre sobre el crecimiento de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1*. Concretamente, ensayamos el efecto de la presencia de  $\text{CuSO}_4$  30  $\mu\text{M}$  y de un quelante de cobre (batocuproinadisulfonato sódico, BCS) 50  $\mu\text{M}$  en el medio MS, cuyo contenido de cobre es de 0,05  $\mu\text{M}$ . En medio MS, no observamos diferencias significativas en el largo de raíces entre las plantas sobreexpresantes y las plantas salvajes. La presencia de un exceso de cobre en el medio, sin embargo, afectó más a las plantas salvajes, mientras que las plantas sobreexpresantes mostraron raíces significativamente más largas. Cuando evaluamos la incidencia de la carencia de cobre por el agregado del quelante mencionado, observamos que las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* presentan raíces significativamente más cortas que las plantas salvajes (Figura 59).

Estos resultados nos indujeron a pensar que las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* muestran alteraciones en la homeostasis de cobre, comportándose como si existiera una disminución de los niveles disponibles de cobre en las mismas.

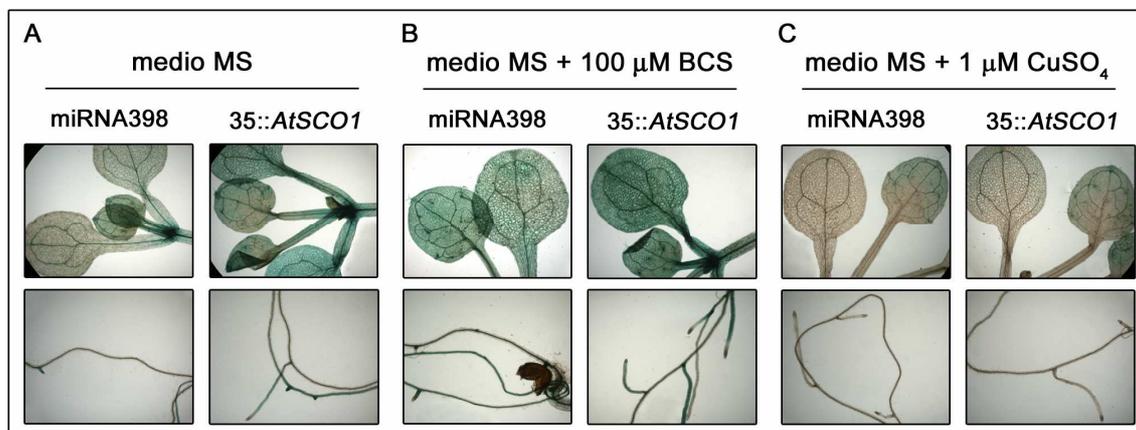


**Figura 59:** Evaluación de la respuesta de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* a cambios en la concentración de cobre en el medio de cultivo. Dos líneas diferentes de plantas sobreexpresantes (barras grises y blancas) y plantas salvajes (barras oscuras) fueron crecidas durante 12 días en placas orientadas en forma vertical en medio MS 0,5X ( $\text{CuSO}_4$  0,05  $\mu\text{M}$ ), o en el mismo medio suplementado con  $\text{CuSO}_4$  30  $\mu\text{M}$  o BCS 50  $\mu\text{M}$ . Las barras representan el largo de la raíz ( $\pm\text{SD}$ ) a los 8 y 12 días de crecimiento. Los asteriscos indican que el largo de las raíces

de las plantas sobreexpresantes es significativamente diferente respecto del de las plantas salvajes crecidas bajo las mismas condiciones, de acuerdo a un test de Student (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ).

### 3.4.3.3.3. Evaluación de la actividad GUS dirigida por el promotor del miRNA398

Decidimos evaluar la actividad del promotor del miRNA398, el cual se induce en respuesta a una deficiencia de cobre, en las plantas que sobreexpresan *AtSCO1*. En primer lugar, realizamos cruza de plantas que contienen el promotor de este miRNA fusionado al gen reportero *gus* con las plantas sobreexpresantes. Luego, evaluamos la actividad GUS en las plantas obtenidas de las cruza, respecto de plantas que poseen sólo la construcción del promotor del miRNA fusionado al gen reportero. Las plantas sobreexpresantes muestran mayor actividad GUS al ser cultivadas tanto en medio MS 0,5X (Figura 60A), como en presencia de BCS (Figura 60B). En presencia de un exceso de cobre la actividad de este promotor se encuentra altamente reprimida, incluso en las plantas sobreexpresantes (Figura 60C). Estos resultados indican que las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* perciben una disminución en los niveles de cobre intracelulares.



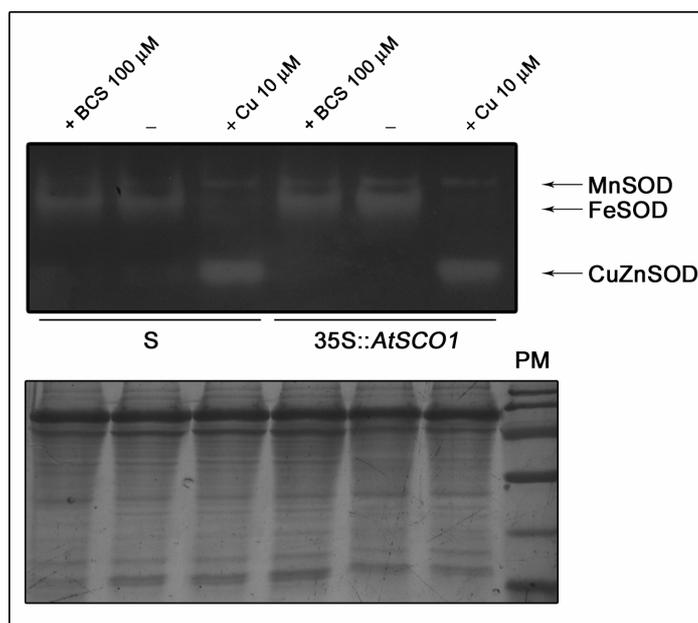
**Figura 60: Evaluación de la actividad del promotor del miRNA398 en plantas que sobreexpresan *AtSCO1*.** Detección histoquímica de la actividad GUS en plantas que contienen el promotor del miRNA398 fusionado al gen reportero *gus* (miRNA398), y en plantas que sobreexpresan *AtSCO1* y contienen la construcción antes mencionada (35::*AtSCO1*). Se evaluó la actividad en diferentes condiciones de crecimiento, en medio MS 0,5X sin suplementar y suplementado con CuSO<sub>4</sub> y BCS en las concentraciones indicadas.

#### *3.4.3.3.4. Evaluación de la actividad de las isoformas de SOD*

El miRNA398 regula la expresión de dos isoformas de la superóxido dismutasa de cobre/zinc (Cu,Zn-SOD, CSD1 y CSD2). Cuando los niveles de cobre en las plantas se encuentran disminuidos, la inducción de este miRNA provoca la reducción de la expresión de la Cu,Zn-SOD, supuestamente a fin de reservar el escaso cobre disponible para las proteínas esenciales, induciéndose consecuentemente la Fe-SOD (Yamasaki y col., 2007).

A fin de evaluar los niveles de las isoformas de SOD, preparamos extractos proteicos de plantas sobreexpresantes y salvajes crecidas en MS 0,5X sin suplementar y en el mismo medio suplementado con CuSO<sub>4</sub> 10 µM o BCS 100 µM, como se describe en Materiales y Métodos 2.16. Luego analizamos la actividad de cada una de las isoformas de SOD mediante un análisis histoquímico en gel. Las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* presentan un incremento en la actividad de Fe-SOD respecto de las plantas salvajes, tanto en MS 0,5X como en medio suplementado con BCS (Figura 61). Además, pudimos observar una relativa disminución en la actividad de la Cu,Zn-SOD en plantas crecidas en el medio 0,5X sin suplementar.

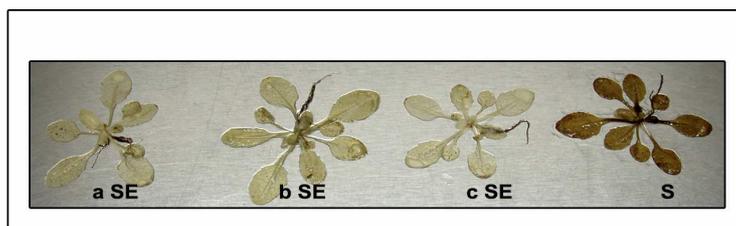
Dado que las plantas sobreexpresantes se comportan como si existiera una disminución en los niveles de cobre, realizamos mediciones del contenido total de cobre en las mismas y en plantas salvajes (ver Materiales y Métodos 2.22), no observándose diferencias significativas entre las mismas. Esto sugiere que la acumulación del metal en las plantas no se vería alterada.



**Figura 61: Detección de la actividad de las distintas isoformas de SOD.** Se prepararon extractos proteicos provenientes de plantas salvajes (S) y de plantas que sobreexpresan *AtSCO1* (*35S::AtSCO1*), crecidas en diferentes condiciones. Se determinó la actividad de las diferentes isoformas de SOD mediante tinción histoquímica en gel. Las flechas muestran la migración de las diferentes isoformas de SOD. En el panel inferior se muestra la tinción con Coomassie Brilliant Blue de un gel preparado con la misma cantidad de los correspondientes extractos, como control. PM: marcador de peso molecular de proteínas.

#### 3.4.3.3.5. Evaluación del contenido de ROS

Otra de las evaluaciones que realizamos fue la medición de ROS en las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* mediante la incubación de las mismas en presencia de DAB (Materiales y Métodos 2.17). Utilizamos plantas de 3 semanas crecidas en tierra y determinamos que las plantas sobreexpresantes poseen menores niveles de ROS que las plantas salvajes (Figura 62). En estas últimas se evidenció una mayor oxidación del DAB, la cual es proporcional a la presencia de ROS y se traduce en la aparición de un precipitado marrón.



**Figura 62: Determinación de ROS en las plantas que sobreexpresan *AtSCO1*.** Analizamos la producción de ROS en plantas que sobreexpresan *AtSCO1* (a SE, b SE y c SE) y en plantas salvajes (S) mediante la incubación de las mismas con DAB.

### 3.4.4. Caracterización del patrón de expresión de *AtSCO2* y evaluación de su función en *Arabidopsis thaliana*

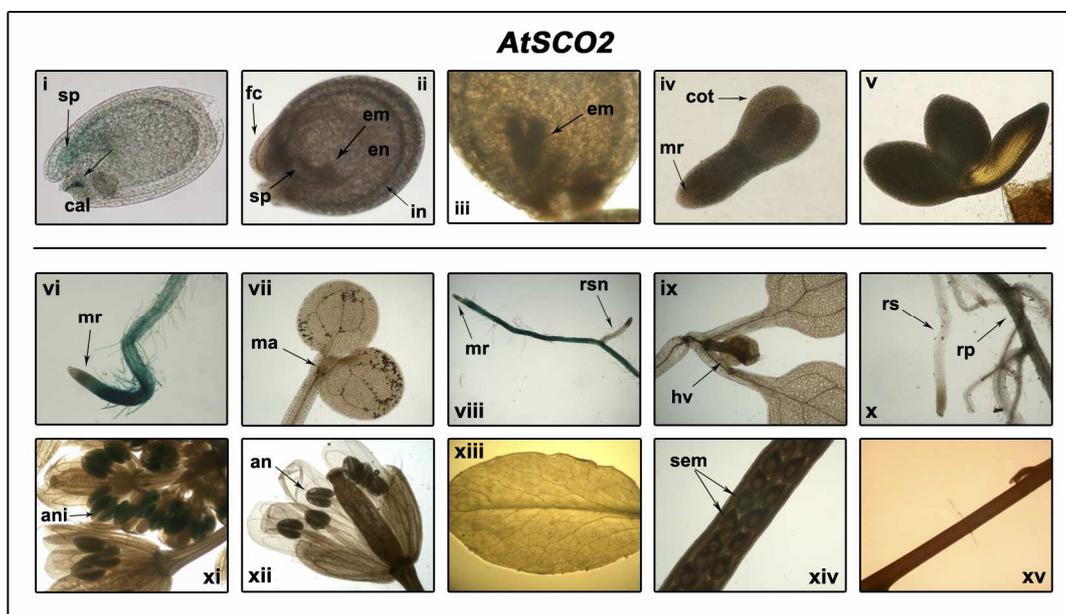
#### 3.4.4.1. Análisis del patrón de expresión del gen *AtSCO2*

Al igual que en el caso del gen *AtSCO1*, analizamos la expresión de *AtSCO2* utilizando datos disponibles en los sitios BAR Expression Browser (Toufighi y col., 2005; <http://bbc.botany.utoronto.ca/>) y Genevestigator (Hruz y col., 2008; <https://www.genevestigator.com>). *AtSCO2* presenta expresión en la mayoría de los órganos, con niveles aumentados en semillas imbibidas, embriones y la zona de los pelos de la raíz. En polen, también se observa mayor expresión en los estadios uni y bicelular.

A fin de determinar los patrones de expresión producidos por la región promotora de *AtSCO2*, obtuvimos plantas transformadas con un fragmento de 1047 pb ubicado corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de este gen fusionado a la región codificante del gen reportero *gus* y realizamos un análisis de la expresión en 10 líneas independientes. En la Figura 63 se puede observar que durante la embriogénesis la actividad está confinada a la región del suspensor y la calaza, sólo en un estadio temprano del desarrollo embrionario (Figura 63, i-v). A diferencia del patrón obtenido en el caso de la región promotora de *AtSCO1*, en este caso no observamos actividad GUS en el embrión propiamente dicho. En las plántulas, observamos actividad GUS en la zona de la elongación de la raíz principal, pero dicha actividad no se evidencia en la

vasculatura central ni en el meristema radicular. Las raíces secundarias tampoco presentan signos de actividad GUS (Figura 63, vi-ix). En plantas adultas la actividad GUS se observa sólo en anteras inmaduras (Figura 63, x-xv).

Es notorio que no observamos expresión de *AtSCO2* en embriones, siendo que los datos de microarreglos indican que este gen se expresa preferentemente en ellos. Quizás la fracción de promotor usada no comprende regiones que posibilitan la expresión de *AtSCO2* en embriones.



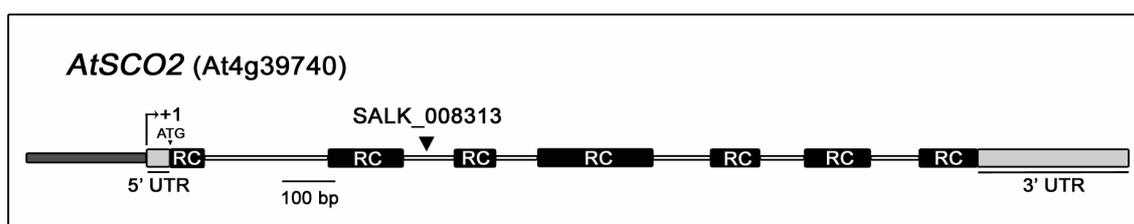
**Figura 63:** Análisis histoquímico de la expresión del gen *gus* dirigida por la región promotora de *AtSCO2*.

Detección histoquímica de la actividad GUS en plantas transformadas con la región promotora de *AtSCO2* fusionada al gen reportero *gus*. (i-iii) Semillas en diferentes estadios de desarrollo. (iv y v) Embriones. (vi y vii) Raíz y cotiledones correspondientes a plántulas de 4 días. (viii y ix) Raíz y primeras hojas verdaderas correspondientes a plantas de 12 días. (x-xv) Raíz, flor inmadura, flor madura, hoja, vaina y tallo correspondientes a plantas de 28 días. Abreviaturas: cal, calaza; em, embrión; en, endosperma; in, integumento; sp, suspensor; fc, funículo; cot, cotiledón; mr, meristema radicular; ma, meristema apical; rsn, raíz secundaria naciente; hv, hojas verdaderas; rs, raíz secundaria; rp, raíz primaria; ani, antera inmadura; an, antera; sem, semillas.

### 3.4.4.1. Evaluación de la función de *AtSCO2* a través del estudio de plantas con una inserción de T-DNA en el gen correspondiente

A fin de obtener información que nos permita dilucidar la función de la proteína *AtSCO2* en plantas caracterizamos una línea SALK (Alonso y col., 2003) que presenta una inserción de T-DNA en el gen correspondiente (ver Materiales y Métodos 2.1.1.5).

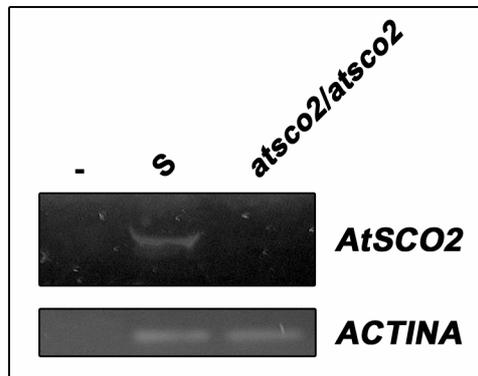
Mediante amplificación por PCR, clonado y posterior secuenciación del producto obtenido, determinamos la presencia y localización exacta de la inserción de T-DNA, utilizando oligonucleótidos específicos del gen y de la propia inserción. De esta manera, corroboramos que la línea SALK\_008313 presenta una inserción en el segundo intrón del gen *AtSCO2* (Figura 64).



