

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



**Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas**

## **“ESTUDIOS FUNCIONALES DE CHAPERONAS DE COBRE INVOLUCRADAS EN LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL”.**

**Lic. Lucila García**

**Director: Dr. Daniel Gonzalez**

**Co-director: Dra. Elina Welchen**

**Laboratorio de Biología Molecular**

**INSTITUTO DE AGROBIOTECNOLOGÍA DEL  
LITORAL UNL-CONICET**

**2015**

---

---

## 1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	
2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	2
3. RESUMEN	6
4. INTRODUCCIÓN	13
4.1. Mitocondrias, funciones generales.	14
4.2. La importancia de las mitocondrias en organismos fotosintéticos.	15
4.3. Las mitocondrias en plantas.	18
4.3.1. Complejos respiratorios en plantas.	19
4.3.2. Transporte alternativo en plantas.	22
4.3.3. Generación de especies reactivas en la mitocondria.	29
4.3.4. Vías metabólicas que hacen ingresar electrones a las mitocondrias de plantas.	31
4.4. Biogénesis mitocondrial.	34
4.5. Genoma mitocondrial.	36
4.6. Regulación de la expresión de los genes de los complejos respiratorios.	37
4.7. Expresión concertada de los genes mitocondriales de codificación nuclear. Pistas de coordinación.	38
4.8. Regulación retrógrada en organismos fotosintéticos.	40
4.9. Transporte de proteínas a la mitocondria de plantas.	44
4.5. Biogénesis del complejo IV.	49
4.5.1. Subunidades estructurales de codificación mitocondrial.	49
4.5.2. Subunidades estructurales de codificación nuclear.	50
4.5.3. Ensamblado de COX.	53
4.5.4. Metalochaperonas e inserción del cobre en COX.	53
4.6. Metalochaperonas en plantas.	57
4.6.1. COX17.	59
4.6.2. COX19.	61
5. OBJETIVOS.	62
5.1. Objetivo general.	63
5.2. Objetivos específicos.	63
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	64
6.1. Materiales.	65
6.1.1. Material vegetal.	65

6.1.2. Plantas mutantes y silenciadas (no generadas en nuestro laboratorio).	65
6.1.3. Cepas utilizadas.	66
6.1.4. Vectores utilizados.	66
6.1.5. Secuencias utilizadas.	68
6.2. Métodos.	68
6.2.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.	68
6.2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	68
6.2.3. Purificación de fragmentos de ADN.	69
6.2.4. Digestión con endonucleasas de restricción.	69
6.2.5. Ligación de moléculas de ADN.	69
6.2.6. Transformación de bacterias de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.	70
6.2.7. Transformación de bacterias de <i>A. tumefaciens</i> con ADN plasmídico.	70
6.2.8. Mini-preparación de ADN plasmídico.	70
6.2.9. Clonados.	71
6.2.10. Condiciones generales de crecimiento de Arabidopsis.	76
6.2.11. Transformación de plantas de Arabidopsis.	77
6.2.12. Selección de plantas transformadas.	78
6.2.13. Mini-preparación de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.	79
6.2.14. Análisis de las plantas transformadas.	79
6.2.15. Extracción de ARN de Arabidopsis.	79
6.2.16. Cuantificación de ácidos nucleicos.	80
6.2.17. Transcripción reversa.	80
6.2.18. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).	80
6.2.19. Análisis de la expresión génica en forma global utilizando microarreglos.	81
6.2.20. Crecimiento de Arabidopsis en medio líquido.	82
6.2.21. Crecimiento de Arabidopsis en condiciones de salinidad.	82
6.2.22. Crecimiento de Arabidopsis en condiciones de alta intensidad de luz (HL).	83
6.2.23. Tratamiento de plantas de Arabidopsis con CuSO <sub>4</sub> .	84
6.2.24. Tratamiento de plantas de Arabidopsis con antimicina A.	84
6.2.25. Tratamientos de plantas de Arabidopsis con rotenona.	85
6.2.26. Tratamiento de plantas de Arabidopsis con ácido abscísico (ABA).	85
6.2.27. Germinación y desarrollo de la raíz en presencia de ABA.	85
6.2.28. Cuantificación de lípidos peroxidados.	86
6.2.29. Evaluación de la muerte celular mediante medición de conductividad.	86
6.2.30. Cuantificación de clorofila.	87
6.2.31. Determinación del contenido de hierro.	87

6.2.32. Obtención de cruas de plantas transgénicas de Arabidopsis.	88
6.2.33. Determinación del contenido de proteína total mediante el método de Bradford.	88
6.2.34. Actividad superóxido dismutasa en geles nativos.	89
6.2.35. Medición del consumo de oxígeno en plantas de Arabidopsis.	89
6.2.36. Obtención de extractos crudos de mitocondrias.	90
6.2.37. Determinación de la actividad citrato sintasa en extractos crudos de mitocondrias.	90
6.2.38. Electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente nativos (BN-PAGE).	91
6.2.39. Actividad del complejo IV en gel.	92
6.2.40. Medición de la actividad COX en oxígrafo.	92
6.2.41. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS).	93
6.2.42. Obtención de anticuerpos para la detección de AtCOX17 o de AtCOX19.	93
6.2.43. Expresión y purificación de proteínas recombinantes para la obtención de anticuerpos.	93
6.2.44. Detección de proteínas mediante western blot.	94
6.2.45. Análisis de la expresión del gen reportero <i>GUS</i> en plantas transformadas mediante histoquímica.	94
6.2.46. Análisis de la expresión del gen reportero <i>GUS</i> en plantas transformadas mediante fluorometría.	95
6.2.47. Determinación de metabolitos mediante GC-MS.	96
6.2.48. Determinación de prolina en plantas de Arabidopsis tratadas con NaCl.	97
6.2.49. Localización subcelular de proteínas mediante microscopía confocal.	98
6.2.50. Determinación de aniones superóxido en plantas de Arabidopsis.	98
6.2.51. Análisis estadísticos.	98
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	100
7.1. CAPÍTULO I. Localización de proteínas homólogas a COX17 y COX19 de levaduras en plantas de Arabidopsis.	101
7.1.1. Introducción.	102
7.1.2. Resultados	106
7.1.2.1. Localización de AtCOX17-1 en plantas de Arabidopsis.	106
7.1.2.2. Localización de AtCOX19 en plantas de Arabidopsis.	108

7.2. CAPÍTULO II. Estudio del rol de las Proteínas AtCOX17 en la biogénesis del complejo citocromo c oxidasa (COX).	115
7.2.1. Introducción.	116
7.2.2. Resultados.	121
7.2.2.1. Obtención de líneas silenciadas en AtCOX17-1 o en AtCOX17-2.	122
7.2.2.2. Obtención de líneas silenciadas en ambos genes AtCOX17.	127
7.2.2.3. Caracterización de los complejos mitocondriales en plantas con niveles disminuidos de AtCOX17-1 o de AtCOX17-2.	129
7.3. CAPÍTULO III. Estudio del rol de las Proteínas AtCOX17 en la respuesta a estrés en Arabidopsis.	135
7.3.1. Introducción.	136
7.3.2. Resultados.	137
7.3.2.1. La deficiencia de AtCOX17-1 y AtCOX17-2 altera la expresión de genes de respuesta estrés.	137
7.3.2.2. Los genes AtCOX17 son inducidos por rotenona y ante distintas situaciones de estrés.	151
7.3.2.3. La disminución de la expresión de los genes AtCOX17 en forma individual modifica la respuesta a determinadas situaciones de estrés.	157
7.3.2.4. La sobreexpresión de AtCOX17-1 podría generar una ventaja respecto de plantas WT durante la respuesta a estrés por NaCl.	176
7.4. CAPÍTULO IV. Estudio del rol de las proteínas AtCOX17 y AtCOX19 en la homeostasis de metales.	182
7.4.1. Introducción.	183
7.4.2. Resultados.	192
7.4.2.1. Los niveles de expresión de AtCOX17 y AtCOX19 son regulados por cambios en la concentración de cobre.	192
7.4.2.2. Cambios en los niveles de AtCOX17 y AtCOX19 modifican la homeostasis de cobre en Arabidopsis.	194
7.4.2.3. El aumento en los niveles de AtCOX17-2 y de AtCOX19 modifica el contenido de cobre total en raíces de Arabidopsis.	
7.4.2.4. El silenciamiento de AtCOX19 modifica la expresión de genes que responden a la deficiencia de hierro y a patógenos.	203
7.4.2.5. La disminución de AtCOX19 modifica el metabolismo del hierro.	206
8. CONCLUSIONES.	209

9. BIBLIOGRAFÍA.	213
10. ANEXOS	249
10.1. ANEXO I	250
10.2. ANEXO II	257
10.3. ANEXO III	260



AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Daniel Gonzalez por la dirección de este trabajo de Tesis y por disponibilizar los recursos para la realización de la misma.*

*A la Dra. Elina Welchen por acompañar de manera constante la dirección de este trabajo de Tesis.*

*A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por sostener la docencia y la investigación en el espacio público y por brindarme durante más de 10 años un espacio de formación y de desarrollo.*

*Al CONICET por financiar mi vida los últimos cinco años y apoyar la inclusión de los profesionales en los distintos espacios de desarrollo.*

*Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por brindarme un espacio de trabajo y por acercarme a la comunidad científica. A sus directivos, por los cambios y el progreso desde su creación.*

*Al Ministerio de Ciencia y Técnica de la Nación, a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNL, a la Universidad Técnica de Dresden y a la DAAD por financiar parte de los experimentos presentados en esta Tesis y permitirme trabajar del otro lado del meridiano.*

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del - Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas – Universidad Nacional del Litoral. La gran mayoría de los resultados presentados en este trabajo manuscrito han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a Congresos:

#### Publicaciones en Revistas Internacionales con Referato Estricto

Garcia L., Welchen E. y Gonzalez D.H. (2014) Mitochondria and copper homeostasis in plants. *Mitochondrion* 19,269-274.

Steinebrunner I., Gey U., Andres M., Garcia L. Gonzalez D.H. (2014) Divergent functions of the Arabidopsis mitochondrial SCO proteins: HCC1 is essential for COX activity while HCC2 is involved in the UV-B stress response. *Front Plant Sci.* 5:87.

Welchen E., Garcia L., Mansilla N., Gonzalez D.H. (2014) Coordination of plant mitochondrial biogenesis: keeping pace with cellular requirements. *Front Plant Sci.* 4:551.

#### Presentaciones en Congresos

Garcia L., Colombatti F., Welchen E., Gonzalez D. Functional studies of COX17, an Arabidopsis copper chaperone involved in COX biogenesis and stress responses. International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB). 2013 - Rosario - Argentina.

Mansilla N., Garcia L., Gonzalez D. y Welchen E. A protein required for heme  $\alpha$  synthesis during COX assembly is involved in plant embryogenesis and senescence. XLVIII Reunión Anual de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2012 - Mendoza - Argentina.

Garcia L., Colombatti F, Welchen E. y Gonzalez D. Mitochondrial copper chaperones COX17 and COX 19: Roles beyond COX biogenesis. XLVII Reunión Anual de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2011 - San Luis - Argentina.

Gonzalez D., Garcia L., Welchen E. y Attallah C. Arabidopsis homologues of mitochondrial copper chaperones SCO1, COX17 and COX19: More than COX assembly factors. International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB). 2011 - Alemania.

## MIEMBROS DEL JURADO

***Dr. Diego Gomes Casati***

Investigador Principal de CONICET

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI) – Rosario

***Dr. Eduardo Ceccarelli***

Investigador Superior de CONICET

Instituto de Biología Celular y Molecular de Rosario (IBR)

***Dr. Eduardo J. Zabaleta***

Investigador Independiente de CONICET

Instituto de Investigaciones Biológicas – Mar del Plata

---

## 2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

## 2. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

ABA	ácido abscísico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
ami	microARN artificial ( <i>artificial microRNA</i> )
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa A
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
C	Complejo (hace referencia a complejos mitocondriales, CI, CII, CIII y CIV)
CaMV	virus del mosaico de la coliflor
cm	centímetros
COX	citocromo c oxidasa
Da	daltos
DAB	3,3'-diaminobencidina
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP,

	dGTP, dTTP)
DO	densidad óptica
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
EROs	especies reactivas del oxígeno
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-1-tiogalactopiranosido
kDa	kilodaltons
MQ	Agua miliQ
NBT	nitroblutetrazolium
kpb	kilopares de bases
KO	<i>Knock out</i>
LB	Luria-Bertani
LETH	Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes
M	Molar
mA	miliamper/s
MDA	malondialdehído
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
MUG	4-metilumbeliferil- $\beta$ ,D-glucurónido
NAD <sup>+</sup>	dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADH	dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido
NBT	Nitroblue tetrazolium
NDs	NAD(P)H deshidrogenasas
nm	nanómetros
oe	sobrepresante
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
Q	Ubiquinona
SA	ácido salicílico
SOD	superóxido dismutasa
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio

TCA	ácido tricarboxílico
TEMED	N,N,N',N',-tetrametilendiamina
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
U	unidad/es
UNL	Universidad Nacional del Litoral
UV	ultravioleta
V	volts

#### Abreviaturas para aminoácidos

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteína	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico	P	Pro	Prolina
E	Glu	Ácido glutámico	Q	Gln	Glutamina
F	Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptófano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

#### Nomenclatura para genes y proteínas

*AtCOX17* Gen COX17 salvaje de *Arabidopsis thaliana*.

*cox17* Gen mutante (*knock-out* o *knock-down*) en *AtCOX17* de *Arabidopsis thaliana*.

*AtCOX17* Proteína COX17 de *Arabidopsis thaliana*.

Las primeras dos letras indican la especie de a la cual pertenece el gen o la proteína.

---

---

## 3. RESUMEN.

### 3.1 RESUMEN

Las mitocondrias de plantas poseen cuatro complejos respiratorios que permiten el transporte de electrones, un complejo encargado de la síntesis de ATP y dos vías de respiración alternativas específicas de plantas. La composición y estructura de los complejos respiratorios ha sido ampliamente estudiada en levaduras y mamíferos y se ha resuelto la composición de algunos complejos en cultivos de células vegetales. De dichos estudios se deduce que la biogénesis mitocondrial es un proceso complejo, no solo porque requiere la coordinación de dos genomas, nuclear y mitocondrial, sino por el gran número de proteínas estructurales y de ensamblaje que deben ser importadas a la mitocondria para que ocurra la biogénesis de los complejos respiratorios. El Complejo IV o citocromo c oxidasa (COX) es la enzima terminal de la cadena respiratoria y participa en la reducción del oxígeno a agua. En eucariotas, el ensamblaje de COX requiere la participación de numerosas proteínas codificadas en el genoma nuclear y tres proteínas estructurales (COX1, COX2 y COX3) codificadas en el genoma mitocondrial. Dentro de las proteínas de codificación nuclear se distinguen aquellas que se encuentran asociadas al núcleo enzimático de aquellas que participan en otros procesos, tales como la síntesis e inserción de cofactores en las subunidades estructurales, la síntesis e inserción en la membrana de las subunidades codificadas en la mitocondria y el ensamblado del complejo. Durante el ensamblado del Complejo IV debe ocurrir la formación de centros metálicos de cobre y hierro hémico en COX1 y COX2, necesarios para la actividad del complejo. La búsqueda de homólogos de las proteínas de levaduras y mamíferos ha permitido encontrar proteínas supuestamente involucradas en el ensamblado del Complejo IV en *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis). Entre las proteínas identificadas figuran supuestos homólogos de OXA1, COX10, COX11, COX15, COX17, COX19, COX23 y SCO1. OXA1p facilitaría la inserción cotraduccional de las subunidades de COX en la membrana interna, mientras que COX10 y COX15 participarían en la formación del grupo hemo *a*. COX17, COX19 y COX23 participarían en la distribución del cobre para su inserción en COX mediada por SCO1 y COX11. Este grupo de proteínas comparte dominios de cisteínas involucrados en la unión

y transferencia del metal. El modelo propuesto en levaduras sugiere que COX17 transfiere el cobre a SCO1 y a COX11 y éstas lo transportan a COX2 y COX1, respectivamente. El rol de COX19 y COX23 aún no ha sido dilucidado. En Arabidopsis encontramos dos genes que codifican proteínas homólogas a COX17, denominados *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2*, y dos genes *AtCOX19* que codifican proteínas idénticas. Tanto *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* como *AtCOX19* son capaces de complementar a las respectivas mutantes nulas de levaduras, lo que sugiere que las proteínas de Arabidopsis participan en la biogénesis de COX. Curiosamente, los promotores de *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* y *AtCOX19* son inducidos en distintas situaciones que generan estrés oxidativo en plantas. De acuerdo a esto, se ha sugerido un rol en la respuesta a estrés para estas proteínas en Arabidopsis.

En este trabajo de Tesis nos propusimos estudiar la función de las metalochaperonas de cobre *AtCOX17* y *AtCOX19*. Para cumplir con este objetivo general, estudiamos la localización subcelular de estas proteínas y obtuvimos plantas con niveles alterados de las mismas. Estudios de microscopía confocal en plantas que expresan fusiones de *AtCOX17-1* y *AtCOX19* a la proteína verde fluorescente (GFP) indicaron que ambas proteínas tienen localización mitocondrial. La localización mitocondrial de estas proteínas está de acuerdo con la función propuesta en la biogénesis de COX. Por otra parte, la disminución de los niveles de expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en forma simultánea retrasa el crecimiento en Arabidopsis. El fenotipo observado podría deberse a una deficiencia en la actividad del Complejo IV. Si bien no hemos podido evaluar esta hipótesis, el hecho de que plantas mutantes nulas en proteínas involucradas en la biogénesis del Complejo IV detienen su desarrollo durante la embriogénesis apoya esta idea. Además, la disminución de la expresión de cada uno de los genes *AtCOX17* en forma individual no afecta el desarrollo de las plantas. Esto es coincidente con el hecho de que estas plantas no presentan diferencias en la actividad COX ni en la respiración respecto de plantas salvajes. Estos resultados sugieren la existencia de redundancia funcional entre *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en la biogénesis del Complejo IV. Sin embargo, la disminución de la expresión de los genes *AtCOX17* de manera individual genera plantas cuya respuesta frente a estrés se encuentra alterada, ya que presentan una menor inducción de genes de respuesta a

estrés y mayores niveles de anión superóxido y lípidos peroxidados luego de un tratamiento con NaCl. Por el contrario, plantas con mayores niveles de AtCOX17-1 presentan menores niveles de lípidos peroxidados y mayor diámetro de roseta luego del tratamiento con NaCl, lo que sugiere que estas plantas son menos sensibles a este tipo de estrés. En conjunto, estos resultados indican que las proteínas AtCOX17 serían necesarias para que ocurra una respuesta eficiente a estrés en plantas.

También se estudió la homeostasis de cobre en plantas con niveles alterados de AtCOX17 o de AtCOX19. Los resultados obtenidos sugieren que AtCOX17-2 y AtCOX19 podrían estar involucradas en el transporte y/o la distribución del metal en Arabidopsis, mientras que la modificación de los niveles de AtCOX17-1 no produjo cambios en la homeostasis de cobre. Además, el silenciamiento de AtCOX19 generó plantas con menores niveles de hierro y que activan mecanismos relacionados con la deficiencia de dicho metal.

Los resultados obtenidos indican funciones diferenciales para las metalochaperonas de cobre AtCOX17 y AtCOX19. Particularmente, las proteínas AtCOX17 participan en la respuesta a estrés, mientras que AtCOX17-2 y AtCOX19 participan en la homeostasis de cobre y/o hierro. Si estas funciones están relacionadas con la participación de estas proteínas en la biogénesis del Complejo IV o son funciones adicionales adquiridas en plantas durante la evolución son interrogantes abiertos para futuras investigaciones.

### 3.2. SUMMARY.

Plant mitochondria contain four complexes involved in electron transport, one complex responsible for ATP synthesis and two plant-specific alternative respiratory pathways. The structure of the respiratory complexes was thoroughly studied in mammals and yeast and the composition of some respiratory complexes has been determined in plants. These studies showed that mitochondrial biogenesis is a complex process that requires the coordination of two different genomes and the participation of many structural proteins and assembly factors. Complex IV or cytochrome c oxidase (COX) is the terminal enzyme of the mitochondrial electron transport chain and is involved in the conversion of oxygen to water. COX is composed of 10 or more different subunits encoded either in the mitochondrial or the nuclear genome. The three core subunits (COX1, COX2 and COX3) are encoded in the mitochondrial genome and are present in COX from different organisms, whilst the number of subunits encoded in the nucleus is variable. In addition to structural subunits, several proteins involved in COX assembly have been identified. These proteins participate in processes like the synthesis of co-factors and their insertion into the structural subunits, the synthesis and insertion into the membrane of subunits encoded in the organelle and the assembly of the complex. During COX assembly, copper and heme *a* must be inserted into the core subunits since they form the catalytic centers necessary for proper COX activity. Copper delivery was thoroughly studied in mammals and yeast. A simple model proposes that copper is transferred from COX17 to SCO1 and COX11, which in turn transfer copper to COX2 and COX1, respectively. COX17 is a soluble protein from the mitochondrial intermembrane space (IMS) that contains four cysteines arranged in two CX<sub>9</sub>C motifs and two additional cysteines involved in copper coordination. Another protein from the IMS, COX19, also contains CX<sub>9</sub>C motifs and is involved in copper delivery in yeast. Homologues of COX17 and COX19 are encoded in plant genomes. In *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), two different genes, *AtCOX17-1* and *AtCOX17-2*, encode proteins which are able to complement the respiratory deficiency of a yeast *cox17* null mutant. Moreover, the expression of *AtCOX17* genes is induced under

biotic and abiotic stress conditions. Similar to *AtCOX17* genes, *AtCOX19* genes (*AtCOX19-1* and *AtCOX19-2*), which encode identical proteins, are able to complement a yeast *cox19* null mutant and are induced under stress conditions.

In this work, we focused on the function of *AtCOX17* and *AtCOX19* in *Arabidopsis*. First, we determined the subcellular location of *AtCOX17-1* and *AtCOX19* using confocal microscopy. Our studies showed that both proteins are located in mitochondria, which is in agreement with their function in COX biogenesis. We also analyzed plants with reduced levels of *AtCOX17* or *AtCOX19*. Silencing of both *AtCOX17* genes originated only a limited number of lines which were strongly affected in growth. This phenotype may be explained by the role of *AtCOX17* in COX assembly. This is in agreement with previous studies which indicated that knockout mutations in genes encoding proteins involved in COX assembly cause an arrest in embryo development. On the contrary, silencing of single *AtCOX17* genes did not significantly affect plant growth or COX activity suggesting the existence of functional redundancy. However, plants with reduced expression of individual *AtCOX17* genes showed a reduced or delayed response to stress, since they were unable to properly induce a set of stress-responsive genes and contained higher ROS and lipid peroxidation levels after a salt stress treatment. These results indicate that *AtCOX17* genes have acquired functions related to stress responses. In fact, plants with reduced expression of both *AtCOX17* genes showed a general decrease in the expression of genes that participate in the response to many different types of stress even under basal conditions.

We also studied the role of *AtCOX17* and *AtCOX19* in copper homeostasis. Silencing the expression of either *AtCOX17* gene or *AtCOX19* did not modify the expression of genes involved in copper transport or delivery. However, plants with increased expression of *AtCOX19* or *AtCOX17-2* showed a significant increase in the expression of genes involved in responses to copper limitation. Moreover, silencing of *AtCOX19* caused a decrease in iron levels and activated gene expression responses related to iron deficiency, suggesting that *AtCOX19* is also involved in iron metabolism.

Although *AtCOX17* and *AtCOX19* show structural similarity, have the same subcellular localization and are induced under similar situations, they probably have

different functions in plants. Our results suggest that *AtCOX17* genes are involved in stress responses while *AtCOX19* participates in modulating metal homeostasis. The link between these functions and their role in COX biogenesis is an open question for future studies.

---

---

## 4. INTRODUCCIÓN.

## 4. INTRODUCCIÓN

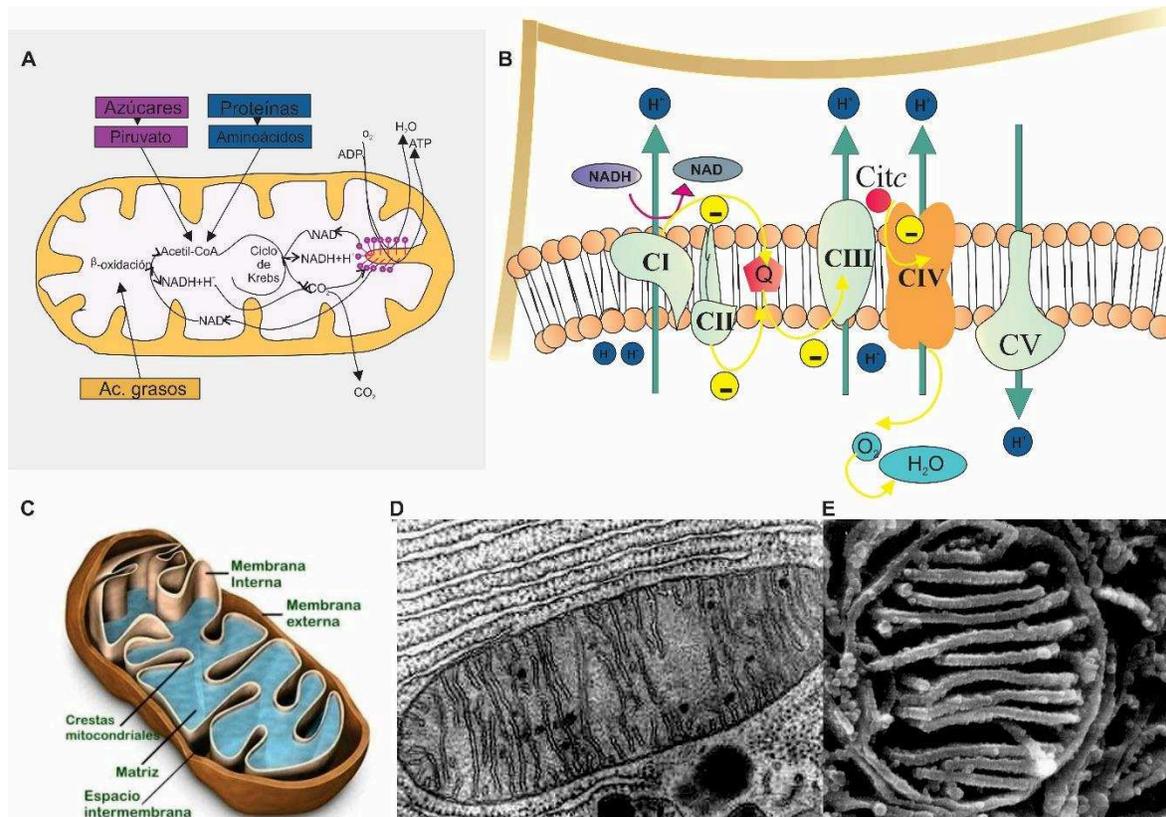
### 4.1. MITOCONDRIAS, FUNCIONES GENERALES.

Las mitocondrias son organelas subcelulares, semiautónomas, de doble membrana, distribuidas en los reinos animal, vegetal, fungi y protista. Dado que presentan genoma propio y maquinaria replicativa y de traducción, aumentan su número por fisión de manera independiente de la maquinaria de la célula en la que residen. Es decir, son independientes de la división celular.

Las mitocondrias tienen como funciones principales la oxidación de los ácidos orgánicos a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la generación de energía disponible en forma de ATP (adenosina trifosfato) (Figura 1 A-B). Los procesos que permiten la generación de ATP se encuentran compartimentalizados dentro de las mitocondrias como consecuencia de la presencia de dos membranas, membrana externa (ME) y membrana interna (MI). Entre las dos membranas queda delimitado un espacio intermembrana (IMS), mientras que la MI delimita la matriz mitocondrial (Figura 1 C-D). La ME está formada principalmente por poros proteicos que permiten el ingreso de iones y moléculas menores a 40 kDa mientras que la MI es más selectiva, similar a la membrana plasmática de eucariotas. En la MI se encuentran integrados cinco complejos multienzimáticos encargados de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Figura 1 B).

En la forma más clásica de describir la respiración, ésta se basa en la transferencia lineal de electrones desde las coenzimas NADH o FADH<sub>2</sub> hasta el oxígeno molecular. Los electrones (2e) provenientes del NADH son transferidos al complejo I en forma acoplada al transporte de 4 protones (H<sup>+</sup>). El complejo I transfiere estos electrones al complejo III a través de la ubiquinona. El complejo II transporta los electrones provenientes del FADH<sub>2</sub> hacia la ubiquinona sin transportar H<sup>+</sup>. Luego, el complejo III o citocromo c reductasa transfiere los electrones de la ubiquinona reducida al citocromo c (oxidado), proceso acoplado al transporte de 2H<sup>+</sup>. Finalmente, el complejo IV toma los electrones de a uno del citocromo c (reducido), transportando 2H<sup>+</sup>. Los electrones provenientes del citocromo c son empleados para la conversión del oxígeno a agua. La energía proveniente del gradiente

de protones es utilizada por la ATP sintetasa para producir ATP a partir de ADP cuando los protones regresan a la matriz a favor del gradiente de concentración (Figura 1 B).

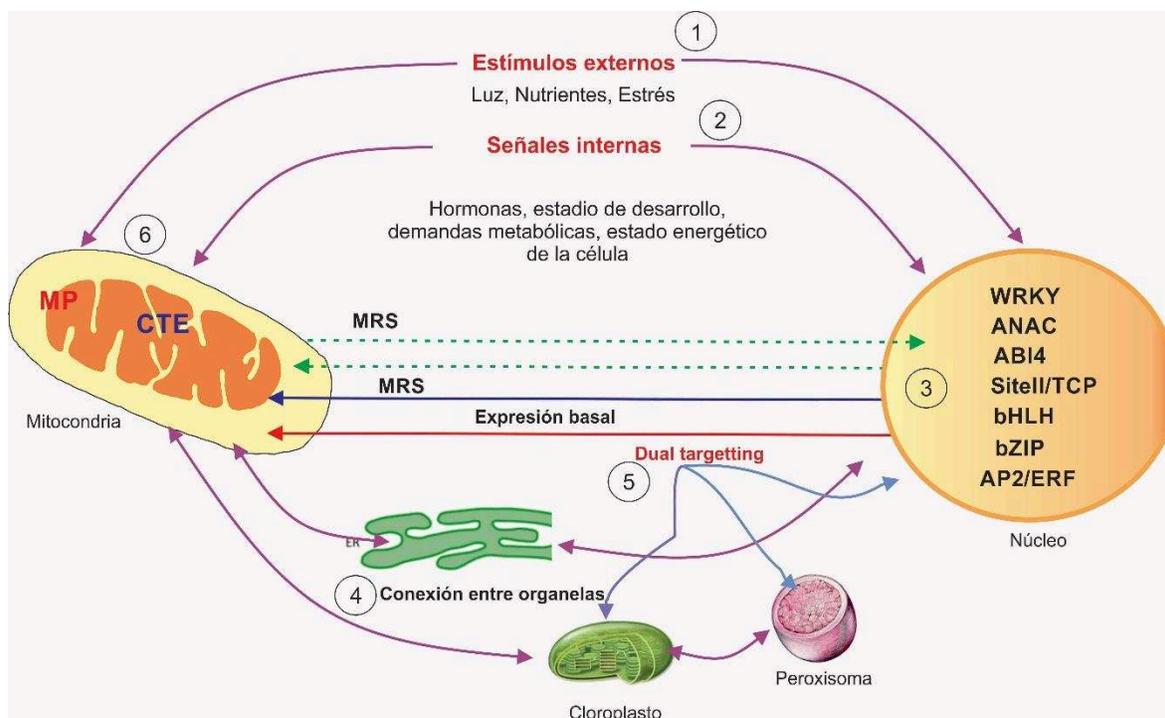


**Figura 1. Mitochondrias, función y estructura.** **A.** Diagrama de las reacciones que ocurren en la matriz mitocondrial y permiten la generación de equivalentes reductores que ingresan a la cadena transportadora de electrones. **B.** Diagrama de los complejos respiratorios de la MI de la mitocondria. La flecha amarilla muestra la dirección del transporte de electrones (círculos amarillos). La flecha verde indica el sentido del movimiento de los protones ( $H^+$ ). **C.** Diagrama tridimensional que indica las membranas mitocondriales y los espacios delimitados por las mismas. **D.** Micrografía electrónica de barrido de una mitocondria (corte longitudinal). **E.** Micrografía electrónica de transmisión de una mitocondria (corte transversal).

#### 4.2. LA IMPORTANCIA DE LAS MITOCONDRIAS EN ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS.

La naturaleza sésil de las plantas les ha permitido desarrollar diversos mecanismos para completar los distintos estadios de su desarrollo, aún bajo situaciones adversas o anómalas (Dangl y Jones, 2001; Esmon y col., 2005; Vickers y col., 2009). De esta forma, las plantas integran distintos caminos de señales, detectando información posicional específica que les permita modular la actividad energética dentro de la célula, cubriendo las demandas estructurales de crecimiento y de desarrollo. De forma resumida, las plantas

integran señales que provienen del ambiente (señales nutricionales, de temperatura y calidad de luz) y de su interacción con el entorno (interacción con patógenos) (Catalá y col., 2011; Depuydt y Hardtke, 2011; Ostaszewska y col., 2014). Las señales detectadas en el exterior se transmiten al interior mediante vías que involucran hormonas, sistemas redox (glutación y ascorbato) y especies reactivas del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs), entre otras (Baudouin y Hancock, 2014; Considine y Foyer, 2014; Sierla y col., 2013). Este sistema de relevamiento de información está sujeto al reloj circadiano y es específico de tejido, órgano y especie (De Vleeschauwer y col., 2013). La mitocondria cumple un rol central en la integración de dichas señales (Colombatti y col., 2014; Jacoby y col., 2012; Schwarzländer y Finkemeier, 2013; Welchen y col., 2014). Estas organelas regulan su organización proteica, composición, forma y número permitiendo un fino ajuste de las actividades metabólicas asociadas con la síntesis de moléculas energéticas, moléculas que intervienen en el metabolismo redox y mensajeros secundarios (Schwarzländer y Finkemeier, 2013) (Figura 2).



Modificado de Welchen y col., 2014

**Figura 2. Regulación de la biogénesis mitocondrial en plantas.** La actividad mitocondrial debe integrar diversas señales, tanto externas (1) como internas (2). Dichas señales modifican la expresión de diversas familias de factores de transcripción (3). Los factores de transcripción de las familias TCP, bHLH, bZIP y AP2/ERF estarían involucrados en la regulación de la biogénesis mitocondrial y sus variaciones en diferentes condiciones de crecimiento (e.j. estrés). La expresión dual de proteínas en distintas organelas constituye un punto de comunicación entre la mitocondria y el ambiente celular (4 y 5). La interacción física y funcional entre los complejos transportadores de electrones y los complejos de importación (MP) contribuyen a la regulación de la expresión génica y el ensamblaje de las proteínas (6). La mitocondria puede generar señales que modifican la expresión génica para ajustarla a las demandas energéticas de la célula (7). Factores de transcripción de las familias ANAC y WRKY y el factor ABI4 ha sido involucrados en la señalización retrógrada mitocondrial (MRS).

El desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se enmarca dentro de una línea de investigación que intenta profundizar nuestro conocimiento sobre la biogénesis mitocondrial en plantas. En particular, esta línea de trabajo intenta entender cómo la mitocondria coordina la actividad respiratoria con las demandas celulares y con las demandas del entorno. A continuación se desarrollan algunos conceptos necesarios para entender el objetivo e interpretar los resultados presentados dentro de esta línea de investigación.

#### 4.3. LAS MITOCONDRIAS EN PLANTAS.

La fotosíntesis y la respiración son los principales procesos metabólicos que permiten la producción energética. Mientras la fotosíntesis requiere energía lumínica, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O para la generación de carbohidratos y O<sub>2</sub>, la respiración utiliza estos carbohidratos para producir intermediarios carbonados, equivalentes reducidos y energía en forma de ATP, con la concomitante reducción del oxígeno a agua.

La glicólisis, el ciclo de oxidación de las pentosas fosfato y el TCA son las principales vías metabólicas que utilizan los carbohidratos provenientes de la fotosíntesis para producir intermediarios carbonados para los procesos biosintéticos (Ferne y col., 2004). La oxidación de carbohidratos está asociada a la producción de equivalentes reducidos en la forma de NADH o NAD(P)H. Estos equivalentes serán utilizados en las vías de biosíntesis o serán incorporados a los complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

El proteoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) ha sido ampliamente caracterizado a partir de la aplicación de diferentes estrategias de electroforesis (Heazlewood y col., 2004; Krufft y col., 2001; Lee y col., 2011; Millar y col., 2001; Taylor y col., 2011). En función de estos resultados, más de 500 proteínas fueron identificadas como proteínas mitocondriales. Sin embargo, más de 1500 proteínas tendrían localización mitocondrial en *Arabidopsis* según programas predictivos. Es probable que las proteínas mitocondriales que presentan baja abundancia y/o alta hidrofobicidad aún no hayan sido identificadas. Gran parte de las proteínas mitocondriales integran complejos proteicos (e.j. los complejos de la cadena transportadora de electrones). Nuevamente, solo los complejos de elevada abundancia han sido caracterizados (Klodmann y col., 2011).

A continuación se describe la composición de los complejos respiratorios de *Arabidopsis*, dado que es la planta modelo de estudio en este trabajo de tesis, tratando de incluir la comparación con otras especies en las que se hubiese descrito la estructura de los mismos. Hasta el momento se han descrito los complejos respiratorios de papa (*Solanum tuberosum*, Jansch y col., 1996 [16 proteínas]; Bykova y col., 2003 [8 proteínas]),

Arabidopsis (Werhahn y Braun, 2002 [14 proteínas]; Gieggé y col., 2003 [26 proteínas]), arroz (*Oryza sativa*; Heazlewood y col., 2003a [57 proteínas]; Millar y col., 2004b [18 proteínas]) y *Arum maculatum* (Sunderhaus y col., 2010 [9 proteínas]).

---

#### 4.3.1. COMPLEJOS RESPIRATORIOS EN PLANTAS.

**Complejo I o NADH deshidrogenasa.** El complejo I (CI) cataliza la transferencia de electrones del NADH, proveniente del TCA, hacia el *pool* de ubiquinona (Q). En forma acoplada a esta reacción de oxidorreducción el CI transporta electrones a través de la cadena interna mitocondrial. Estudios de microscopía electrónica muestran que este complejo se compone de dos brazos dispuestos en una conformación ortogonal adquiriendo una forma en L. Uno de los brazos es hidrofóbico y se encuentra embebido en la membrana interna mientras que el otro, hidrofílico, alcanza la matriz mitocondrial (Hunte y col., 2010). Las subunidades que forman el CI han sido caracterizadas en distintos reinos. El estudio de este complejo en arroz (*Oryza sativa*), Arabidopsis y *Chlamydomonas reinhardtii* ha permitido identificar subunidades específicas de plantas (Dubinin y col., 2011; Heazlewood y col., 2003b; Klodmann y Braun, 2011). En Arabidopsis se han identificado al menos 40 subunidades, 9 de las cuales son de codificación mitocondrial (subunidades NAD), formando 10 subcomplejos que se distribuyen entre el brazo hidrofóbico y el brazo hidrofílico (Klodmann y col., 2010). Dentro de las subunidades que son específicas de plantas, muchas forman parte de un dominio específico de plantas asociado a la membrana interna y ubicado hacia la matriz mitocondrial. Este dominio presenta una forma esférica y está constituido por cinco proteínas tipo  $\gamma$ -anhidrasa carbónica (CA). La función de este dominio adicional no ha sido elucidada; sin embargo, se ha propuesto que estaría involucrado en la transferencia de CO<sub>2</sub> en la célula para proveer CO<sub>2</sub> mitocondrial para la fijación de carbono en el cloroplasto (Martin y col., 2009). Otra particularidad de plantas es la asociación estructural entre la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH) y el CI (Klodmann y col., 2010). La presencia de subunidades específicas en el reino vegetal le proporciona al CI funciones adicionales, además de las reacciones de oxidorreducción asociadas al transporte de electrones. Se ha propuesto que el CI es necesario para

mantener el balance redox durante la fotosíntesis; además, la presencia de la GLDH proporciona una conexión directa con la síntesis de ascorbato y de manera indirecta con el transporte de electrones en el cloroplasto (Bartoli y col., 2006; Szarka y col., 2013; Talla y col., 2011). La presencia de subunidades específicas en plantas podría evidenciar la necesidad de las mitocondrias vegetales de intercambiar y coordinar información con el cloroplasto.

**Complejo II (CII) o succinato deshidrogenasa (SDH).** El complejo SDH forma parte tanto del TCA como de la cadena transportadora de electrones, permitiendo la transferencia de electrones hacia la Q a partir de la reducción del succinato a fumarato. Este complejo enzimático es el único que emplea FAD como cofactor. El CII está constituido por 8 subunidades en *Arabidopsis*, 4 de las cuales no encuentran homología con subunidades del CII en mamíferos o en bacterias (Millar y col., 2004). En forma similar a lo observado para el CI, la composición del complejo SDH difiere según la especie vegetal, si bien en general se conservan las 4 subunidades específicas mencionadas. Las mutantes en las subunidades de codificación nuclear SDH1 y SDH2 han sido ampliamente estudiadas (Huang y col., 2010). La disminución en la expresión de estas subunidades tiene un claro efecto sobre la eficiencia fotosintética, aumentando la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> y la conductancia estomática (Araujo y col., 2011; Fuentes y col., 2011). Por otro lado, la deficiencia en el factor de ensamblaje SDHF2 (de sus siglas en inglés *Succinate Dehydrogenase Factor 2*) altera el desarrollo normal de la raíz debido a una disminución en el consumo de oxígeno (Huang y col., 2013).

**Complejo III (CIII) o citocromo c reductasa.** El complejo citocromo c reductasa es el tercer complejo de la cadena transportadora de electrones y cataliza la oxidación de la dihidroquinona<sup>1</sup> (QH<sub>2</sub>) a partir de la reducción del citocromo férrico. De esta manera se transportan 2 protones al IMS. El CIII en plantas está formado por 10 subunidades. Las subunidades citocromo *b*, citocromo *c*<sub>1</sub> y la proteína RIESKE participan en el transporte de electrones, mientras que otras dos subunidades forman el núcleo respiratorio. Seis de las

---

<sup>1</sup> Ubiquinona reducida

subunidades de este complejo se presentan en forma de dímeros ( $\alpha$ -MPP, citocromo  $c_1$ , proteína de FeS, QCR6<sup>2</sup>, QCR7 y QCR8) (Klodmann y col., 2011; Meyer y col., 2008).

**Complejo IV o citocromo c oxidasa (COX).** COX es el complejo terminal de la cadena transportadora de electrones, encargado de transportar dos electrones desde el citocromo c al oxígeno para convertirlo en agua. En *Arabidopsis* se han identificado 14 subunidades para este complejo. COX1, COX2, COX3, COX Vb, COX Vc, COX VIa, COX VIb, COX VIc y COX X1-X6. Las subunidades COX X1 a COX X6 son específicas de plantas (Millar y col., 2004). Este complejo se presenta en dos isoformas, ninguna de las cuales incluye todas las subunidades: una mayor denominada IVa (350 kDa) y una menor denominada IVb (280 kDa). Estas estructuras menores del CIV han sido encontradas formando parte de supercomplejos mitocondriales (Eubel y col., 2004; Klodmann y col., 2011). El núcleo de este complejo está formado por las tres subunidades de codificación mitocondrial (COX1, COX2 y COX3). Las subunidades COX1 y COX2 requieren la inserción de iones metálicos como cobre (Cu), hierro (Fe) y manganeso (Mn). La subunidad COX1 coordina un centro metálico binuclear formado por un átomo de Cu ( $Cu_B$ ) y un átomo de hemo $a_3$ , mientras que la subunidad COX2 contiene un centro de Cu bivalente ( $Cu_A$ ).

**Supercomplejos mitocondriales.** Los supercomplejos se definen como asociaciones de proteínas complejas cuya formación es beneficiosa para una función celular particular (Eubel y col., 2004). La formación de supercomplejos entre los complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria fue descrita hace más de diez años como un mecanismo que permite aumentar u optimizar el transporte de electrones entre los complejos I a IV disminuyendo la distancia de difusión de los electrones (Krause y col., 2004; Lenaz y Genova, 2012). En este sentido, el CII no forma supercomplejos dado que solo necesita interactuar con la Q. La formación de supercomplejos parece ser una característica conservada entre organismos eucariotas (Eubel y col., 2003). La estructura supramolecular de estos complejos ha sido estudiada sistemáticamente a través de la solubilización de las membranas mitocondriales con detergentes y posterior separación en geles *Blue Native* (BN) y segunda dimensión en SDS-PAGE (Meyer y col., 2008). En

---

<sup>2</sup>Proteína "hinge" o bisagra

Arabidopsis el supercomplejo más abundante incluye al CI y al CIII en una relación 1:2 (CI:III<sub>2</sub>). Los supercomplejos de menor abundancia incluyen la asociación CI<sub>2</sub> + CIII<sub>4</sub>, II<sub>2</sub> + IV(1-2) y, finalmente, el supercomplejo I<sub>1</sub> + II<sub>2</sub> + IV(1-4), denominado “respirasoma”<sup>3</sup> (Klodmann y col., 2011; Krause y col., 2004). Sin embargo, la composición de los supercomplejos es dependiente del tejido, de la condición de crecimiento de la planta y de la técnica que se emplee para la purificación de los mismos (Liu y col., 2008; Ramirez-Aguilar y col., 2011).

---

#### 4.3.2. TRANSPORTE ALTERNATIVO EN PLANTAS.

El proteoma mitocondrial es altamente dependiente de la especie que se estudie y del contexto celular en el cual se encuentre la organela (Lotz y col., 2014). En plantas y hongos, la característica distintiva respecto de otros eucariotas es la presencia de una cadena respiratoria ramificada, como consecuencia de la presencia de dos vías de respiración alternativas representadas por la enzima oxidasa alternativa (AOX) y las enzimas NAD(P)H deshidrogenasas (NDs) de Tipo II alternativas (Kerscher, 2000; van Dongen y col., 2011) (Figura 3). La presencia de una amplia variedad de NDs en plantas tiene como consecuencia que los puntos de ingreso de electrones a la cadena transportadora de electrones se diversifiquen respecto de otros eucariotas (Schertl y Braun, 2014). La segunda característica distintiva de las mitocondrias en células de especies fotosintéticas es el hecho de que deban coexistir y cooperar funcionalmente con otra organela como el cloroplasto (Yoshida y Noguchi, 2011). La necesidad de esta coexistencia podría explicar las diferencias observadas entre los complejos de plantas y los complejos mitocondriales en otros reinos (Schertl y Braun, 2014). Finalmente, las enzimas de la vía alternativa no forman supercomplejos; sin embargo, algunos autores proponen que la formación de estas supraestructuras podría regular indirectamente la actividad de las vías alternativas. Se ha observado, además, que las enzimas NAD(P)H deshidrogenasas

---

<sup>3</sup> Esta denominación es consecuencia de la capacidad de este supercomplejo de consumir oxígeno en presencia Q y citocromo c.

forman complejos de 160 kDa (Klodman y col., 2011) o de 150-700 kDa (Rasmusson y Aguis, 2001).

En esta sección se describen las vías alternativas y se incluye la descripción de las proteínas desacoplantes (UCP, de su nombre en inglés *Uncoupling Proteins*), si bien no han sido tradicionalmente descritas como miembros de la vía de respiración alternativa.

La presencia de vías alternativas ramifica el transporte lineal de electrones en dos puntos. La primera ramificación ocurre entre el CI y la Q debido a la presencia de enzimas NDs alternativas que transportan electrones desde el NADH o el NADPH sin necesidad de la actividad del CI. El segundo punto de ramificación ocurre entre la QH<sub>2</sub> y el CIII. La AOX toma los electrones de la QH<sub>2</sub> para reducir el oxígeno a agua, evitando el pasaje de los electrones al CIII y posteriormente al CIV. La presencia de vías respiratorias alternativas le permite a las plantas un nivel más de regulación y coordinación entre la producción de ATP y el proceso metabólico a partir del cual derivan los equivalentes reductores NADH y NADPH (NAD(P)H).

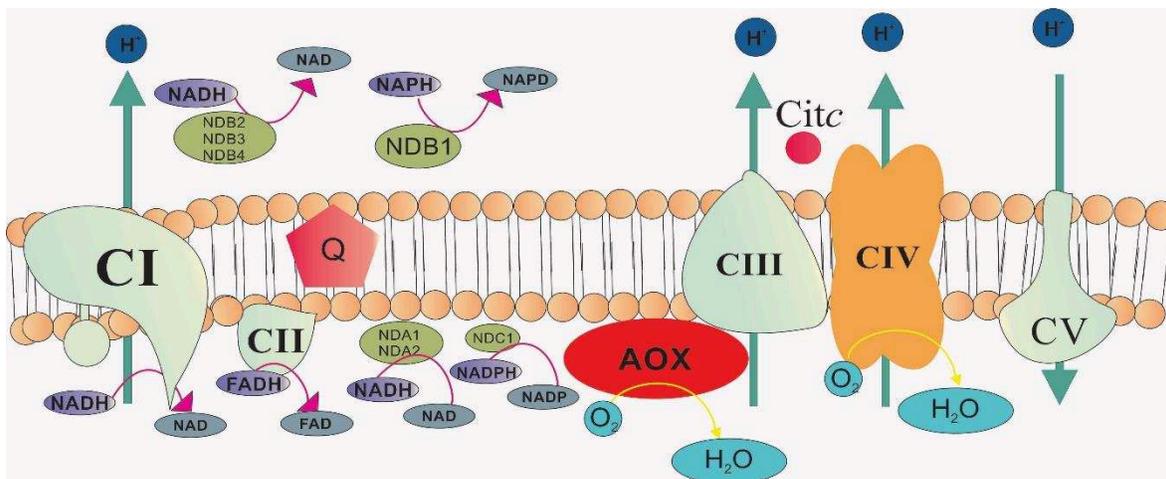


Figura 3. Esquema de la cadena de transporte de electrones en plantas. Se muestran los complejos respiratorios comunes a los organismos eucariotas (CI, CII, CIII, CIV y CV) y las vías alternativas (NAD(P)H deshidrogenasas y AOX) presentes en el reino vegetal. Q: ubiquinona.

**NAD(P)H deshidrogenasas alternativas.** La primera vía alternativa está integrada por un grupo de enzimas deshidrogenasas que transportan los electrones del NADH o del NADPH a la Q, pertenecientes a la familia de NDs de Tipo II. Estas enzimas se localizan tanto hacia la matriz mitocondrial como hacia el IMS. Es importante recordar que la MI no

es permeable al pasaje del NADH o del NADPH, con lo cual esta membrana separa físicamente los equivalentes de reducción provenientes de la matriz, originados en el TCA, de los provenientes del IMS o del citosol. Esta separación física regula la lanzadera de malato/oxalacetato, la que crea una conexión entre el estado de reducción del citosol y la matriz mitocondrial.

Las NDs del IMS se denominan deshidrogenasas externas, mientras que las de la matriz se denominan deshidrogenasas internas. En *Arabidopsis* se han identificado tres familias de genes que codifican enzimas NDs Tipo II, denominadas NDA, NDB y NDC. La familia NDA codifica dos NDs internas (NDA<sub>1</sub> y NDA<sub>2</sub>), la familia NDB codifica tres NDs externas (NDB<sub>2</sub>, NDB<sub>3</sub> y NDB<sub>4</sub>) y una ND externa (NDB<sub>1</sub>) y la familia NDC codifica solo una ND interna (NDC<sub>1</sub>) (Elhafez y col., 2006). Los primeros resultados obtenidos en relación a la localización de las NDs Tipo II habían mostrado que estas enzimas tenían localización mitocondrial; sin embargo, resultados posteriores muestran que varios de los integrantes de esta familia presentan localización dual, mitocondria-cloroplasto o mitocondria-peroxisoma (Carrie y col., 2008). Sin embargo, la función de estas enzimas en cloroplastos y peroxisomas aún no ha sido dilucidada (Wallstrom y col., 2014).

En forma similar a la vía de la AOX, la actividad ND no está acoplada al transporte de H<sup>+</sup>. Sin embargo, estas enzimas emplean los electrones provenientes de las nicotinamidas para reducir la Q, imitando la función del CI. Nuevamente, la Q reducida luego es oxidada por el CIII para transportar electrones al citocromo c y, finalmente, al CIV. De acuerdo con esto, la respiración dependiente de ND es inhibida por el inhibidor del CIII antimicina A<sup>4</sup>, el inhibidor del CIV cianuro y una relación ADP:Oxígeno mayor a 1:2, pero no por el inhibidor del complejo I rotenona. Además, la actividad de las deshidrogenasas externas es regulada por cationes divalentes como el calcio (Ca) y por cambios en los niveles de pH. Esta regulación no ocurre para las deshidrogenasas internas (Rasmusson y col., 2004).

Si bien la actividad ND externa ha sido demostrada tiempo atrás, su rol fisiológico aún es materia de debate. La función de estas enzimas debe entenderse considerando que

---

<sup>4</sup> La antimicina A inhibe el transporte entre el CIII y el CIV.

en plantas son capaces de regular los niveles de reducción del NADH y del NADPH. Dada la multiplicidad de rutas metabólicas que incluyen a estas moléculas, es de esperarse que participen en gran parte de los procesos celulares. Las deshidrogenasas externas podrían regular y/o detectar el estado de reducción del NADH y del NADPH en el citoplasma. De esta manera, podrían influenciar la actividad de vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del carbono, la asimilación de nitrógeno, la defensa ante patógenos y la actividad de vías de biosíntesis y de respuesta a estrés abiótico (Rasmusson y col., 2004; Rasmusson y Wallstrom, 2010). Recientemente, se ha demostrado que plantas de *Arabidopsis* mutantes en la enzima NDB1 (ND externa) presentan niveles reducidos de NADP<sup>+</sup>. Esta reducción disminuye los niveles de azúcares solubles y los intermediarios del TCA en hojas. Además, las plantas *ndb1* modifican la expresión de genes que participan en la defensa ante patógenos mediada por el ácido jasmónico. Finalmente, la reducción de la actividad NDB1 afecta el normal desarrollo de las hojas en plantas de *Arabidopsis* (Wallström y col., 2014). Resultados obtenidos en plantas de tabaco (*Nicotiana sylvestris*) que expresan la enzima NDB1 de papa muestran que esta enzima regula los niveles de NADP<sup>+</sup>/NADPH en hojas, sin modificar la relación NAD/NADH. Además, la disminución de la expresión de NDB1 incrementa la expresión de genes de la vía de la AOX de manera similar a lo observado en mutantes del CI (mutantes CMSII) (Liu y col., 2008). Si bien la enzima NDB1 es regulada por luz, en las plantas con niveles alterados no se observaron cambios en el estado de oxidorreducción del cloroplasto. Esto indicaría que la regulación de los equivalentes de reducción exportados desde el cloroplasto no estaría asociada al estado de oxidorreducción del citosol (Liu y col., 2008). Se ha sugerido que la principal vía que es afectada por cambios en la relación NADP/NADPH en el citosol es el ciclo de la oxidación de las pentosas fosfato (Rasmusson y Wallstrom, 2010).