**Figura 64:** Esquema del gen *AtSCO2*. Las regiones negras representan las regiones codificantes (RC). En gris están representadas las regiones 5' y 3' UTR. En líneas más delgadas están representados los intrones. El sitio de inicio de la transcripción se indica a través del +1. La flecha muestra el sitio de inserción del T-DNA en la línea de plantas SALK\_008313.

#### 3.4.4.1.1. Análisis de la línea SALK\_008313

Encontramos plantas homocigotas para la inserción de T-DNA en *AtSCO2*. Experimentos de RT-PCR no permitieron detectar transcritos correspondientes a *AtSCO2* en estas plantas (Figura 65), lo cual es un indicador de que las mismas serían mutantes nulas.



**Figura 65:** RT-PCR para determinar la presencia de transcritos correspondientes a *AtSCO2*. Se analizaron extractos de ARN preparados a partir de plantas salvajes (S) o de plantas homocigotas para la inserción de T-DNA en *AtSCO2* (*atSCO2/atSCO2*). Los oligonucleótidos utilizados para el análisis fueron RTSCO2F y RTSCO2R. En el panel inferior se muestran los productos de amplificación obtenidos al emplear los oligonucleótidos específicos de actina a partir de la misma reacción de transcripción reversa, sólo que dicha reacción fue detenida en el ciclo 20. La columna correspondiente a (-) muestra los productos obtenidos al omitir la reacción de transcripción reversa.

Las plantas homocigotas para la inserción de T-DNA en el gen *AtSCO2* presentan un retraso en el crecimiento durante las fases iniciales de la etapa reproductiva en comparación con las plantas salvajes, adquiriendo una altura normal luego de 5 semanas de crecimiento (Figura 66).

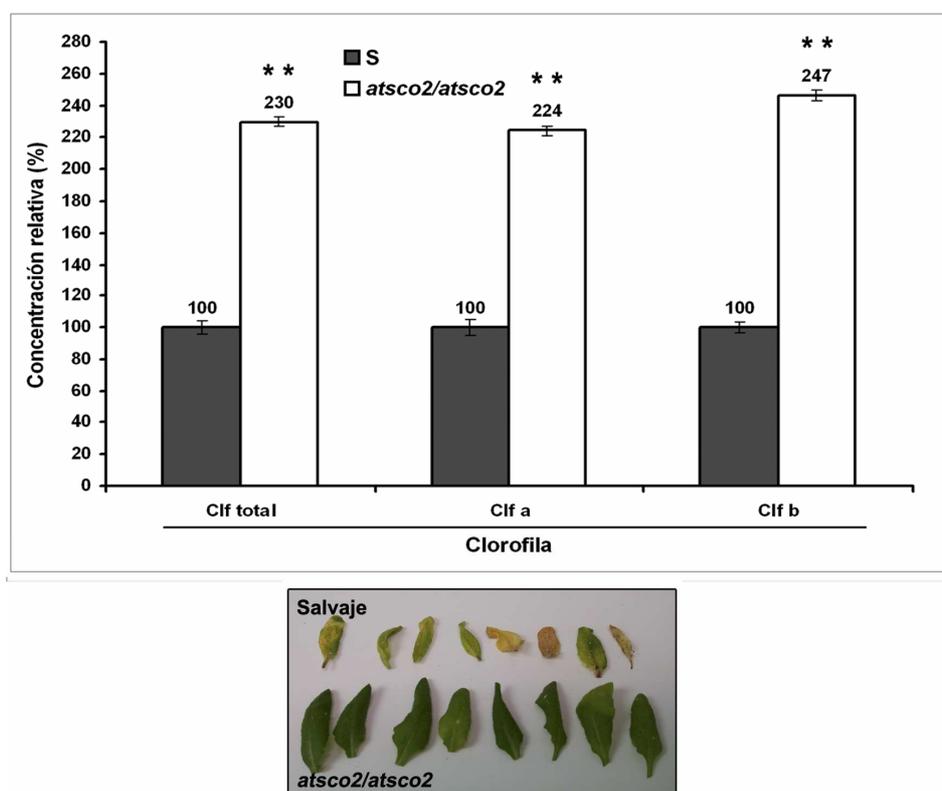


**Figura 66:** Análisis del crecimiento de las plantas homocigotas para la inserción en *AtSCO2*. Se analizó el desarrollo de las plantas salvajes (S) y homocigotas para la inserción de T-DNA (*atsco2/atsco2*) en tierra.

#### 3.4.4.1.2. Evaluación del contenido de clorofila

Las plantas homocigotas para la inserción de T-DNA en *AtSCO2*, en forma similar a lo observado en las plantas que sobreexpresan *AtSCO1*, presentan un retraso en la senescencia. Además, al determinar el contenido de clorofila de las hojas observamos que las plantas de 7 semanas que no expresan *AtSCO2* presentan mayores

niveles de clorofilas a y b que las plantas salvajes (Figura 67), en concordancia con los resultados obtenidos en el caso de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* (Figura 58).

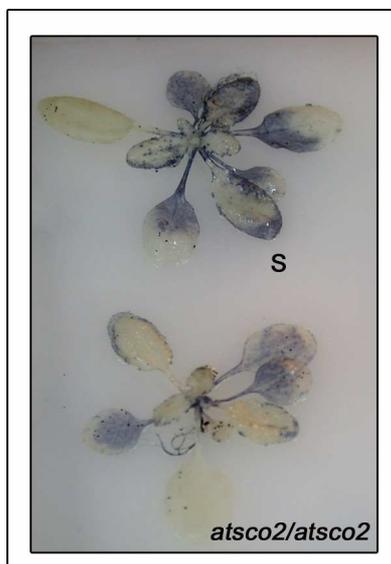


**Figura 67:** Análisis del contenido de clorofila de las hojas de plantas que no expresan *AtSCO2*. Realizamos mediciones espectrofotométricas de clorofila total, clorofila a (Clf a) y clorofila b (Clf b) en las plantas salvajes (S) y en plantas homocigotas para la inserción de T-DNA en *AtSCO2* (*atSCO2/atSCO2*) (panel de la izquierda). En el panel de la derecha se muestran las hojas de roseta de las plantas salvajes y de las plantas que no expresan *AtSCO2* crecidas en las mismas condiciones, durante 7 semanas.

#### 3.4.4.1.3. Evaluación del contenido de ROS

En las plantas mutantes *atSCO2* también analizamos la producción de ROS. En este caso, determinamos que las plantas homocigotas para la inserción de T-DNA evidencian menores niveles de ROS que las plantas salvajes al ser incubadas con NBT (Figura 68), pero no con DAB. Cabe aclarar que el NBT refleja la presencia de iones

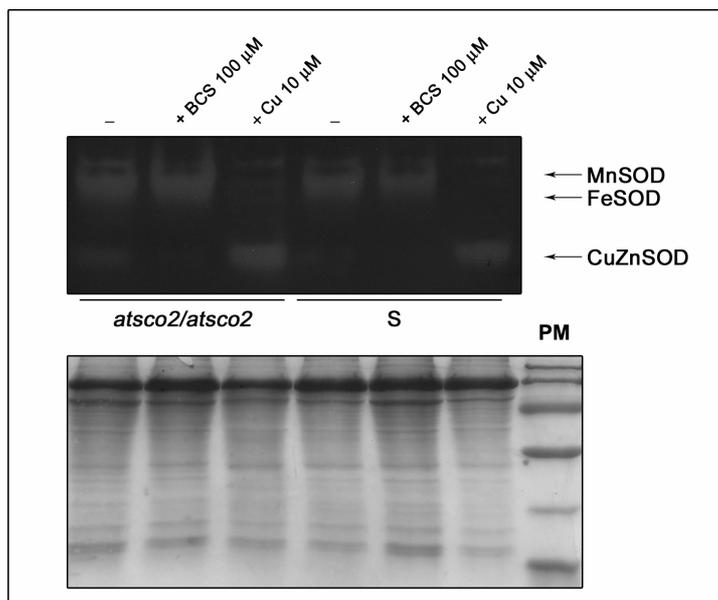
superóxido específicamente, mientras que el DAB refleja la presencia de ROS en forma más general.



**Figura 68: Determinación de ROS en plantas que no expresan *AtSCO2*.** Analizamos la presencia de ROS en plantas homocigotas para la inserción de T-DNA en *AtSCO2* (*atsco2/atsco2*) y en plantas salvajes (S) mediante la incubación de las plantas con NBT.

#### 3.4.4.1.4. Evaluación de la actividad de las isoformas de SOD

En función del resultado anterior, decidimos evaluar las diferentes isoformas de SOD en las plantas mutantes en *AtSCO2*. Por esta razón preparamos extractos proteicos de estas plantas y de plantas salvajes crecidas en MS 0,5X sin suplementar y suplementado con  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{M}$  o BCS 100  $\mu\text{M}$ , como se describe en Materiales y Métodos 2.16. Luego evaluamos la actividad de cada una de las isoformas de SOD en dichos extractos mediante un análisis histoquímico en gel. Las plantas que no expresan *AtSCO2* presentan un incremento en las isoformas Fe-SOD y Cu,Zn-SOD en relación con las plantas salvajes en todas las condiciones ensayadas (Figura 69).



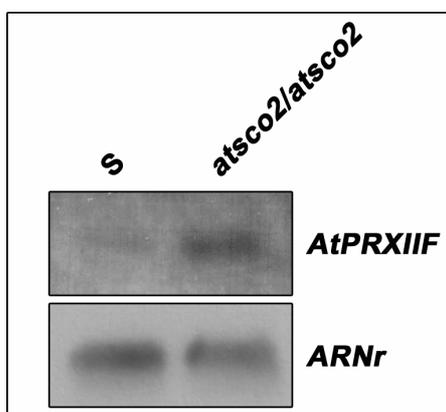
**Figura 69: Detección de las diferentes isoformas de SOD en plantas mutantes en *AtSCO2*.** Se analizaron extractos de plantas salvajes (S) y de plantas que no expresan *AtSCO2* (*atsco2/atsco2*), crecidas en diferentes condiciones, a través de una reacción histoquímica en gel (panel superior). Las flechas indican la migración de las diferentes isoformas de SOD. En el panel inferior se muestra la tinción con Coomassie Brilliant Blue de un gel preparado con la misma cantidad de los correspondientes extractos, como control del experimento. PM: marcador de peso molecular de proteínas.

Este resultado nos lleva a pensar que la disminución en la producción de iones superóxido podría deberse al incremento en la actividad de SOD.

#### 3.4.4.1.5. Evaluación de los niveles de transcritos de proteínas relacionadas con el metabolismo redox mitocondrial

A fin de determinar la implicancia de *AtSCO2* en el metabolismo redox de las mitocondrias de plantas, realizamos experimentos de Northern blot para determinar los niveles de transcritos de AOX1a (oxidasa alternativa) y *AtPRXIIIF* (una peroxirredoxina mitocondrial) (Sweetlove y col., 2002). Las plantas mutantes en *AtSCO2* no muestran

diferencias en los niveles de ARNm de AOX1a (no mostrado), pero presentan niveles aumentados de transcritos correspondientes al gen *AtPRXIIF* (Figura 70).



**Figura 70:** Northern blot de los niveles de *AtPRXIIF* (At3g06050) en plantas mutantes en *AtSCO2*. Se analizaron muestras de ARN total obtenidas de plantas de 4 semanas (S: salvajes; *atsco2/atsco2*: mutantes). En el panel inferior se muestra una hibridación de la misma membrana con una sonda de ARNr.

Los resultados obtenidos sugieren que *AtSCO2* participa en el metabolismo redox de las células vegetales y que la falta de un gen *AtSCO2* funcional provoca un incremento en los niveles de enzimas antioxidantes.

### 3.4.5. Discusión

El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica dos proteínas similares a las proteínas Sco de *Saccharomyces cerevisiae* y humanos. Sorprendentemente, sólo una de las proteínas de *Arabidopsis* (*AtSCO1*) presenta las cisteínas conservadas del motivo CXXXX y la histidina involucradas en la coordinación del cobre. Esto podría indicar que la otra proteína (*AtSCO2*) es no funcional. Sin embargo, la existencia de proteínas similares a *AtSCO2* en otras angiospermas y en la gimnosperma *Picea glauca* sugiere que la proteína *AtSCO2* probablemente cumpla alguna función. Es notorio que las proteínas SCO2 tienen conservados los residuos localizados en el interior de las proteínas Sco cuya estructura se conoce, lo que sugiere que la estructura terciaria de estas proteínas estaría conservada.

Se ha propuesto que las proteínas Sco de levaduras y humanos participarían también en procesos independientes de la biogénesis de COX. En este sentido, la proteína Sco2p de levaduras no parece estar involucrada en el ensamblado de COX debido a que la delección del gen correspondiente no produce defectos respiratorios, mientras que esto sí ocurre en el caso de Sco1p (Glerum y col., 1996b). Las proteínas Sco podrían actuar como peroxidases u oxidorreductasas de grupos tioles en reacciones redox, ya que poseen similitudes con peroxirredoxinas y tiorredoxinas (Arnesano y col., 2005a; Balatri y col., 2003; Banci y col., 2007; Chinenov, 2000). Recientemente, se ha demostrado que las proteínas Sco de humanos participan en vías de señalización involucradas en el mantenimiento de la homeostasis celular de cobre (Leary y col., 2007). Otra evidencia que sustenta la hipótesis de que las proteínas Sco poseen roles adicionales es la presencia de proteínas homólogas a Sco en procariontas que no poseen oxidases con centro  $Cu_A$  como el de COX (Banci y col., 2007). Sin embargo, en cualquiera de los casos mencionados es lógico asumir que las cisteínas conservadas son requeridas para la mayoría de las funciones de las proteínas Sco relacionadas con el metabolismo redox y la unión de cobre.

Nuestros resultados indican que una de las proteínas homólogas a Sco de *Arabidopsis* está involucrada en la biogénesis de COX. A partir del estudio de plantas con una inserción de T-DNA en el segundo exón de *AtSCO1* determinamos que la integridad de este gen es esencial para el desarrollo embrionario, ya que no encontramos plantas mutantes homocigotas en la descendencia de las plantas heterocigotas para la inserción de T-DNA. En las vainas de dichas plantas encontramos un 25% de embriones que detienen su desarrollo en estadios tempranos de la embriogénesis. Este requerimiento de *AtSCO1* en el desarrollo embrionario y la ausencia de actividad COX en los embriones anormales nos hacen pensar que esta proteína participa de la biogénesis de COX. Debido a que la inserción de cobre es esencial para la actividad de COX (Tsukihara y col., 1995), asumimos que es quizás la falta de esta actividad la que provoca defectos en el desarrollo embrionario, probablemente porque se requiere la energía proveniente de la respiración. Se ha observado que ante la privación de oxígeno

se produce la detención del desarrollo embrionario y la eventual degeneración de los embriones (Kuang y col., 1998), tal como lo observamos en las mutantes insercionales de *AtSCO1*. Este papel importante de *AtSCO1* durante la embriogénesis se ve sustentado además por los datos de expresión que indican que el gen correspondiente se expresa preferentemente en embriones. A partir del análisis de los patrones de expresión que dirige la región promotora de *AtSCO1* pudimos determinar, además, que este gen se expresa principalmente en los meristemas de la raíz y del tallo, en raíces secundarias nacientes y en polen. Este patrón de expresión es similar al observado para uno de los genes de citocromo *c* y para genes nucleares de subunidades de COX (Welchen y col., 2004; Welchen y Gonzalez 2005; Mufarrege y col., 2009), lo cual reafirma la idea de que *AtSCO1* está vinculado con la respiración dependiente de citocromo *c*.

No resulta claro cuál es el requerimiento de la actividad de COX en diferentes tipos celulares o diferentes etapas del desarrollo, sobre todo si consideramos que las células vegetales presentan una oxidasa alternativa. Cuando los electrones son conducidos a esta vía alternativa, únicamente la oxidación del NADH a partir del Complejo I se encuentra acoplada a la producción de ATP, por lo que se produce sólo un tercio de la energía que potencialmente podría generarse. De acuerdo a nuestros resultados, la energía proveniente de la vía del citocromo *c* parece ser esencial durante las primeras etapas del desarrollo embrionario y la biogénesis de COX podría ser requerida para satisfacer dicha demanda.