La actividad ND Tipo II ha sido ampliamente asociada al proceso de fotorrespiración y a la respuesta a estrés abiótico (Vanlerberghe y col., 2009). La fotorrespiración incrementa drásticamente la producción de NADH en la matriz mitocondrial. La actividad deshidrogenasa alternativa podría regular el estado reducido del NADH evitando la saturación de la cadena transportadora de electrones. En este punto, es necesaria la

actividad coordinada de las NDs alternativas y la actividad de la vía de la AOX. De acuerdo con esta idea, los genes que codifican proteínas de las vías alternativas se encuentran coordinadamente regulados a nivel transcripcional durante situaciones de estrés y en diferentes estadios del desarrollo (Clifton y col., 2006; Ho y col., 2007; Rasmusson y col., 2009; Van Aken y col., 2009b). Considerando este resultado, la deshidrogenasa NDB<sub>2</sub> (ND externa), la NDA<sub>2</sub> (ND interna) y una de las isoformas de AOX (AOX<sub>1a</sub>) integrarían una misma vía alternativa coordinada. Ho y col. (2007) han propuesto que la enzima NDB<sub>4</sub> regularía de manera coordinada con la vía de la AOX (a través del producto génico de AOX<sub>1c</sub>) el estado redox de la célula en diferentes estadios del desarrollo. Notablemente, plantas de *Arabidopsis* mutantes en NDB<sub>4</sub> presentan alteraciones en el desarrollo de las hojas en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, bajo condiciones de estrés las plantas mutantes inducen genes que codifican la vía de la AOX y los genes que codifican NDB<sub>2</sub> y NDB<sub>1</sub>. Esta reorganización transcripcional explicaría la mayor tolerancia a estrés por NaCl evidenciada en estas plantas.

**La oxidasa alternativa.** La enzima AOX es una ubiquinol oxidasa presente en la mitocondria de la mayoría de las plantas estudiadas y en otros organismos como hongos y protistas, incluyendo microorganismos patógenos como *Trypanosoma brucei* y *Cryptosporidium parvum*. En  $\alpha$ -proteobacterias y en algunas especies primitivas del reino animal también se han encontrado homólogos de esta enzima (Vanlerberghe, 2013).

AOX ha sido localizada en la MI de la mitocondria de distintas eucariotas. En plantas, la forma activa de la enzima es un homodímero (Moore y Albury, 2008; Moore y col., 2013). Aparentemente, esta sería una particularidad de plantas dado que los homólogos de AOX en hongos y en protistas pierden las cisteínas necesarias para la formación del homodímero (Umbach y col., 2006; Umbach y Siedow, 2000). Si bien no se la ha encontrado asociada a ninguno de los supercomplejos mitocondriales hasta ahora conocidos se cree que la inclusión o no de AOX en supercomplejos es dinámica (Kakizaki y col., 2012).

AOX cataliza la oxidación de la QH<sub>2</sub>, transfiriendo los electrones necesarios para la reducción del oxígeno a agua. Considerando los sustratos y los productos de la catálisis de esta enzima, AOX puede cumplir la función oxidativa realizada por los complejos III y IV en

la mitocondria. Dado que esta enzima no puede transportar  $H^+$ , el transporte de electrones mediado por AOX produce una reducción dramática de la producción de ATP. Sin embargo, si los electrones aún ingresan a través del CI, AOX puede mantener una producción mínima de ATP (Vanlerberghe, 2013).

En plantas, se ha sugerido que esta vía alternativa cumpliría un rol clave durante el metabolismo celular y ante situaciones de estrés biótico y abiótico (Van Aken y col., 2009a). Se propone que esta enzima podría aliviar el transporte de electrones acoplado a la producción de ATP. De esta manera, actuaría como un componente amortiguador entre el metabolismo del carbono y la producción de energía. Además de una función en el metabolismo primario, se cree que esta enzima podría actuar como una molécula de señalización, indicando el estado reducido u oxidado de la mitocondria. AOX podría regular los niveles de especies reactivas del oxígeno (EROs) y de las especies reactivas del nitrógeno (ERNs), a través de la regulación de los niveles de moléculas antioxidantes como el glutatión (GSH) y el ascorbato (Millar y col., 2011) o modificando la expresión de genes nucleares de respuesta a estrés (Van Aken y col., 2009a; Van Aken y col., 2009b). En el reino vegetal, la AOX está codificada por dos subfamilias génicas, *AOX1* y *AOX2*. En plantas dicotiledóneas se han encontrado genes pertenecientes a ambas subfamilias, mientras que en monocotiledóneas solo se han identificado genes pertenecientes a la subfamilia *AOX1* (Considine y col., 2002). Los genes pertenecientes a la subfamilia *AOX1* son inducidos antes diversas situaciones de estrés, mientras que los genes pertenecientes a la subfamilia *AOX2* no responden a situaciones adversas pero presentan una expresión diferencial según el órgano y el estadio de desarrollo de la planta (Clifton y col., 2006; Finnegan y col., 1997; Van Aken y col., 2009a). En *Arabidopsis* se han identificado cinco genes que codifican AOX, *AOX1a-d* y *AOX2* (Saish y col., 2001). Los primeros estudios que intentaron dilucidar la función y regulación de AOX en *Arabidopsis* muestran que *AOX1a* es inducido por los inhibidores de los complejos de la cadena respiratoria, inhibidores del TCA e inhibidores del flujo de calcio, así como por diversas situaciones de estrés biótico y abiótico (Juszczuk y col., 2012; Vanlerberghe y McIntosh, 1996). El análisis de la secuencia promotora de *AOX1a* y ensayos de retardo en gel permitieron identificar un elemento represor que es

unido por el factor de transcripción *ABI4* (de su nombre en inglés *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4*) (Giraud y col., 2009). Dado que *ABI4* participa en la regulación retrógrada por señales del cloroplasto, este resultado permite pensar en la existencia de un punto de coordinación entre la mitocondria y la organela fotosintética (Giraud y col., 2009). Recientemente, se ha demostrado que la sobreexpresión del factor de transcripción *WRKY15* inhibe la inducción de *AOX1a* en plantas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de estrés salino (Vanderauwera y col., 2012). Este resultado es coincidente con la existencia de cajas-*W*<sup>5</sup> en el promotor de este gen (Dojcinovic y col., 2005). Además, la expresión de *AOX1a* en *Arabidopsis* sería regulada por factores de transcripción de la familia ANAC y otros miembros de la familia WRKY (De Clercq y col., 2013; Ng y col., 2013b; Van Aken y col., 2013).

**Proteínas desacoplantes.** Hasta su descubrimiento en mitocondrias de papa, se creía que las proteínas desacoplantes (UCP) eran una evolución tardía solo presente en el tejido pardo de mamíferos (Vercesi y col., 1995). Estas proteínas permiten el transporte de aniones lipídicos a través de la MI. Los aniones lipídicos inducen el transporte de  $H^+$  (Garlid y col., 1996). Este mecanismo le permite a la mitocondria desacoplar el transporte de protones hacia la matriz de la producción de ATP. Se ha propuesto que los aniones de ácidos grasos son producto de reacciones de peroxidación lipídica en la matriz mitocondrial, consecuencia de la generación de EROs (Vercesi y col., 2006). Las especies reactivas pueden originarse como subproductos de la respiración (ver en la próxima sección) o como consecuencia de una situación adversa. Cualquiera fuese el caso, la presencia de las UCP permite mantener, o incluso incrementar, la tasa de transporte de electrones aun cuando los niveles de ATP son elevados (Smith y col., 2004). Recientemente, se descubrió que plantas de tabaco que sobreexpresan la *UCP1* son capaces de tolerar situaciones de estrés osmótico y de toxicidad por iones  $Na^+$  (Begcy y col., 2011). Finalmente, la actividad de estas proteínas no solo influiría sobre el gradiente de membrana sino también sobre la actividad del TCA (Smith y col., 2004).

---

<sup>5</sup> Elementos reconocidos por los proteínas de la familia WRKY

#### 4.3.3. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS EN LA MITOCONDRIA.

Como resultado de la actividad respiratoria, las mitocondrias son organelas productoras de EROs (mtEROs). El transporte de electrones mediante los complejos I, III y IV puede generar aniones superóxido ( $O_2^-$ ) dado que los electrones que se transportan tienen suficiente energía libre para reducir directamente el oxígeno molecular. Los aniones  $O_2^-$  generados luego serán dismutados a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como consecuencia de la actividad de la enzima superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) (Moller, 2001). Esta isoforma se ha localizado en la matriz mitocondrial (Kliebenstein y col., 1998). Luego, parte del  $H_2O_2$  producido en la matriz podría ser detoxificado por enzimas del sistema de peroxirredoxinas o por enzimas del ciclo ascorbato-glutatión (Dietz y col., 2006; Locato y col., 2009). Además, el  $H_2O_2$  puede reaccionar con cationes  $Fe^{2+}$  o  $Cu^+$  para producir radicales aún más tóxicos. Dada la falta de polaridad del  $H_2O_2$ , esta molécula puede atravesar las membranas mitocondriales, abandonar la mitocondria y salir al citosol (Moller y Sweetlove, 2010; Morgan y col., 2008).

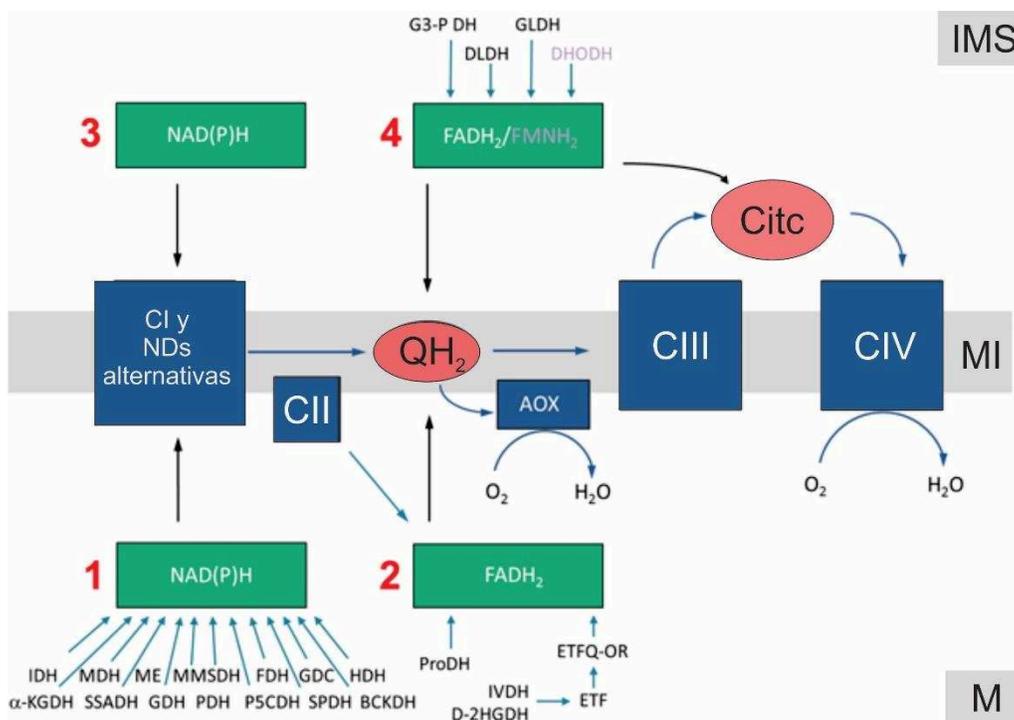
La producción de  $O_2^-$  en la mitocondria se incrementa cuando la organela no produce ATP, ya que entonces el  $\Delta p$  es elevado y las relaciones  $NADH/NAD^+$  y  $QH_2/Q$  se incrementan. Este es un mecanismo común en organismos eucariotas (Blokhina y Fagerstedt, 2010; Cvetkovska y col., 2013a; Navrot y col., 2007). Los electrones de la  $QH_2$  formados entre el CI y el CIII son altamente reactivos y pueden atacar el oxígeno molecular (Moller, 2001). Este principio se ha demostrado en mitocondrias aisladas, donde la producción de  $O_2^-$  se incrementa de una manera dependiente de sustrato y en presencia de inhibidores del CIV y de la AOX en plantas (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2012; Moreno-Sanchez y col., 2013). Además, en células de mamífero se ha postulado que la actividad del CII es la determinante de la producción de mtEROs (Moreno-Sanchez y col., 2013). En condiciones normales de funcionamiento, la producción de  $O_2^-$  es mínima y no hay evidencias de que bajo estas condiciones las mtEROs generen algún tipo de daño (Sena y Chandel, 2012). Sin embargo, cuando los niveles de mtEROs se incrementan, estos pueden generar daño a nivel del ADN mitocondrial (mtADN), de los complejos mitocondriales y de los lípidos que constituyen las membranas (Kristensen y col., 2004; Millar y Leaver, 2000;

Rhoads y col., 2006; Rurek, 2014). El daño o la alteración en la función mitocondrial podría originar una cascada de consecuencias que incluyen la modificación de la transcripción (comunicación retrógrada) e incluso la muerte celular (Schwarzlander y col., 2012; Simon y col., 2000). Sin embargo, las mtEROs, podrían actuar como moléculas de señalización sin generar un daño y transmitiendo el estado oxidativo de los diferentes compartimentos de la célula (Hamanaka y Chandel, 2010).

La implicancia de las EROs producidos en la célula durante la repuesta a estrés en plantas ha sido ampliamente demostrada (revisado en Sharma y col., 2012). Además, su función no se restringe a la respuesta a estrés sino que actúan como reguladores de distintos procesos (Considine y Foyer, 2014; Karkonen y Kuchitsu, 2014). El estudio del rol de las mtEROs, distinguiéndolas de las EROs generadas en el resto de la célula, es complejo y dicha complejidad se evidencia en las escasas publicaciones que distinguen el origen de las EROs producidas. Se ha demostrado que, en células de la raíz, las mitocondrias son las principales productoras de EROs tanto en condiciones adecuadas de crecimiento como en presencia de ácido salicílico (Gleason y col., 2011). Además, la disminución de la actividad del CII disminuye los niveles de  $H_2O_2$  mitocondriales, generando plantas incapaces de activar la expresión del gen *GST8* (*GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE 8*). La falta de expresión de *GST8* o la falta de señalización mediada por  $H_2O_2$  mitocondrial genera plantas más sensibles al ataque por patógenos fúngicos (Gleason y col., 2011). En línea con esta idea, un estudio reciente en el cual analizan las mtEROs mediante microscopia sugiere que la generación de aniones superóxido en la mitocondria es una señal necesaria para que se desencadene la respuesta hipersensible en plantas de tabaco infectadas con *Pseudomonas syringae* incompatible pv. Maculicola (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2012). En forma contraria a lo observado en las plantas deficientes en el CII, las plantas mutantes en *AOX1a* aumentan los niveles de las mtEROs pero presentan una respuesta hipersensible retardada luego de la infección con *P. syringae* incompatible pv. Maculicola. Los niveles de AOX en plantas determinan la magnitud de la producción de aniones superóxido en la mitocondria y la magnitud de la respuesta hipersensible (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2013).

4.3.4. VÍAS METABÓLICAS QUE HACEN INGRESAR ELECTRONES A LAS MITOCONDRIAS DE PLANTAS.

Los electrones ingresan a la cadena transportadora de electrones a través de la oxidación del NAD(P)H generado en la matriz mitocondrial, en el IMS o en el citosol debido a la actividad de diversas deshidrogenasas. Además, los nucleótidos de flavina (FADH<sub>2</sub>, FMNH<sub>2</sub>) unidos pueden hacer ingresar electrones a la cadena transportadora. Finalmente, distintas deshidrogenasas pueden ingresar electrones directamente a la Q o al citocromo c (Liu y col., 2008; Rasmusson y Wallstrom, 2010). Se pueden definir cuatro vías de ingreso de electrones a la cadena transportadora de electrones (Schertl y Braun, 2014): 1) La vía del NAD(P)H de la matriz; 2) la vía del FADH<sub>2</sub> de la matriz; 3) la vía del NAD(P)H del IMS y 4) la vía del FADH<sub>2</sub> del IMS (Figura 4).



**Figura 4. Vías metabólicas que podrían ingresar electrones a la cadena transportadora de electrones en plantas.** Los electrones ingresan a la cadena transportadora de electrones en plantas a través de distintas vías (detalladas en el cuerpo de este trabajo). **1.** Distintas deshidrogenasas transfieren electrones en forma de NADH a la cadena transportadora a través del C1. **2.** Enzimas que utilizan FAD oxidan compuestos carbonados y transfieren electrones directa o indirectamente a la ubiquinona. **3.** El NAD(P)H citoplasmático ingresa electrones a la ubiquinona a través de las deshidrogenasas alternativas. **4.** Las enzimas que contienen

FAD/FMN oxidan compuestos carbonados en el IMS y transfieren electrones directamente a la ubiquinona o al citocromo c.

1) NAD(P)H de la matriz. El NAD(P)H en la matriz es generado como consecuencia del TCA (Fernie y col., 2004) y de la actividad de distintas deshidrogenasas de la matriz. Entre ellas podemos nombrar:  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa ( $\alpha$ -KGDH), deshidrogenasa de  $\alpha$ -cetoácidos de cadena ramificada (BCKDH), formato deshidrogenasa (FDH), glicina descarboxilasa (GDC), glutamato deshidrogenasa (GDH), histidinol deshidrogenasa (HDH), isocitrato deshidrogenasa (IDH), malato deshidrogenasa (MDH), enzima málica (ME), metilmalonato deshidrogenasa (MMSDH), piruvato deshidrogenasa (PDH), pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P<sub>5</sub>CDH), succinatosemialdeído deshidrogenasa (SSADH) y sacaropina deshidrogenasa (SPDH).

2) FADH<sub>2</sub> de la matriz. El FADH<sub>2</sub> es generado en la matriz como consecuencia del metabolismo de la prolina a partir de la enzima prolina deshidrogenasa (ProDH, Szabados en Savoure, 2010) . La enzima isovaleril deshidrogenasa (IVH), involucrada en el catabolismo de los aminoácidos ramificados, y la enzima D-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa (D-2HGDH), involucrada en el catabolismo de la lisina, transfieren electrones a un sistema enzimático formado por dos flavoproteínas (Araujo y col., 2010): la enzima flavoproteína de transferencia de electrones (ETF) y la flavoproteína de transferencia de electrones-ubiquinona oxidoreductasa (ETFQ-QR)<sup>6</sup>. Las enzimas ProDH y ETFQ-QR podrían transferir electrones directamente a la Q sin necesidad de la actividad del CII (Szabados y Savoure, 2010).

3) NAD(P)H del IMS. El NAD(P)H originado en el citosol ingresa al IMS en donde será oxidado como consecuencia de la actividad de las enzimas NDs Tipo II alternativas (Rasmusson y Wallstrom, 2010).

4) FADH<sub>2</sub> del IMS. El FADH<sub>2</sub> es generado en el IMS como consecuencia de metabolismos mitocondriales específicos de plantas. El paso final de la síntesis del ascorbato en plantas se realiza en la mitocondria (Bartoli y col., 2000). La oxidación del precursor del ascorbato (L-galactono-1,4-lactona; GL), catalizada por la enzima GL

---

<sup>6</sup> El par enzimático ETF/ETFQ-QR participan en el catabolismo de la leucina y en la degradación de la clorofila en situaciones de hambre inducido por oscuridad (Ishizaki y col., 2006).

deshidrogenasa (GLDH), transfiere electrones al nucleótido de flavina de esta enzima. Además, las enzimas D-Lactato deshidrogenasa (DLDH), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y orotato deshidrogenasa (DHODH)<sup>7</sup> pueden transferir electrones a sus nucleótidos de flavina como consecuencia de la oxidación de productos carbonados. Todas estas enzimas podrían transferir electrones directamente a la Q o al citocromo c.

Las distintas vías de ingreso de electrones a la cadena de transporte de electrones de la mitocondria reflejan la flexibilidad de este proceso en plantas. Cuando las plantas crecen bajo condiciones de suficiencia de carbohidratos el TCA es el principal proveedor de NAD(P)H y FADH<sub>2</sub>. Lo mismo ocurre en tejidos no fotosintéticos o durante la noche (Sweetlove y col., 2010). Esta forma de transferencia de electrones es similar a la observada en mamíferos. Sin embargo, durante el día, cuando la fotosíntesis ocurre, los niveles de NAD(P)H provenientes del TCA disminuyen drásticamente dado que los intermediarios carbonados son utilizados para reacciones anabólicas. En paralelo, las reacciones de la fotorrespiración aumentan los niveles de NADH como consecuencia de la activación de la enzima GDC (Sweetlove y col., 2010). En situaciones adversas de crecimiento, las plantas nuevamente modifican las vías de ingreso de electrones para asegurar su supervivencia. A modo de ejemplo, cuando *Arabidopsis* es crecida en presencia de elevadas concentraciones de NaCl, el aminoácido prolina es utilizado como osmoprotector. Luego de la situación de estrés, este aminoácido es usado como una de las fuentes principales de electrones a través de la ProDH (Szabados y Savoure, 2010). De esta manera las plantas adaptan la actividad de los centros respiratorios a los requerimientos celulares, tanto en condiciones de crecimiento normal como ante situaciones de estrés.

---

#### 4.4. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL.

El termino biogénesis mitocondrial define al conjunto de eventos que derivan en la generación de una nueva organela a partir de la fisión o de la fusión de mitocondrias preexistentes. La generación de nuevas mitocondrias es un proceso altamente plástico

---

<sup>7</sup> Esta enzima participa en la síntesis de pirimidinas a partir del orotato.

dato que debe responder a las demandas energéticas celulares que dependerán tanto del estadio de desarrollo de la planta como de las condiciones ambientales.

La plasticidad de este proceso queda evidenciada por los cambios en número, tamaño y forma que sufre esta organela en función del entorno en el que se desarrolla (Palmer y col., 2011). La dinámica mitocondrial es regulada en dos niveles (Hyde y col., 2010). Uno de ellos, denominado control local, está representado por la ocurrencia de modificaciones postraduccionales que incluyen proteínas de unión a nucleótidos, fosforilaciones, ubiquitinaciones, SUMOilaciones y cambios en el ambiente lipídico (Soubannier y McBride, 2009). Estas modificaciones alteran la capacidad de la mitocondria para fusionarse, dividirse o moverse en la célula. El segundo nivel de regulación, denominado control global, está determinado por el entorno ambiental, en el cual proteínas mitocondriales de codificación nuclear, iones, segundos mensajeros y el estado redox modifican la composición mitocondrial (Hyde y col., 2010). Mediante microscopía electrónica sobre cortes de meristema apical de *Arabidopsis* se demostró que las mitocondrias sufren modificaciones arquitecturales durante el ciclo celular. Se ha sugerido que esto serviría para aumentar la eficiencia de liberación del ATP y de los eventos de recombinación del mtDNA. Otro hecho que pone en evidencia la coordinación de la dinámica mitocondrial con los requerimientos celulares es el cambio de posición de esta organela observado durante la fotosíntesis (Logan y Leaver, 2000). Se ha observado que las mitocondrias se aproximan a los cloroplastos en los tejidos fotosintéticos. Más interesante aún, las mitocondrias en tejidos fotosintéticos en condiciones de oscuridad se distribuyen aleatoriamente, mientras que se aproximan o siguen a los cloroplastos en presencia de distintas intensidades de luz (Islam y Takagi, 2010). Finalmente, la forma de las mitocondrias cambia, desde mitocondrias reticuladas a mitocondrias pequeñas y sin reticulaciones, durante la senescencia (Zottini y col., 2006). Otro cambio observado en plantas de *Arabidopsis* es el cambio de conformación de mitocondrias tubulares a mitocondrias esféricas como consecuencia de la producción de mtEROs durante la muerte celular programada (Yoshinaga y col., 2005). Estas evidencias refuerzan la idea del rol central de la mitocondria en las distintas funciones celulares.

Además de la regulación de la biogénesis en términos de la dinámica mitocondrial, la génesis mitocondrial encuentra otro nivel de regulación y complejidad. Como consecuencia de la migración de genes de la mitocondria y del cloroplasto al núcleo, el genoma de las organelas se ha empobrecido y la mayoría de los productos génicos que requieren las funciones que éstas desarrollan son codificados en el núcleo, transcritos en los ribosomas del citosol e importados a las organelas. En este contexto, el ensamblaje de los complejos respiratorios es un proceso complejo que debe coordinar la síntesis de las subunidades de codificación mitocondrial con la síntesis de las subunidades y proteínas accesorias de codificación nuclear. Es decir, requiere la coordinación entre dos genomas y sus respectivas maquinarias de traducción y la maquinaria de transporte e inserción de proteínas en las membranas mitocondriales, en la matriz o en el IMS. Distintos mecanismos permiten controlar la expresión de genes mitocondriales (MGE) a partir de la regulación de la expresión de genes nucleares (NGE). Estas vías de señalización se denominan señales anterógradas. Por otro lado, el ensamblaje de complejos y supercomplejos debe atender a los requerimientos celulares en concordancia con las evidencias obtenidas en relación al cambio de número, forma y posición que se mencionaron anteriormente. En este contexto, la regulación de la NGE debe contemplar información sobre el estado metabólico y el estadio de desarrollo de la organela. La información proveniente de las organelas que genera una modificación en la NGE se denomina señal retrógrada. En este escenario de comunicación, con diversos protagonistas, las señales que permiten el diálogo aún no han sido identificadas.

En las secciones siguientes se describen las características del genoma mitocondrial y su relación con el genoma nuclear, el sistema de importación de proteínas a la mitocondria y finalmente el ensamblado de los complejos respiratorios.

---

#### 4.5. GENOMA MITOCONDRIAL.

Se han identificado 2500 productos génicos en las mitocondrias. Sin embargo, no se han identificado más de 45 proteínas de codificación mitocondrial en *Arabidopsis* (Emanuelsson y col., 2000; Gagliardi y Binder, 2007; Lee y col., 2013). Se ha propuesto que

los genes nucleares requeridos para la función mitocondrial son el resultado de la migración de genes desde la mitocondria al núcleo durante el curso de la evolución.

El genoma mitocondrial (mtADN) de plantas superiores presenta particularidades respecto de otros genomas mitocondriales eucariotas. En relación a la conformación del mtADN, se ha observado que es más grande que el de otros eucariotas, es heterogéneo entre especies de plantas y además puede adoptar una conformación lineal (Backert y col., 1997a). Esta característica le permitiría replicarse mediante el mecanismo de círculo rodante, a diferencia de la replicación tipo *theta* observada en el genoma mitocondrial de mamíferos (Backert y col., 1997b).

El genoma mitocondrial de plantas se caracteriza por la presencia de secuencias quiméricas, inserciones de DNA foráneo y elevados niveles de recombinación como consecuencia de la presencia de secuencias repetidas activas (Mackenzie y McIntosh, 1999). El proceso de recombinación produce un genoma multipartito (fracciones subgenómicas) o en forma de mosaico, generando nuevas secuencias quiméricas y alterando el número de copias de las porciones que se recombinan. Se ha demostrado que el grado de recombinación del genoma mitocondrial de *Arabidopsis* estaría regulado por la expresión de genes nucleares (Giege y col., 2005). El mtADN proveniente de plantas es muy diferente de la molécula simple de mtADN encontrada en mamíferos en donde cada base tiene una función asociada a la codificación de una proteína o a la replicación y transcripción y en donde no existen intrones ni secuencias repetidas.

El genoma mitocondrial de *Arabidopsis*, descrito por Unsel y col. (1997), contiene 57 genes distribuidos en 366924 nucleótidos, representando solo el 10% de los productos génicos encontrados en la mitocondria. Entre los genes presentes en este genoma se encuentran los que codifican las proteínas NAD1 a NAD9 del CI, el gen que codifica la proteína COB del CIII, los genes que codifican las tres subunidades que forman el núcleo enzimático del CIV (COX1, COX2 y COX3) y los genes que codifican las proteínas ATP1, 6 y 9 del complejo ATP sintetasa. Además, se han encontrado genes que codifican proteínas involucradas en la biogénesis del citocromo *c*, genes que codifican los ARNr 26S, 18S y 5S

y los que codifican las proteínas ribosomales RPL<sub>2, 5 y 16</sub> y RPS<sub>3, 4, 7 y 12</sub>. Finalmente, se han identificado 22 ARNt codificados en el genoma mitocondrial (Kadowaki y col., 1996).

La transcripción de los genes mitocondriales es realizada por una ARN polimerasa homóloga a las encontradas en bacteriófagos. Los intrones de los genes mitocondriales son removidos teniendo en cuenta la estructura del intrón. Este tipo de *splicing* puede funcionar en *trans*. Una vez obtenido el ARN maduro, éste sufre un procesamiento en el cual las citosinas se desaminan a uracilos. Los ARNs maduros de genes mitocondriales sufren adición de polímeros de adenina como ocurre con los genes nucleares, pero en la mitocondria la adición de polímeros de adenina funciona como una señal de degradación (Giege y Brennicke, 2001).

---

#### 4.6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS.

El modelo de regulación de los genes respiratorios sugerido hasta la fecha propone que los genes de codificación mitocondrial son regulados a nivel de la estabilidad y el procesamiento del ARN y no a nivel de la transcripción (para una revisión consultar (Liere y col., 2011). En el modelo propuesto por Giegé y col. (2005), las subunidades de codificación mitocondrial siempre se encontrarían en exceso mientras que los factores limitantes al momento del ensamblaje de los complejos respiratorios serían las subunidades codificadas por el núcleo. Además, las subunidades de codificación nuclear estarían reguladas de manera específica en función del tejido y de distintas señales (para una revisión consultar Welchen y col., 2014). Sin embargo, un trabajo reciente sugiere que la síntesis de proteínas mitocondriales podría actuar como un factor limitante en algunas situaciones. La mutación del gen RPS10 de codificación nuclear incrementa la síntesis de proteínas ribosomales codificadas en la mitocondria pero disminuye la síntesis de componentes de los complejos respiratorios codificados en la organela, que de esta forma se vuelven limitantes (Kwasniak y col., 2013).

---

#### 4.7. EXPRESIÓN CONCERTADA DE LOS GENES MITOCONDRIALES DE CODIFICACIÓN NUCLEAR. PISTAS DE COORDINACIÓN.

Le expresión de los genes de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo debe estar finamente coordinada con las demandas celulares y ambientales a lo largo del desarrollo de la planta. Es de esperarse entonces que existan uno o varios mecanismos que permitan la expresión concertada de estos genes. De acuerdo con esta idea, genes que codifican proteínas constituyentes de los complejos respiratorios muestran un patrón similar de expresión, observándose una acumulación en los niveles de transcritos durante un mismo momento del desarrollo como la floración (Ribichich y col., 2001). El incremento de la expresión de genes respiratorios durante la floración estaría directamente relacionado con el rol fundamental que cumple la mitocondria durante el desarrollo del polen. Además de responder a un programa de desarrollo, se ha mostrado que la expresión de estos genes es dependiente de tejido (Skiryecz y col., 2010; Welchen y col., 2004). Peters y col. (2012) han demostrado que la relación de proteínas que componen los Complejos I y II difiere en tejidos fotosintéticos respecto de tejidos no fotosintéticos.

Los genes de proteínas mitocondriales de codificación nuclear no solo muestran una expresión coordinada según el estado de desarrollo y de diferenciación celular de la planta. Se ha observado que los genes que codifican subunidades del CIV y del CI modifican su expresión en función de la disponibilidad de nutrientes, frente al tratamiento con hormonas, cuando las plantas son crecidas en diferentes ciclos de luz y oscuridad y bajo distintas intensidades lumínicas (Comelli y Gonzalez, 2009a; Gibala y col., 2009; Giege y col., 2005; Welchen y col., 2002, 2004). De forma particular, la regulación transcripcional de los genes respiratorios de codificación nuclear incorpora un punto de balance y comunicación entre la función mitocondrial y la actividad sintética de los cloroplastos (Gonzalez y col., 2007). Finalmente, se ha observado una respuesta coordinada de los genes nucleares que codifican subunidades de los complejos respiratorios ante situaciones que generan estrés oxidativo, luego de la infección con patógenos o durante una situación de estrés abiótico (Attallah y col., 2007a; Cvetkovska y col., 2013b; Ho y col., 2008; Rurek; Van Aken y col., 2009b; Van Aken y col., 2013).

Distintas evidencias sugieren que la coordinación de la expresión de los genes respiratorios de codificación nuclear podría ocurrir a nivel transcripcional y principalmente

debido a la interacción de factores de transcripción que unen elementos comunes encontrados en los promotores de estos genes. Se ha propuesto que los elementos denominados site II (5'-TGGGCC/T-3') podrían participar en la coordinación de la expresión de los genes respiratorios (Giraud y col., 2010; Welchen y Gonzalez, 2005; Welchen y Gonzalez, 2006). Estos sitios se han identificado en más del 80% de los genes que codifican subunidades del CI, CIII, CIV y el complejo ATP sintetasa en *Arabidopsis* y en *O. sativa* y serían unidos por factores de transcripción pertenecientes a la familia TCP (Welchen y Gonzalez, 2006). Dada la función de las proteínas TCP en los procesos de crecimiento en plantas se ha propuesto que la interacción TCP-siteII permitiría coordinar la expresión de los genes de proteínas mitocondriales con las demandas de la célula durante el crecimiento y la proliferación (Uberti-Manassero y col., 2012; Uberti-Manassero y col., 2013). Considerando que estos elementos han sido encontrados en genes que codifican proteínas ribosomales, proteínas del cloroplasto y proteínas peroxisomales, se ha sugerido que formarían parte de un mecanismo global de coordinación de la expresión génica durante el desarrollo y la proliferación.

Además de los elementos site II, estudios bioinformáticos sugieren que habría un enriquecimiento de las secuencias consenso para los factores de transcripción ABL4, MNB1A, DOF2 y DOF3 en los promotores de los genes respiratorios de codificación nuclear (Leister y col., 2011). Otros factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los genes respiratorios de codificación nuclear pertenecen a las familias bZip, AP2/ERF y bHLH (Comelli y Gonzalez, 2009b; Comelli y col., 2012; Welchen y col., 2009).

---

#### 4.8. REGULACIÓN RETRÓGRADA EN ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS.

La biogénesis de los complejos respiratorios requiere que el estado energético de la mitocondria sea transmitido al núcleo para modificar la expresión de genes nucleares que participan en la síntesis de componentes de la cadena de transporte de electrones. Como se mencionó en la introducción de esta sección, esta red de señales se denomina señalización retrógrada mitocondrial (SRM). Una de las principales complicaciones al momento de estudiar este tipo de mecanismos es poder diferenciar cuáles son las señales

que se generan exclusivamente desde la mitocondria. En plantas, la presencia de una segunda organela portadora de información génica y de función relevante en la célula incorpora un punto más de complejidad al momento de estudiar el proceso de señalización retrógrada debido a la interacción entre las dos organelas (Van Aken y Whelan, 2012). De hecho, un estudio sobre la función de una prolil-tRNA sintetasa de localización dual (mitocondria-cloroplasto) demostró que es necesaria la perturbación de la traducción en ambas organelas para que se dispare la señalización retrógrada. En los últimos años distintos grupos de investigación se han abocado al estudio y determinación de las moléculas o señales que participan en la SRM (De Clercq y col., 2013; Leister y col., 2011; Schwarzlander y col., 2012; Van Aken y col., 2013). La forma de estudiar este proceso, en términos generales, es someter las plantas a inhibidores de la cadena respiratoria, a inhibidores de los fotosistemas o a situaciones que generan un estrés general en la célula y evaluar los cambios transcripcionales y metabólicos. Estos resultados se comparan con los obtenidos a partir de plantas mutantes en proteínas mitocondriales o del cloroplasto que podrían presentar una disfunción en alguna de las dos organelas. A partir de estos resultados se han establecido grupos de elementos en *cis* que podrían participar en esta señalización, posibles vías reguladas mediante señalización retrógrada y genes blancos de la regulación retrógrada (Leister y col., 2011; Van Aken y Whelan, 2012; Van Aken y col., 2013; Vanderauwera y col., 2012). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha reportado una molécula que pueda disparar y transmitir la señal retrógrada. Schwarzländer y Finkemeier (2013) revisaron señales mitocondriales putativas sugiriendo que los procesos que involucran cambios redox serían señales estratégica para transmitir el estado metabólico mitocondrial. De acuerdo con esto, metabolitos como el ascorbato y el glutatión han sido postulados como candidatos en la señalización retrógrada del cloroplasto (Foyer y Noctor, 2011). Si bien a las EROs se les ha adjudicado un rol como moléculas señalizadoras, su función en la señalización retrógrada aún no ha sido determinada. Como se mencionó anteriormente, el  $H_2O_2$  generado en la mitocondria podría atravesar las membranas mitocondriales y alcanzar el citosol y luego el núcleo. Distintos factores de transcripción específicos de plantas son sensibles al  $H_2O_2$  y a diferentes cambios en el estado redox

(Hiltscher y col., 2014; Shaikhali y col., 2008; Shaikhali y col., 2012; Viola y col., 2013). Sin embargo, una investigación reciente sugiere que la estabilidad del  $H_2O_2$  no es compatible con un rol directo de esta molécula en el proceso de señalización (Vestergaard y col., 2012). Las moléculas propuestas como protagonistas en la señalización retrógrada en el cloroplasto son moléculas asociadas a procesos sintéticos (Beale, 2011; Rintamaki y col., 2009). En esta vía, metabolitos intermediarios en la síntesis de tetrapirroles, como la Mg-protoporfirina, actúan como moléculas señalizadoras. Recientemente, Estavillo y col. (2012) mostraron que la molécula 3'-phosphoadenosina 5'-phosphate (PAP) se acumula bajo condiciones de alta intensidad de luz o sequía en el cloroplasto y migra hacia el núcleo donde activa la transcripción de genes de respuesta a estrés. La acumulación de PAP en la organela en condiciones normales de crecimiento sería regulada por la fosfatasa SAL1. Esta fosfatasa también ha sido localizada en la mitocondria. En una investigación reciente se propone que cambios en la concentración de ácido cítrico, un intermediario del TCA, modifican la expresión génica en el núcleo.

A partir de los distintos estudios de transcriptómica realizados se han identificado una serie de genes de proteínas mitocondriales y elementos en *cis* que participarían en la señalización retrógrada. El gen que codifica una de las isoformas de la oxidasa alternativa, *AOX1a*, fue el primer gen indicado como protagonista de la señalización retrograda (Clifton y col., 2006; Giraud y col., 2009; Umbach y col., 2005; Umbach y col., 2006). La expresión de este gen es inducida en plantas de *Arabidopsis* cuando la cadena transportadora de electrones es inhibida con rotenona (inhibidor del CI). Sin embargo, este aumento en la expresión no se observa cuando se tratan con rotenona plantas mutantes en el factor de transcripción *ABI4* (*abi4-1*) (Giraud y col., 2009). Dado que en estas mutantes la expresión del gen se encuentra inducida, se postuló que es necesaria la represión constitutiva de este gen para permitir su inducción ante situaciones de estrés. Posteriormente, se demostró que *ABI4* se une a un elemento, denominado elemento B (CGTGAT), que reprime de manera constitutiva la expresión del gen *AOX1a*. En el promotor de *AOX1a* la secuencia del elemento B se solapa con el elemento CE1 (CACCG) y con un elemento CGTG (Giraud y col., 2009). Estos elementos son unidos por *ABI4* y se ha identificado una región con

dominio similar en el promotor del gen *LHCB* (Staneloni y col., 2008). La regulación de la expresión de *AOX1a* mediada por *ABI4* provee una conexión molecular entre la regulación retrógrada mitocondrial y la del cloroplasto, dado que *LHCB* participaría en la regulación retrógrada del cloroplasto (Leon y col., 2012).

El hecho de que *AOX1a* participe en la regulación retrógrada se ha utilizado para buscar nuevos genes blancos de la SRM. El análisis de plantas mutantes *rao* (*response alternative oxidase*) que no responden al tratamiento con antimicina A (inhibidor del CIII) ha permitido identificar un grupo de genes blancos de la SRM y distintos miembros de la familia de factores de transcripción ANAC como involucrados en la SRM. Los genes pertenecientes a este grupo (34 genes) se denominan genes MDS (de sus siglas en inglés *Mitochondrial Dysfunction Stimulon*). La secuencia consenso de unión para los factores ANAC definida a partir del análisis de las secuencias promotoras de los genes MDS ha sido encontrada en más de 70 genes que no responden a disfunciones mitocondriales pero están relacionados con la respuesta durante situaciones de estrés. Si bien 24 de los genes MDS presentan potenciales sitios de unión para proteínas ANAC, solo se ha demostrado la interacción con ANAC013 y ANAC017. El factor de transcripción ANAC013 une 11 de los 24 genes MDS, siendo *AOX1a*, *UPOX* y *At5g09570* los que presentaron mayores valores de interacción en experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina. Con respecto a ANAC017, se ha demostrado que frente a una inhibición del CIII con antimicina A se generan señales que permiten el clivado de esta proteína unida a la membrana del retículo endoplasmático. La porción N-terminal de ANAC017 migra al núcleo y se une al promotor de *AOX1a* activando la transcripción. Si bien los genes MDS se clasificaron según su variación de expresión luego de una disfunción mitocondrial, su agrupamiento considerando diferentes situaciones de estrés sugiere que este grupo de genes estaría involucrado principalmente en estrés salino, estrés por exposición a radiación UV y deficiencia de hierro (De Clercq y col., 2013).

Además de las proteínas pertenecientes a la familia ANAC se han propuesto distintos elementos en *cis* que se encontrarían enriquecidos en genes que modifican su expresión ante una disfunción mitocondrial, si bien su funcionalidad aún no ha sido

probada (Schwarzlander y col., 2012). En un estudio reciente que incluye información transcripcional proveniente de 27 perturbaciones mitocondriales y cloroplásticas diferentes se identificó un grupo de 12 genes que responden exclusivamente a perturbaciones en la mitocondria, 14 genes que responden solo a perturbaciones en el cloroplasto y 14 genes que responden a ambas perturbaciones (Van Aken y Whelan, 2012). Curiosamente, los genes que se comparten entre este grupo y el grupo de genes MDS pertenecen al grupo de genes que responde a ambas perturbaciones. Si bien se han identificado diversos genes involucrados en la regulación retrógrada, los procesos que realmente están influenciados por la regulación retrógrada mitocondrial aún no se han estudiado en profundidad. Sin embargo, resultados recientes demuestran que las plantas *rao1* son deficientes en una quinasa involucrada en el ciclo celular denominada CDKE1 (de sus siglas en inglés *Cycling Dependent Kinase E1*). CDKE1 participaría, además, en la integración de señales provenientes del medio ambiente con el desarrollo de la planta, el crecimiento y la elongación celular (Ng y col., 2013a). El hecho de que la mutación en una quinasa dependiente de ciclina altere la inducción de *AOX1a* por antimicina A es un indicio de la integración de la SRM en el contexto regulatorio general de la célula (Ng y col., 2013a). De manera similar, las mutantes *rao3-6* son deficientes en proteínas involucradas en la señalización de auxinas, generándose así una relación entre una respuesta retrógrada en una condición de estrés y la modificación del crecimiento ante esa situación (Ivanova y col., 2014).

En el trabajo desarrollado por Van Aken y Whelan (2012), los autores proponen un nuevo marcador mitocondrial de respuesta a estrés, el gen *At5g09570*. Este gen codifica una proteína denominada *MSM1* que presenta un dominio CHCH similar al reportado para la proteína *MIC17* del IMS de levaduras. Las características de esta proteína sugieren que podría actuar como una molécula señalizadora, detectando y transmitiendo el estado redox del IMS, y no como un blanco de regulación retrógrada. El IMS de *Arabidopsis* presentaría varias proteínas que presentan cisteínas susceptibles de regulación redox agrupadas en motivos similares a los de *MSM1*, como *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* y *AtCOX19*. En forma similar a lo observado para *MSM1*, los promotores de los genes que codifican

estas proteínas son inducidos ante diversas condiciones de estrés (Attallah y col., 2007a; Attallah y col., 2007b). Estas evidencias, en conjunto con el hecho de que las proteínas del IMS serían transportadas y plegadas correctamente por un sistema regulado por el estado redox de la mitocondria, apuntan al IMS como un espacio capaz de detectar y transmitir señales desde la mitocondria hacia el citosol (Chatzi y Tokatlidis, 2013).

---

#### 4.9. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS A LA MITOCONDRIA DE PLANTAS.

El origen endosimbiótico de la mitocondria deriva en la existencia de un complejo y finamente regulado sistema de importación proteico hacia los distintos compartimentos de la organela (Murcia y col., 2014). El éxito del ensamblado de los complejos respiratorios depende de la importación de las distintas subunidades desde el citosol hacia la membrana interna de la mitocondria (Murcia y col., 2012). Las subunidades de los complejos respiratorios deben atravesar primero el complejo transportador de la membrana externa integrado por las proteínas TOM (de sus siglas en inglés *Translocase of the Outer Membrane*) y luego el complejo transportador de la membrana interna integrado por las proteínas TIM (de sus siglas en inglés *Translocase of the Inner Membrane*). Trabajos recientes demuestran que el sistema de importación de proteínas está regulado por el estado energético mitocondrial, integrándose como otro punto de regulación y coordinación al proceso complejo de la biogénesis mitocondrial (Carrie y col., 2013; Murcia y col., 2014; Wang y col., 2012).

**Complejos de la membrana externa mitocondrial.** El complejo TOM en levaduras y mamíferos está formado por dos subunidades que miran hacia la cara citosólica de la ME denominadas TOM20 y TOM70, el receptor TOM22 y la proteína formadora del poro TOM40 (Stan y col., 2000). Las preproteínas que ingresan por el complejo TOM son reconocidas por TOM20 a través de una secuencia de 6 a 90 aminoácidos presente en su extremo N-terminal (Vogtle y col., 2009). Las proteínas que presentan péptido señal interno no clivable son reconocidas por TOM70 (Yamamoto y col., 2009). Luego del reconocimiento del péptido señal todas las proteínas mitocondriales atraviesan la ME a través de TOM40 (Humphries y col., 2005).

En *Arabidopsis* existen tres isoformas de TOM<sub>40</sub>; sin embargo, solo las mutantes insercionales en AtTOM<sub>40-1</sub> no son viables (Lister y col., 2004). AtTOM<sub>9</sub> es el homólogo funcional de TOM<sub>22</sub>, es más pequeña y no presenta cara citosólica. La pérdida de la cara citosólica evitaría el reconocimiento de proteínas que se localizan en el cloroplasto (Lister y col., 2007). El homólogo de TOM<sub>70</sub> no ha sido encontrado en plantas; sin embargo, se ha identificado un receptor anclado en la ME específico del reino vegetal y parálogo del receptor del cloroplasto TOC<sub>64</sub>, denominado OM<sub>64</sub> (Duncan y col., 2013; Lister y col., 2007).

El ensamblado del complejo TOM está asociado a las proteínas del complejo SAM (ScSAM<sub>50</sub>, ScSAM<sub>35</sub>, ScSAM<sub>37</sub>) (Chan y Lithgow, 2008). Sólo AtSAM<sub>37</sub> tendría una función vital en la biogénesis mitocondrial en *Arabidopsis* (Duncan y col., 2011). En levaduras, el complejo TOM y el complejo SAM están estrechamente vinculados con el complejo ERMES (de sus siglas en inglés *Endoplasmic Reticulum Mitochondrial Encounter Structure*) que participaría en el movimiento de fosfolípidos y el transporte de calcio (Michel y Kornmann, 2012). El complejo TOM y el complejo SAM se encuentran físicamente conectados con el complejo MINNOS (de sus siglas en inglés *Mitochondrial Inner Organising System*) de la membrana interna. El complejo MINNOS está compuesto por seis subunidades en levaduras: FCJ<sub>1</sub>, MIO<sub>10</sub>, AIM<sub>5</sub>, AIM<sub>13</sub>, AIM<sub>37</sub> y MIO<sub>27</sub> (Herrmann, 2011). La mutación de cualquiera de las subunidades modifica la morfología de las crestas de la MI. Mientras que este complejo está altamente conservado entre levaduras, hongos superiores y mamíferos, en plantas los ortólogos candidatos solo muestran un 27-32% de identidad (Zerbes y col., 2012).

**Importación de proteínas al IMS.** El IMS contiene proteínas TIM pequeñas (ScTIM<sub>8</sub>, <sub>9</sub>, <sub>10</sub> y <sub>13</sub>), que son proteínas solubles ricas en cisteínas que forman una estructura similar a un anillo de seis caras (Ceh-Pavia y col., 2013). Estas proteínas están involucradas en la importación de proteínas transportadoras que se insertan en la MI o de proteínas de tipo barril- $\beta$  destinadas a insertarse nuevamente en la ME (Truscott y col., 2002). La importación de estas proteínas TIM pequeñas requiere la maquinaria MIA (Milenkovic y col., 2007). Este sistema de importación está constituido por dos proteínas con actividad

azufre oxidasa/reductasa denominadas MIA<sub>40</sub> y ERV<sub>1</sub> (Terziyska y col., 2007). Estas dos proteínas son responsables del plegamiento oxidativo y de la maduración de las proteínas ricas en cisteínas del IMS, permitiendo la formación de puentes disulfuro en los residuos de cisteína (Sideris y col., 2009).

Además de las proteínas TIM pequeñas, el sistema MIA permite el transporte de un grupo de proteínas solubles del IMS que presentan los dominios conservados C(X)<sub>3</sub>C y C(X)<sub>9</sub>C (Koch y Schmid, 2014). En levaduras, MIA<sub>40</sub> permite el transporte y correcto plegamiento de proteínas del IMS oxidando los puentes disulfuro de la proteína transportada, mientras que ERV<sub>1</sub> mantiene los puentes disulfuro de MIA<sub>40</sub> oxidados (Chatzi y Tokatlidis, 2013). En plantas se han identificado los ortólogos de MIA<sub>40</sub> y ERV<sub>1</sub>; sin embargo, se observan diferencias funcionales. MIA<sub>40</sub> no es una proteína esencial en *Arabidopsis* y está localizada tanto en el IMS como en peroxisomas de plantas superiores, aunque se la ha localizado únicamente en mitocondrias en *Physcomitrella patens* (musgo) (Xu y col., 2013). La doble localización de MIA<sub>40</sub> habría ocurrido en paralelo con la aparición de la isoforma de la enzima Cu/ZnSOD del peroxisoma (CSD<sub>3</sub>) y de su proteína chaperona CCS (Carrie y col., 2010a). Curiosamente, AtERV<sub>1</sub> es esencial en plantas superiores igual que su ortólogo en levaduras; sin embargo, su estructura secundaria es más similar a ERV<sub>2</sub> del parásito *Trypanosoma cruzi* que a ERV<sub>1</sub> de levaduras (Eckers y col., 2013). Aún más interesante, en *T. cruzi* no se ha identificado el ortólogo de MIA<sub>40</sub> de levaduras (Carrie y col., 2010b; Eckers y col., 2013).

**Complejos de la membrana interna mitocondrial.** Los componentes de la membrana interna mitocondrial de plantas muestran mayor conservación en términos de genes ortólogos con respecto a levaduras que lo observado en los componentes de la membrana externa (Carrie y col., 2010b). Sin embargo, las asociaciones recientemente propuestas entre los integrantes del complejo TIM y los complejos respiratorios dan indicios de neo o subfuncionalizaciones para las proteínas TIM en plantas (Murcha y col., 2012). Tanto en levaduras como en *Arabidopsis*, todos los precursores proteicos de proteínas cuyo destino es la MI deben pasar a través del complejo TIM<sub>17:23</sub> (Murcha y col., 2003; van der Laan y col., 2010). El complejo TIM<sub>17:23</sub> existe en dos conformaciones; una

de ellas (SORT) recibe los precursores proteicos provenientes de TOM<sub>40</sub> y cuyo destino es la MI y la otra (PAM) recibe precursores proteicos cuyo destino es la matriz mitocondrial (Chacinska y col., 2010). El complejo TIM<sub>17:23</sub> interacciona de manera física y dinámica formando supercomplejos tanto con el complejo TOM como con los complejos respiratorios I, III y IV en levaduras y con el CI en Arabidopsis (Duncan y col., 2013; Stuart, 2008). Esta interacción aumentaría la eficiencia del proceso de importación aprovechando el potencial de membrana (Wang y col., 2012).