Además del papel propuesto para *AtSCO1* en la biogénesis de COX, los estudios realizados en plantas que sobreexpresan *AtSCO1* indican que esta proteína influencia la homeostasis de cobre en las células vegetales. A pesar de que podemos atribuir la mayor elongación de las raíces que presentan estas plantas, en presencia de altas concentraciones de cobre, tanto al aumento en la tolerancia a condiciones de estrés como a la producción de ROS asociada con el exceso de este metal, el hecho que al introducir un quelante en el medio observamos un comportamiento opuesto, sugiere que lo que se ve modificado es la sensibilidad al cobre. Esta idea es sustentada por el

cambio observado en la abundancia relativa de las diferentes isoformas de SOD y el aumento en la actividad del promotor del miR398, el cual responde a una deficiencia de cobre. En humanos, las líneas celulares que presentan mutaciones en *SCO1* y *SCO2* presentan deficiencia de cobre y este efecto no sólo es producido por la falta de actividad de Sco sino que también se observa en presencia de ciertas formas mutantes de las proteínas, sugiriendo que las proteínas Sco poseen funciones de señalización (Leary et al. 2007). Además, el papel de las proteínas Sco en la homeostasis de cobre puede ser desacoplado de su papel en la biogénesis de COX bajo ciertas condiciones, indicando que se trata de dos funciones independientes. Nosotros no hemos detectado cambios en el contenido total de cobre en las plantas que sobreexpresan *AtSCO1*. Una posibilidad que explicaría el fenotipo de estas plantas, en cuanto al crecimiento en distintas concentraciones de cobre y el mantenimiento del cobre total, es que el aumento de expresión de *AtSCO1* genera una relocalización del cobre dentro de las células, alterando la homeostasis de este metal.

La sobreexpresión de *AtSCO1* también resultó en plantas con una menor producción de ROS. En levaduras, la falta de actividad de Sco1p incrementa la sensibilidad de las células al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Williams y col., 2005). Se ha propuesto que esta característica se debe a la producción de intermediarios pro-oxidantes Cox1p-hemo durante el ensamblado de COX y que Sco1p podría funcionar como una chaperona necesaria para el ensamblado de Cox2p en el complejo Cox1p-hemo (Khalimonchuk y col., 2007). Si en plantas consideramos la formación de un intermediario similar, el exceso de *AtSCO1* podría ayudar a disminuir las cantidades del mismo durante el ensamblado de COX, disminuyendo así la producción de ROS. Considerando que la proteína Sco1p de levaduras es capaz de complementar la sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las levaduras que presentan una delección en el gen *SCO1* aún cuando se mutan los residuos de unión a cobre (Khalimonchuk y col., 2007), *AtSCO2* podría participar también de esta función en *Arabidopsis*. Es sorprendente que los aminoácidos que se ha propuesto que interaccionan con Cox2 (Rigby y col., 2008) se encuentran conservados en las proteínas *SCO2* de plantas.

Mientras AtSCO1 estaría involucrada en el ensamblado de COX, la función de AtSCO2 permanece sin dilucidar. La hipótesis de que *AtSCO2* es un pseudogén que ha acumulado mutaciones que inactivaron a esta proteína es altamente improbable. Una de las evidencias que sugieren que *AtSCO2* es una proteína funcional es que hemos encontrado proteínas similares en otras especies de plantas, incluyendo una gimnosperma. Además, existen genes que codifican proteínas Sco que no poseen las cisteínas conservadas en el género *Rickettsia* (Banci y col., 2007), aunque no se le ha asignado ninguna función a estas proteínas. En estas bacterias, como en plantas, existe además una proteína Sco que posee las cisteínas conservadas.

Las plantas mutantes homocigotas para la inserción de T-DNA en el gen *AtSCO2* se desarrollan normalmente, aunque presentan alteraciones en el metabolismo redox, como un incremento en los niveles de las isoformas de SOD y la inducción de una peroxirredoxina mitocondrial. La expresión de *AtSCO2* es inducida por compuestos relacionados con el incremento de la producción de ROS, algunos de los cuales inhiben además la función mitocondrial, como es el caso de rotenona, siringolina y ácido salicílico (Norman y col., 2004; Michel y col., 2006). Estos datos argumentan en favor de la participación de *AtSCO2* en el metabolismo redox.

En conclusión, una de las dos proteínas de *Arabidopsis* con homología a las proteínas Sco de levaduras y humanos, *AtSCO1*, es esencial en la embriogénesis de plantas, probablemente por su requerimiento para el ensamblado de COX. Esta proteína también participa en el mantenimiento de la homeostasis de cobre en las células vegetales y limita la producción de ROS. La segunda proteína, *AtSCO2*, que forma parte de un grupo característico junto con otras proteínas de plantas, no es esencial para la viabilidad y probablemente participa del metabolismo redox celular. Esta función parece ser independiente del motivo de unión a cobre CXXXC presente en la mayoría de las proteínas Sco. Nos resulta interesante que algunas características de las plantas que sobreexpresan *AtSCO1* son similares a las de las plantas mutantes en *AtSCO2*. Esto podría indicar que *AtSCO1* y *AtSCO2* funcionan como proteínas antagónicas en

determinadas condiciones. Si AtSCO1 y AtSCO2 son capaces de interactuar físicamente, como se ha descrito para las proteínas Sco de humanos (Leary y col., 2004), entonces AtSCO2 podría actuar como un modulador de la función de AtSCO1 a través de una interacción directa proteína-proteína. Esta hipótesis deberá ser corroborada con futuros experimentos.

## ***4. Conclusiones***

#### 4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos durante el presente Trabajo de Tesis, se pueden enunciar las siguientes conclusiones:

1. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* existen genes que codifican proteínas con homología de secuencia con las proteínas de levaduras Cox17p, COX19p, Cox11p y Sco1p, involucradas en la inserción de cobre en las subunidades 1 y 2 de COX. Los genes *AtCOX17*, *AtCOX19* y *AtCOX11* de *Arabidopsis* presentan semejanzas estructurales. Estos genes presentan un intrón cercano o dentro de la región 5' no codificante y elementos site II en la región proximal de sus promotores. Salvo en el caso de *AtCOX11*, existen dos genes de cada tipo en el genoma de *Arabidopsis*. Sin embargo, los procesos de duplicación que los originaron ocurrieron en etapas diferentes de la evolución de las plantas.
2. Todos los genes analizados, excepto *AtSCO2*, que no se expresa en meristemas, se expresan en regiones meristemáticas y en polen. Esta característica, compartida también por genes que codifican componentes de la cadena respiratoria, es consistente con nuestra hipótesis de una expresión coordinada para la biogénesis de COX. *AtCOX17*, *AtCOX19* y *AtCOX11* se expresan además en las raíces jóvenes, en el cilindro vascular de la raíz y en las raíces secundarias nacientes. En flores también se expresan en las venas de los sépalos y en el filamento de las anteras. La expresión en estos tejidos podría estar relacionada con otras funciones de estas proteínas en *Arabidopsis*. En el caso de *AtSCO2*, su expresión diferencial respecto de las otras proteínas es consistente con nuestros resultados que no la involucran en la biogénesis de COX.

3. Los genes que codifican *AtCOX17* y *AtCOX19* presentan una alta expresión en raíces, lo que podría involucrarlas en la incorporación y el transporte de cobre en la planta.
4. *AtCOX17* y *AtCOX19* aumentan su expresión frente al daño producido en los tejidos y frente a la bacteria patógena *Pseudomonas syringae*. Además, estos genes se inducen por tratamiento con compuestos que producen un incremento de las ROS. Esto podría indicar que estas proteínas actúan en la respuesta frente a condiciones de estrés, quizás como factores limitantes en el ensamblado de COX o para reparar la enzima dañada.
5. Los genes *AtCOX17* y *AtCOX19* comparten, además de patrones, mecanismos de expresión, ya que en todos ellos son necesarios el primer intrón (ubicado cerca del codón de iniciación) y motivos site II (en la región proximal del promotor) para la expresión. Esto refuerza la idea de que ambas proteínas participan en procesos estrechamente relacionados.
6. En los genes *AtCOX17* y *AtCOX19*, los elementos relacionados con la respuesta frente a factores de estrés se encuentran cadena arriba de la región que contiene los motivos site II.
7. Si bien ambos genes *AtCOX17* se inducen ante los mismos factores, las diferencias observadas nos llevan a especular que *AtCOX17-1* es la responsable principal de la actividad de biogénesis de COX en condiciones normales y que *AtCOX17-2* sería la encargada de colaborar cuando la célula vegetal ha sufrido estrés y requiere de una mayor capacidad de biosíntesis de sus componentes.
8. Las proteínas *AtCOX19-1.1* y *AtCOX19-2* (que son idénticas) son capaces de restaurar la respiración de levaduras mutantes en *cox19*, por lo que la función de estas proteínas en el ensamblado de COX, y de ambas *AtCOX17* de acuerdo a resultados previos, parece estar conservada entre levaduras y plantas.

9. Las proteínas AtCOX19, AtCOX11 y AtSCO1 son importadas a mitocondrias de plantas *in vitro*. AtCOX19 y AtCOX11 son importadas a las mitocondrias sin la escisión de un péptido señal y en forma independiente del potencial de membrana, mientras que AtSCO1 presenta una presecuencia que es escindida al ser incorporada a las mitocondrias vegetales.
10. Uno de los genes *AtCOX19* codifica dos proteínas diferentes por mecanismos de *splicing* alternativo. Una de estas proteínas, que posee una porción N-terminal extra, es importada a mitocondrias pero no es capaz de restituir la deficiencia respiratoria de las levaduras mutantes en *cox19*. La presencia de esta proteína parece ser una exclusividad de Arabidopsis. No queda claro si la misma posee alguna función en el ensamblado de COX o en algún otro proceso.
11. Si bien el patrón de expresión de *AtCOX11* coincide con el de los genes *AtCOX17* y *AtCOX19*, dicho gen no es inducido ante situaciones de estrés. AtCOX11 es una proteína localizada en la membrana mitocondrial interna, lo cual podría explicar las diferencias de expresión respecto de AtCOX17 y AtCOX19 frente a compuestos que producen un aumento de ROS. Estas últimas son proteínas pequeñas que podrían movilizarse rápidamente y participar de las vías de señalización involucradas en las respuestas a condiciones de estrés.
12. Una de las dos proteínas de Arabidopsis que presentan similitud de secuencia con Sco1p de levaduras, AtSCO1, es esencial durante la embriogénesis de Arabidopsis, probablemente por su requerimiento para el ensamblado de COX.
13. La sobreexpresión de AtSCO1 produce alteraciones en la respuesta de las plantas a cambios en la concentración de cobre del medio y la inducción del promotor del miRNA398, que responde a deficiencia de cobre. Esto sugiere que esta proteína también participa en el mantenimiento de la homeostasis de cobre en las células vegetales.

14. La otra proteína Sco de Arabidopsis, AtSCO2, forma parte de un grupo característico de proteínas de plantas que carecen de los residuos involucrados en la unión de cobre en otras proteínas Sco.
15. AtSCO2 no es esencial para la viabilidad de las plantas y probablemente participa del metabolismo redox celular, ya que su ausencia provoca la inducción de SOD y de una peroxirredoxina mitocondrial.
16. Tanto las plantas que sobreexpresan AtSCO1 como las que son deficientes en AtSCO2 presentan un retraso en la senescencia, lo que podría indicar que las mismas funcionan como proteínas antagónicas en determinadas condiciones.

Como conclusión general podemos mencionar que la vía de ensamblado de cobre en las subunidades de COX se halla altamente conservada en plantas con relación a levaduras, ya que participan proteínas similares y que, al menos en algunos casos, pueden funcionar en forma heteróloga. Por otra parte, sobre todo para COX17, COX19 y SCO, podemos especular con que a lo largo de la evolución han surgido funciones adicionales para algunas de estas proteínas, probablemente relacionadas con el metabolismo redox, la unión a metales y la respuesta a estrés. Futuros estudios ayudarán a evaluar el papel de las proteínas mencionadas en estos procesos y su relación con el funcionamiento mitocondrial.

## ***5. Resumen***

## 5. RESUMEN

La citocromo *c* oxidasa (COX) es la enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial que recibe los electrones del citocromo *c* y los cede al oxígeno molecular. Esta enzima es un complejo constituido por varios polipéptidos (entre 11 y 14, dependiendo de la especie). Tres de estos polipéptidos están codificados en el genoma mitocondrial en la mayoría de los organismos, mientras que el resto se encuentra codificado en el núcleo. Además de las proteínas que componen la enzima, COX requiere varios cofactores para cumplir su función, entre ellos iones de cobre. COX contiene tres iones de cobre, uno de los cuales forma un centro heterobimetálico (Cu<sub>B</sub>) junto al hemo *a*<sub>3</sub> en la subunidad 1 (Cox1). Los otros dos conforman un centro binuclear (Cu<sub>A</sub>) localizado en la subunidad Cox2.

En el último tiempo se han realizado estudios en levaduras en los que se ha descubierto la existencia de varias proteínas requeridas para la inserción de cobre en COX. Hasta el momento, poco se conoce acerca de los factores que colaboran en la biogénesis de COX en plantas. En esta tesis, nos propusimos caracterizar genes de *Arabidopsis* que codifican proteínas que presentan homología de secuencia con los factores involucrados en la inserción de cobre en COX. En el Capítulo I describimos dos diferentes genes de *Arabidopsis* que codifican homólogos funcionales de la proteína Cox17p de levaduras. Estudiamos las regiones promotoras de ambos genes *AtCOX17*, las cuales incluyen un intrón en la región 5' no codificante que es esencial para la expresión. En el caso de ambos genes, *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2*, la expresión se localiza principalmente en raíces jóvenes, anteras y vainas, pero las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX17-1* presentan mayores niveles de actividad GUS. Ambos promotores se inducen por daño a los tejidos, por el tratamiento

de las hojas con el patógeno *Pseudomonas syringae*, por la incubación con agentes que producen estrés oxidativo y por metales. *AtCOX17-2* presenta una respuesta similar ante estos factores, mientras que *AtCOX17-1* se induce preferentemente por concentraciones de cobre relativamente bajas (10-100  $\mu$ M). Nuestros resultados indican que ambos genes *AtCOX17* poseen similares, pero no idénticas, características de expresión. Podemos especular que las proteínas COX17 constituyen un factor limitante en la biogénesis de COX en plantas y que su acumulación bajo condiciones de estrés podría ser necesaria para reemplazar la enzima dañada o inactiva.

En el Capítulo II describimos dos genes casi idénticos que codifican proteínas que presentan una alta homología de secuencia con la proteína de unión a metales Cox19p de levaduras. Uno de estos genes (*AtCOX19-1*) produce dos transcritos por *splicing* alternativo, los cuales codifican proteínas que se diferencian en la porción N-terminal. El segundo gen codifica una proteína idéntica a la isoforma más corta de *AtCOX19-1*. Ambas isoformas de *AtCOX19* son importadas a mitocondrias en experimentos *in vitro* y se encuentran unidas a la membrana interna, de cara al espacio intermembrana. Sólo la isoforma más corta de *AtCOX19-1* tiene la capacidad de restaurar la deficiencia respiratoria que presentan las levaduras mutantes en *cox19*. Estos resultados sugieren que los genes *AtCOX19* codifican homólogos funcionales de la proteína de levaduras Cox19p. Los niveles de transcritos correspondientes a *AtCOX19* se incrementan por el tratamiento con cobre o compuestos que generan ROS. Las plantas transformadas con la región promotora de *AtCOX19-1* presentan una alta actividad GUS en raíces jóvenes y anteras. En hojas, sólo se observa expresión al dañar los tejidos por corte, lo cual sugiere que la inducción es debida a la injuria producida. También observamos inducción del promotor de *AtCOX19-1* en hojas infectadas con la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Para el gen *AtCOX19-1*, como para los genes *AtCOX17*, determinamos que el intrón cercano a la región 5' no codificante influencia positivamente la expresión. Los genes *AtCOX19* y *AtCOX17*

también comparten el hecho de que los motivos site II presentes en la región proximal del promotor son esenciales para la expresión, mientras que los elementos involucrados en la inducción por factores de estrés se hallan ubicados en porciones más distales de los respectivos promotores.

En el Capítulo III estudiamos un gen de *Arabidopsis* que codifica una proteína que presenta homología de secuencia con la proteína Cox11p de levaduras. AtCOX11 se importa a mitocondrias *in vitro* y se localiza en la membrana interna, expuesta al espacio intermembrana. El gen correspondiente se expresa principalmente en raíces jóvenes, anteras y vainas y no es inducido ante situaciones de estrés. En el caso de este gen, el intrón presente en la región 5' no codificante influencia negativamente la expresión y los motivos site II no son esenciales para la expresión.