Se ha propuesto que la cantidad de complejo TIM<sub>17:23</sub> es una determinante de la abundancia del CI o, al menos, de la cantidad de CI disponible para formar otros supercomplejos (Murcha y col., 2012). Asimismo, las mutantes *knock-out* en subunidades del CI muestran un incremento en la abundancia de AtTIM<sub>23-1</sub>. Además, la subunidad PRAT del CI es compartida con el complejo TIM<sub>17:23</sub> (Murcha y col., 2012; Wang y col., 2012). Es interesante que al aumento de la abundancia de AtTIM<sub>23-2</sub> resulte en un incremento de la expresión de los genes respiratorios de codificación mitocondrial, proteínas ribosomales y translocasas. Genes mitocondriales de codificación nuclear también incrementan su actividad cuando AtTIM<sub>23-2</sub> es sobreexpresada (Murcha y col., 2012; Wang y col., 2012). Estos resultados indican que la disponibilidad de los complejos TIM modifica la biogénesis mitocondrial. Otro indicativo de la coordinación entre estas dos entidades mitocondriales queda reflejado durante el proceso de germinación, momento en el cual el requerimiento de la actividad mitocondrial es fundamental para movilizar energía desde el endosperma, antes de que la fotosíntesis sea establecida. Estudios detallados en arroz revelaron que el aumento de la respiración durante la germinación es bifásico y comienza inmediatamente luego de la imbibición de la semilla. El segundo incremento en el consumo de oxígeno es acompañado por cambios a nivel transcripcional y proteico de los componentes de las membranas mitocondriales (Howell y col., 2007; Howell y col., 2006; Taylor y col., 2010). Estos resultados son similares a los obtenidos en Arabidopsis (Law y col., 2012).

---

#### 4.5. BIOGÉNESIS DEL COMPLEJO IV.

El CIV o complejo COX es un complejo enzimático multimérico que cataliza la oxidación del  $O_2$  a  $H_2O$  a partir de la oxidación del citocromo *c* a través de los cuatro centros metálicos de sus subunidades estructurales (Soto y col., 2012). Los electrones ingresan a COX a través del centro de cobre binuclear ( $Cu_A$ ) localizado en la subunidad COX2. Los electrones son transferidos al hemo  $\alpha$  de bajo spin situado en la subunidad COX1. Posteriormente ocurre una transferencia intramolecular desde el hemo  $\alpha$  al sitio activo de COX1 donde está presente el centro bimetálico hemo  $\alpha_3$ - $Cu_B$ . Este centro bimetálico permite la unión del oxígeno molecular. La transferencia de electrones está acoplada a la translocación de protones (Brunori y col., 2005; Soto y col., 2012).

El CIV está compuesto por 11 subunidades en levaduras, 12 subunidades en mamíferos y entre 11 y 14 subunidades en plantas (Barrientos y col., 2009). La biogénesis del complejo COX comenzó a estudiarse hace más de 50 años, siendo los primeros reportes sobre el aislamiento del complejo intacto de mediados de los años 1990. Nuestro conocimiento sobre la estructura y el proceso de ensamblaje de COX en eucariotas es consecuencia de su estudio principalmente en levaduras y células de fibroblastos en cultivo. A continuación se describen las distintas proteínas que integran el complejo COX o participan en su ensamblaje en levaduras, estableciendo un paralelo con plantas cada vez que sea posible.

---

#### 4.5.1. SUBUNIDADES ESTRUCTURALES DE CODIFICACIÓN MITOCONDRIAL.

Las subunidades estructurales de COX, COX1, COX2 y COX3, son codificadas por el genoma mitocondrial (Tabla 1-A) (Khalimonchuk y Rodel, 2005) .

COX1 es la subunidad más grande e hidrofóbica del corazón de COX. En su estructura se identifican dos hélices transmembrana que se unen en un rulo extramembrana. 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 de glutamato conservado, mientras que el canal K conecta la matriz con el centro  $Cu_B$  (Tsukihara y col., 1995, 1996).

La subunidad COX2 posee un centro binuclear Cu<sub>A</sub> de valencia mixta, el cual está expuesto al IMS. 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> (Tsukihara y col., 1995, 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; Svensson-Ek y col., 2002).

---

#### 4.5.2. SUBUNIDADES ESTRUCTURALES DE CODIFICACIÓN NUCLEAR.

El centro catalítico de COX está rodeado por subunidades de codificación nuclear. La función de las mismas en el proceso de fosforilación oxidativa aún es desconocida. Sin embargo, se ha postulado que podrían influir en la estabilización estructural del complejo, como se ha sugerido para el citocromo *c*, así como formar parte de un sistema de protección para COX ante la generación de EROs en la mitocondria (Barrientos y col., 2009; Bourens y col., 2013; Welchen y col., 2012). Estas subunidades se nombran con números consecutivos desde el 4 (COX<sub>4</sub>) hasta el 9 (COX<sub>9</sub>) (Millar y col., 2004). En caso de observarse más de una isoforma se utilizan letras (a o b) para diferenciarlas. Las subunidades de codificación nuclear pueden presentar dominios transmembrana (todas las pertenecientes a levaduras) o presentar dominios transmembrana y dominios hidrofílicos que no atraviesan la MI (ScCOX<sub>4</sub> y ScCOX<sub>6</sub>; HsCOX<sub>5a</sub>, HsCOX<sub>5b</sub>, HsCOX<sub>6b</sub>). Es interesante destacar que para una misma especie no siempre todas las subunidades de codificación nuclear forman el CIV, sino que se observa una dependencia de tejido o condición de crecimiento. En levaduras, la isoforma COX<sub>5a</sub> se expresa durante el crecimiento en condiciones de aerobiosis, mientras que COX<sub>5b</sub> aparece en presencia de niveles de oxígeno reducidos (Burke y Poyton, 1998).

En la Tabla 1-B se muestra una comparación de las subunidades del CIV codificadas en el genoma nuclear de levaduras, humanos y plantas. Experimentos de electroforesis 2D muestran que los CIV de *Arabidopsis*, *S. tuberosum* y *Vicia faba* presentan ocho subunidades similares a las identificadas en otros eucariotas y seis subunidades específicas del reino vegetal (Millar y col., 2004). Estas subunidades se describen por convención en números romanos. La separación del CIV de *Arabidopsis* es compleja debido a su solapamiento con proteínas del complejo TOM (Millar y col., 2004). En mitocondrias de *Arabidopsis* pueden observarse dos isoformas del CIV, una isoforma mayor denominada IVa que incluye proteínas TOM y una menor denominada IVb (Eubel y col., 2003). En estas dos isoformas se han reconocido las subunidades de codificación nuclear COX5b1, COX5b2, COX5c y COX6a, reconocidas en otros eucariotas, y las subunidades COX X1-8, específicas del reino vegetal (Millar y col., 2004). Si bien no se ha identificado mediante esta técnica, *Arabidopsis* presenta un gen homólogo a COX6b de levaduras (Eubel y col., 2003).

Tabla I. Subunidades del complejo IV en levaduras, mamíferos y plantas.

LEVADURAS		HUMANOS		PLANTAS		Función en levaduras o mamíferos
Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	
A. Subunidades estructurales de codificación mitocondrial						
COX1	Cox1p	MTCOXI	COX1	ATMG01360	COX1	Subunidades del núcleo catalítico
COX2	Cox2p	MTCOXII	COX2	ATMG00160	COX2	
COX3	Cox3p	MTCOXIII	COX3	ATMG00730	COX3	
B. Subunidades estructurales de codificación nuclear						
COX4	Cox4p	COX5b	COXVb	AT3G15640 (1) AT1G80230 (2)	COX5b	Subunidades requeridas para el ensamblaje y función del CIV
COX5a	Cox5a	COX4-1	COXIV-1	-	-	
COX5b	Cox5b	COX4-2	COXIV-2	-	-	
COX6	Cox6	COX5a	COXVa	-	-	
COX7	Cox7	COX7a	COXVIIa	-	-	
COX8	Cox8	COX7c	COXVIIc	-	-	
COX9	Cox7a	COX6c	COXVIc	AT3G22210	COX6c	
-	-	COX7b	COXVIIb	-	-	
-	-	COX8	COXVIII	AT2G47380 (1) AT3G62400 (2) AT5G61310 (3) At5G57815 (2)	COX5c	
COX12	Cox9	COX6b	COXVIb	AT4G28060 (3) AT1G22450 (1) AT1G32710 (4)	COX6b	
COX13	Cox10	COX6a	COXVIa	AT4G37830 AT5G27760 AT3G05550 AT4G00860 AT1G01170 AT1G72020 AT4G21150 AT3G43410 AT2G16460	COX6a COXX1 COXX2 COXX3 COXX4 COXX5 COXX6	

El estudio de la expresión de los genes estructurales de codificación nuclear ha permitido identificar patrones de expresión particulares para estas subunidades. Los genes *COX6b* y *COX6a* se expresan en anteras y regiones meristemáticas (Mufarrege y col., 2009). De forma similar, *COX5b-1* se expresa en tejido meristemático, tejido vascular, polen y anteras (Welchen y col., 2004). Otra característica común a los genes COX de codificación nuclear es que son inducidos cuando se incorporan al medio de cultivo de *Arabidopsis* azúcares metabolizables o compuestos nitrogenados (Comelli y col., 2009; Mufarrege y col., 2009). Se ha propuesto que uno de los mecanismos que permite regular la expresión concertada de los genes COX es la disponibilidad de carbohidratos. Como se mencionó anteriormente, esta regulación opera a nivel transcripcional a través de elementos comunes presentes en los promotores de los genes COX (Gonzalez y col., 2007). La proteína COX5b es codificada por dos genes distintos denominados *COX5b-1* y *COX5b-2*, que responden de forma diferente a los mismos o distintos estímulos (Comelli y Gonzalez, 2009b). Se ha propuesto que uno de los genes ha retenido su función ancestral mientras que otro ha adquirido nuevos elementos de respuesta (Comelli y Gonzalez, 2009a).

---

#### 4.5.3. ENSAMBLADO DE COX.

El ensamblado de COX ha sido descrito como un proceso lineal, en el cual las diferentes subunidades y cofactores se adicionan de manera ordenada (Soto y col., 2012). El concepto del ensamblaje como un proceso secuencial fue demostrado a principios de los 80 en estudios realizados en mitocondrias de hígado de rata. Este modelo fue posteriormente confirmado mediante electroforesis en geles nativos (*Blue Native*). El estudio de los intermediarios permitió demostrar que el ensamblaje comienza a partir de una semilla formada por la subunidad COX1 y prosigue con la formación de varios intermediarios discretos, los que probablemente representan pasos limitantes de la velocidad<sup>8</sup> (para una revisión consultar Soto y col., 2012) . En este proceso lineal de síntesis, las dos subunidades principales, COX1 y COX2, siguen líneas de adición de subunidades

---

<sup>8</sup> El proceso de ensamblaje es complejo de estudiar en levaduras dado que la falta de COX1 no permite el ensamblaje de COX.

relativamente independientes. Esto implica que las subunidades maduran por separado y luego se ensamblan en la membrana. Por otro lado, los intermediarios subensamblados podrían interactuar con otros complejos respiratorios formando supercomplejos y las subunidades importadas desde el citosol pueden integrarse no solo en la holoenzima COX sino también con los complejos intermedios (para revisiones consultar Fontanessi y col., 2008; Khalimonchuk y Rodel, 2005; Soto y col., 2012). Algunos autores describen el proceso de ensamblaje de COX como un proceso “asistido por proteínas”, considerando la cantidad de factores de ensamblaje, estructurales y no estructurales, que son requeridos para producir la maduración de las subunidades y que culmina con la formación de los centros metálicos antes de la interacción en la membrana.

---

#### 4.5.4. METALCHAPERONAS E INSERCIÓN DEL COBRE EN COX.

Como se mencionó anteriormente, el ensamblado de los centros catalíticos de COX requiere la inserción de átomos metálicos de cobre y hemo  $\alpha$ . La inserción del cobre en COX1 y COX2 es mediada por proteínas chaperonas solubles del IMS y por proteínas chaperonas transmembrana embebidas en la MI (Tabla II) (Horn y Barrientos, 2008; Leary, 2010). Resultados obtenidos en *Saccharomyces cerevisiae* sugieren que las reservas de cobre presentes en la matriz mitocondrial son la fuente de  $\text{Cu}^{1+/2+}$  para las subunidades COX1 y COX2 (Cobine y col., 2004). Es ampliamente aceptado que las metalochaperonas del IMS pueden unir y liberar  $\text{Cu}^{1+/2+}$ ; sin embargo, se desconoce cómo el cobre es transportado desde el citosol o desde la matriz mitocondrial al IMS. En levaduras y en mamíferos, la función de COX17, COX11 y de las proteínas SCO como chaperonas involucradas en la inserción del cobre ha sido muy bien caracterizada (para una revisión consultar Robinson y Winge, 2010). COX17 es una proteína pequeña y soluble del IMS que contiene cuatro cisteínas arregladas en dos dominios CX9C y dos cisteínas adicionales, conservadas en eucariotas. Estas dos cisteínas están involucradas en la unión del cobre en conjunto con una de las cisteínas del primer dominio CX9C. ScCOX17 puede adquirir distintas conformaciones como consecuencia de su capacidad de unir distinto número de átomos de cobre, en función de las interconversiones redox que puede tolerar. Además,

puede adoptar distintos estados de oligomerización en función de la cantidad de átomos de cobre que pueda unir (Palumma y col., 2004; Voronova y col., 2007).SCO1 y COX11 se encuentran unidas a la MI a través de un dominio transmembrana presente en su extremo N-terminal. El dominio globular, hacia el extremo C-terminal, se localiza en el IMS. Ambas proteínas unen cobre a través de sus cisteínas conservadas (SCO1 también utiliza su histidina conservada para la unión) ubicadas en el dominio globular (Balatri y col., 2003; Banci y col., 2011; Carr y col., 2002; Horng y col., 2005).

Tabla 2. Factores de ensamblaje de COX y proteínas con dominios CX<sub>9</sub>C del IMS.

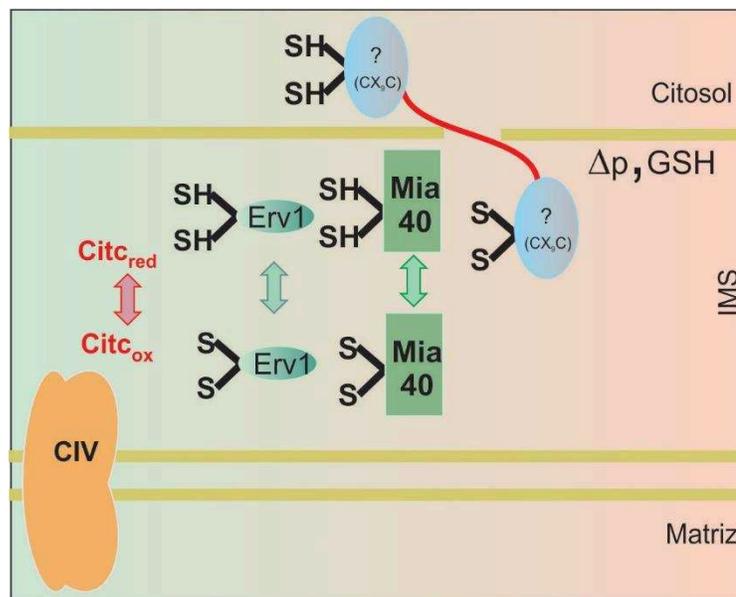
LEVADURAS		HUMANOS		PLANTAS		Función
Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	
<b>A. Factores de ensamblaje del CIV y codificados en el núcleo.</b>						
COX17	Cox17p	COX17	COX17	AT3G15352	COX17-1	Inserción del cobre en SCO1 y en COX11.
				AT1G53030	COX17-2	
SCO1	Sco1p	SCO1	SCO1	AT3G08950	HCC1	Inserción del cobre en COX2 y/o mantención del estado reducido de las cisteínas en COX2.
	Sco2p	SCO2	SCO2	AT1G02410		
COX11	Cox11p	COX11	COX11	AT1G02410	COX11	Inserción del cobre en COX1.
COX10	Cox10p	COX10	COX10	AT2G44520	COX10	Adición de un grupo farnesilo al protohemo.
COX15	Cox15p	COX15	COX15	AT5G56090	COX15	Conversión de hemo $\sigma$ a hemo $\alpha$ .
				AT4G39740	HCC2	Participación de la respuesta a estrés por UV-B.
<b>B. Proteínas con dominios CX<sub>9</sub>C del IMS que podrían participar en la biogénesis del CIV.</b>						
COX19	Cox19p	COX19	COX19-1	AT1G66590	COX19	
			COX19-2	AT1G69750		
COX23	Cox23p	COX23	COX23	AT1G2160		
PET191	Pet191p	PET191	PET191	AT1G10865		
CMC1	Cmc1p	CMC1	CMC1	AT5G16060		
CMC2	Cmc2p	CMC2	CMC2	AT4G21192		
YMR002w	mic17p	CHCHD2	MIC17	AT5G09570		
YDR512c	emi1p	C22orf39	EMI1	AT4G25315		
YKL053c-a	mdm35p	TRIAP1	MDM35	AT4G33100		
YEL059c-a	som1p	-	-	-		
YDR031w	mic14p	CHCHD5	MIC14	-		

En el modelo más simple que permite explicar la transferencia e inserción del cobre en las subunidades de COX, COX17 liberaría átomos de Cu<sup>+1</sup> a COX11 y SCO1. Se ha postulado que el sistema redox glutatión reducido/glutatión oxidado participaría en el mantenimiento del estado redox de las cisteínas de COX17. Luego, las chaperonas de membrana transferirían los átomos de cobre a COX1 y COX2, respectivamente (Robinson y Winge, 2010) . La función de estas chaperonas es soportada por la observación de que

ambas pueden unir y liberar cobre (Carr y col., 2002; Horng y col., 2005). Además, mutaciones en cualquiera de las tres chaperonas induce deficiencia en la actividad COX en mamíferos y en levaduras (Carr y col., 2002; Leary y col., 2004; Oswald y col., 2009). La deficiencia respiratoria observada en las mutantes de levaduras *cox17* es restaurada cuando se adiciona  $\text{Cu}^{2+}$  al medio de crecimiento o cuando se incrementa el número de copias de *ScSCO1*. El incremento de la expresión de *ScSCO2*, una proteína cuya mutación en levaduras no produce una deficiencia respiratoria, también revierte la deficiencia respiratoria en *cox17* (Glerum y col., 1996). Considerando que la sobreexpresión de *ScCOX17* no restaura la deficiencia respiratoria en las mutantes *sco1* de levaduras, se ha postulado que COX17 actúa en un paso previo a SCO1. Además, la función de COX17 podría ser reemplazada por otra metalochaperona, al menos cuando la concentración de cobre en el medio es elevada. Esto podría reflejar la activación de otros mecanismos de liberación de cobre en COX ante la presencia de una situación de estrés oxidativo, como es la generada por la alta concentración de metales de transición. Estudios por resonancia magnética nuclear permitieron demostrar la existencia de un mecanismo de transferencia del cobre desde COX17 a SCO1 (Banci y col., 2008). La presencia de un motivo de tipo tiorredoxina en SCO1 sugiere que esta chaperona actuaría como una tioldisulfuro isomerasa durante la captación del cobre (Williams y col., 2005). De acuerdo con esta idea, Abriata y col. (2008) mostraron que la inserción del cobre en COX2 de *Thermus thermophilus* requiere la actividad de una nueva metalochaperona (PCuAC), mientras que SCO1 sería requerida para mantener el estado de oxidación de las cisteínas aceptoras en el centro de  $\text{Cu}_A$  de COX2. Además, el hecho de que las proteínas SCO estén presentes en procariotas que no contienen oxidasas con centros de  $\text{Cu}_A$  sugiere que estas proteínas cumplen también funciones no relacionadas con el ensamblado de COX (Banci y col., 2007). En la variedad patogénica de *Neisseria monocitogenesse* se ha demostrado que SCO está involucrada en la respuesta frente al estrés oxidativo (Seib y col., 2003).

Además de COX17, otras proteínas con dominios  $\text{CX}_9\text{C}$  o  $\text{CX}_3\text{C}$  se localizan en el IMS (Khalimonchuk y Winge, 2008; Longen y col., 2009). Este motivo forma una doble hélice en horquilla estabilizada por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y por la formación

de puentes disulfuro (Abajian y col., 2004; Banci y col., 2009; Longen y col., 2009). En levaduras, la mutación de la mayoría de estas proteínas produce una deficiencia respiratoria, sugiriendo que participarían en el ensamblaje de COX. Como se describió anteriormente, la incorporación de estas proteínas esta mediada por el sistema MIA (Fraga y col., 2014; Terziyska y col., 2007). Considerando que los electrones provenientes de las etapas de oxidorreducción asociadas a MIA<sub>40</sub>/ERV1 son dirigidos a la cadena transportadora de electrones a través del citocromo c, se plantea una conexión directa entre las proteínas del IMS y la cadena respiratoria. Recientemente, se ha demostrado que la importación de proteínas a través del sistema MIA en mamíferos es dependiente de la relación GSH/GSSG y del potencial de membrana (Fischer y col., 2013), planteándose así una conexión entre el estado redox de la mitocondria y la cantidad de proteínas importadas al IMS (Figura 5).



**Figura 5. Conexión entre la actividad del CIV y el estado redox de la mitocondria a través de la importación de proteínas con dominios de cisteína.** La importación y correcto plegamiento de proteínas con dominios CX<sub>9</sub>C o CX<sub>3</sub>C son realizados a través del sistema MIA<sub>40</sub>/ERV1. Este transporte está asociado al potencial de membrana, requiere glutatión reducido y deriva en sucesivas reacciones de oxidorreducción. Los electrones puestos en juego ingresan al CIV a través del citocromo c. Considerando que las proteínas que incorporan cobre en las subunidades del CIV poseen dominios de cisteína, el estado de reducción de la cadena transportadora de electrones podría determinar la importación de proteínas al IMS. CIV, complejo IV; Citc, citocromo c; GSH, glutatión reducido;  $\Delta p$ , potencial de membrana.

#### 4.6. METALLOCHAPERONAS EN PLANTAS.

Proteínas similares a los factores de ensamblaje de COX se han identificado en plantas (para una revisión consultar García et al, 2014). En Arabidopsis, los genes *AtCOX17-1* (At3g15352) y *AtCOX17-2* (At1g53030) codifican dos proteínas COX17 capaces de complementar la mutante nula *cox17* de levaduras (Wintz y Vulpe, 2002). Arabidopsis también contiene dos genes diferentes, *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2*, los cuales codifican una proteína homóloga a COX19 de levaduras (Attallah y col., 2007b). *AtCOX19-1* produce dos transcritos, los cuales codifican proteínas que difieren en el extremo N-terminal, como consecuencia de un evento de *splicing* alternativo. Experimentos de importación en mitocondrias de papa mostraron que ambas proteínas se encuentran en el IMS, asociadas a la MI. Sin embargo, solo la isoforma corta complementa levaduras mutantes en COX19 (Attallah y col., 2007b). La proteína codificada por *AtCOX19-2* es idéntica a la forma corta producida por *AtCOX19-1* (Attallah y col., 2007b).

Proteínas homologas a SCO1 de humanos, denominadas HCC1 y HCC2, han sido identificadas en Arabidopsis (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). Sin embargo, HCC2 pierde, dependiendo de la especie vegetal, una o ambas cisteínas involucradas en la unión del cobre en SCO1. Además, la histidina conservada en las proteínas SCO que estaría involucrada en la unión del cobre tampoco está presente en HCC2. Sin embargo, HCC2 conserva el dominio tiorredoxina encontrado en SCO1 de levaduras. HCC1, en cambio, presenta un elevado porcentaje de homología con las proteínas SCO de levaduras y mamíferos. Además, el dominio soluble de HCC1 fusionado al dominio transmembrana de SCO1 de levaduras complementa la mutante nula *sco1* de levaduras. De acuerdo con esto, la mutante *hcc1/hcc1* es letal, obteniéndose embriones detenidos en la fase corazón que presentan una disminución significativa de la actividad COX (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). Por el contrario, mutantes nulas en HCC2 muestran niveles de actividad COX normales (Steinebrunner y col.2014), sugiriendo que esta proteína tiene una función diferente a la sugerida para HCC1.

En el genoma de *Arabidopsis* se ha identificado un gen (At1g02410) homólogo al gen de levaduras que codifica la proteína COX11 (Welchen y Gonzalez, 2005). Las proteínas AtCOX11 y ScCOX11 muestran un alto grado de similitud en su secuencia (32%, de identidad de aminoácidos) y en su estructura secundaria (Ivan Radin 2014, Tesis doctoral). Notoriamente, la alta similitud observada no es suficiente para que AtCOX11 complemente la mutante nula *cox11* de levaduras. Sin embargo, COX11 ha sido localizada en la MI de la mitocondria en células de raíz de *Arabidopsis*. Resultados recientes muestran que la deficiencia de AtCOX11 (30% de expresión del transcripto) disminuye en un 45% la actividad del complejo COX cuando esta actividad es evaluada como el consumo de oxígeno en presencia de citocromo *c* reducido (Ivan Radin 2014, Tesis doctoral). Sorpresivamente, las plantas que sobreexpresan (4-6 veces) AtCOX11 también muestran una disminución en la actividad del complejo COX. Además, ambos tipos de plantas muestran una disminución en la longitud de la raíz y en la velocidad de germinación del polen, dos procesos regulados por la eficiencia respiratoria. Es interesante que la deficiencia observada en las raíces de las plantas que sobreexpresan AtCOX11 es revertida si se adiciona cobre en el medio de crecimiento, mientras que la deficiencia del mismo exagera el acortamiento de la raíz. Las plantas deficientes en AtCOX11 no responden a los cambios de cobre en el medio de crecimiento (Ivan Radin 2014, Tesis doctoral). El autor propone que la disminución en los niveles de AtCOX11 en las plantas deficientes limita la posibilidad de la inserción del  $\text{Cu}^{2+}$  independientemente de la disponibilidad de cobre en el medio. En las plantas que sobreexpresan AtCOX11, la unión de cantidades limitadas de cobre por cantidades elevadas de AtCOX11 podría limitar la cantidad de cobre disponible para AtHCC1.

*Arabidopsis* también contiene homólogos a las proteínas CX<sub>9</sub>C de levaduras (Longen y col., 2009). Sin embargo, no hay reportes sobre la función de estos homólogos en plantas, excepto para la proteína AtMSM1 (*Arabidopsis Mitochondrial Stress Marker 1*), la cual ha sido propuesta como un marcador de respuesta a estrés mitocondrial (Van Aken y Whelan, 2012) y podría participar en la señalización retrógrada mitocondrial.

#### 4.6.1. COX17.

El primer gen de *Arabidopsis* que codifica un homólogo de COX17 de *Saccharomyces* fue identificado por Balandin y Castresana (2002) en plantas de *Nicotiana tabacum* hipersensibles a patógenos necrotróficos. La proteína codificada por este gen presenta un porcentaje de homología de 33% y 15% con COX17 de levaduras y humanos, respectivamente. Posteriormente, se demostró que existen dos genes en *Arabidopsis* que codifican dos proteínas homólogas a ScCOX17 denominadas COX17-1 (At3g15352) y COX17-2 (At1g53030) (Attallah y col., 2007a; Wintz y Vulpe, 2002). Las proteínas codificadas por estos genes presentan un 69% de identidad, siendo la región C-terminal la que presenta mayor conservación. Esta región presenta las cisteínas necesarias para la unión del cobre y para el transporte mediado por el sistema MIA. En la región que corresponde al extremo N-terminal, solo se observa un 25% de identidad. Un árbol filogenético construido mediante el alineamiento de proteínas COX17 eucariotas mostró que solo en plantas existe más de una copia de genes COX17 (Attallah y col., 2007a). La duplicación habría ocurrido solo en angiospermas, dado que no se encontró una segunda copia en gimnospermas (Figura 6)<sup>9</sup>. Dado que hay una segunda copia tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas pudo haber ocurrido una duplicación común a todas las Angiospermas y luego se habría perdido la segunda copia en las dicotiledóneas. La segunda copia en dicotiledóneas apareció antes de la separación entre *Brassica napus* y *Arabidopsis*. En monocotiledóneas la aparición de la segunda copia ocurrió antes de la separación que dio origen a los linajes de arroz, cebada y maíz. Notablemente, la segunda copia de COX17 en monocotiledóneas y dicotiledóneas no pertenecientes a Brassicaceas presenta mayor similitud con AtCOX17-1 que con AtCOX17-2. AtCOX17-2 tendría varios cambios que son específicos de la duplicación que ocurre en Brassicaceas.

Ambos genes presentan un intrón en la región 5' no codificante, cercano al respectivo inicio de la transcripción. Estos intrones poseen un tamaño grande (709 pb y 922 pb) comparados con el tamaño de los transcritos maduros, los cuales tienen 544 pb en el

---

<sup>9</sup> Se muestra un árbol filogenético actualizado respecto de las secuencias empleadas por Attallah y col. 2007a

caso de *AtCOX17-1* y 530 pb en el caso de *AtCOX17-2*. La delección de estos intrones anula la expresión de los genes. El estudio de la actividad de las secuencias promotoras indicó que los patrones de expresión son similares. Ambos genes se expresan en la raíz a lo largo de todo el ciclo de desarrollo de *Arabidopsis*, en cotiledones de plantas hasta el día 12 de desarrollo y en granos de polen. *AtCOX17-1* se expresa de manera diferencial en primordios de hoja, raíces nacientes y en el septum de las vainas. Además, la región promotora presenta dos elementos site II funcionales, dado que la mutación de uno o ambos disminuye significativamente la expresión de ambos genes. Como se mencionó anteriormente, estos elementos podrían permitir la expresión coordinada de los genes respiratorios de codificación nuclear (Attallah y col., 2007a).

El transcripto del gen codificado en el cromosoma 3 aumenta sus niveles en presencia de altas concentración de cobre, luego de la inoculación con bacterias necrotróficas, tratamientos con ácido salicílico, nitroprusiato de sodio y peróxido de hidrógeno. Según los autores (Balandin y Castresana, 2002), la inducción de la expresión de *AtCOX17-1* bajo dichas condiciones de crecimiento sería consecuencia de la inhibición de la actividad mitocondrial como consecuencia de la situación de estrés generada. Posteriormente, Attallah y col. (2007a) demostraron que *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* se inducen bajo diferentes situaciones de estrés.

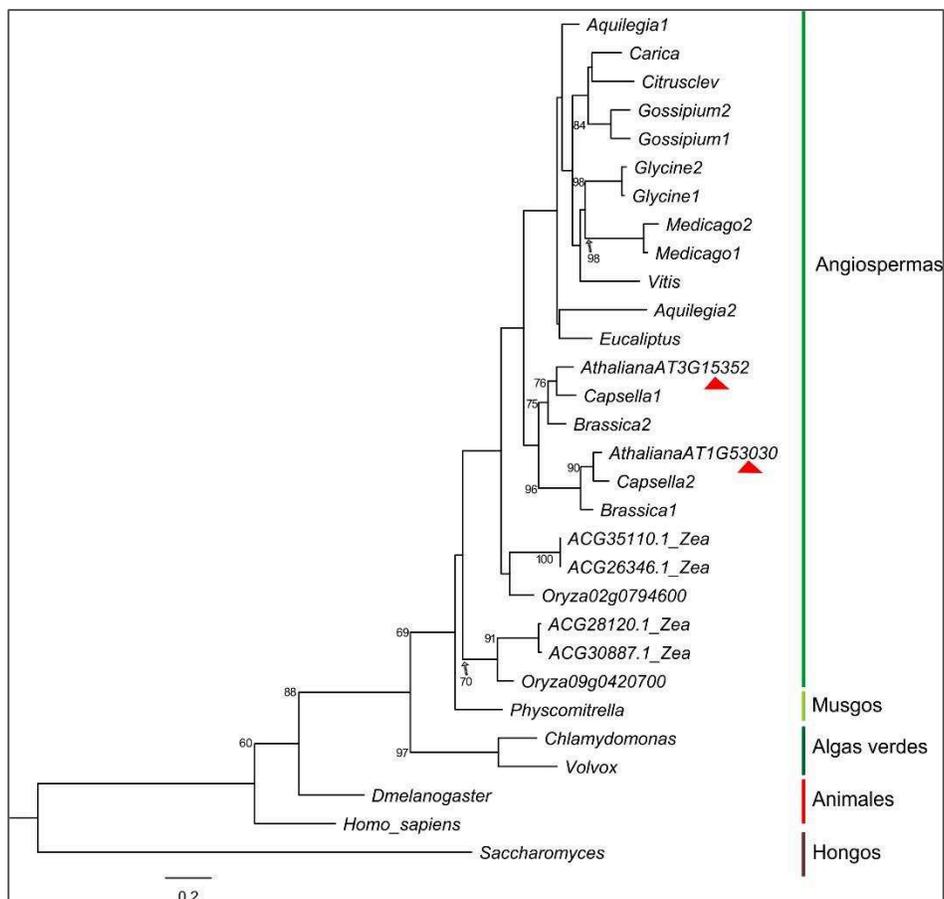


Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud de COX17. Los números debajo de las ramas indican el valor de *bootstrap*; solo se indican en ramas con soporte significativo ( $\geq 50$ ). El largo de las ramas indica la tasa de sustitución nucleotídica. El árbol fue obtenido con el programa PhyML 3.0.

#### 4.6.2. COX19.

En el genoma de Arabidopsis existen dos genes que codifican proteínas similares a la proteína de levaduras ScCOX19, ambos localizados en el cromosoma 1, los cuales fueron nombrados AtCOX19-1 y AtCOX19-2 (At1g66590 y At1g69750, respectivamente). Estos genes codifican proteínas idénticas, pero uno de ellos (AtCOX19-1) sufre un evento de *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 es específica de Arabidopsis. Los dos genes se expresan ya que se han encontrado clones de ADNc (ESTs o clones de secuencia completa) para cada uno de ellos (Attallah y col., 2007b). Estos genes están compuestos por cuatro exones. 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. Estas evidencias sugieren que estos dos genes se originaron a partir de un evento de duplicación reciente en el genoma de Arabidopsis.

Attallah y col. (2007b) han comprobado que las proteínas AtCOX19 son importadas al IMS de mitocondrias vegetales. Además, la expresión de la secuencia codificante de AtCOX19-1 o de AtCOX19-2 en la mutante de levaduras rescata el fenotipo respiratorio (Attallah y col., 2007b).

Por otro lado, resultados obtenidos con plantas que expresan la secuencia codificante de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) bajo el control de la secuencia promotora de AtCOX19-1 mostraron que la actividad del promotor es inducida ante la presencia de compuestos que generan EROs y en condiciones tanto de estrés biótico como abiótico. En particular, la exposición de estas plantas a concentraciones elevadas de FeSO<sub>4</sub> o de CuSO<sub>4</sub> produjo un aumento en la actividad de la enzima reportera (Attallah y col., 2007b).

Frente a estas evidencias nos preguntamos cuales son las funciones de AtCOX17 y AtCOX19 en Arabidopsis. El primer interrogante que nos planteamos fue si estas proteínas participan en la biogénesis del complejo COX en plantas. Luego, nos preguntamos si los cambios en la expresión de estos genes frente a distintas condiciones de estrés son consecuencia de su participación en el ensamblaje de COX o un reflejo de la participación de estas proteínas en otros procesos.

---

---

## 5. OBJETIVOS.

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de Tesis es estudiar la función de un grupo de proteínas vegetales involucradas en la inserción de cobre en las subunidades I y II del complejo IV de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria. Se estudiará el rol de estas proteínas en la biogénesis del complejo IV, durante la respuesta a estrés y en el metabolismo de metales en plantas de *Arabidopsis*. De esta manera, se busca aportar información para conocer cómo la actividad mitocondrial se relaciona con los cambios que ocurren a nivel celular y ambiental y con las respuestas asociadas a los mismos.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la localización intracelular de AtCOX17 y AtCOX19, para las cuales se ha observado una localización dual en levaduras.
- Obtener plantas con niveles de expresión disminuidos de los genes *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* y analizar si ocurren modificaciones en la actividad del complejo CIV o en su ensamblado.
- Estudiar la respuesta a estrés en plantas deficientes en los genes *AtCOX17*.
- Obtener plantas con niveles disminuidos de la proteína AtCOX19.
- Estudiar los cambios transcripcionales asociados al metabolismo de metales y la respuesta a estrés en plantas deficientes en *AtCOX19*



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. MATERIALES.

#### 6.1.1. Material vegetal.

La etapa experimental de este trabajo se llevó a cabo empleando como organismo de estudio la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*). Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Heyhn. ecotipo Columbia (Col-o) fueron provistas por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Heyhn. Ecotipo Landsberg erecta (Ler), las semillas de plantas mutantes con inserciones de T-DNA de líneas SALK (Alonso y col., 2003) y las mutantes que contienen genes reporteros fueron obtenidas del *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, Ohio State University). Las mutantes obtenidas mediante mutagénesis química, las plantas mutantes con inserciones de T-DNA de la línea GABI-Kat (Scholl y col., 2000) y las plantas transformadas con una construcción antisentido (as) para silenciar el gen *AOX1a* fueron obtenidas del *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC, Nottingham, UK).

#### 6.1.2. Plantas mutantes y silenciadas (no generadas en nuestro laboratorio).

La presencia de la inserción de T-DNA en las plantas mutantes de líneas SALK fue confirmada mediante PCR sobre  $\mu$  empleando un oligonucleótido específico para el gen mutado y el oligonucleótido LBb<sub>1</sub> (ver Tabla 1, Anexo I). Este oligonucleótido es específico para la inserción de T-DNA de las líneas SALK. La construcción *antisense* (as) en plantas silenciadas fue evaluada mediante oligonucleótidos específicos (ver Tabla 1, Anexo I). Tanto para las mutantes de líneas SALK como para las mutantes obtenidas mediante mutagénesis química se evaluaron los niveles de los transcritos derivados del gen de interés mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR, ver inciso 1.2.18).

En la Tabla 1 se detallan las plantas mutantes y líneas reporteras empleadas durante la etapa experimental de este trabajo.

**Tabla 1. Plantas mutantes y líneas reporteras utilizadas en este trabajo de Tesis**

Gen blanco	AGI	Línea	Ecotipo	Nombre en este trabajo	Descripción de la modificación	Técnica para evaluar la modificación	Proveedor
COX17-2	At1g53030	SALK_062021C	Col-0	cox17-2	T-DNA	PCR	ABRC
AOX1a	At3g22370	N6599	Col-0	asAOX1a.99	35s:asAOX1a	PCR	NASC
		N6707	Col-0	asAOX1a.07	35s:asAOX1a	PCR	NASC
ABI4	At2g40220	N8104	Col-0	abi4-1	delección (DG) y cambio del marco de lectura	RT-qPCR	NASC
		N3837	Col-0	abi4-102	sustitución (G80A)	RT-qPCR	NASC
ABI3	At3g24650	N24	Ler-0	abi3-1	sustitución y cambio del marco de lectura	RT-qPCR	NASC
ABI3		N6131	Ler-0	abi3-5		RT-qPCR	NASC
		CS16707	Col-0	pDR5:GUS	expresión del gen <i>GUS</i> bajo el control de un promotor sintético derivado del gen <i>GH3</i>	Histoquímica	ABRC
			Col-0	pMIR398b:GUS	expresión del gen <i>GUS</i> bajo el control del promotor del <i>MIR398b</i>	Histoquímica	Dr. Javier Palatnik
		N16263	Col-0	mt-gk	expresión de GFP en la mitocondria	PCR	Dr. Iris Stenebrunner

### 6.1.3. Cepas utilizadas.

Todos los clonados fueron realizados utilizando la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ [supE44  $\Delta$ lacU16g ( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1') thi-1 relA1) (Hanahan, 1983).

Las construcciones realizadas para expresar proteínas recombinantes para la producción de anticuerpos fueron obtenidas en la cepa DH5 $\alpha$  y luego introducidas en la cepa de *E. Coli* BL21 [F - ompThsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)].

Para la transformación de *Arabidopsis* empleó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LB4404. Esta cepa presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/l). Esta cepa utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomicina (300 mg/l)) en la cepa Ach5. Esta cepa además posee el plásmido pTi/pRi pTiAch5 (Ooms y col., 1982).

### 6.1.4. Vectores utilizados.

**pENTR-3C.** Vector de entrada (Entry vector) para el sistema Gateway (Life Technologies). Este vector permite el clonado de la secuencia de ADN de interés entre los sitios denominados *attL*. La secuencia clonada entre estos sitios puede recombinarse entre los sitios *attrR* del vector de destino (Destination Vector). Este vector genera

resistencia a cloranfenicol ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) y kanamicina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en bacterias. Todas las secuencias de ADN clonadas en este vector fueron recuperadas como productos de PCR empleando oligonucleótidos específicos para el vector denominados AHLF y AHLR.

**pEarlygate100.** Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar el gen de interés en plantas bajo el control del promotor  $35S$  del virus del mosaico de la coliflor ( $35S\text{CaMV}$ ). Genera resistencia a estreptomicina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) y espectinomicina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en bacterias y a herbicida BASTA (Bayer) en plantas.

**pGWB554.** Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la secuencia codificante de la proteína roja fluorescente monomérica (mRFP) bajo el control del promotor  $35S$  del virus del mosaico de la coliflor ( $35S\text{CaMV}$ ). Genera resistencia a estreptomicina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) y espectinomicina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en bacterias y a higromicina ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en plantas (Nakagawa y col., 2007).

**pGWB553.** Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés como fusión a la secuencia codificante de la mRFP bajo el control de un promotor de interés. Genera resistencia a estreptomicina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) y espectinomicina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en bacterias y a higromicina ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en plantas (Nakagawa y col., 2007).

**pBI121.** 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 ( $35S\text{CaMV}$ ) frente al gen *GUS* (Jefferson y col., 1987).

**pNB47.** Este vector deriva del vector binario pCHF3 (Jarvis y col., 1998). Permite el clonado de microARNs artificiales (amiARNs) empleando el esqueleto del miR319 y bajo el control del promotor  $35S\text{CaMV}$ . Genera resistencia a espectinomicina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en bacterias y a kanamicina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en plantas. Este vector fue gentilmente cedido por el Dr. Javier Palatnik (IBR, Argentina).

**pGEX-4T3.** Este vector permite expresar la secuencia codificante de la proteína de interés como fusión a la proteína GST (GE Healthcare).

#### 6.1.5. Secuencias utilizadas.

Todas las secuencias nucleotídicas analizadas en este trabajo se obtuvieron de la base de datos proporcionada por el TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*). Los estudios de alineamientos de secuencias nucleotídicas se realizaron utilizando el programa BLAST (blastn o blastp, respectivamente, Altschul y col., 1990), así como el programa ClustalO 1.0.2 (Sievers y col., 2011; [www.ebi.ac.uk/Tools/mhsc/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/mhsc/clustalo/)) (Thompson y col., 1994). El diseño de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RT-qPCR se realizó con el programa Primer BLAST (Ye y col., 2012).

---

## 6.2. MÉTODOS .

#### 6.2.1. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

Las reacciones de amplificación para obtener fragmentos de ADN para su posterior clonado se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ L. Brevemente, en cada reacción se empleó solución amortiguadora,  $MgCl_2$  2 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos específicos (500 ng) y 1,5 U de la enzima *TaqDNA* polimerasa (Invitrogen). A esta mezcla de reacción se le adicionó el ADN molde y se procedió a la reacción de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PxE 0,2 ThermalCycler (ThermoElectronCorporation) 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 [ $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ ].

Las reacciones de amplificación en las que se utilizó como molde ADN procedente de colonias de bacterias tomadas directamente desde la placa de Petri se realizaron en un volumen final de 15  $\mu$ L, conservando las proporciones de todos los reactivos.

Los productos de amplificación se separaron y visualizaron en geles de agarosa (ver el siguiente inciso).

#### 6.2.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Los productos de amplificación obtenidos en la PCR fueron separados y visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (Sambrook, 1989). Para esto, se preparó agarosa en buffer TAE 1x (ver Anexo II) en la concentración correspondiente al tamaño del ADN que debía separarse. Los productos de amplificación se diluyeron en buffer de siembra de ADN conteniendo el agente intercalante Syber Green (ver Anexo II). Se sembraron en la matriz de agarosa y se corrieron a 80V durante 20 minutos. Como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN se empleó ADN del bacteriófago  $\lambda$  (Promega) digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Finalizada la corrida electroforética, se procedió a la visualización del ADN mediante exposición a luz UV.

#### 6.2.3. Purificación de fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN se purificaron a partir de geles de agarosa, empleándose el equipo comercial GFX<sup>TM</sup> PCR DNA y Gel Purification (AXYGEN, USA).

#### 6.2.4. Digestión 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  $\mu\text{g}$  de ADN a digerir en un volumen final que varió entre 20 y 50  $\mu\text{L}$ , dependiendo de la cantidad de ADN. Para la digestión de los vectores provenientes de las mini preparaciones de ADN, se adicionó a la reacción de corte la enzima ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0,5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .

#### 6.2.5. Ligación de moléculas de ADN.

La ligación de fragmentos de ADN se realizó empleando 1 U de la enzima T<sub>4</sub> DNA ligasa (Promega) en un volumen final de reacción de 10  $\mu\text{L}$ . En la mezcla de reacción se incorporaron la solución amortiguadora y los fragmentos a ligar en las proporciones sugeridas por el fabricante.

#### 6.2.6. Transformación de bacterias de *E. coli* con ADN plasmídico.

La preparación de células de *E. coli* competentes para transformación por electroporación se realizó según las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Luego de la electroporación las células de *E. coli* se recuperaron en 1 mL de medio LB y se incubaron durante 1h a 37°C. Se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 µL de medio LB y se sembró en placas de Petri con LB-agar (ver Anexo II) suplementado con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron toda la noche (o hasta la aparición de colonias) a 37°C. Luego de la aparición de colonias, las mismas se utilizaron para realizar PCR en colonia como se describió en el inciso 1.2.1. Cuando la PCR fue positiva (presencia de un amplicón del tamaño adecuado) se procedió al repique de la colonia correspondiente para realizar posteriormente mini-preparación de ADN plasmídico.

#### 6.2.7. Transformación de bacterias de *A. tumefaciens* con ADN plasmídico.

La preparación de células competentes de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación para *E. coli*, modificando la solución amortiguadora en la que se conservan las bacterias (ver Anexo II, Solución de conservación de *A. tumefaciens*). Luego del disparo eléctrico las bacterias se recuperaron en 1 mL de LB y se incubaron durante 2 horas a 28°C. Se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 µL y se sembró en placas de Petri con LB-agar (ver Anexo II) suplementado con estreptomicina (300 µg.mL<sup>-1</sup>), rifampicina (50 µg.mL<sup>-1</sup>) y el antibiótico correspondiente al plásmido con el que se procedió a la transformación.

#### 6.2.8. Mini-preparación de ADN plasmídico.

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *E. coli* 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 Mini-preps DNA Purification (AXYGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### 6.2.9. Clonados.

Durante este trabajo de Tesis se realizaron diferentes clonados con el objetivo de obtener plantas silenciadas en *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* o *AtCOX19*, plantas que sobreexpresen dichos genes y plantas que expresen dichas proteínas como proteínas de fusión a la proteína fluorescente roja monomérica (mRFP), ya sea bajo el control del promotor 35SCaMv o del promotor del propio gen. A continuación se detallan cada uno de estos clonados.

**Construcciones amiCOX17-1, amiCOX17-2<sup>1</sup>.** Estas construcciones permiten silenciar específicamente *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* mediante la generación de un microARN artificial (amiARN). Para obtener estas construcciones se emplearon las herramientas provistas en el sitio WMD3 (Web MicroRNA Designer;

---

<sup>1</sup> Las construcciones denominadas ami(1) fueron realizadas por la Dra. Elina Welchen. Las construcciones ami(2) fueron realizadas por la autora de este trabajo de Tesis

[wmd3.weigelworld.org](http://wmd3.weigelworld.org)). Se diseñaron dos amiARNs que permiten silenciar específicamente *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2*. Estos se obtuvieron de una lista de 40 amiARNs arrojados como resultado por el WMDR3. De esta lista se tomaron mejores, considerando el  $\Delta G^\circ$  y los grados de penalización en relación a la especificidad. Luego de seleccionar las secuencias más apropiadas para los amiARNs, se diseñaron los oligonucleótidos sugeridos por la herramienta del WMD3 (Tabla 1, Anexo I). Los primeros 21 nucleótidos del oligonucleótido denominado amis permiten verificar los genes blancos para el amiARN diseñado en el sitio web del WMD3. Se realizaron tres reacciones de amplificación para obtener cada uno de los amiARNs (ver Figura 3, Anexo I). Como molde se empleó el plásmido pNB47 (ver inciso 1.1.4.). Este plásmido binario permite la expresión del amiARN empleando el esqueleto del *miR319a* bajo el control del promotor 35SCaMV. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pNB47 reemplazando la secuencia del *miR319a* entre los sitios *PstI* y *NcoI*. Esta construcción se empleó para transformar *A. tumefaciens* y finalmente plantas salvajes de Arabidopsis.

**Construcciones amiCOX19.** Para silenciar *AtCOX19* también se empleó una estrategia basada en la expresión de un microARN. Como se mencionó en la introducción, en Arabidopsis existen dos genes, *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2*, que codifican proteínas idénticas. Dentro de la lista de los 10 mejores amiARNs sugeridos por la herramienta del WMDR3, no fue posible silenciar un gen o el otro de manera diferencial, ya que los mismos presentan muy pocas variaciones en secuencia (ver Figura 1, Anexo I). De acuerdo a esto, se diseñaron dos amiARNs que silencian ambos genes en simultáneo (Figura 3, Anexo I).

**Construcción 35S:COX17-1<sup>2</sup>.** Esta construcción permite expresar el gen *AtCOX17-1* bajo el control del promotor 35SCaMV. Para obtener esta construcción se procedió a la extracción de ADN genómico de Arabidopsis como se describe en el inciso 1.2.13. Usando este ADN como molde se amplificó, mediante PCR, un fragmento de ADN de 990pb usando oligonucleótidos específicos que incorporan los sitios de restricción *BglII/XhoI* (GateCOX17-1F y GateCOX17-1RSTOP; ver Tabla 1, Anexo I). El oligonucleótido

---

<sup>2</sup> Este clonado fue realizado por la Dra. Elina Welchen

GateCOX17-1RSTOP incluye un codón de finalización de la traducción. El fragmento amplificado incluye 710pb ubicados corriente arriba del codón de inicio de la traducción, donde se localiza un intrón. Se incluyó esta región no codificante dado que se ha demostrado que el intrón mencionado es necesario para la expresión de este gen (Attallah y col., 2007). Una vez purificado y digerido con las enzimas de restricción apropiadas, el fragmento de ADN fue clonado en el vector pENTR-3C. Este clon se utilizó como molde para una PCR utilizando oligonucleótidos específicos del vector que permiten amplificar el inserto de interés adicionando los sitios de recombinación del sistema Gateway. El producto de esta PCR fue purificado y se recombinó empleando 1 U de la enzima Gateway LR Clonase (Invitrogen), solución amortiguadora provista por el fabricante, buffer TE 1x pH=8 (ver Anexo II), 50 ng del vector de destino y 100 ng del producto de amplificación en un volumen final de 10  $\mu$ L. La reacción se incubó a 25°C durante 2 horas, se diluyó 50 veces y se transformaron células DH5 $\alpha$  como se describió en el inciso 1.2.6. Como vector de destino para esta construcción se utilizó el vector pEarlygate-100 (Earley y col., 2006). Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de Arabidopsis.

**Construcción 35S:COX17-1-RFP.** Esta construcción permite expresar el gen *AtCOX17-1* bajo el control del promotor 35S<sub>CaMV</sub> y como fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP en plantas. Para obtener esta construcción se procedió a la extracción de ADN genómico de Arabidopsis como se describe en el inciso 1.2.13. Usando este ADN como molde se amplificó, mediante PCR, un fragmento de ADN de 990-pb con oligonucleótidos específicos que incorporan los sitios de restricción *BglII/XhoI* (GateCOX17-1F y GateCOX17-1R; ver Tabla 1, Anexo I). El fragmento amplificado incluye 710-pb ubicados corriente arriba del codón de inicio de la transcripción. Una vez purificado y digerido con las enzimas de restricción apropiadas, el fragmento de ADN fue clonado en el vector pENTR-3C. Este clon se utilizó como molde para una PCR utilizando oligonucleótidos específicos del vector que permiten amplificar el inserto de interés adicionando los sitios de recombinación del sistema Gateway. El producto de esta PCR fue purificado y se recombinó según las condiciones descritas en el inciso anterior. Como

vector de destino para esta construcción se utilizó el vector pGWB554 (Nakagawa y col., 2007). Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de *Arabidopsis*.

**Construcción *pCOX17-1:COX17-1-RFP*.** Esta construcción permite expresar *AtCOX17-1* bajo la dirección de su promotor propio y como fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP en plantas. Empleando ADN genómico como molde, se realizó una PCR con los oligonucleótidos GateCOX17-1p y GateCOX17-1R (ver Tabla 1, Anexo I). El fragmento obtenido en esta PCR tiene 2709 pb, incluyendo 1719 pb de la secuencia promotora, 710 pb del primer intrón y 280 pb que corresponden a la secuencia codificante. Los oligonucleótidos utilizados incorporan los sitios de restricción *Sall/XhoI*. El producto de amplificación, purificado y digerido con las enzimas correspondientes, fue clonado en el vector pENTR-3C para su posterior recombinación en el vector pGWB553 (Nakagawa y col., 2007). El protocolo de recombinación fue el mismo detallado para la construcción *35S:COX17-1*. El vector pGWB553 permite la fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP. Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de *Arabidopsis*.

**Construcciones *35S:COX17-2*<sup>3</sup>.** Esta construcción permite expresar el gen *AtCOX17-2* frente al promotor *35SCaMV* en plantas. Para obtener esta construcción se procedió a la extracción de ADN genómico de *Arabidopsis* como se describe en el inciso 1.2.13. Usando este ADN como molde se amplificó, mediante PCR, un fragmento de ADN de 1217-pb usando oligonucleótidos específicos que incorporan los sitios de restricción *BglII/XhoI* (GateCOX17-2F y GateCOX17-2RSTOP; ver Tabla 1, Anexo I). El oligonucleótido GateCOX17-1RSTOP incluye un codón de finalización de la traducción. El fragmento amplificado incluye 992-pb ubicados corriente arriba del codón de inicio de la traducción, que contienen un intrón. Se incluyó esta región no codificante dado que se ha demostrado que este intrón es necesario para la expresión del gen (Attallah y col., 2007). Una vez purificado y digerido con las enzimas de restricción apropiadas, el fragmento de ADN fue clonado en el vector pENTR-3C. Este clon se utilizó como molde para una PCR

---

<sup>3</sup> Este clonado fue realizado por la Dra. Elina Welchen

con oligonucleótidos específicos del vector que permiten amplificar el inserto de interés adicionando los sitios de recombinación del sistema Gateway. El producto de esta PCR fue purificado y se recombinó según las condiciones descritas en el inciso anterior. Como vector de destino para esta construcción se utilizó el vector pEarlygate-100. Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de *Arabidopsis*.