En el último capítulo, caracterizamos dos genes de *Arabidopsis* (*AtSCO1* y *AtSCO2*) que codifican proteínas que presentan homología de secuencia con las proteínas Sco involucradas en la biogénesis de COX en otros organismos. A través de un análisis filogenético pudimos inferir que los genes de *Arabidopsis* son el resultado de una duplicación que tuvo lugar antes de la aparición de las plantas con flores. Las plantas heterocigotas para una inserción de T-DNA en el segundo exón de *AtSCO1* producen un 25% de semillas anormales, las cuales contienen embriones defectuosos arrestados en la fase corazón o torpedo de la embriogénesis. En la progenie de dichas plantas heterocigotas no encontramos plantas mutantes homocigotas, lo cual sugiere que la función de *AtSCO1* es esencial durante las primeras etapas del desarrollo de las plantas. Los embriones presentes en las semillas anormales no presentan actividad COX, lo que indica que *AtSCO1* sería la encargada del ensamblado de esta enzima. Consistentemente con ello, al analizar la región promotora de *AtSCO1* determinamos que este gen se expresa en regiones meristemáticas, anteras y embriones en distintas etapas del desarrollo. Al complementar las plantas heterocigotas con una construcción que expresa el ADNc de *AtSCO1* dirigido por el promotor 35SCaMV, logramos obtener

plantas mutantes homocigotas. Estas plantas presentan un defecto en la elongación del tubo polínico, probablemente debido a que poseen un requerimiento determinado de la proteína AtSCO1 durante el desarrollo de polen. Las plantas que sobreexpresan AtSCO1 presentan una respuesta alterada frente a diferentes concentraciones de cobre, ya que se ve afectada la elongación de las raíces, presentan una proporción diferente de las isoformas de SOD y la actividad del promotor del miR398 se ve incrementada.

Las plantas que no expresan AtSCO2 se desarrollan normalmente, pero muestran un retraso en el crecimiento en la fase reproductiva y alteraciones relacionadas con el metabolismo redox. A través del análisis de su región promotora, determinamos que *AtSCO2* se expresa en raíces jóvenes y anteras inmaduras, pero no en regiones meristemáticas o durante la embriogénesis. Nuestros resultados sugieren que AtSCO1 es la proteína involucrada en la biogénesis de COX y que además participa de la homeostasis de cobre en las células vegetales. AtSCO2, que no posee los residuos de cisteína y la histidina que han sido involucrados en la unión al cobre, podría participar del metabolismo redox mitocondrial.

En esta tesis, estudiamos genes de *Arabidopsis thaliana* que codifican proteínas que presentan homología con las proteínas Cox17p, Cox19p, Cox11p y Sco1p de levaduras, las que han sido involucradas en la biogénesis de COX. Las respectivas proteínas de plantas parecen tener funciones más complejas, además de su participación en la biogénesis de COX, que pueden haberse desarrollado durante la evolución de las especies vegetales.

## ***6. Abstract***

## 6. ABSTRACT

Cytochrome *c* oxidase (COX) is the terminal component of the mitochondrial respiratory chain, receiving electrons from cytochrome *c* for oxygen reduction. The enzyme is a complex of several polypeptides (about 11 to 14, depending on the species), three of them encoded in the mitochondrial genome in most organisms and the rest encoded in the nucleus. In addition to its polypeptidic components, COX requires several cofactors for function, among them copper and heme. COX contains three copper atoms, one of them (Cu<sub>B</sub>) forming a heterobimetallic site with heme *a*<sub>3</sub> in subunit 1 (Cox1) and the other two (Cu<sub>A</sub>) in a cysteine bridged binuclear center located in Cox2.

Studies in yeast have uncovered the existence of several proteins required for the insertion of copper into COX. COX biogenesis in plants is still poorly understood. In this thesis we have characterized Arabidopsis genes encoding proteins with sequence homology to factors involved in the insertion of copper into COX. In the first chapter we have studied two different Arabidopsis genes encoding functional homologues of yeast Cox17p. Sequences upstream from the translation start site of *AtCOX17* genes, which include an intron located in the 5' leader region that is essential for expression, were introduced into plants in front of the *gus* gene. For both genes, *AtCOX17-1* and *AtCOX17-2*, expression is localized preferentially in young roots, anthers and siliques, but almost 10-fold higher GUS activity levels are observed in plants transformed with *AtCOX17-1* upstream regions. Both promoters are induced to different extents by wounding, treatment of leaves with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*, incubation with agents that produce oxidative stress and metals. *AtCOX17-2* shows similar responses to these factors, while *AtCOX17-1* is induced by relatively low (10-

100  $\mu$ M) copper. Our results indicate that both *AtCOX17* genes have similar, though not identical, expression characteristics. It can be speculated that COX17 may be a limiting factor for COX biogenesis in plants and that its accumulation under stress conditions may be required to actively replace damaged or inactive COX.

In the second chapter, we have studied two nearly identical genes that encode proteins showing similarity with the yeast metal chaperone Cox19p. One of these genes (*AtCOX19-1*) produces two transcript forms that arise from an alternative splicing event and encode proteins with different N-terminal portions. The other gene encodes a protein that is identical to the smaller *AtCOX19-1* isoform. Both *AtCOX19* isoforms are imported into mitochondria *in vitro* and are found attached to the inner membrane facing the intermembrane space. The smaller *AtCOX19-1* isoform, but not the larger one with an extra N-terminus, is able to restore growth on non-fermentable carbon sources when expressed in a yeast *cox19* null mutant. These results suggest that *AtCOX19* genes encode functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p. *AtCOX19* transcript levels increase by treatment with copper or compounds that produce reactive oxygen species. Young roots and anthers are highly stained in *AtCOX19-1::GUS* plants. Expression in leaves is only observed when cuts are produced, suggesting an induction by wounding. Infection of plants with the pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. tomato also induces *AtCOX19-1* gene expression. As in the case of *AtCOX17* genes, we have demonstrated that the intron located near the 5' leader region of *AtCOX19-1* positively influences the expression of this gene. *AtCOX19* and *AtCOX17* genes also share the fact that site II motifs present in the proximal promoter region are essential for expression, while the elements involved in responses to stress are located in more distal portions of the respective promoters.

In the third chapter we have studied an Arabidopsis gene that encodes a protein showing similarity with the yeast metal chaperone Cox11p. *AtCOX11* is imported into

mitochondria *in vitro* and is found in the inner membrane, facing the intermembrane space. *AtCOX11* expression is localized preferentially in young roots, anthers and siliques and is not induced by stress treatments. We have demonstrated that the intron located in the 5' leader region negatively influences the expression of this gene and that site II motifs are not essential for expression.

In the last chapter we have studied two *Arabidopsis* genes (*AtSCO1* and *AtSCO2*) that encode proteins with homology to the Sco proteins involved in COX biogenesis in other organisms. Phylogenetic reconstructions indicate that the two *Arabidopsis* genes are the result of a duplication that took place before the emergence of flowering plants. Heterozygote plants with a T-DNA insertion in the second exon of *AtSCO1* produce 25% abnormal seeds with defective embryos arrested at the heart or torpedo stage and no homozygote mutant plants can be detected in the progeny, indicating that *AtSCO1* function is essential during early stages of plant development. Embryos from abnormal seeds lack COX activity, suggesting that *AtSCO1* participates in COX assembly. Expression of a reporter gene directed by the *AtSCO1* promoter is observed in meristematic tissues, anthers and embryos at different developmental stages. Homozygote mutant plants obtained by inserting a construct that expresses the *AtSCO1* cDNA from a 35SCaMV promoter show a defect in pollen tube elongation, probably indicating a special requirement of *AtSCO1* for pollen function. Plants that overexpress *AtSCO1* have altered responses to copper, among them a different rate of root elongation, altered ratios of superoxide dismutase isoenzymes and increased activity of the miR398 promoter.

Plants that lack *AtSCO2* expression develop normally but show retarded growth during the reproductive phase and alterations related with redox metabolism. Expression of the reporter gene directed by the *AtSCO2* promoter is localized in young roots and immature anthers, but not in meristematic tissues or embryos at different developmental

stages. The results suggest that AtSCO1 is the protein involved in COX biogenesis and that it also has a role in maintaining copper homeostasis in plant cells. AtSCO2, that lacks the cysteines and histidine putatively involved in copper binding, may participate in mitochondrial redox metabolism.

In this thesis, we studied *Arabidopsis thaliana* genes that encode proteins showing similarity with yeast Cox17p, Cox19p, Cox11p and Sco1p, involved in COX biogenesis. The respective plant proteins seem to have more complex functions, besides their role in COX assembly, that may have arisen during the evolution of plants.

## ***7. Bibliografía***

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abajian, C.; Yatsunyk, L.A.; Ramirez, B.E.; Rosenzweig, A.C. (2004).** *Yeast cox17 solution structure and Copper(I) binding.* J Biol Chem. 279 (51), 53584-53592.
- Adams, K. L.; Daley, D. O.; Qiu, Y. L.; Whelan, J. and Palmer, J. D. (2000).** *Repeated, recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants.* Nature. 408, 354-357.
- Adams, K. L.; Song, K.; Roessler, P. G.; Nugent, J. M.; Doyle, J. L.; Doyle, J. J. and Palmer, J. D. (1999).** *Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial cox2 genes in legumes.* PNAS. 96(24):13863-13868.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J. (1996).** *Biología Molecular de la Célula. Conversión energética: mitocondria y cloroplastos.* Ediciones Omega. Barcelona, España.
- Allen, J.F. (2002).** *Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, rotors and poise.* Cell. 110, 273-276.
- Allen, J.F. (2003).** *The functions of genomes in bioenergetics organelles.* Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 308, 19-38.
- Alonso, J.M.; Stepanova, A.N.; Leisse, T.J.; Kim, C.J.; Chen, H.; Shinn, P.; Stevenson, D.K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; Gadrinab, C.; Heller, C.; Jeske, A.; Koesema, E.; Meyers, C.C.; Parker, H.; Prednis, L.; Ansari, Y.; Choy, N.; Deen, H.; Geralt, M.; Hazari, N.; Hom, E.; Karnes, M.; Mulholland, C.; Ndubaku, R.; Schmidt, I.; Guzman, P.; Aguilar-Henonin, L.; Schmid, M.; Weigel, D.; Carter, D.E.; Marchand, T.; Risseuw, E.; Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W.L.; Berry, C.C. and Ecker, J.R. (2003).** *Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana.* Science 301: 653-657.
- Altschul, S.F.; Madden, T.M.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman, D.J. (1997).** *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.* Nucleic Acids Res. 25, 3389.

- Alvarez, M.E.; Pennell, R.I.; Meijer, P.J.; Ishikawa, A.; Dixon, R.A.; Lamb, C. (1998).** *Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity.* Cell. 92, 773-784.
- Amaravadi, R.; Glerum, D.M.; Tzagoloff, A. (1997).** *Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment.* Hum Genet. 99, 329-333.
- Andrés-Colás, N.; Sancenón, V.; Rodríguez-Navarro, S.; Mayo, S.; Thiele, D.J.; Ecker, J.R.; Puig, S.; Peñarrubia, L. (2006).** *The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots.* Plant J. 45, 225-236.
- Ap Rees, T.; Bryce, J.H.; Wilson, P.M. and Green, J.H. (1983).** *Role and location of NAD malic enzyme in thermogenic tissues of Araceae.* Arch. Biochem. Biophys. 227, 511-521.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004).** *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction.* Annu. Rev. Plant Biol. 55, 373-399.
- Arnesano, F.; Balatri, E.; Banci, L.; Bertini, I.; Winge, D.R. (2005b).** *Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding.* Structure. 13 (5), 713-722.
- Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Martinelli, M. (2005a).** *Ortholog search of proteins involved in copper delivery to cytochrome C oxidase and functional analysis of paralogs and gene neighbors by genomic context.* J Proteome Res. 4 (1), 63-70.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. and Struhl, K. (1987).** *Current Protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing and Wiley. Intersciencie. New York.
- Alves, R.; Herrero, E.; Sorbías, A. (2004).** *Predictive reconstruction of the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly metabolism: I. The role of the protein pair ferredoxin-ferredoxin reductase (Yah1-Arh1).* Proteins. 56 (2), 354-366.
- Backert, S.; Nielsen, B.L.; Borner, T. (1997).** *The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants.* Trends Plant Sci. 2, 477-483.
- Baker, K.E.; Parker, R. (2004).** *Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression.* Curr Opin Cell Biol. 16, 293-299.

- 
- Balandin, T.; Castresana, C. (2002).** *AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17.* Plant Physiol. 129, 1852-1857.
- Balatri, E.; Banci, L.; Bertini, I.; Cantini, F.; Cioffi-Baffoni, S. (2003).** *Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c oxidase assembly.* Structure. 11, 1431-1443.
- Banci, L.; Bertini, I.; Cantini, F.; Cioffi-Baffoni, S.; Gonnelli, L.; Mangani, S. (2004).** *Solution structure of Cox11, a novel type of beta-immunoglobulin-like fold involved in CuB site formation of cytochrome c oxidase.* J Biol Chem. 279 (33), 34833-34839.
- Banci, L.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Rosato, A. (2007).** *The functions of Sco proteins from genome-based analysis.* J Proteome Res. 6, 1568-1579.
- Banci, L.; Bertini, I.; Cioffi-Baffoni, S.; Katsari, E.; Katsaros, N.; Kubicek, K.; Mangani, S. (2005).** *A copper(I) protein possibly involved in the assembly of CuA center of bacterial cytochrome c oxidase.* Proc Natl Acad Sci U S A. 102 (11), 3994-3999.
- Banting, G.S. and Glerum, D.M. (2006).** *Mutational Analysis of the Saccharomyces cerevisiae Cytochrome c Oxidase Assembly Protein Cox11p.* Eukaryotic Cell. 5 (3), 568-578.
- Barr, C.M.; Neiman, M.; Taylor, D.R. (2005).** *Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals.* New Phytol. 168, 38-50.
- Barrientos, A.; Barros, M.H.; Valnot, I.; Rotig, A.; Rustin, P.; Tzagoloff, A. (2002).** *Cytochrome oxidase in health and disease.* Gene 286, 53-63.
- Barrientos, A.; Gouget, K.; Horn, D.; Soto, I.C.; Fontanesi, F. (2009).** *Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: Insights into the COX assembly process.* Biochimica et Biophysica Acta. 1793, 97-107.
- Barrientos, A.; Zambrano, A.; Tzagoloff, A. (2004).** *Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in Saccharomyces cerevisiae.* EMBO J. 23 (17), 3472-3482.
- Barros, M.H.; Carlson, C.G.; Glerum, D.M. and Tzagoloff, A. (2001).** *Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O.* FEBS Lett. 492, 133-138.
- Barros, M.H.; Johnson, A.; Tzagoloff, A. (2004).** *Cox23, a homologue of Cox17, is required for cytochrome oxidase assembly.* J Biol Chem. 279, 31943-31947.

- Barros, M.H.; Nobrega, F.G.; Tzagoloff, A. (2002).** *Mitochondrial ferredoxin is required for heme a synthesis in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem. 277, 9997-10002.
- Bartoli, C.G.; Gómez, F.; Martínez, D.E. and Guiamet, J.J. (2004).** *Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (Triticum aestivum L.).* Journal of Experimental Botany. 55 (403), 1663-1669.
- Baud, S.; Graham, I.A. (2006).** *A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of Arabidopsis using in situ histochemistry.* Plant J 46, 155-169.
- Beauchamp, C.; Fridovich, I. (1971).** *Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.* Anal Biochem 44, 276-287.
- Beers, J.; Glerum, D.M.; Tzagoloff, A. (1997).** *Purification, characterization, and localization of yeast Cox17, a mitochondrial copper shuttle.* J Biol Chem. 272, 33191-33196.
- Beers, J.; Glerum, D.M.; Tzagoloff, A. (2002).** *Purification and characterization of yeast Sco1, a mitochondrial copper protein.* J Biol Chem. 277, 22185-22190.
- Belevich, I.; Verkhovsky, M.I.; Wikström, M. (2006).** *Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome c oxidase.* Nature. 440, 829-832.
- Berlett, B.S.; Stadtman, E.R. (1997).** *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress.* J Biol Chem. 272, 20313-20316.
- Bihlmaier, K.; Mesecke, N.; Terziyska, N.; Bien, M.; Hell, K.; Herrmann, J.M. (2007).** *The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain.* J Cell Biol. 179 (3), 389-395.
- Binder, S.; Brennicke, A. (2003).** *Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 358 (1429), 181-188.
- Birnboim, H. and Dolly, J. (1979).** *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nuc. Acids. Res. 7, 1513-1515.
- Blanchard, J.L.; Lynch, M. (2000).** *Organellar genes: why do they end up in the nucleus?* Trends Genet. 16 (7), 315-320.
- Bogorad, L. (1975).** *Evolution of organelles and eukaryotic genomes.* Science 188, 891-898.

- 
- Bolender, N.; Sickmann, A.; Wagner, R.; Meisinger, C. and Pfanner, N. (2008).** *Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins.* EMBO Rep. 9, 42-49.
- Bonen L. (1991).** *The mitochondrial genome: so simple yet so complex.* Curr. Opin. Genet. Dev. 1, 515-522.
- Borecký, J.; Maia, I.G.; Costa, A.D.; Jezek, P.; Chaimovich, H.; de Andrade, P.B.; Vercesi, A.E.; Arruda, P. (2001).** *Functional reconstitution of Arabidopsis thaliana plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMPI) expressed in Escherichia coli.* FEBS Lett. 505 (2), 240-244.
- Bratton, M.R.; Hiser, L.; Antholine, W.E.; Hoganson, C.; Hosler, J.P. (2000).** *Identification of the structural subunits required for formation of the metal centers in subunit I of cytochrome c oxidase of Rhodobacter sphaeroides.* Biochemistry. 39, 12989-12995.
- Bradnam, K.R.; Korf, I. (2008).** *Longer first introns are a general property of eukaryotic gene structure.* PLoS One. 3 (8), e3093.
- Braun, H-P. and Schmitz, U.K. (1999).** *The protein-import apparatus of plant mitochondria.* Planta 209, 267-274.
- Brown, N.G.; Costanzo, M.C.; Fox, T.D. (1994).** *Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol. 14 (2), 1045-1053.
- Brunelli, J.P.; Pall, M.L. (1993).** *A series of yeast shuttle vectors for expression of cDNAs and other DNA sequences.* Yeast 9, 1299-1308.
- Burke, P.V. and Poyton, R.O. (1998).** *Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase.* The Journal of Experimental Biology. 201, 1163-1175.
- Burkhead, J.L.; Reynolds, K.A.; Abdel-Ghany, S.E.; Cohu, C.M.; Pilon, M. (2009).** *Copper homeostasis.* New Phytol.
- Capaldi, R.A. (1990).** *Structure and Function of Cytochrome c Oxidase.* Annu. Rev. Biochem. 59, 569-596.
- Carpenter, C.D. and Simon, A.E. (1998).** *Methods in Molecular Biology. Arabidopsis Protocols. Preparation of RNA.* (José M. Martínez-Zapater and Julio Salinas). Humana Press. U.S.A. 82:85-89.

- Carr, H.S.; George, G.N.; Winge, D.R. (2002).** *Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I) binding protein.* J Biol Chem. 277, 31237-31242.
- Carr, H.S.; Maxfield, A.B.; Horng, Y-C. and Winge, D.R. (2005).** *Functional Analysis of the Domains in Cox11.* The Journal of Biological Chemistry. 280 (24), 22664-22669.
- Carr, H.S.; Winge D.R. (2003).** *Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion.* Acc Chem Res. 36, 309-316.
- Chacinska, A.; Pfannschmidt, S.; Wiedemann, N.; Kozjak, V.; Sanjuán Szklarz, L.K.; Schulze-Specking, A.; Truscott, K.N.; Guiard, B.; Meisinger, C.; Pfanner, N. (2004).** *Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins.* EMBO J. 23 (19), 3735-3746.
- Chan, N.C.; Likić, V.A.; Waller, R.F.; Mulhern, T.D.; Lithgow, T. (2006).** *The C-terminal TPR domain of Tom70 defines a family of mitochondrial protein import receptors found only in animals and fungi.* J Mol Biol. 358 (4), 1010-1022.
- Charrier, B.; Champion, A.; Henry, Y.; Kreis, M. (2002).** Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Plant Physiol. 130, 577-590
- Chee, P. P.; Klassy, C. and Slightom, J. (1986).** *Expression of a bean storage protein "phaseolin minigene" in foreign plant tissues.* Gene. 41:47-57.
- Chen, Y.; Shi, J.; Tian, G.; Zheng, S.; Lina, Q. (2004).** *Fe deficiency induces Cu uptake and accumulation in Commelina communis.* Plant Science. 166, 1371-1377.
- Chew, O.; Lister, R.; Qbadou, S.; Heazlewood, J.L.; Soll, J.; Schleiff, E.; Millar, A.H.; Whelan, J. (2004).** *A plant outer mitochondrial membrane protein with high amino acid sequence identity to a chloroplast protein import receptor.* FEBS Lett. 557 (1-3), 109-114.
- Chinenov, Y.V. (2000).** *Cytochrome c oxidase assembly factors with a thioredoxin fold are conserved among prokaryotes and eukaryotes.* J Mol Med. 78, 239-242.
- Chory, J.; Reinecke, D.; Sim, S.; Washburn, T. and Brenner, M. A. (1994).** *Role for Cytokinins in De-Etiolation in Arabidopsis. det Mutants Have an Altered Response to Cytokinins.* Plant Physiol. 104, 339-347.
- Church, C.; Goehring, B.; Forsha, D.; Wazny, P.; Poyton, R.O. (2005).** *A role for Pet100p in the assembly of yeast cytochrome c oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a pet100 mutant.* J Biol Chem. 280, 1854-1863.

- 
- Clay, N.K.; Adio, A.M.; Denoux, C.; Jander, G. And Ausubel, F.M. (2009).** *Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response.* Science. 2, 323 (5910), 95-101.
- Clifton, S.W.; Minx, P.; Fauron, C.M.; Gibson, M.; Allen, J.O.; Sun, H.; Thompson, M.; Barbazuk, W.B.; Kanuganti, S.; Tayloe, C.; Meyer, L.; Wilson, R.K.; Newton, K.J. (2004).** *Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome.* Plant Physiol. 136(3), 3486-3503.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998).** *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.* Plant Journal. 16:735-743.
- Cobine, P.A.; Ojeda, L.D.; Rigby, K.M.; Winge, D.R. (2004).** *Yeast contain a nonproteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix.* J Biol Chem. 279, 14447-14455.
- Cobine, P.A.; Pierrel, F.; Bestwick, M.L.; Winge, D.R. (2006).** *Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome c oxidase and superoxide dismutase.* J Biol Chem. 281 (48), 36552-36559.
- Comelli, R.N.; Gonzalez, D.H. (2009).** *Identification of regulatory elements involved in expression and induction by sucrose and UV-B light of the Arabidopsis thaliana COX5b-2 gene, encoding an isoform of cytochrome c oxidase subunit 5b.* Physiologia Plantarum, 137, 213-224.
- Comelli, R.N.; Viola, I.L.; Gonzalez, D.H. (2009).** *Characterization of promoter elements required for expression and induction by sucrose of the Arabidopsis COX5b-1 nuclear gene, encoding the zinc-binding subunit of cytochrome c oxidase.* Plant Mol Biol. 69 (6), 729-743.
- Considine, M.J.; Goodman, M.; Echtay, K.S.; Laloi, M.; Whelan, J.; Brand, M.D.; Sweetlove, L.J. (2003).** *Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein.* J Biol Chem. 278 (25), 22298-22302.
- Cooper, G. (2000).** *The Cell. A Molecular Approach. Second Edition. Bioenergetics and Metabolism - Mitochondria, Chloroplasts, and Peroxisomes.* Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachussets.
- Coruzzi, G.; Tzagoloff, A. (1979).** *Assembly of the mitochondrial membrane system. DNA sequence of subunit 2 of yeast cytochrome oxidase.* J Biol Chem. 254 (18), 9324-9330.

- Costanzo, M.C.; Fox, T.D. (1988).** *Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA.* Proc Natl Acad Sci U S A. 85 (8), 2677-2681.
- Coyne, H.J.; Ciofi-Baffoni, S.; Banci, L.; Bertini, I.; Zhang, L.; George, G.N.; Winge, D.R. (2007).** *The characterization and role of zinc binding in yeast Cox4.* J. Biol. Chem. 282, 8926-8934.
- Curi, G.C.; Chan, R.L.; Gonzalez, D.H. (2002).** *Genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5c from sunflower (*Helianthus annuus* L.) are regulated by nitrate and oxygen availability.* Plant Sci. 163, 897-905.
- Curi, G.C.; Chan, R.L.; Gonzalez, D.H. (2005).** *The leader intron of Arabidopsis thaliana genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5c promotes high-level expression by increasing transcript abundance and translation efficiency.* J Exp Bot. 56 (419), 2563-2571.
- Curi, G.C.; Welchen, E.; Chan, R.L. and Gonzalez, D.H. (2003).** *Nuclear and mitochondrial genes encoding cytochrome c oxidase subunits respond differently to the same metabolic factors.* Plant Physiol. Biochem. 41, 689-693.
- Daley, D.O.; Adams, K.L.; Clifton, R.; Qualmann, S.; Millar, A.H.; Palmer, J.D.; Pratje, E. and Whelan, J. (2002).** *Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2.* Plant J. 30(1), 11-21.
- Das, J.; Miller, S.T.; Stern, D.L. (2004).** *Comparison of diverse protein sequences of the nuclear-encoded subunits of cytochrome C oxidase suggests conservation of structure underlies evolving functional sites.* Mol Biol Evol. 21 (8), 1572-1582.
- Dat, J.; Vandenabeele, S.; Vranová, E.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Van Breusegem, F. (2000).** *Dual action of the active oxygen species during plant stress responses.* Cell Mol Life Sci. 57 (5), 779-795.
- Davis, A.J.; Alder, N.N.; Jensen, R.E.; Johnson, A.E. (2007).** *The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import.* Mol Biol Cell. 18 (2), 475-486.
- Dean, R.T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M.J. (1997).** *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.* Biochem J. 324, 1-18.
- Deblaere, R.; Bytebier, B.; De Greve, H.; Deboeck, F.; Schell, J.; Van Montagu, M. and Leemans, J. (1985).** *Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants.* Nucleic Acids Res. 13, 4777-4788.

- 
- Dickinson, E.K.; Adams, D.L.; Schon, E.A.; Glerum, D.M. (2000).** *A human SCO2 mutation helps define the role of Sco1p in the cytochrome oxidase assembly pathway.* J Biol Chem. 275 (35), 26780-26785.
- Diekert, K.; de Kroon, A.I.; Ahting, U.; Niggemeyer, B.; Neupert, W.; de Kruijff, B.; Lill, R. (2001).** *Apocytochrome c requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane.* EMBO J 20:5626–5635
- Djajanegara, I.; Finnegan, P.M.; Mathieu, C.; McCabe, T.; Whelan, J.; Day, D.A. (2002).** *Regulation of alternative oxidase gene expression in soybean.* Plant Mol Biol. 50 (4-5), 735-742.
- Doudican, N.A.; Song, B.; Shadel, G.S.; Doetsch, P.W. (2005).** *Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in Saccharomyces cerevisiae.* Mol Cell Biol. 25, 5196-5204.
- Drazkiewicz, M.; Skorzynska-Polit, E.; Krupa, Z. (2004).** *Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in Arabidopsis thaliana.* Biometals. 17, 379-387.
- Duchêne, A.M.; Giritch, A.; Hoffmann, B.; Cognat, V.; Lancelin, D.; Peeters, N.M.; Zaepfel, M.; Marechal-Drouard, L.; Small, I.D. (2005).** *Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in Arabidopsis thaliana.* Proc Natl Acad Sci USA. 102, 16484-16489.
- Duchêne, A.M.; Peeters, N.; Dietrich, A.; Cosset, A.; Small, I.D.; Wintz, H. (2001).** *Overlapping destinations for two dual targeted glycyl-tRNA synthetases in Arabidopsis thaliana and Phaseolus vulgaris.* J Biol Chem. 276, 15275-15283.
- Eckhardt, U.; Mas-Marques, A.; Buckhout, T.J. (2001).** *Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants.* Plant Mol Biol. 45, 437-448.
- Elliott, N.A.; Volkert, M.R. (2004).** *Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans.* Mol Cell Biol. 24 (8), 3180-3187.
- Elorza, A.; León, G.; Gómez, I.; Mouras, A.; Holuigue, L.; Araya, A.; Jordana, X. (2004).** *Nuclear SDH2-1 and SDH2-2 genes, encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II in Arabidopsis, have distinct cell-specific expression patterns and promoter activities.* Plant Physiol. 136, 4072-4087.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; von Heijne, G. (2000).** *Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence.* J Mol Biol. 300 (4), 1005-1016.

- 
- Fabian, M.; Jancura, D.; Palmer, G. (2004a).** *Two sites of interaction of anions with cytochrome a in oxidized bovine cytochrome c oxidase.* J Biol Chem. 279 (16), 16170-16177.
- Fabian, M.; Skultety, L.; Jancura, D.; Palmer, G. (2004b).** *Implications of ligand binding studies for the catalytic mechanism of cytochrome c oxidase.* Biochim Biophys Acta. 1655 (1-3), 298-305.
- Farré, J-C. and Araya, A. (2001).** *Gene expression in isolated plant mitochondria: high fidelity of transcription, splicing and editing of a transgene product in electroporated organelles.* Nucleic Acids Res. 29(12), 2484-2491.
- Feinberg, A. and Vogelstein, B. (1983).** *A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.* Analytical Biochemistry. 132:6-13.
- Felitti, S.A.; Chan, R.L.; Gago, G.; Valle, E.M.; Gonzalez, D.H. (1997).** *Expression of sunflower cytochrome c mRNA is tissue-specific and controlled by nitrate and light.* Physiol. Plant. 99, 342-347.
- Felitti, S.A.; Gonzalez, D.H. (1998).** *Carbohydrates modulate the expression of the sunflower cytochrome c gene at the mRNA level.* Planta 206, 410-415.
- Felsenstein, J. (1989).** *PHYLIP -- Phylogeny Inference Package (Version 3.2).* Cladistics 5. 164-166.
- Figuroa, P.; Leon, G.; Elorza, A.; Holuigue, L.; Araya, A. and Jordana, X. (2002).** *The four subunits of mitochondrial respiratory complex II are encoded by multiple nuclear genes and targeted to mitochondria in Arabidopsis thaliana.* Plant Mol. Biol. 50, 725-734.
- Flint, D.H.; Tuminello, J.F.; Emptage, M.H. (1993).** *The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide.* J Biol Chem. 268, 22369-22376.
- Fontanesi, F.; Soto, I.C.; Barrientos, A. (2008).** *Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation.* IUBMB Life. 60 (9), 557-568.
- Fontanesi, F.; Soto, I.C.; Horn, D. and Barrientos, A. (2006).** *Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process.* Am J Physiol Cell Physiol. 291, 1129-1147.
- Foyer, C.H.; Noctor, G. (2000).** *Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling.* New Phytologist 146, 359-388.
- Foyer, C.H.; Noctor, G. (2003).** *Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria.* Physiol Plant. 119, 355-364.

- Fujie, M.; Kuroiwa, H.; Kawano, S.; Kuroiwa, T. (1993).** *Studies on the behavior of organelles and their nucleoids in the root apical meristem of Arabidopsis thaliana (L.) Col.* Planta. 189, 443-452.
- Gagliardi, D.; Perrin, R.; Marechal-Drouard, L.; Grienenberger, J.M.; Leaver, C.J. (2001).** *Plant mitochondrial polyadenylated mRNAs are degraded by a 3'- to 5'-exoribonuclease activity, which proceeds unimpeded by stable secondary structures.* J Biol Chem. 276 (47), 43541-43547.
- Gakh, O.; Cavadini, P.; Isaya, G. (2002).** *Mitochondrial processing peptidases.* Biochim Biophys Acta. 1592 (1). 63-77.
- Gamborg, O.L.; Miller, R.A. and Ojima, K. (1968).** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50:151-158.
- Gasser, C. S.; Simonsen, J. W.; Schilling, J. W. and Schimke, R. T. (1982).** *Expression of abbreviated mouse dihydrofolate reductase genes in cultured hamster cells.* PNAS. 79:6522-6526.
- Geier, B.M.; Schägger, H.; Ortwein, C.; Link, T.A.; Hagen, W.R.; Brandt, U.; Von Jagow, G. (1995).** *Kinetic properties and ligand binding of the eleven-subunit cytochrome-c oxidase from Saccharomyces cerevisiae isolated with a novel large-scale purification method.* Eur J Biochem. 227 (1-2), 296-302.
- Gibney, B.R.; Isogai, Y.; Rabanal, F.; Reddy, K.S.; Grosset, A.M.; Moser, C.C.; Dutton, P.L. (2000).** *Self-assembly of heme A and heme B in a designed four-helix bundle: implications for a cytochrome c oxidase maquette.* Biochemistry. 39 (36),11041-11049.
- Giegé, P.; Hoffmann, M.; Binder, S. and Brennicke, A. (2000).** *RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria.* EMBO Rep. 1, 164-170.
- Glaser, E.; Dessi, P. (1999).** *Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc1 complex in plants.* J Bioenerg Biomembr. 31 (3), 259-274.
- Glaser, E.; Sjoling, S.; Tanudji, M.; Whelan, J. (1998).** *Mitochondrial protein import in plants.* Plant Mol Biol. 38, 311-338.
- Glerum, D.M.; Koerner, T.J.; Tzagoloff, A. (1995).** *Cloning and characterization of COX14, whose product is required for assembly of yeast cytochrome oxidase.* J Biol Chem. 270 (26), 15585-15590.