**Construcción 35S:COX17-2-RFP.** Esta construcción permite expresar *AtCOX17-2* bajo el control del promotor 35SCaMV y como fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP en plantas. Empleando ADN genómico como molde se amplificó un fragmento de 1217 pb empleando oligonucleótidos específicos (GateCOX17-2F y GateCOX17-2R, ver Anexo I). Los oligonucleótidos utilizados incorporan los sitios de restricción *Sall/XhoI*. El producto de amplificación, purificado y digerido con las enzimas correspondientes, fue clonado en el vector pENTR-3C para su posterior recombinación en el vector pGWB554. El protocolo de recombinación fue el mismo detallado para la construcción 35S:COX17-2. El vector pGWB554 permite la fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP. Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de *Arabidopsis*.

**Construcción pCOX17-2:COX17-2-RFP.** Esta construcción permite expresar el gen *AtCOX17-2* bajo la dirección de su promotor propio y como fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP en plantas. Empleando ADN genómico como molde, se realizó una PCR con los oligonucleótidos GateCOX17-2p y GateCOX17-2R (ver Tabla 1, Anexo I). El fragmento obtenido en esta PCR tiene 2153 pb, incluyendo 939 pb de la secuencia promotora, 992 pb del primer intrón y 225 pb que corresponden a la secuencia codificante. Los oligonucleótidos utilizados incorporan los sitios de restricción *Sall/XhoI*. El producto de amplificación, purificado y digerido con las enzimas correspondientes, fue clonado en el vector pENTR-3C para su posterior recombinación en el vector pGWB553. El protocolo de recombinación fue el mismo detallado para la construcción 35S:COX17-2. El vector pGWB553 permite la fusión a la secuencia codificante de la proteína mRFP. Esta

construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de *Arabidopsis*.

**Construcción 35S:COX19.** Esta construcción permite expresar el gen *AtCOX19* bajo el control del promotor 35sCaMV en plantas. Empleando ADN genómico como molde, se realizó una PCR con los oligonucleótidos GateCOX19F y GateCOX19RSTOP (ver Tabla 1, Anexo I). Estos oligonucleótidos permiten amplificar un fragmento de 1004 pb del gen *AtCOX19-1* entre los sitios *BglII/XhoI* y adicionan un codón de finalización de la traducción. Este fragmento incluye el primer intrón en la región 5' codificante. El producto de amplificación, purificado y digerido con las enzimas correspondientes, fue clonado en el vector pENTR-3C para su posterior recombinación en el vector pEarlyGate-100. El protocolo de recombinación fue el mismo detallado para la construcción 35S:COX17-2. Esta construcción fue utilizada para transformar *A. tumefaciens* y finalmente para transformar plantas de *Arabidopsis*.

#### 6.2.10. Condiciones generales de crecimiento de *Arabidopsis*.

Las plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas en cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura (21-23°C durante el día y 15-19°C durante la noche), humedad (50-64% durante el día y 80-100% durante la noche) y luz (flujo de fotones fotosintéticos 84-100  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Las condiciones de iluminación fueron logradas con una combinación de lámparas fluorescentes blancas frías y de tipo GroLux (Silvania, Vinhedo, SP, Brasil). En función del estudio realizado se simuló un fotoperiodo de "día largo" (LD) o de "día corto" (SD). El fotoperiodo LD consistió en 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad mientras que el fotoperiodo SD consistió en 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad.

*Crecimiento en sustrato.* Las condiciones anteriores fueron consideradas como condiciones "control" para plantas sembradas y crecidas en sustrato. El sustrato se preparó mezclando vermiculita, perlita y turba (1:2:1) y se cubrió con tierra fértil previamente esterilizada. Las plantas crecidas de esta forma fueron regadas con agua por

subirrigación tres veces por semana y fertilizadas con 0,375 g/L del fertilizante Hakaphos rojo cada 7 días en un volumen de 1L cada 16 macetas.

*Crecimiento en placa.* Las semillas de Arabidopsis empleadas para crecimiento en placa de Petri fueron desinfectadas durante 5 min en etanol absoluto, durante 15 minutos con solución de desinfección (HClO 5% y SDS 1%) y lavadas en H<sub>2</sub>O<sub>(d)</sub> tres veces. Luego, se resuspendieron en solución estéril de agar 0,1% y se sembraron por punto (empleando un tip amarillo cortado) en medio Murashige y Skoog (MS) 0,5x (MS519, New Phytotechnology) suplementado con agar 0,8%. Las placas se dispusieron de manera horizontal en cámara de cultivo con fotoperiodo LD. Cuando se necesitó cuantificar el largo de la raíz las placas se dispusieron de manera vertical. Medios con distintas concentraciones de Cu<sup>2+</sup> se consiguieron mediante el agregado de CuSO<sub>4</sub> al medio MS 0,5x. Los ensayos de crecimiento de raíz en distintas concentraciones de Fe<sup>+2</sup> se realizaron empleando como medio base solución Hoaglands suplementada con agarosa 0,8%. El Fe<sup>2+</sup> se adicionó en forma de EDTAFe(II).

#### 6.2.11. Transformación de plantas de Arabidopsis.

Las plantas de Arabidopsis fueron transformadas mediante el método de inmersión floral (*floral dip*) descrito por Clough y Bent (1998). Para cada transformación se prepararon 8 macetas con tierra en las que se sembraron aproximadamente 11 semillas. Las semillas se cultivaron en cámara bajo las condiciones antes descritas hasta el momento de la floración (aproximadamente 4 semanas). En ese momento, se procedió a cortar las inflorescencias para obtener un mayor número de flores al momento de transformar. Luego de tres cortes se procedió a la inmersión floral, en solución de transformación.

La solución de transformación se preparó a partir del pellet de un cultivo de *A. tumefaciens* previamente transformado (ver inciso 1.2.7) crecido hasta una DO<sub>600</sub>=0.5. Para obtener este cultivo se preparó un pre-inóculo en 30mL de medio Luria-Bertani (LB) con rifampicina (50 µg.mL<sup>-1</sup>), estreptomina (300 µg.mL<sup>-1</sup>) y el antibiótico marcador de selección para la construcción de interés. El pre-inóculo se cultivó hasta saturación

durante 24 h a 28°C y una agitación de 160 rpm. Este cultivo se diluyó 50 veces en Erlenmeyer con 600 mL de medio LB suplementado con los mismos antibióticos que el pre-inóculo. Este cultivo se creció hasta alcanzar la fase estacionaria (12-14 hs, a 28°C y 160 rpm). Las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos. El pellet se resuspendió cuidadosamente en 1 L de solución de sacarosa 5%. Una vez resuspendidas las células, se adicionaron 500 µL de detergente a la suspensión (Silwet L-77, OSI Specialties, Inc.). La solución se llevó a agitación y se procedió a la inmersión de las inflorescencias de plantas de Arabidopsis durante 1 min aproximadamente. Finalmente, las plantas se incubaron en posición horizontal durante 24 hs en cámara de cultivo (condiciones control). Finalizado el tiempo de incubación, las plantas se colocaron en posición vertical, se fertilizaron y regaron con agua hasta la observación de la formación de las vainas (pleno desarrollo de las semillas, 4-5 semanas aproximadamente). Una vez formadas las vainas, se suspendió el riego. Al finalizar el ciclo de vida de Arabidopsis se colectaron las vainas, se purificaron las semillas y éstas se conservaron a 4°C para su posterior análisis.

#### 6.2.12. Selección de plantas transformadas.

Las semillas provenientes del proceso de transformación se desinfectaron como se explicó anteriormente y se sembraron en placas de Petri con medio MS 0,5x suplementado con el antibiótico correspondiente (marcador de selección en plantas determinado por el vector en el cual se realizó el clonado). Las semillas fueron vernalizadas durante 48hs y se colocaron en la cámara de cultivo (fotoperiodo LD) para permitir el desarrollo de aquellas semillas que hubiesen recibido el ADN exógeno y la consecuente resistencia a un antibiótico. Las plantas que fueron transformadas con el vector pEarlygate-100 (ver inciso 1.2.9), que otorga resistencia al herbicida BASTA, fueron seleccionadas en tierra. Brevemente, las semillas purificadas y vernalizadas fueron sembradas en alta densidad en sustrato y se regaron con BASTA una vez cada 7 días durante los primeros 20 días de crecimiento (momento en el cual se observa clorosis y muerte celular en las plantas no transformadas).

En ambos casos, se extrajo ADN genómico (ver en el siguiente inciso) de las plantas que resistieron el proceso de selección. El ADN obtenido se utilizó como molde para evaluar mediante PCR la presencia del transgén.

#### 6.2.13. Mini-preparación de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.

La extracción de ADN genómico se realizó según el método descrito por Li y Chory (1998). Una hoja de roseta fue disgregada durante 15 segundos con un pilón plástico a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 700  $\mu\text{L}$  de solución de extracción (ver Anexo II), se mezcló en vórtex durante 15 segundos y se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó con 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet con el ADN genómico se secó y se disolvió en 50  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O-MQ estéril.

#### 6.2.14. Análisis de las plantas transformadas.

Con el objetivo de verificar la presencia de la inserción de interés en las plantas resistentes al marcador de selección se realizó una PCR empleando como molde ADN genómico de las mismas. En las reacciones de amplificación se emplearon oligonucleótidos específicos para cada una de las inserciones de interés (ver Tabla 2, Anexo I). Las plantas que presentaron la inserción de interés se dejaron crecer hasta maduración de las vainas, se recuperaron las semillas y se proliferaron hasta obtener plantas homocigotas, siempre que fue posible. Con estas líneas se realizaron los ensayos descritos en este trabajo.

#### 6.2.15. Extracción de ARN de Arabidopsis.

Las extracciones de ARN se realizaron con Trizol comercial (Molecular ProbesTRizol, número de catálogo 15596026), de acuerdo a las especificaciones del fabricante con mínimas modificaciones. Luego de la precipitación con isopropanol absoluto sugerida por el fabricante, se procedió a la resuspensión del pellet con LiCl 2M. Esta solución se incubó a 4°C durante 12 horas, se centrifugó y se descartó el

sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -MQ estéril y se precipitó con 30  $\mu\text{L}$  de Acetato de sodio 2M pH=5 y 783  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Se incubó durante 5 minutos a  $-80^\circ\text{C}$  y se centrifugó durante 20 minutos a 15000 rpm. El pellet obtenido se lavó dos veces con etanol 80%, se centrifugó nuevamente y se dejó secar. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -MQ estéril tratada con luz UV-B durante 30 minutos.

#### 6.2.16. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La calidad de los ácidos nucleicos obtenidos (ADN y ARN) se evaluó mediante medición de la relación de absorbancia 260nm/280 nm. La cuantificación de ADN se realizó considerando que  $\text{DO}_{260}=1$  equivale a  $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de ADN y mediante comparación de la intensidad de fluorescencia en geles de agarosa en relación a una concentración conocida de ADN. La cuantificación de ARN se realizó considerando que  $\text{DO}_{260}=1$  equivale a  $40 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de ARN.

#### 6.2.17. Transcripción reversa.

La cuantificación de los niveles de transcritos de los genes de interés fue realizada mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). El ADNc (ADN copia) se obtuvo mediante transcripción reversa. Dicha reacción se realizó utilizando como molde 1-1,5  $\mu\text{g}$  de ARN de Arabidopsis. En un primer paso se procedió a la desnaturalización del ARN en agua durante 5 minutos a  $70^\circ\text{C}$  e incubación en hielo durante 5 minutos. Luego, se adicionó la mezcla de reacción con solución amortiguadora provista por el fabricante (Promega), 0,5 U de la enzima transcriptasa reversa MMLV (Promega), dNTPs 0,05 mM y oligo(dT)<sub>18</sub> 0,1mM, considerando un volumen final de 15  $\mu\text{L}$  de reacción. Esta mezcla se incubó durante 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente la enzima se inactiva a  $85^\circ\text{C}$  durante 5 minutos.

#### 6.2.18. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Las reacciones de qPCR fueron realizadas en los termocicladores StepOne™ Real Time PCR System (LifeTechnologies™) y Chromo4 (MJ-Research). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20µL con buffer de reacción provisto por el fabricante (5x, 4µL), 0,15 U de enzima Phirell ADN polimerasa (Thermo), dNTPs 62,25 µM, SYBR Green (10x, 1µL), oligonucleótidos específicos (la concentración fue optimizada para cada par de oligonucleótidos, ver Tabla 3 Anexo I) y 10 µL de la dilución del producto de la retrotranscripción descrita en el inciso anterior. Para normalizar la cantidad de ADN en cada reacción se emplearon los oligonucleótidos ActinaF y ActinaR que amplifican fragmentos de los genes *ACTIN2* y *ACTIN8* previamente descritos (Charrier y col., 2002; ver Tabla 3, Anexo I). Cuando el nivel de expresión de los genes fue inferior a un Ct (*threshold cycle*) promedio entre 25 y 27, para normalizar la cantidad de ADN en cada reacción se emplearon los oligonucleótidos PP2AF y PP2AR que amplifican un fragmento del gen *PP2A3* (Czechowski y col., 2005; ver Tabla 3, Anexo I). La intensidad de fluorescencia se midió a 72°C durante 40 ciclos y los niveles de transcritos relativos se calcularon mediante el método del Ct comparativo (O'Connell, 2002). Los resultados presentados corresponde a replicados biológicos y técnicos de una línea independiente siempre que hayan sido obtenidos resultados similares al menos con tres líneas independientes. Los datos fueron comparados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y cuando fue necesario se aplicaron pruebas de comparaciones múltiples. Las pruebas aplicadas se mencionan en el epígrafe de cada figura.

6.2.19. Análisis de la expresión génica en forma global utilizando microarreglos de ADN.

Muestras de ARN obtenidas como se describió previamente (inciso 1.2.15) provenientes de plantas silenciadas en *AtCOX19* (*amiCOX19#17*), de plantas mutantes en *AtCOX17-2* y silenciadas en *AtCOX17-1* (*amiCOX17-1/cox17-2*) y de plantas salvajes con resistencia a kanamicina (WT-Kan) fueron hibridizadas en un chip Agilent Arabidopsis (V4) 4x44K empleando marcación recíproca a dos colores. La marcación, hibridización, escaneo y extracción de datos fueron realizados en el Ontario Cancer Institute Genomic

Centre (<http://www.ocigc.ca/ocigc/>) de acuerdo con los protocolos sugeridos por el fabricante del chip. El procesamiento de los datos fue realizado empleando el programa libre de estadística R (R Core Team, 2013) y el paquete estadístico *limma* (Gentleman y col., 2004) descargado desde *Bioconductor project* (Gentleman y col., 2004). Primero, los datos fueron filtrados con el objetivo de eliminar intensidades menores a  $\log_2=9,1$  para los datos obtenidos con las muestras *amiCOX19#17/WT-kan* e intensidades menores a  $\log_2=7,2$  para los datos obtenidos con las muestras *amiCOX17-1/cox17-2*. Intensidades menores a estos valores fueron corregidas mediante el método de normalización “normex” con un valor de corte de 16 (Silver y col., 2009). Luego, los datos fueron normalizados según el procedimiento “loess”. Finalmente, aquellos genes expresados diferencialmente entre las plantas *WT-kan* y las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* o las plantas *amiCOX19#17* fueron identificados aplicando regresión de Bayes (Gentleman y col., 2004) para un valor de probabilidad ajustado (FDR) establecido en 0.05. Los genes se consideraron expresados diferencialmente cuando el  $\log_2$  fue significativamente mayor a 1 (valor de *threshold=1*). El análisis de los procesos biológicos enriquecidos (categorías GO) para los genes cuya expresión mostró un cambio significativo fue realizado usando las herramientas disponibles en el sitio web VirtualPlant 1.3 (Katari y col., 2010; <http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/>).

#### 6.2.20. Crecimiento de Arabidopsis en medio líquido.

Las semillas de Arabidopsis fueron desinfectadas como se describió previamente y vernalizadas en agua durante 48 horas. Luego se trasvasaron a un frasco de tipo Erlenmeyer de 500 mL con 150 mL de medio para cultivo líquido (ver Anexo II) cada 100 mg de semillas. Se dejaron crecer las plantas en cámara de cultivo con agitación constante (110 rpm) durante 12-15 días. Cuando se necesitaron condiciones de oscuridad, los Erlenmeyers se cubrieron con papel de aluminio.

#### 6.2.21. Crecimiento de Arabidopsis en condiciones de salinidad

Con el objetivo de someter plantas de Arabidopsis a estrés por NaCl se diseñaron dos clases de experimentos en función de los parámetros que se necesitaba evaluar:

A) Tratamientos prolongados con NaCl. Once semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en macetas con 63g de sustrato fértil y subirrigadas con agua y fertilizante durante 7 días en condiciones de SD. Luego de la germinación se dejaron 4 plantas por maceta. Al cabo de 20 días de crecimiento cada maceta se subirrigó con 55 mL de NaCl 50 mM (fase de aclimatación). Al día 38 de crecimiento y cada 7 días durante tres semanas cada maceta se subirrigó con 55 mL de NaCl 150 mM (Cabello y Chan, 2012). Parámetros de desarrollo foliar fueron medidos cada dos días a partir de la aclimatación. Plantas crecidas en estas condiciones fueron empleadas para la cuantificación de lípidos peroxidados, contenido de clorofila, tinción con DAB/NBT y conductividad. Para la determinación de los niveles transcripcionales de *COR15A*, *FSD3*, *RBOHD*, *RBOHF* y *RD29A* el riego se realizó con NaCl 100 mM en lugar de NaCl 150 mM.

B) Tratamientos cortos con NaCl. Semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas por punto en medio MS 0,5x agarizado, vernalizadas durante 48 horas y crecidas durante 15 días en condiciones de LD. Luego de 8 horas de luz al día 15 de crecimiento, 15 plantas fueron cuidadosamente distribuidas de a 5 en placas de seis pocillos con 6 mL de medio MS 0,5x líquido por pocillo. Las plántulas se incubaron 60 minutos en cámara de cultivo (condiciones normales). Finalizada la incubación, se congelaron 5 plantas que se consideraron como muestras a tiempo 0 (t=0). Finalmente, se adicionaron 750  $\mu$ L de NaCl 2 M. Se tomaron muestras luego de 30, 60, 120 y 180 minutos. Estas muestras fueron empleadas para extracción de ARN y posterior análisis de expresión mediante RT-qPCR.

#### 6.2.22. Crecimiento de *Arabidopsis* en condiciones de alta intensidad de luz (HL)

Plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas en condiciones de "día corto" como se describió previamente (inciso 1.2.10). Luego de 7 días de crecimiento se homogeneizaron las macetas dejando 4 plantas por maceta. Al día 20 de crecimiento, luego de 4 horas de luz, se tomaron muestras consideradas como tiempo 0 (t=0). Seguidamente, las plantas fueron irradiadas durante 4 horas con 600  $\mu$ E/m<sup>2</sup>. s<sup>-1</sup> de radiación PAR (AL). Estas muestras se consideraron como t=1 de tratamiento. Al día 21 de crecimiento las plantas fueron irradiadas con AL desde el comienzo del período de luz. Luego de 4 horas, se

tomaron muestras consideradas como t=2 de tratamiento. Al final del ciclo de luz se tomó la última muestra considerada como t=3 de tratamiento. Se obtuvo ARN de cada una de las muestras descritas, el que se utilizó para análisis de la expresión mediante RT-qPCR. El ensayo se repitió tres veces. Las muestras correspondientes a t=0 y t=2 fueron, además, utilizadas para extracción y cuantificación de antocianinas en dos ensayos distintos. Las mediciones de parámetros fotosintéticos se realizaron en muestras distintas sometidas al mismo tratamiento. Esta cuantificación se repitió dos veces.

#### 6.2.23. Tratamiento de plantas de Arabidopsis con $\text{CuSO}_4$ .

Semillas de Arabidopsis fueron crecidas en placa de Petri durante 8 días como se describió previamente (inciso 1.2.10) en un fotoperiodo de LD. Luego de 8 horas de luz, al día 8 de crecimiento, 15 plantas fueron cuidadosamente distribuidas de a 5 en placas de seis pocillos con 6 mL de medio MS 0,5x líquido por pocillo. Las plántulas se incubaron 60 minutos en cámara de cultivo (condiciones normales). Finalizada la incubación se congelaron 5 plantas que se consideraron como muestras a tiempo 0 (t=0). Finalmente, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  300  $\mu\text{M}$ . Se tomaron muestras luego de 30, 60, 120 y 180 minutos de incubación. Estas muestras fueron empleadas para extracción de ARN y posterior análisis de la expresión mediante RT-qPCR.

#### 6.2.24. Tratamiento de plantas de Arabidopsis con antimicina A.

El tratamiento con antimicina A (AA) de plantas de Arabidopsis fue realizado siguiendo un protocolo previamente descrito con mínimas modificaciones (Umbach y col., 2012). El uso de AA como inhibidor del Complejo III de la cadena transportadora de electrones ha sido ampliamente descrito (Leister y Shikanai, 2013). Plantas de Arabidopsis fueron cultivadas en sustrato sólido durante 20 días en un fotoperiodo de LD. Tres horas después del comienzo del período de luz, las plantas se mantuvieron durante tres horas en oscuridad. Luego, se aplicó con pincel en la cara abaxial una solución de antimicina A 20  $\mu\text{M}$  conteniendo Tween 20 0,01 %. La aplicación se repitió seis veces durante tres horas. Como control se empleó Tween 20 0,01% diluido en etanol 70%. Se

tomaron muestras luego de 30, 120, 180 y 240 minutos. Estas muestras fueron empleadas para extracción de ARN y posterior análisis de la expresión mediante RT-qPCR.

#### 6.2.25. Tratamientos de plantas de Arabidopsis con rotenona.

Los protocolos descritos hasta la fecha que permiten inhibir el Complejo I de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria se realizan en células en cultivo de Arabidopsis. En este trabajo, plantas de Arabidopsis fueron cultivadas durante 8 días en placas de Petri con medio MS 0,5x suplementado con agar. Tres horas después del comienzo del período de luz (LD), 5 plantas de cada línea a evaluar fueron incubadas en 6 mL de MS 0,5x líquido suplementado con Tween-20 0,01% durante 60 minutos. Luego, se adicionó rotenona a una concentración final de 40  $\mu$ M (en etanol absoluto) y se aplicó vacío durante 5 minutos. Finalmente, se tomaron muestras luego de 30, 60, 120, 180 y 240 minutos. Estas muestras fueron empleadas para extracción de ARN y posterior análisis de la expresión mediante RT-qPCR.

#### 6.2.26. Tratamiento de plantas de Arabidopsis con ácido abscísico (ABA).

Plantas de Arabidopsis fueron cultivadas en placas de Petri como se describió previamente (inciso 1.2.10) durante 6 días en un fotoperiodo de LD, momento en el cual se las incubó durante 60 minutos en 6 mL de MS 0,5x. Transcurrido este tiempo, se adicionaron a la solución 12  $\mu$ L de ABA 125  $\mu$ M. Se tomaron muestras luego de 30, 60 y 180 minutos de incubación.

#### 6.2.27. Germinación y desarrollo de la raíz en presencia de ABA.

Para evaluar la germinación, las semillas de los genotipos de interés fueron desinfectadas y vernalizadas durante 3 días a 4°C. Luego se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS 0,5x, glucosa 2% y ABA 0,3  $\mu$ M. La placa de Petri se dividió por la mitad y siempre se sembró la línea de interés y su control en la misma placa (2 líneas por placa). El proceso de germinación se evaluó en la lupa cada 4 horas. El desarrollo de la raíz se realizó en placa de Petri conteniendo medio MS 0,5x, glucosa 2% y ABA 0,3  $\mu$ M. Las

placas de dispusieron en posición vertical y la longitud de la raíz se evaluó cada 2 días empelando el programa libre Rootdetection ([www.labutilis.de](http://www.labutilis.de)).

#### 6.2.28. Cuantificación de lípidos peroxidados.

La generación de lípidos peroxidados como consecuencia de la producción de radicales libres se evaluó de forma indirecta mediante la cuantificación de molondialdehído (MDA) (Hodges y col., 1999). Rosetas de Arabidopsis (100-150 mg) se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se procesaron en mortero hasta obtener un polvo fino. Este polvo se trasvasó a un tubo de 1,5 mL y se homogeneizó en 800 µL de solución de ácido tricloroacético (TCA) 6% fría. Se centrifugó a 10000 x g durante 15 minutos a 4°C y se recuperaron 700 µL del sobrenadante. El sobrenadante se fraccionó en partes iguales en dos tubos de 1,5 mL. Una de las fracciones se diluyó en solución de ácido tiobarbitúrico (ver Anexo II) y la segunda fracción se diluyó en solución control (ver Anexo II). Las dos fracciones se incubaron 30 minutos a 95°C. Transcurrida la incubación las fracciones se centrifugaron a 6000 x g durante 10 minutos y se mantuvieron en hielo hasta el momento de la lectura. Las lecturas se realizaron a 440<sup>4</sup>, 532<sup>5</sup> y 600<sup>6</sup>nm. La concentración de MDA se calculó aplicando un factor de calibración proveniente de una curva de calibrado. Se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo de la concentración de MDA:

$$1) [(Abs_{532}+TBA)-(Abs_{600}+TBA)] - [(Abs_{532}-TBA-Abs_{600}-TBA)]] = A$$

$$2) [(Abs_{440}+TBA)-(Abs_{600}+TBA) 0.0571]= B$$

$$3) MDA equivalentes (nmol . mL^{-1})= (A-B/157 000) 10^6$$

#### 6.2.29. Evaluación de la muerte celular mediante medición de conductividad.

La estabilidad de membranas luego del tratamiento con NaCl se realizó siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Blum, 1981) con mínimas modificaciones. Brevemente, plantas de Arabidopsis fueron cultivadas durante 20 días en condiciones de

<sup>4</sup> Corrección por lectura proveniente de azúcares en la muestra.

<sup>5</sup> Lectura que corresponde al pico de absorbancia máxima del MDA.

<sup>6</sup> Corrección por lectura proveniente de antocianinas y polifenoles en la muestra.

SD antes y después del tercer riego con NaCl como se describió previamente (inciso 1.2.21 A). Se cortaron cinco rosetas completas y se sumergieron en 35 mL de H<sub>2</sub>O-MQ de conductividad conocida (C<sub>i</sub>). Las rosetas se incubaron durante dos horas y a partir de ese momento se tomaron mediciones de la conductividad de la solución a distintos tiempos (C<sub>x</sub>). Luego de 24 horas de incubación las rosetas se incubaron a 80°C durante 48 horas y se midió nuevamente la conductividad de la solución (C<sub>f</sub>). Los datos se expresaron como porcentaje de pérdida de electrolitos según la fórmula:

$$\% \text{ de Electrolitos liberados} = 100 \times \frac{C_x - C_i}{C_f - C_i}$$

Valores mayores al 50% se consideraron como daño severo (Cabello y Chan, 2012).