- 
- Glerum, D.M.; Shtanko, A.; Tzagoloff, A. (1996a).** *Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase.* J Biol Chem. 271 (24), 14504-14509.
- Glerum, D.M.; Shtanko, A.; Tzagoloff, A. (1996b).** *SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem. 271 (34), 20531-20535.
- Glerum, D.M.; Tzagoloff, A. (1994).** *Isolation of a human cDNA for heme A:farnesyltransferase by functional complementation of a yeast cox10 mutant.* Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 8452-8456.
- Goka, T.J.; Stevenson, R.E.; Hefferan, P.M.; Howell, R.R. (1976).** *Menkes disease: a biochemical abnormality in cultured human fibroblasts.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 73, 604-606.
- Gomez-Casati, D.F.; Busi, M.V.; Gonzalez-Schain, N.; Mouras, A.; Zabaleta, E.J. and Araya, A. (2002).** *A mitochondrial dysfunction induces the expression of nuclear-encoded complex I genes in engineered male sterile Arabidopsis thaliana.* FEBS Lett. 532, 70-74.
- Gray, M.W.; Burger, G.; Lang, B.F. (1999).** *Mitochondrial evolution.* Science. 283,1476-1481
- Gray, M.W.; Lang, B.F.; Cedergren, R.; Golding, G.B.; Lemieux, C.; Sankoff, D.; Turmel, M.; Brossard, N.; Delage, E.; Littlejohn, T.G.; Plante, I.; Rioux, P.; Saint-Louis, D.; Zhu, Y.; Burger, G. (1998).** *Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs.* Nucleic Acids Res. 26 (4), 865-878.
- Grossman, L.I.; Lomax, M.I. (1997).** *Nuclear genes for cytochrome c oxidase.* Biochim. Biophys. Acta 1352, 174-192.
- Grun, S.; Lindermayr, C.; Sell, S.; Durner, J. (2006).** *Nitric oxide and gene regulation in plants.* J Exp Bot. 57, 507-516.
- Hamza, I.; Gitlin, J.D. (2002).** *Copper chaperones for cytochrome c oxidase and human disease.* J Bioenerg Biomembr. 34 (5), 381-388.
- Hanahan, D. (1983).** *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J. Mol. Biol. 166, 557-580.
- Handa, H. (2003).** *The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (Brassica napus L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and Arabidopsis thaliana.* Nucleic Acids Res. 31(20), 5907-5916.

- 
- Harris, E.D. (2000).** *Cellular copper transport and metabolism.* Annu Rev Nutr. 20, 291-310.
- Heaton, D.; Nittis, T.; Srinivasan, C. and Winge, D.R. (2000).** *Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17.* J Biol Chem. 275, 37582-37587.
- Heazlewood, J.L.; Tonti-Filippini, J.S.; Gout, A.; Day, D.A.; Whelan, J.M. and Millar, A.H. (2004).** *Experimental Analysis of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome Highlights Signalling and Regulatory Components, Provides Assessment of Targeting Prediction Programs and Points to Plant Specific Mitochondrial Proteins.* Plant Cell. 16, 241-256.
- Hell, K.; Neupert, W. and Stuart, R.A. (2001).** *Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA.* The EMBO Journal. 20 (6), 1281-1288.
- Hell, K.; Tzagoloff, A.; Neupert, W.; Stuart, R.A. (2000).** *Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2.* J Biol Chem. 275, 4571-4578.
- Herrmann, J.M.; Funes, S. (2005).** *Biogenesis of cytochrome oxidase- Sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane.* Gene. 354. 43-52.
- Herrmann, J.M. and Köhl, R. (2007).** *Catch me if you can! Oxidative protein trapping in the intermembrane space of mitochondria.* The Journal of Cell Biology. 176 (5), 559-563.
- Hiser, L.; Di Valentin, M.; Hamer, A.G.; Hosler, J.P. (2000).** *Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase.* J. Biol. Chem. 275, 619-623.
- Ho, L.H.; Giraud, E.; Lister, R.; Thirkettle-Watts, D.; Low, J.; Clifton, R.; Howell, K.A.; Carrie, C.; Donald, T. and Whelan, J. (2007).** *Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development.* Plant Physiol. 143, 1519-1533
- Hoefnagel, M.H.N.; Atkin, O.K., and Wiskich, J.T. (1998).** *Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark.* Biochim. Biophys. Acta. 1366, 235-255.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L. (1988).** *Storage of competent cells for Agrobacterium transformation.* Nucleic Acids Res. 16, 9977.

- 
- Horn, D.; Al-Ali, H. and Barrientos, A. (2008).** *Cmc1p Is a Conserved Mitochondrial Twin CX9C Protein Involved in Cytochrome c Oxidase Biogenesis.* *Molecular and Cellular Biology.* 28 (13), 4354-4364.
- Horng, Y.C.; Cobine, P.A.; Maxfield, A.B.; Carr, H.S.; Winge, D.R. (2004).** *Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase.* *J Biol Chem.* 279 (34), 35334-35340
- Horng Y.C; Leary, S.C.; Cobine, P.A.; Young, F.B.J.; George, G.N.; Shoubridge, E.A.; Winge, D.R. (2005).** *Human Sco1 and Sco2 function as copper binding proteins.* *J Biol Chem.* 280, 34113-34122.
- Hosler, J.P. (2004).** *The influence of subunit III of cytochrome c oxidase on the D pathway, the proton exit pathway and mechanism-based inactivation in subunit I.* *Biochim Biophys Acta.* 1655 (1-3), 332-339.
- Huang, J.; Struck, F.; Matzinger, D.F.; Levings III, C.S. (1994).** *Flower-enhanced expression of a nuclear-encoded mitochondrial respiratory protein is associated with changes in mitochondrion number.* *Plant Cell* 6: 439-448
- Huang, S.; Taylor, N.L.; Whelan, J. and Millar, A.H. (2009).** *Refining the Definition of Plant Mitochondrial Presequences through Analysis of Sorting Signals, N-Terminal Modifications, and Cleavage Motifs.* *Plant Physiology.* 150, 1272-1285.
- Hurt, E.C.; Allison, D.S.; Müller, U.; Schatz, G. (1987).** *Amino-terminal deletions in the presequence of an imported mitochondrial protein block the targeting function and proteolytic cleavage of the presequence at the carboxy terminus.* *J Biol Chem.* 262 (3), 1420-1424.
- Ito, H.; Fukuda, Y.; Murata, K.; Kimura, A. (1983).** *Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.* *J Bacteriol.* 153 (1), 163-168.
- Jaksch, M.; Paret, C.; Stucka, R.; Horn, N.; Muller-Hocker, J.; Horvath, R.; Trepesch, N.; Stecker, G.; Freisinger, P.; Thirion, C.; Müller, J.; Lunkwitz, R.; Rödel, G.; Shoubridge, E.A.; Lochmüller, H. (2001).** *Cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in SCO2, encoding a mitochondrial copper-binding protein, is rescued by copper in human myoblasts.* *Hum Mol Genet.* 10, 3025-3035.
- Janska, H.; Mackenzie, S.A. (1993).** *Unusual mitochondrial genome organization in cytoplasmic male sterile common bean and the nature of cytoplasmic reversion to fertility.* *Genetics.* 135(3), 869-879.
- Jarmuszkiewicz, W.; Almeida, A.M.; Sluse-Goffart, C.M.; Sluse, F.E.; Vercesi, A.E. (1998).** *Linoleic acid-induced activity of plant uncoupling mitochondrial*

- protein in purified tomato fruit mitochondria during resting, phosphorylating, and progressively uncoupled respiration. J Biol Chem. 273 (52), 34882-34886.*
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987).** *Gus fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal. 6, 3901-3907.*
- Jezeq, P.; Costa, A.D.; Vercesi, A.E. (1996).** *Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. J Biol Chem. 271 (51), 32743-32748.*
- Job, C.; Rajjou, L.; Lovigny, Y.; Belghazi, M.; Job, D. (2005).** *Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. Plant Physiol. 138, 790-802.*
- Johansson, E.; Olsson, O.; Nyström, T. (2004).** *Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of Arabidopsis thaliana. J Biol Chem. 279, 22204-22208.*
- Kadenbach, B.; Huttemann, M.; Arnold, S.; Lee, I.; Bender, E. (2000).** *Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. Free Radic Biol Med. 29, 211-221.*
- Kadowaki, K.; Kubo, N.; Ozawa, K.; Hirai, A. (1996).** *Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signal. EMBO Journal. 15, 6652-6661.*
- Kaiser, P.; Auer, B.(1993).** *Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to E. coli. Biotechniques. 14 (4), 552.*
- Kercher, S. J. (2000).** *Diversity and origin of alternative NADH-ubiquinone oxidoreductases. Biochim. Biophys. Acta. 1459, 274-283.*
- Khalimonchuk, O.; Bird, A.; Winge, D.R. (2007).** *Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. J Biol Chem. 282, 17442-17449.*
- Khalimonchuk, O.; Rigby, K.; Bestwick, M.; Pierrel, F.; Cobine, P.A.; Winge, D.R. (2008).** *Pet191 is a cytochrome c oxidase assembly factor in Saccharomyces cerevisiae. Eukaryot Cell. 7 (8), 1427-1431.*
- Khalimonchuk, O.; Rödel, G. (2005).** *Biogenesis of cytochrome c oxidase. Mitochondrion. 5 (6), 363-388.*
- Kim, B.E.; Nevitt, T.; Thiele, D.J. (2008).** *Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. Nat. chem. Biol. 4, 176-185.*

- 
- Kirichenko, A.; Vygodina, T.; Mkrtychyan, H.M.; Konstantinov, A. (1998).** *Specific cation binding site in mammalian cytochrome oxidase.* FEBS Lett. 423 (3), 329-333.
- King E.O.; Ward, M.K.; Raney, D.E. (1954).** *Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin.* J Lab Clin Med. 44 (2), 301-307.
- Koehler, C.M. (2000).** *Protein translocation pathways of the mitochondrion.* FEBS Letters. 476, 27-31.
- Kohler, R.H.; Cao, J.; Zipfel, W.R.; Webb, W.W. and Hanson, M.R. (1997).** *Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids.* Science. 276, 2039-2042.
- Kosugi, S.; Suzuka, I.; Ohashi, Y. (1995).** *Two of three promoter elements identified in a rice gene for proliferating cell nuclear antigen are essential for meristematic tissue-specific expression.* Plant J. 7, 877-886.
- Kosugi, S.; Suzuka, I.; Ohashi, Y.; Murakami, T.; Arai, Y. (1991).** *Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants.* Nucleic Acids Res. 19 (7), 1571-1576.
- Krauss, S.; Zhang, C.Y.; Lowell, B.B. (2005).** *The mitochondrial uncoupling-protein homologues.* Nat Rev Mol Cell Biol. 6 (3), 248-261.
- Krummeck, G.; Rödel, G. (1990).** *Yeast SCO1 protein is required for a post-translational step in the accumulation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunits I and II.* Curr Genet. 18 (1), 13-15.
- Hruz, T.; Laule, O.; Szabo, G.; Wessendorp, F.; Bleuler, S.; Oertle, L.; Widmayer, P.; Gruissem, W.; Zimmermann, P. (2008).** *Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes.* Adv. Bioinformatics 2008. 420747.
- Kuang, A.; Crispi, M.; Musgrave, M.E. (1998).** *Control of seed development in Arabidopsis thaliana by atmospheric oxygen.* Plant Cell Environ. 21, 71-78.
- Kubo, T.; Mikami, T. (2007).** *Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome.* Physiol. Plant. 129, 6-13.
- Kubo, T.; Nishizawa, S.; Sugawara, A.; Itchoda, N.; Estiati, A.; Mikami, T. (2000).** *The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (Beta vulgaris L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA).* Nucleic Acids Res. 28(13), 2571-2576.

- Kutik, S.; Guiard, B.; Meyer, H.E.; Wiedemann, N.; Pfanner, N. (2007).** *Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import.* J Cell Biol. 179 (4), 585-591.
- Laemmli, U. (1970).** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.* Nature 227, 680-685.
- Lang, B.F.; Burger, G.; O'Kelly, C.J.; Cedergren, R.; Golding, G.B.; Lemieux, C.; Sankoff, D.; Turmel, M.; Gray, M.W. (1997).** *An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature.* Nature. 387 (6632), 493-497.
- Larsson, S.; Källebring, B.; Wittung, P.; Malmström, B.G. (1995).** *The CuA center of cytochrome-c oxidase: electronic structure and spectra of models compared to the properties of CuA domains.* Proc Natl Acad Sci U S A. 92 (16), 7167-7171.
- Leary, S.C.; Cobine, P.A.; Kaufman, B.A.; Guercin, G.H.; Mattman, A.; Palaty, J.; Lockitch, G.; Winge, D.R.; Rustin, P.; Horvath, R.; Shoubridge, E.A. (2007).** *The human cytochrome c oxidase assembly factors SCO1 and SCO2 have regulatory roles in the maintenance of cellular copper homeostasis.* Cell Metab. 5, 9-20.
- Leary, S.C.; Kaufman, B.A.; Pellechia, G.; Guercin, G-H.; Mattman, A.; Jaksch, M.; Shoubridge, E.A. (2004).** *Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase.* Hum Mol Genet. 13, 1839-1848.
- Leary, S.C.; Winge, D.R.; Cobine, P.A. (2009).** *"Pulling the plug" on cellular copper: the role of mitochondria in copper export.* Biochim Biophys Acta. 1793 (1), 146-153.
- Lee, A.; Kirichenko, A.; Vygodina, T.; Siletsky, S.A.; Das, T.K.; Rousseau, D.L.; Gennis, R.; Konstantinov, A.A. (2002a).** *Ca(2+)-binding site in Rhodobacter sphaeroides cytochrome C oxidase.* Biochemistry. 41 (28), 8886-8898.
- Lee, B. H.; Lee, H.; Xiong, L. and Zhu, J. K. (2002b).** *A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression.* Plant Cell. 14, 1235-1251.
- Lee, S.L.J.; Warmke, H.E. (1979).** *Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn.* Am J Bot. 60, 141-148.
- Le Hir, H.; Nott, A.; Moore, M.J. (2003).** *How introns influence and enhance eukaryotic gene expression.* Trends Biochem Sci. 28, 215-220.

- 
- Li, J. and Chory, J. (1998).** *Methods in Molecular Biology. Arabidopsis Protocols. Preparation of DNA from Arabidopsis.* (José M. Martínez-Zapater and Julio Salinas). Humana Press. U.S.A. 82:55-60.
- Lister, R. and Whelan, J. (2006).** *Mitochondrial protein import: convergent solutions for receptor structure.* *Curr. Biol.* 16, R197-199.
- Lister, R.; Carrie, C.; Duncan, O.; Ho, L.H.; Howell, K.A.; Murcha, M.W.; Whelan, J. (2007).** *Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria.* *Plant Cell.* 19 (11), 3739-3759.
- Lister, R.; Chew, O.; Lee, M-N.; Heazlewood, J.L.; Clifton, R.; Parker, K.L.; Millar, A.H. and Whelan, J. (2004).** *A transcriptomic and proteomic characterization of the Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial stresses.* *Plant Physiol.* 134, 777-789.
- Lister, R.; Hulett, J.M.; Lithgow, T.; Whelan, J. (2005).** *Protein import into mitochondria: origins and functions today (review).* *Mol Membr Biol.* 22 1-2), 87-100.
- Lister, R.; Murcha, M.W.; Whelan, J. (2003).** *The Mitochondrial Protein Import Machinery of Plants (MPIMP) database.* *Nucleic Acids Res.* 31 (1), 325-327.
- Lode, A.; Paret, C.; Rödel, G. (2002).** *Molecular characterization of Saccharomyces cerevisiae Sco2p reveals a high degree of redundancy with Sco1p.* *Yeast.* 19 (11), 909-922.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. and Darnell, J. (2002).** *Biología Celular y Molecular. Energética celular: glucólisis, oxidación aeróbica y fotosíntesis.* Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Luirink, J.; Samuelsson, T.; de Gier, J.W. (2001).** *YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly.* *FEBS Lett.* 501 (1), 1-5.
- Lussier, M.; White, A.M.; Sheraton, J.; di Paolo, T.; Treadwell, J.; Southard, S.B.; Horenstein, C.I.; Chen-Weiner, J.; Ram, A.F.; Kapteyn, J.C.; Roemer, T.W.; Vo, D.H.; Bondoc, D.C.; Hall, J.; Zhong, W.W.; Sdicu, A.M.; Davies, J.; Klis, F.M.; Robbins, P.W.; Bussey, H. (1997).** *Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in Saccharomyces cerevisiae.* *Genetics.* 147 (2), 435-450.
- Maas, C.; Laufs, J.; Grant, S.; Korfhage, C. and Werr, W. (1991).** *The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhance reporter gene expression up to 1000-fold.* *Plant Mol. Biol.* 16 (2), 199-207.

- Macasev, D.; Newbigin, E.; Whelan, J. and Lithgow, T. (2000).** *How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from Arabidopsis differ from their fungal counterparts.* Plant Physiol. 123, 811-816.
- Macasev, D.; Whelan, J.; Newbigin, E.; Silva-Filho, M.C.; Mulhern, T.D. and Lithgow, T. (2004).** *Tom22', an 8-kDa trans-site receptor in plants and protozoans, is a conserved feature of the TOM complex that appeared early in the evolution of eukaryotes.* Mol. Biol. Evol. 21, 1557-1564.
- Mackenzie, S. and McIntosh, L. (1999).** *Higher Plant Mitochondria.* Plant Cell. 11, 571-585.
- Mackenzie, S.; He, S.; Lyznik, A. (1994).** *The elusive plant mitochondrion as a genetic system.* Plant Physiol. 105, 775-780.
- Malmström, B.G.; Aasa, R. (1993).** *The nature of the CuA center in cytochrome c oxidase.* FEBS Lett. 325 (1-2), 49-52.
- Manthey, G.M.; McEwen, J.E. (1995).** *The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of Saccharomyces cerevisiae.* EMBO J. 14 (16), 4031-4043.
- Marienfeld, J.; Unseld, M.; Brennicke, A. (1999).** *The mitochondrial genome of Arabidopsis is composed of both native and immigrant information.* Trends Plant Sci. 4, 495-502.
- Mascarenhas, D.; Mettler, I.J.; Pierce, D.A.; Lowe, H.W. (1990).** *Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize.* Plant Mol Biol. 15, 913-920.
- Maxfield, A.B.; Heaton, D.N.; Winge, D.R. (2004).** *Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane.* J Biol Chem. 279 (7), 5072-5080.
- Maxwell, D.P.; Wang, Y.; McIntosh, L. (1999).** *The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells.* Proc Natl Acad Sci USA. 96, 8271-8276.
- McEwen, J.E.; Ko, C.; Kloeckner-Gruissem, B.; Poyton, R.O. (1986).** *Nuclear functions required for cytochrome c oxidase biogenesis in Saccharomyces cerevisiae. Characterization of mutants in 34 complementation groups.* J. Biol. Chem. 261, 11872-11879.

- Mesecke, N.; Terziyska, N.; Kozany, C.; Baumann, F.; Neupert, W.; Hell, K.; Herrmann, J.M. (2005). *A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import*. Cell. 121 (7), 1059-1069.
- Meyer, E.H.; Giegé, P.; Gelhaye, E.; Rayapuram, N.; Ahuja, U.; Thony-Meyer, L.; Grienenberger, J.M.; Bonnard, G. (2005). *AtCCMH, an essential component of the c-type cytochrome maturation pathway in Arabidopsis mitochondria, interacts with apocytochrome c*. Proc Natl Acad Sci USA. 102, 16113-16118.
- Michel, K.; Abderhalden, O.; Bruggmann, R.; Dudler, R. (2006). *Transcriptional changes in powdery mildew infected wheat and Arabidopsis leaves undergoing syringolin-triggered hypersensitive cell death at infection sites*. Plant Mol Biol. 62, 561-578.
- Mick, D.U.; Wagner, K.; van der Laan, M.; Frazier, A.E.; Perschil, I.; Pawlas, M.; Meyer, H.E.; Warscheid, B.; Rehling, P. (2007). *Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome c oxidase assembly*. EMBO J. 26, 4347-4358.
- Millar, A.H.; Eubel, H.; Jansch, L.; Kruff, V.; Heazlewood, J.L.; Braun, H.P. (2004). *Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits*. Plant Mol Biol. 56 (1), 77-90.
- Millar, A.H.; Small, I.D.; Day, D.A.; Whelan, J. (2008). *Mitochondrial Biogenesis and Function in Arabidopsis*. The Arabidopsis Book 1-36. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, eds. (Rockville, MD: American Society of Plant Biologist).<http://www.Aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Mills, R.F.; Krijger, G.C.; Baccarini, P.J.; Hall, J.L.; Williams, L.E. (2003). *Functional expression of AtHMA4, a PIB-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass*. Plant J. 35, 164-176.
- Mittler, R. (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. Trends Plant Sci. 7, 405-410.
- Mokranjac, D.; Paschen, S.A.; Kozany, C.; Prokisch, H.; Hoppins, S.C.; Nargang, F.E.; Neupert, W.; Hell, K. (2003). *Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria*. EMBO J. 22 (4), 816-825.
- Møller, I. M. (1997). *The oxidation of cytosolic NAD(P)H by external NAD(P)H dehydrogenases in the respiratory chain of plant mitochondria*. Physiol. Plant. 100, 85-90.
- Møller, I. M. (2001). *Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NAD(P)H turnover and metabolism of reactive oxygen species*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52, 561-591.

- 
- Møller, I. M.; and Rasmusson, A. G. (1998).** *The role of NADP in the mitochondrial matrix.* Trends Plant Sci. 3, 21-27.
- Mufarrege, E.F.; Curi, G.C.; Gonzalez, D.H. (2009).** *Common sets of promoter elements determine the expression characteristics of three Arabidopsis genes encoding isoforms of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 6b.* Plant Cell Physiol. 50 (7), 1393-1399.
- Mulero, J.J; Fox, T.D. (1993).** *Alteration of the Saccharomyces cerevisiae COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111.* Mol Biol Cell. 4 (12), 1327-35.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962).** *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.* Physiologia Plantarum. 15:473-497.
- Murcha, M.W.; Elhafez, D.; Lister, R.; Tonti-Filippini, J.; Baumgartner, M.; Philippar, K.; Carrie, C.; Mokranjac, D.; Soll, J.; Whelan, J. (2007).** *Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in Arabidopsis.* Plant Physiol. 143 (1), 199-212.
- Murcha, M.W.; Lister, R.; Ho, A.Y. and Whelan, J. (2003).** *Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from Arabidopsis.* Plant Physiol. 131, 1737-1747.
- Nakagawa, T.; Maeshima, M.; Nakamura, K.; Asahi, T. (1990).** *Molecular cloning of a cDNA for the smallest nuclear-encoded subunit of sweet potato cytochrome c oxidase. Analysis with the cDNA of the structure and import into mitochondria of the subunit.* European Journal of Biochemistry. 191, 557-561.
- Neupert, W. (1997).** *Protein import into mitochondria.* Annu Rev Biochem. 66, 863-917.
- Nijtmans, L.G.; Taanman, J.W.; Muijsers, A.O.; Speijer, D.; Van Den Bogert, C. (1998).** *Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells.* Eur J Biochem. 254, 389-394.
- Nittis, T.; George, G.N.; Winge, D.R. (2001).** *Yeast Sco1, a protein essential for cytochrome c oxidase function is a Cu(I)-binding protein.* J Biol Chem 276. 42520-42526.
- Nobrega, M.P.; Bandeira, S.C.B.; Beers, J.; Tzagoloff, A. (2002).** *Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase.* J. Biol. Chem. 277, 40206-40211.

- 
- Noctor, G.; De Paepe, R.; Foyer, C.H. (2007). *Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants*. Trends in Plant Science. 12, 125-134.
- Norman, C.; Howell, K.A.; Millar, A.H.; Whelan, J.M.; Day, D.A. (2004). *Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport*. Plant Physiol 134, 492-501
- Notsu, Y.; Masood, S.; Nishikawa, T.; Kubo, N.; Akiduki, G.; Nakazono, M.; Hirai, A.; Kadowaki, K. (2002). *The complete sequence of the rice (Oryza sativa L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants*. Mol Genet Genomics. 268(4), 434-445.
- Nunes-Nesi, A.; Sulpice, R.; Gibon, Y. and Fernie, A.R. (2008). *The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis*. Journal of Experimental Botany. 59 (7), 1675-1684.
- Nunnari, J. and Walter, P. (1996). *Regulation of organelle biogenesis*. Cell 84, 389-394.
- Oda, K.; Yamato, K.; Ohta, E.; Nakamura, Y.; Takemura, M. (1992). *Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort Marchantia polymorpha mitochondrial DNA: a primitive form of plant mitochondrial genome*. J. Mol. Biol. 223, 1-7.
- Ogihara, Y.; Yamazaki, Y.; Murai, K.; Kanno, A.; Terachi, T.; Shiina, T.; Miyashita, N.; Nasuda, S.; Nakamura, C.; Mori, N.; Takumi, S.; Murata, M.; Futo, S.; Tsunewaki, K. (2005). *Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome*. Nucleic Acids Res. 33, 6235–6250.
- Ogishima, T.; Niidome, T.; Shimokata, K.; Kitada, S.; Ito, A. (1995). *Analysis of elements in the substrate required for processing by mitochondrial processing peptidase*. J Biol Chem. 270, 30322-30326.
- Ohtsu, K.; Hamanaka, S.; Yamazaki, K, and Hirai, A. (1999). *Characterization of a cDNA encoding a novel subunit for cytochrome c oxidase (COX6b) from rice*. Breeding Science. 49, 211-215.
- Ohtsu, K.; Nakazono, M.; Tsutsumi, N. and Hirai, A. (2001). *Characterization and expression of the genes for cytochrome c oxidase subunit VIb (COX6b) from rice and Arabidopsis thaliana*. Gene. 264, 233-239.
- Ooms, G.; Hooykaas, P.J.; Van Veen, R.J.; Van Beelen, P.; Regensburg-Tuïnk, T.J.; Schilperoort, R.A. (1982). *Octopine Ti-plasmid deletion mutants of*

- agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. Plasmid. 7(1),15-29.
- Orozco-Cardenas, M.; Ryan, C.A. (1999).** *Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway.* Proc Natl Acad Sci USA. 96, 6553-6557.
- Palumaa, P.; Kanpur, L.; Voronova, A.; Sillard, R. (2004).** *Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase.* Biochem J. 382 (1), 307-314.
- Papadopoulou, L.C.; Sue, C.M.; Davidson, M.M.; Tanji, K.; Nishino, I.; Sadlock, J.E.; Krishna, S.; Walker, W.; Selby, J.; Glerum, D.M.; Coster, R.V.; Lyon, G.; Scalais, E.; Lebel, R.; Kaplan, P.; Shanske, S.; De Vivo, D.C.; Bonilla, E.; Hirano, M.; Dimauro, S.; Schon, E.A. (1999).** *Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene.* Nat Genet. 23, 333-337.
- Pastore, D.; Trono, D.; Laus, M.N.; Di Fonzo, N. and Flagella, Z. (2007).** *Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria.* Journal of Experimental Botany, 58 (2), 195-210.
- Perez-Martinez, X.; Broadley, S.A.; Fox, T.D. (2003).** *Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p.* EMBO J. 22 (21), 5951-5961.
- Perry, A.J.; Hulett, J.M.; Likic, V.A.; Lithgow, T. and Gooley, P.R. (2006).** *Convergent evolution of receptors for protein import into mitochondria.* Curr. Biol. 16, 221-229.
- Pesaresi, P.; Masiero, S.; Eubel, H.; Braun, H-P.; Bhushan, S.; Glaser, E.; Salamini, F. and Leister, D. (2006).** *Nuclear Photosynthetic Gene Expression Is Synergistically Modulated by Rates of Protein Synthesis in Chloroplasts and Mitochondria.* The Plant Cell. 18, 970-991.
- Petruzzella, V.; Tiranti, V.; Fernandez, P.; Ianna, P.; Carrozzo, R.; Zeviani, M. (1998).** *Identification and characterization of human cDNAs specific to BCS1, PET112, SCO1, COX15, and COX11, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain.* Genomics. 54 (3), 494-504.
- Pfanner, N.; Geissler, A. (2001).** *Versatility of the mitochondrial protein import machinery.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2 (5), 339-349.

- 
- Piechulla, B.; Glick, R.E.; Bahl, H.; Melis, A.; Gruissem, W. (1987).** *Changes in Photosynthetic Capacity and Photosynthetic Protein Pattern during Tomato Fruit Ripening.* Plant Physiol. 84 (3), 911-917.
- Pierrel, F.; Bestwick, M.L.; Cobine, P.A.; Khalimonchuk, O.; Cricco, J.A.; Winge, D.R. (2007).** *Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly.* EMBO J. 26, 4335-4343.
- Pierrel, F.; Khalimonchuk, O.; Cobine, P.A.; Bestwick, M. and Winge, D.R. (2008).** *Coa2 Is an Assembly Factor for Yeast Cytochrome c Oxidase Biogenesis That Facilitates the Maturation of Cox1.* Molecular and Cellular Biology. 28 (16), 4927-4939.
- Pontier, D.; Tronchet, M.; Rogowsky, P.; Lam, E.; Roby, D. (1998).** *Activation of hsr203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death.* Mol Plant-Microbe Interact. 6, 544-554.
- Poyton, R. O. and McEwen, J. E. (1996).** *Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes.* Annu. Rev. Biochem. 65, 563-607.
- Preuss, M.; Leonhard, K.; Hell, K.; Stuart, R.A.; Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2001).** *Mba1, a Novel Component of the Mitochondrial Protein Export Machinery of the Yeast Saccharomyces cerevisiae.* The Journal of Cell Biology. 153 (5), 1085-1095.
- Prohaska, J.R. (2008).** *Role of copper transporters in copper homeostasis.* Am J Clin Nutr. 88 (3), 826S-829S.
- Punter, F.A.; Glerum, D.M. (2003).** *Mutagenesis reveals a specific role for Cox17p in copper transport to cytochrome oxidase.* J Biol Chem. 278 (33), 30875-30880.
- Rae, T.D.; Schmidt, P.J.; Pufahl, R.A.; Culotta, V.C.; O'Halloran, T.V. (1999).** *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase.* Science. 284 (5415), 805-808.
- Raghavendra, A.S. and Padmasree, K. (2003).** *Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation.* Trends Plant Sci. 8, 546-553.
- Rahman, S.; Taanman, J.W.; Cooper, J.M.; Nelson, I.; Hargreaves, I.; Meunier, B.; Hanna, M.G.; García, J.J.; Capaldi, R.A.; Lake, B.D.; Leonard, J.V.; Schapira, A.H. (1999).** *A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy.* Am J Hum Genet. 65 (4), 1030-1039.

- Rao, M.V.; Paliyath, G.; Ormrod, D.P.; Murr, D.P.; Watkins, C.B. (1997).** *Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.* Plant Physiol. 115, 137-149.
- Rasmusson, A. G.; Heiser, V.; Zabaleta, E.; Brennicke, A.; and Grohmann, L. (1998).** *Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants.* Biochim. Biophys. Acta. 1364, 101-111.
- Rasmusson, A. G.; Soole, K. L. and Elthon, T. E. (2004).** *Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria.* Annu. Rev. Plant Biol. 55, 23-39.
- Rathus, C.; Bowe, R. and Birch, R. (1993).** *Effects of promoter, intron and enhancer elements on transient gene expression in sugar-cane and carrot protoplasts.* Plant Mol. Biol. 23 (3), 613-618.
- Rees, E.M.; Lee, J.; Thiele, D.J. (2004).** *Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter.* J. Biol. Chem. 279, 54221-54229.
- Rehling, P.; Model, K.; Brandner, K.; Kovermann, P.; Sickmann, A.; Meyer, H.E.; Kühlbrandt, W.; Wagner, R.; Truscott, K.N.; Pfanner, N. (2003).** *Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase.* Science. 299, 1747-1751.
- Rentzsch, A.; Krummeck-Weiss, G.; Hofer, A.; Bartuschka, A.; Ostermann, K. and Rödel, G. (1999).** *Mitochondrial copper metabolism in yeast: mutational analysis of Sco1p involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase.* Curr Genet. 35, 103-108.
- Rhoads, D.M.; Umbach, A.L.; Subbaiah, C.C. and Siedow, J.N. (2006).** *Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling.* Plant Physiology. 141, 357-366.
- Ribichich, K.; Tioni, M.F.; Chan, R.L.; Gonzalez, D.H. (2001).** *Cell-type specific expression of plant cytochrome c mRNA in developing flowers and roots.* Plant Physiol. 125, 1603-1610.
- Rigby, K.; Cobine, P.A.; Khalimonchuk, O.; Winge, D.R. (2008).** *Mapping the functional interaction of Sco1 and Cox2 in cytochrome oxidase biogenesis.* J Biol Chem 283. 15015-15022.
- Rigby, K.; Zhang, L.; Cobine, P.A.; George, G.N.; Winge, D.R. (2007).** *Characterization of the cytochrome c oxidase assembly factor Cox19 of Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem. 282(14), 10233-10242.

- Rissler, M.; Wiedemann, N.; Pfannschmidt, S.; Gabriel, K.; Guiard, B.; Pfanner, N.; Chacinska, A. (2005). *The essential mitochondrial protein Erv1 cooperates with Mia40 in biogenesis of intermembrane space proteins*. J Mol Biol. 353, 485-492.
- Roise, D.; Horvath, S.J.; Tomich, J.M.; Richards, J.H.; Schatz, G. (1986). *A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers*. EMBO J. 5, 1327-1334.
- Roldan-Arjona, T.; Garcia-Ortiz, M.V.; Ruiz-Rubio, M.; Ariza, R.R. (2000). *cDNA cloning, expression and functional characterization of an Arabidopsis thaliana homologue of the Escherichia coli DNA repair enzyme endonuclease III*. Plant Mol Biol. 44, 43-52.
- Rose, A.B. (2004). *The effect of intron location on intron-mediated enhancement of gene expression in Arabidopsis*. Plant J. 40, 744-751.
- Sacconi, S.; Trevisson, E.; Pistollato, F.; Baldoin, M.C.; Rezzonico, R.; Bourget, I.; Desnuelle, C.; Tenconi, R.; Basso, G.; DiMauro, S.; Salviati, L. (2005). *hCOX18 and hCOX19: two human genes involved in cytochrome c oxidase assembly*. Biochem Biophys Res Commun. 337 (3), 832-839.
- Sakamoto, A.; Tsukamoto, S.; Yamamoto, H.; Ueda-Hashimoto, M.; Takahashi, M.; Suzuki, H.; Morikawa, H. (2003). *Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species*. Plant J. 33, 841-851.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Sancenon, V.; Puig, S.; Mira, H.; Thiele, D.J.; Penarrubia, L. (2003). *Identification of a copper transporter family in Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology. 51, 577-587.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. PNAS. USA. 74:5463-5467.
- Satoh, M.; Kubo, T.; Nishizawa, S.; Estiati, A.; Itchoda, N.; Mikami, T. (2004). *The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs*. Mol Genet Genomics. 272(3), 247-256.

- Scheibe, R.; Backhausen, J.E.; Emmerlich, V.; Holtgreffe, S. (2005).** *Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions.* Journal of Experimental Botany. 56, 1481-1489.
- Schmidt, B.; McCracken, J.; Ferguson-Miller, S. (2003).** *A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome c oxidase.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 15539-15542.
- Schneider, G.; Sjoling, S; Wallin, E.; Wrede, P.; Glaser, E.; von Heijne, G. (1998).** *Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides.* Proteins 30, 49-60.
- Schulze, M.; Rödel, G. (1989).** *Accumulation of the cytochrome c oxidase subunits I and II in yeast requires a mitochondrial membrane-associated protein, encoded by the nuclear SCO1 gene.* Mol Gen Genet. 216 (1), 37-43.
- Schuster, W. and Brennicke, A. (1994).** *THE PLANT MITOCHONDRIAL GENOME: Physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus.* Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 61-78.
- Sedmak, J. and Grossberg, S. (1977).** *A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250.* Anal. Biochem. 79:544-552.
- Seki, M.; Narusaka, M.; Kamiya, A.; Ishida, J.; Satou, M.; Sakurai, T.; Nakajima, M.; Enju, A.; Akiyama, K.; Oono, Y.; Muramatsu, M.; Hayashizaki, Y.; Kawai, J.; Carninci, P.; Itoh, M.; Ishii, Y.; Arakawa, T.; Shibata, K.; Shinagawa, A.; Shinozaki, K. (2002)** *Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection.* Science 296, 141-145.
- Shen, W.; Wei, Y.; Dauk, M.; Zheng, Z. and Zou, J. (2003).** *Identification of a mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase from Arabidopsis thaliana: Evidence for a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in plants.* FEBS Lett. 536, 92-96.
- Shikanai, T.; Müller-Moulé, P.; Munekage, Y.; Niyogi, K.K.; Pilon, M. (2003).** *PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts.* Plant Cell 15, 1333-1346
- Sicheritz-Pontén T.; Kurland C.G.; Andersson S.G. (1998).** *A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae.* Biochim Biophys Acta. 1365 (3), 545-541.
- Silva-Filho, M.C. (2003).** *One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations.* Curr. Opin. Plant Biol. 6, 1-7.

- Sirrenberg, C.; Bauer, M.F.; Guiard, B.; Neupert, W.; Brunner, M. (1996).** *Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22.* Nature. 384 (6609), 582-585.
- Smart, C.J.; Moneger, F. and Leaver, C.J. (1994).** *Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower.* Plant Cell. 6, 811-825.
- Smith, D.; Gray, J.; Mitchell, L.; Antholine, W.E. and Hosler, J.P. (2005).** *Assembly of cytochrome-c oxidase in the absence of assembly protein Surf1p leads to loss of the active site heme.* J Biol Chem. 280, 17652-17656.
- Smith, A.M.; Ratcliffe, R.G.; Sweetlove, L.J. (2004).** *Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants.* J Biol Chem. 279 (50), 51944-51952.
- Southworth, D.; Strout, G. and Russell, S.D. (1997).** *Freeze-fracture of sperm of *Plumbago zeylanica* L. in pollen and in vitro.* Sex. Plant Reprod. 10, 217-226.
- Srinivasan, C.; Posewitz, M.C.; George, G.N.; Winge, D.R. (1998).** *Characterization of copper chaperone Cox17 of *Saccharomyces cerevisiae*.* Biochemistry. 37, 7572-7757.
- Staelin, L.A. (1997).** *The plant ER: A dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains.* Plant J. 11, 1151-1165.
- Stiburek, L.; Hansikova, H.; Tesarova, M.; Cerna, L.; Zeman, J. (2006).** *Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase.* Physiol Res. 55, S27-41.
- Stiburek, L.; Vesela, K.; Hansikova, H.; Pecina, P.; Tesarova, M.; Cerna, L.; Houstek, J.; Zeman, J. (2005).** *Tissue-specific cytochrome c oxidase assembly defects due to mutations in SCO2 and SURF1.* Biochem. J. 392, 625-632.
- Stojanovski, D.; Guiard, B.; Kozjak-Pavlovic, V.; Pfanner, N. and Meisinger, C. (2007).** *Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of  $\alpha$ -helical TOM proteins.* The Journal of Cell Biology. 179 (5), 881-893.
- Stuart, R. A. (2002).** *Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxal complex.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 1592 (1), 79-87.
- Stuart, R.A.; Neupert, W. (1996).** *Topogenesis of inner membrane proteins of mitochondria.* Trends Biochem Sci. 21 (7), 261-267.
- Sugiyama, Y.; Watase, Y.; Nagase, M.; Makita, N.; Yagura, S.; Iria, A.; Sugiera, M. (2005).** *The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the*

- 
- tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants*. Mol Genet Genomics. 272(6), 603-615.
- Sweetlove, L.J.; Foyer, C.H. (2004).** *Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria*. In DA Day, AH Millar, J Whelan, eds, Plant Mitochondria: From Genome to Function, Vol 1, Advances in Photosynthesis and Respiration. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. 307-320.
- Sweetlove, L.J.; Heazlewood, J.L.; Herald, V.; Holtzapffel, R.; Day, D.A.; Leaver, C.J.; Millar, A.H. (2002).** *The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria*. Plant J. 32 (6), 891-904.
- Sweetlove, L.J.; Lytovchenko, A.; Morgan, M.; Nunes-Nesi, A.; Taylor, N.L.; Baxter, C.J.; Eickmeier, I. and Fernie, A.R. (2006).** *Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis*. PNAS. 103 (51), 19587-19592.
- Szigyarto, C.; Dessi, P.; Smith, M.K.; Knorpp, C.; Harmey, M.A.; Day, D.A.; Glaser, E.; Whelan, J. (1998).** *A matrix-located processing peptidase of plant mitochondria*. Plant Mol Biol. 36 (1), 171-181.
- Szyrach, G.; Ott, M.; Bonnefoy, N.; Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003).** *Ribosome binding to the Oxal complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria*. The EMBO Journal. 22 (24), 6448-6457.
- Taanman, J-W.; Williams, S. (2001).** *Assembly of cytochrome c oxidase: what can we learn from patients with cytochrome c oxidase deficiency?* Biochem Soc Trans. 29, 446-451.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006).** *Plant Physiology, Fourth Edition. Respiration and Lipid Metabolism*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Tanudji, M.; Sjoling, S.; Glaser, E.; Whelan, J. (1999).** *Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria*. J Biol Chem. 274, 1286-1293.
- Taylor, N.L.; Day, D.A.; Millar, A.H. (2004).** *Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism*. J Exp Bot. 55 (394),1-10.
- Taylor, R.D.; Pfanner, N. (2004).** *The protein import and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane*. Biochim Biophys Acta. 1658 (1-2), 37-43.
- Terziyska, N.; Lutz, T.; Kozany, C.; Mokranjac, D.; Mesecke, N.; Neupert, W.; Herrmann, J.M. and Hell, K. (2005).** *Mia40, a novel factor for protein import into*

---

*the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions.* FEBS Lett. 579, 179-184.

**Thompson, J. D.; Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994).** *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice.* Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.

**Timmis, J.; Ayliffe, M.A.; Huang, C.Y.; Martin, W. (2004).** *Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes.* Nat. Rev. Genet. 5, 123-135.

**Tong, A.H.; Lesage, G.; Bader, G.D.; Ding, H.; Xu, H.; Xin, X.; Young, J.; Berriz, G.F.; Brost, R.L.; Chang, M.; Chen, Y.; Cheng, X.; Chua, G.; Friesen, H.; Goldberg, D.S.; Haynes, J.; Humphries, C.; He, G.; Hussein, S.; Ke, L.; Krogan, N.; Li, Z.; Levinson, J.N.; Lu, H.; Ménard, P.; Munyana, C.; Parsons, A.B.; Ryan, O.; Tonikian, R.; Roberts, T.; Sdicu, A.M.; Shapiro, J.; Sheikh, B.; Suter, B.; Wong, S.L.; Zhang, L.V.; Zhu, H.; Burd, C.G.; Munro, S.; Sander, C.; Rine, J.; Greenblatt, J.; Peter, M.; Bretscher, A.; Bell, G.; Roth, F.P.; Brown, G.W.; Andrews, B.; Bussey, H.; Boone, C. (2004).** *Global mapping of the yeast genetic interaction network.* Science. 303 (5659), 808-813.

**Toufighi, K.; Brady, S.M.; Austin, R.; Ly, E.; Provart, N.J. (2005).** *The Botany Array Resource: e-Northerns, Expression Angling, and promoter analyses.* The Plant Journal. 43, 153-163.

**Trémousaygue, D.; Garnier, L.; Bardet, C.; Dabos, P.; Hervé, C.; Lescure, B. (2003).** *Internal telomeric repeats and "TCP-domain" protein binding sites cooperate to regulate gene expression in Arabidopsis thaliana cycling cells.* Plant J. 33, 957-966.

**Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Hakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. (1995).** *Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å.* Science. 269, 1069-1074.

**Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. (1996).** *The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å.* Science. 272, 1136-1144.

**Tzagoloff, A.; Capitano, N.; Nobrega, M.P.; Gatti, D. (1990).** *Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of COX11, a homolog of the P. denitrificans protein encoded by ORF3.* EMBO J. 9, 2759-2764.

- 
- Umbach, A.L. and Siedow, J.N. (1993).** *Covalent and Noncovalent Dimers of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase Protein in Higher Plant Mitochondria and Their Relationship to Enzyme Activity.* Plant Physiol. 103, 845-854
- Umbach, A.L.; González-Meler, M.A.; Sweet, C.R. and Siedow, J.N. (2002).** *Activation of the plant mitochondrial alternative oxidase: insights from site-directed mutagenesis.* Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 1554 (1-2), 118-128.
- Umbach, A.L.; Wiskichb, J.T.; Siedow, J.S. (1994).** *Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria.* FEBS Letters. 348, 181-184.
- Unsold, M.; Marienfeld, J. R.; Brandt, P. and Brennicke, A. (1997).** *The mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana contains 57 genes in 366.924 nucleotides.* Nat. Genet. 15, 57-61.
- Van Aken, O.; Giraud, E.; Clifton, R.; Whelan, J. (2009).** *Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses.* Physiol Plant.
- van der Laan, M.; Rissler, M. and Rehling, P. (2006).** *Mitochondrial preprotein translocases as dynamicmolecular machines.* FEMS Yeast Res 6, 849-861.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L. (1996).** *Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria.* Plant Physiol 111, 589-595.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L. (1997).** *ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function.* Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 703-734.
- Vanlerberghe, G.C.; Robson, C.A.; Yip, J.Y. (2002).** *Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death.* Plant Physiol. 129 (4), 1829-1842.
- Verniquet, F.; Gaillard, J.; Neuburger, M.; Douce, R. (1991).** *Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide.* Biochem J. 276, 643-648.
- von Heijne, G. (1986).** *Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices.* EMBO J. 5, 1335-1342.
- von Heijne, G.; Steppuhn, J.; Herrmann, R.G. (1989).** *Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides.* Eur J Biochem 180, 535-545.

- Wang, J.; Zhang, H.; Allen, R.D. (1999).** *Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress.* Plant Cell Physiol. 40, 725-732.
- Welch, R.M.; Norvell, W.A.; Schaefer, S.C.; Shaff, J.E.; Kochian, L.V. (1993).** *Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea roots by Fe and Cu status: does the root-cell plasmalemma Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulation of cation uptake.* Planta. 190, 555-561.
- Welchen, E. and Gonzalez, D.H. (2005).** *Differential expression of the Arabidopsis cytochrome c genes Cyt<sub>c</sub>-1 and Cyt<sub>c</sub>-2. Evidence for the involvement of TCP-domain protein-binding elements in anther- and meristem-specific expression of the Cyt<sub>c</sub>-1 gene.* Plant Physiol. 139, 88-100.
- Welchen, E. and Gonzalez, D.H. (2006).** *Overrepresentation of elements recognized by TCP-domain transcription factors in the upstream regions of nuclear genes encoding components of the mitochondrial oxidative phosphorylation machinery.* Plant Physiol. 141, 540-545.
- Welchen, E.; Chan, R.L. and Gonzalez, D.H. (2002).** *Metabolic regulation of genes encoding cytochrome c and cytochrome c oxidase subunit Vb in Arabidopsis.* Plant Cell Environ. 25, 1605-1615.
- Welchen, E.; Chan, R.L.; Gonzalez, D.H. (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.* J Exp Bot. 55 (405), 1997-2004.
- Werhahn, W.; Niemeyer, A.; Jansch, L.; Kruft, V.; Schmitz, U.K.; Braun, H-P. (2001).** *Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from Arabidopsis. Identification of multiple forms of TOM20.* Plant Physiol. 125 (2), 943-954.
- Whelan, J. and Schleiff, E. (2004).** *Protein targeting and import. In Advances in Photosynthesis and Respiration.* D.A. Day, A.H. Millar, and J. Whelan, eds, Dordrecht: Kluwer.
- Wiedemann, N.; Truscott, K.N.; Pfannschmidt, S.; Guiard, B.; Meisinger, C.; Pfanner, N. (2004).** *Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway.* J. Biol. Chem. 279, 18188-18194.
- Williams, J.C.; Sue, C.; Banting, G.S.; Yang, H.; Glerum, D.M.; Hendrickson, W.A.; Schon, E.A. (2005).** *Crystal structure of human SCO1: implications for*

- redox signaling by a mitochondrial cytochrome c oxidase “assembly” protein.* J Biol Chem. 280, 15202-15211.
- Williams, S.L.; Valnot, I.; Rustin, P.; Taanman, J.W. (2004).** *Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1.* J Biol Chem. 279 (9):, 7462-7469.
- Wilmink, A.; van de Ven, B. and Dons, J. (1995).** *Activity of constitutive promoters in various species from the Liliaceae.* Plant Mol. Biol. 28, 949-955.
- Wintz, H.; Fox, T.; Wu, Y.Y.; Feng, V.; Chen, W.; Chang, H.S.; Zhu, T.; Vulpe, C. (2003).** *Expression profiles of Arabidopsis thaliana in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis.* Journal of Biological Chemistry. 278, 47644-47653.
- Wintz, H.; Vulpe, C. (2002).** *Plant copper chaperones.* Biochem Soc Trans. 30 (4), 732-725.
- Wong-Riley, M. (1979).** *Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry.* Brain Res 171, 11-28
- Yamamoto, H.; Esaki, M.; Kanamori, T.; Tamura, Y.; Nishikawa, S. and Endo, T. (2002).** *Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes.* Cell. 111, 519-528.
- Yamano, K.; Yatsukawa, Y.I.; Esaki, M.; Hobbs, A.E.; Jensen, R.E. and Endo, T. (2008).** *TOM20 and TOM22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import.* J. Biol. Chem. 283, 3799-3807.
- Yamasaki, H.; Abdel-Ghany, S.E.; Cohu, C.M.; Kobayashi, Y.; Shikanai, T.; Pilon, M. (2007).** *Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis.* J Biol Chem. 282, 16369-16378.
- Ye,Q.; Imriskova-Sosova, I.; Hill, B.C. and Jia, Z. (2005).** *Identification of a disulfide switch in BsSco, a member of the Sco family of cytochrome c oxidase assembly proteins.* Biochemistry. 44, 2934-2942.
- Zabaleta, E.; Heiser, V.; Grohmann, L.; Brennicke, A. (1998).** *Promoters of nuclear-encoded respiratory chain complex I genes from Arabidopsis thaliana contain a region essential for anther/pollen-specific expression.* Plant J. 15, 49-59.
- Zhong, Q.; Gvozdenovic-Jeremic, J.; Webster, P.; Zhou, J.; Greenberg, M.L. (2005).** *Loss of function of KRE5 suppresses temperature sensitivity of mutants lacking mitochondrial anionic lipids.* Mol Biol Cell. 16 (2), 665-675.

- Zhu, Z.; Yao, J.; Johns, T.; Fu, K.; De Bie, I.; Macmillan, C.; Cuthbert, A.P.; Newbold, R.F.; Wang, J.; Chevrette, M.; Brown, G.K.; Brown, R.M.; Shoubridge, E.A. (1998).** *SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome.* Nat. Genet. 20, 337-343.
- Zottini, M.; Formentin, E.; Scattolin, M.; Carimi, F.; Lo Schiavo, F.; Terzi, M. (2002).** *Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo.* FEBS Lett. 515, 75-78.