#### 6.2.30. Cuantificación de clorofila.

Los valores de concentración de clorofila se obtuvieron según la técnica descrita por Porra (2002). Rosetas completas o plantas cultivadas en placa se congelaron en nitrógeno líquido y se procesaron en mortero. El polvo obtenido se extrajo durante 12 horas a 4°C con solución de acetona amortiguada a pH 7,8. Se centrifugó, y el sobrenadante se leyó en espectrofotómetro a 663 nm, 647 nm y 537<sup>7</sup>nm. Los cálculos se realizaron según la ecuación reportada por Simmons y Gamon (2002).

$$\text{Clorofila } a = 0.01373 A_{663} - 0.000897 A_{537} - 0.003046 A_{647}$$

$$\text{Clorofila } b = 0.02405 A_{647} - 0.004305 A_{537} - 0.005507 A_{663}$$

#### 6.2.31. Determinación del contenido de hierro.

La cuantificación de hierro total se realizó en muestras de tejido aéreo o tejido radical provenientes de plántulas crecidas durante 15 días en placas de Petri dispuestas horizontalmente, en las condiciones de cámara de cultivo descritas en el inciso 1.2.10. El tejido fue lavado cuidadosamente con H<sub>2</sub>O-MQ y manipulado con tips amarillos, para evitar contaminaciones. El tejido vegetal fue secado en estufa a 70°C durante 3 días. El material vegetal seco fue pesado exactamente (aproximadamente 20 mg para tejido aéreo y 2 mg para tejido radical) y mineralizado con el agregado de 500 µL de HNO<sub>3</sub> 65%

<sup>7</sup> Corrección por lectura proveniente de antocianinas presentes en la muestra.

a 100 °C, durante 3 h. Luego se tomaron 200 µL del sobrenadante y se agregaron en orden los siguientes reactivos, agitando con vórtex luego del agregado de cada uno, acetato de amonio (7,8 M; pH 7) 400 µL, hidroxilamina (10 % p/v) 400 µL, o-fenantrolina (5 mM) 200 µL. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente hasta desarrollo de color rojizo y posteriormente se cuantificó la absorbancia a 510 nm. La curva de calibrado se realizó utilizando soluciones de distintas concentraciones de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  (0; 0,5; 1; 2; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 75; 100 µM). Dicho protocolo fue tomado de Tamarit y colaboradores (2006) y luego modificado y puesto a punto en nuestro laboratorio.

#### 6.2.32. Obtención de cruza de plantas transgénicas de Arabidopsis.

La técnica utilizada para realizar las cruza de plantas de Arabidopsis consistió en frotar suavemente los estambres de las flores de la planta que poliniza (♂), sobre el estigma del pistilo de la planta a polinizar (♀). La selección de las semillas procedentes de la cruza se realizó mediante crecimiento en presencia de antibiótico cuando fue posible y mediante reacción de PCR a partir de ADN genómico de las plantas provenientes de la cruza.

#### 6.2.33. Determinación del contenido de proteína total mediante el método de Bradford.

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método descrito por Mitra y col. (1994). Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (ASB) cuya concentración se determinó espectrofotométricamente, considerando 0,667 unidades de absorbancia a 280 nm como 1 mg/ml de ASB en solución. Las determinaciones se realizaron con 5 µl de extracto proteico en 100 µl de NaCl 0,15 M y 900 µl del reactivo de Azul Brillante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie G-250 10 mg%, etanol absoluto 5% (v/v) y ácido fosfórico 10% (v/v)). La absorbancia se determinó en espectrofotómetro a 595nm.

#### 6.2.34. Actividad superóxido dismutasa en geles nativos.

Para evidenciar la actividad de las isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se recurrió a la detección en gel de la actividad SOD como se describió en Weydert y col. (2010). Se obtuvieron extractos proteicos en solución de extracción SOD (ver Anexo II). Rosetas completas de plantas cultivadas en sustrato o en placas como se describió previamente se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se procesaron en mortero. El polvo fino obtenido se pesó hasta obtener 100-150 mg y se homogenizó en solución de extracción SOD en una relación 2:1 (extracto:solución de extracción). Los extractos se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 minutos y se recuperó el mismo volumen de sobrenadante para cada uno de los extractos. Los extractos así obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en el inciso 1.2.4.1. Finalizada la corrida electroforética el gel se incubó con agitación durante 15 minutos en solución de reacción sin sustratos (ver Anexo II). Transcurrido ese tiempo, se preparó la solución de reacción con riboflavina y nitrobluetetrazolium (NBT, ver Anexo II) y se incubó durante 15 minutos con agitación y en oscuridad. Finalmente, el gel se expuso a una fuente de luz blanca (75 W) hasta aparición de las bandas de actividad. La reacción se detuvo incubando el gel en agua MQ

#### 6.2.35. Medición del consumo de oxígeno en plantas de Arabidopsis.

La cuantificación del consumo de oxígeno en plantas de Arabidopsis se realizó empleando un electrodo de oxígeno (OxygraphSystem, Hansatech Instruments). Antes de comenzar con las lecturas el electrodo fue calibrado con la solución amortiguadora de medición (ver Anexo II) como medición máxima de la concentración de oxígeno y mediante el agregado de ditionito de sodio como concentración nula de oxígeno. Las plantas empleadas para la medición se aclimataron en oscuridad durante 20 minutos y entre 100 y 150 mg de hojas proveniente de dichas plantas fueron utilizadas para la medición. Las lecturas se realizaron durante 10 minutos para obtener una pendiente constante. A partir del valor de la pendiente se calculó el consumo de oxígeno y se expresó en porcentaje relativo a la planta control. Con el objetivo de evaluar el consumo

de oxígeno independiente de la vía del citocromo c se adicionó al medio de reacción KCN a una concentración final de 1 mM.

#### 6.2.36. Obtención de extractos crudos de mitocondrias.

La obtención de extractos crudos de mitocondrias se realizó según fue descrito por Steinebrunner y col. (2014). La extracción de mitocondrias se realizó a partir de cultivos líquidos de *Arabidopsis*. El tejido recuperado (5-10g) se homogeneizó en mortero (o licuadora) hasta obtener una pasta en 2 ml de solución de extracción (ver Anexo II) por gramo de tejido fresco. El homogenato se filtró en membranas de nylon de 45  $\mu\text{m}$ . El eluato se centrifugó a 2500 x g durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 15000 x g durante 15 minutos. El pellet, conteniendo las mitocondrias y otras organelas, se resuspendió en 5 mL de solución de lavado (ver Anexo II) utilizando un pincel. Se centrifugó a 2500 x g durante 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente a 15000 x g durante 15 minutos. El pellet de mitocondrias se disolvió en 100  $\mu\text{L}$  de solución de resuspensión por cada g de tejido procesado. Los extractos así obtenidos se fraccionaron de a 40  $\mu\text{L}$ , se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido y se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### 6.2.37. Determinación de la actividad citrato sintasa en extractos crudos de mitocondrias.

Dado que la pureza de los extractos crudos de mitocondriales puede variar se empleó la determinación de la actividad citrato sintasa para calibrar los extractos crudos de mitocondrias. La actividad citrato sintasa fue determinada en placa de 96 pocillos. En cada pocillo se adicionaron de manera sucesiva y en orden los siguientes reactivos: 130 $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora TE.2 (ver Anexo II), 10 $\mu\text{L}$  de oxalacetato 10 mM, 30 $\mu\text{L}$  de acetilcoenzima A 5 mM y 10 $\mu\text{L}$  de 5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico 10 mM. La reacción se inició mediante el agregado de 100  $\mu\text{g}$  de extractos mitocondriales crudos cuantificados mediante el método del ácido bicinconínico empleando un kit comercial (Pierce Número de catálogo #23225; (Brown y col., 1989) o mediante el método de

Bradford (ver inciso 1.2.34). El incremento de la absorción a 412 nm fue registrado durante 15 minutos a 25 °C. La pendiente de la región lineal de la curva obtenida fue utilizada para calcular la actividad enzimática. La actividad enzimática obtenida en el extracto crudo de mitocondrial proveniente plantas WT fue empleada para calcular la cantidad de mitocondrias en cada extracto crudo de la siguiente forma:

$$\text{Mitocondrias en la muestra } x = \frac{\text{actividad WT}}{\text{actividad muestra } x} \times \mu\text{g de proteína total de } x$$

Este contenido de mitocondrias ajustado fue empleado para evaluar la actividad COX en geles (ver inciso 1.2.39) y para la medición de la actividad COX en oxígrafo (ver inciso 1.2.40).

#### 6.2.38. Electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente nativos (BN-PAGE).

Los extractos enriquecidos en mitocondrias obtenidos como se describió previamente fueron separados mediante BN-PAGE siguiendo el protocolo descrito por Witting y col. (2006). Para la correcta separación de los complejos mitocondriales se armó un gel que permitió generar un gradiente de concentración de acrilamida entre 3% y 13% en solución amortiguadora BN-I (ver Anexo II). Para la formación del gradiente se utilizó una bomba peristáltica y una relación acrilamida:bis-acrilamida 32:0,8 (p:p) (SIGMA). El gel de separación se dejó polimerizar durante tres horas. Finalmente, se preparó el gel de concentración en solución amortiguadora a una concentración final de acrilamida de 3%. Se centrifugó el volumen apropiado de extracto mitocondrial para obtener 50 µg de mitocondrias. El pellet obtenido se resuspendió en 12 µL de solución de lisis (ver Anexo II) y se adicionaron 8 µL de digitonina 10% (relación detergente:proteína, 4:1) para solubilizar las membranas mitocondriales sin alterar la actividad de los complejos. Luego de incubar 10 minutos en hielo, se centrifugó a 2500 x g durante 10 minutos y se recuperaron 10 µL del sobrenadante. Antes de sembrar el sobrenadante se diluyó en solución de siembra para geles nativos (ver Anexo II). El gel se corrió durante 30 minutos a 0,5 mA en solución de cátodo BN-I (ver Anexo II) y luego a 15 mA hasta alcanzar la mitad

del gel de separación. Luego, se cambió la solución de corrida por la solución amortiguadora BN-II (ver Anexo II). En esta solución el gel se corrió a 110 V hasta correcta resolución de los complejos mitocondriales mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue (SERVA; Neuhoff y col., 1988). La solución de ánodo BN se describe en el Anexo II.

#### 6.2.39. Actividad del complejo IV.

La detección de la actividad en gel se realizó según protocolos descriptos previamente (Jung y col., 2000; Steinebrunner y col., 2014; Wittig y col., 2007). Finalizada la corrida electroforética, se descartó el gel de concentración, mientras que el gel de separación se estabilizó durante 2 horas en solución de reacción IV (ver Anexo II); luego el gel se sumergió en la solución amortiguadora de la solución de reacción que contenía citocromo *c* y 3-3'diaminobencidina (DAB) (ver Anexo II). La reacción se dejó transcurrir con agitación constante hasta aparición de tinción color marrón. Se tomaron fotos a distintos tiempos.

#### 6.2.40. Medición de la actividad COX en oxígrafo.

La medición de la actividad COX en extractos crudos de mitocondrias se realizó como fue descrito por Sweetlove y col. (2007). Se empleó un electrodo de oxígeno (STRATHKELVIN Oxygen Meter 782 conectado a una cámara Mitocell MT200 c). Brevemente, 200  $\mu\text{g}$  de extractos crudos de mitocondrias fueron disueltos en 500  $\mu\text{L}$  de solución de extracción de extracción de mitocondrias (ver Anexo II) e incluidas en la cámara del oxígrafo. Luego de la estabilización de la señal se adicionaron en orden los siguientes reactivos: 10  $\mu\text{L}$  de ascorbato de sodio 0,5 M y 25  $\mu\text{L}$  de citocromo *c* reducido 1mM (extraído sin ácido tricloroacético (TCA); Sigma-Aldrich). La reacción se inició con la lisis de las membranas mitocondriales mediante la adición de 10  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 10%. La pendiente obtenida en la región lineal de la curva de disminución de la concentración de oxígeno en la cámara del oxígrafo fue empleada para determinar la actividad COX.

#### 6.2.41. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS).

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida se realizó según el protocolo descrito por Laemmli (1970) utilizando un sistema vertical de geles (Miniprotean Bio-Rad). En todos los casos, en la matriz de poliacrilamida se empleó una relación acrilamida:bis-acrilamida 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 15-18% (p/v). El gel de concentración se preparó en solución Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1% (p/v), con una concentración de acrilamida final de 4% (p/v). Las muestras se sembraron previa dilución en solución de siembra de proteínas (ver Anexo II) y desnaturalización durante 5 minutos a 96°C, excepto aquellas muestras en las que posteriormente debían detectarse COX17 o COX19 mediante western-blot. La separación electroforética se llevó a cabo en solución Laemmli 1x (ver Anexo II), aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel de separación.

#### 6.2.42. Obtención de anticuerpos para la detección de AtCOX17 o de AtCOX19.

Se obtuvieron anticuerpos policlonales contra AtCOX17 o contra AtCOX19. Para generar dichas proteínas fue necesario clonar AtCOX17 y AtCOX19 como proteínas de fusión a GST (glutación-S-transferasa). Para obtener la fusión GST-COX17 se amplificó mediante PCR a partir de ADNc (ver inciso 1.2.1), un fragmento de 258 pb que comprende la región codificante de AtCOX17-1. El producto de PCR se clonó en el vector pGEX-4T3 entre los sitios de restricción *BamHI/XhoI*. Para obtener la fusión GST-COX19 se amplificó a partir de ADNc un fragmento de 297 pb que comprende la región codificante de AtCOX19-1. El producto de PCR se clonó en el vector pGEX-4T3 entre los sitios *BamHI/XhoI*. Las construcciones obtenidas se emplearon para transformar la cepa de *E.coli*BL21.

#### 6.2.43. Expresión y purificación de proteínas recombinantes para la obtención de anticuerpos.

La bacterias portadoras de las construcciones GST-COX17 y GST-COX19 se cultivaron en 10 mL de medio LB (ver Anexo II) durante 12-14 horas a 37°C con agitación (160 rpm). El cultivo obtenido se diluyó 100 veces en 500 mL de medio LB durante 3 horas en las mismas condiciones de crecimiento del cultivo anterior, momento en el cual se adicionó isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosio (IPTG) 10 mM. El cultivo se incubó con agitación (160 rpm) durante 3 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo el cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm. El pellet obtenido se lavó dos veces en solución amortiguadora TE (ver Anexo II) y se disolvió en 50 mL de la solución de lavado. La suspensión así obtenida se purificó en columna de glutatión-agarosa (Amersham) según las recomendaciones del fabricante. La pureza y concentración de las proteínas obtenidas se verificó mediante electroforesis en SDS-PAGE empleando un gel cuya concentración final de acrilamida fue del 18%. Dado que, además de los productos esperados, se observaron bandas de menor PM, se procedió a cortar las bandas del PM esperado, las que se sometieron a elución por aplicación de corriente durante 12 horas según sugerencias del fabricante (Electroeluter™, BioRad). Las proteínas purificadas se entregaron a un servicio de producción de anticuerpos provisto por el Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormono dependientes (LETH) de la Universidad Nacional del Litoral (UNL), donde se efectuó la obtención, purificación y concentración de los anticuerpos específicos.

#### 6.2.44. Detección de proteínas mediante western blot.

Finalizada la separación electroforética, el gel se estabilizó en solución de transferencia (ver Anexo II) durante 30 minutos y se transfirió a una membrana de PVDF (Amersham). La transferencia se realizó mediante aplicación de electricidad y en presencia de solución de transferencia durante 60 minutos a 350 mA y 4°C. Luego de la transferencia, la membrana se incubó en solución de bloqueo (ver Anexo II) durante 60 minutos y con permanente agitación. Finalizado el paso de bloqueo se incubó con una dilución del anticuerpo primario. La dilución empleada y el tiempo de incubación se detallan en el Anexo II según el anticuerpo elegido. Luego de tres lavados con TBS-Tween

(ver Anexo II), la membrana se incubó con 10 mL de una solución de anticuerpo secundario (anti-rabbitIgG obtenido en cabra, LETH) diluido 2500 veces en TBS-Leche (ver Anexo II). Transcurrido este tiempo la membrana se lavó tres veces con agitación constante y se reveló mediante la utilización de reactivos quimioluminiscentes.

Para el revelado se empleó el sustrato SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y posteriormente se expuso la membrana a películas CL-X Posure™Film (ThermoScientific) durante distintos tiempos.

6.2.45. Análisis de la expresión del gen reportero *GUS* en plantas transformadas mediante histoquímica.

La actividad  $\beta$ -glucuronidasa se analizó mediante reacción histoquímica en distintos órganos y tejidos de 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. 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 las muestras se guardaron en solución etanólica a 4°C hasta ser fotografiadas. Las imágenes se procesaron con el software Corel Photopaint X6.

6.2.46. Análisis de la expresión del gen reportero *GUS* en plantas transformadas mediante fluorimetría.

Plantas cultivadas durante 8-10 días en medio MS 0,5x se procesaron en mortero, agregándose 500  $\mu$ L de 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  $\mu\text{L}$  de extracto proteico a 100  $\mu\text{L}$  de una solución del sustrato MUG (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronido) 1 mM en metanol 40%. Con una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  se realizó inmediatamente una medida fluorométrica a tiempo = 0. Los 75  $\mu\text{L}$  restantes se incubaron a 37°C en baño de agua y a los 10 min se extrajo una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  y se realizó una segunda medida fluorométrica (tiempo = 10 min). Para detener la reacción enzimática se utilizaron 975  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en pmoles de MU (4-metilumbeliferona). $\text{min}^{-1}$ . (mg de proteínas totales) $^{-1}$  de acuerdo a una curva patrón de RFU (unidades de fluorescencia relativa) vs. concentración de producto 4-MU. Las proteínas totales se cuantificaron según el método de Bradford (ver inciso 1.2.34). 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 Versa Fluor™ Fluorometer System de Bio-Rad (filtros EM 460/10 y EX 360/40) en cubetas de 1 mL.

#### 6.2.47. Determinación de metabolitos mediante GC-MS.

Para la determinación de metabolitos, las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo tanto en condiciones de LD como en condiciones de SD. Al final de la noche (EON) y en la mitad del ciclo de luz (MD) se cosecharon hojas de rosetas sin pecíolo por cuadruplicado y se congelaron en nitrógeno líquido. Las muestras se procesaron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Las muestras se procesaron como fue descrito previamente por Fahnenstich y col. (2007). Brevemente, el polvo se pesó manteniendo las muestras congeladas hasta obtener 60-80 mg y se homogeneizó en 1,5 mL de solución de extracción alcohólica (ver Anexo II) con ribitol como control interno. El homogenizado se agitó en vórtex y se centrifugó durante 2 minutos a 2000 x g. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se agitó nuevamente en vórtex. Una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  se trasvasó a un tubo nuevo y se secó a 4°C mediante aplicación de vacío. El pellet así obtenido se

derivatizó con 10  $\mu\text{L}$  de hidrocloreuro de metoxiamina (MTFA) 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 30 minutos a  $90^{\circ}\text{C}$  con agitación continua. Luego, se adicionaron 90  $\mu\text{L}$  de MTFA y las muestras se incubaron durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación continua. Finalmente, se procedió a la inyección de 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión en el equipo de cromatografía (Agilent 7890A GC and Waters GCT Premier TOF/MS). La identificación de las sustancias se realizó en mediante comparación con estándares. Las muestras para la determinación de metabolitos fueron procesadas en el Laboratorio de la Dra. Verónica Maurino perteneciente al instituto de Bioquímica de Plantas de la Universidad Henirich-Heine de Düsseldorf, Alemania en el marco de un proyecto de colaboración binacional. La determinación de metabolitos mediante GC-MS fue realizada por la Dra. Katrin Weber perteneciente al Center of Advanced imaging (CAi) de la misma universidad.

#### 6.2.48. Determinación de prolina en plantas de Arabidopsis tratadas con NaCl.

Para la determinación de prolina las plantas fueron crecidas y tratadas como se detalla a continuación. Las plantas se crecieron durante 15 días en LD y se regaron con agua cada 7 días. El día 15 se regó con NaCl 30 mM y el día 18 con NaCl 50 mM. El día 21 comenzó el riego con NaCl 150 mM. El riego se repitió cada 5 días hasta completar 3 riegos con NaCl 150 mM. Los niveles de prolina en plantas de Arabidopsis se determinaron según el protocolo descrito por Carillo y Gibón (2011) con mínimas modificaciones. Brevemente, entre 5 y 8 rosetas completas de plantas tratadas como se describió anteriormente se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido y se procesó en mortero hasta obtener un polvo fino. Entre 50 y 100 mg del polvo obtenido se homogeneizaron en 800  $\mu\text{L}$  etanol 80%. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. Se recuperaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se adicionaron a 1000  $\mu\text{L}$  de solución de reacción (Ninhidrina 1%, acético glacial 60% y etanol absoluto 20% en  $\text{H}_2\text{O}$ -MQ). La mezcla así preparada se incubó durante 20 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 1 min. El sobrenadante limpio se leyó a 520 nm. La determinación de los niveles de prolina en cada muestra se realizó empleando curva de calibrado realizada con un estándar de prolina.

#### 6.2.49. Localización subcelular de proteínas mediante microscopía confocal

Los estudios de localización subcelular se realizaron mediante microscopía confocal, empleando un microscopio (C-Apochromat 10x/1.20 W Korr M27 or C-Apochromat 63x/1.20 W Korr M27). La localización se realizó en raíces de plantas *mt-gk* transformadas con las construcciones *35S:COX17-2*, *35S:COX17-9* o con *pCOX19:COX19*. Las plantas fueron crecidas durante 8 días en medio MS 0,5x suplementado con higromicina 50  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , se recuperaron las raíces y se colocaron en el microscopio como muestras frescas (entre porta objeto y cubre objeto en  $\text{H}_2\text{O}$ ). El campo de interés fue irradiado con un láser de 488 nm y con un láser de 561 nm para obtener los espectros de emisión de GFP y mRFP respectivamente. La detección para GFP se realizó entre 491 y 552 nm y la detección de mRFP se realizó entre 587 y 631 nm. La emisión de GFP y mRFP de manera simultánea fueron obtenidas mediante barrido unidireccional modificando el canal de detección en cada línea. La apertura del *pinhole* fue mantenida siempre en una unidad de apertura. Las imágenes fueron analizadas empleando el programa Zeiss Zen 2011.

#### 6.2.50. Determinación de aniones superóxido en plantas de Arabidopsis.

La producción de aniones superóxido en plantas de Arabidopsis se evaluó de manera cualitativa mediante histoquímica (Attallah y col., 2011). Para tal fin, se obtuvieron rosetas completas y se incubaron en solución de NBT 0,01% en Hepes 20 mM pH 7,8 conteniendo Tween 20 0,01%. Se aplicó vacío durante 5 minutos. Se tomaron fotografías a distintos tiempos a partir de la aparición de tinción azul. La reacción se detuvo luego de 24 horas y las plantas se decoloraron en etanol 70% durante 48 horas a 37°C.

#### 6.2.51. Análisis estadísticos.

Los datos experimentales son expresados como medias de los valores obtenidos  $\pm$  el error estándar de la media (SD) del número indicado de mediciones independientes, excepto que se aclare lo contrario. Diferencias significativas entre dos grupos de datos

cuyas varianzas eran iguales y la distribución de Gauss fue aplicable fueron analizadas mediante Prueba t de Student. Cuando las varianzas fueron diferentes se recurrió a la corrección mediante la Prueba de Welch (o Prueba t no pareada) y cuando no se cumplió el supuesto de normalidad entre dos grupos se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Diferencias significativas entre más de dos grupos de datos fueron analizadas empleando Análisis de la Varianza (ANOVA) combinado con la prueba de Tukey para comparaciones múltiples. Cuando el ensayo fue desbalanceado (diferente número de muestras para cada grupo de datos comparado) o no se cumplió el supuesto de normalidad de los datos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico se realizó con el programa InfoStat Versión 2014 (Di Rienzo y col., 2011). El análisis estadístico de los ensayos de microarreglos y metabolómica se realizó como se describió en 1.2.19.

---

---

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

---

---

## 7.1. CAPITULO I.

## 7.1. CAPÍTULO I.

## LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A COX17 Y COX19 DE LEVADURAS EN PLANTAS DE ARABIDOPSIS.

## 7.1.1. INTRODUCCIÓN.

La localización subcelular de las proteínas COX17 y COX19 ha sido determinada por distintos grupos en levaduras y en células de mamífero. COX17 fue identificada y caracterizada por primera vez en *Saccharomyces* (Beers y col., 1997). Ensayos de western blot empleando un anticuerpo contra la región C-terminal de COX17 indicaron que Cox17p se localiza en el IMS de la mitocondria y en el citosol, en una relación 3:2 (mitocondria:citosol) (Beers y col., 1997). Considerando la localización dual de Cox17p, se propuso que esta proteína podría actuar como un transportador de cobre desde el citosol hacia el IMS. Sin embargo, la expresión de una proteína quimérica que incluye la secuencia completa de Cox17p y el dominio transmembrana de Sco2p en mutantes *cox17* recupera el fenotipo respiratorio de la levadura mutante (Maxfield y col., 2004). Dado que esta proteína permanece anclada a la MI mitocondrial, esto indicaría que Cox17p puede transferir el cobre a Sco1p y a Cox11p cuando se encuentra unida a la MI y exponiendo el dominio de unión a cobre hacia el IMS y que la función de Cox17p en el citosol no estaría relacionada con la biogénesis de COX.

La proteína COX17 de humanos presenta un 48% de identidad de secuencia con Cox17p de levaduras. Estudios de localización mediante microscopía confocal derivaron en un resultado similar al obtenido en levaduras, ya que el 80% de COX17 fue localizada en el IMS de mitocondrias purificadas de células HeLa mientras que la fracción restante fue localizada en el citosol (Oswald y col., 2009; Punter y col., 2000). Los autores sugirieron que esta partición refleja el equilibrio entre las distintas conformaciones reportadas para COX17 de mamíferos. La forma completamente reducida de COX17 se encontraría en el citosol uniéndose cooperativamente 4 átomos de cobre y las formas oxidadas de COX17, COX17<sub>2S-5</sub> y COX17<sub>3S-5</sub>, con uno y ningún átomo de cobre, respectivamente (Palumaa y col., 2004), se encontrarían en la mitocondria. Los potenciales redox indicarían que la isoforma COX17<sub>2S-5</sub> se encontraría en el IMS y sería

capaz de transferir un átomo de cobre a SCO<sub>1</sub> (Voronova y col., 2007a; Voronova y col., 2007b). La isoforma citosólica actuaría como reservorio de átomos de cobre en una conformación de tiolato de cobre en el citosol (Voronova y col., 2007b). Además, la forma citosólica se agruparía formando dímeros que podrían unir hasta cuatro átomos de cobre (forma oligomérica de COX17) (Heaton y col., 2001). Es interesante recordar que en células eucariotas la maquinaria enzimática dedicada a la formación de puentes disulfuro a partir de cisteínas se localiza únicamente en el IMS y en el retículo endoplasmático (Riemer, 2009). Los resultados obtenidos sobre el origen del cobre en COX17 sugieren que el metal provendría de un reservorio ubicado en la matriz mitocondrial (Cobine y col., 2004a; Cobine y col., 2004b; Cobine y col., 2006). En este escenario, el cobre unido a un ligando desconocido debería ser transportado al IMS para formar las isoformas oxidadas y luego ser transportado al citosol para formar las isoformas completamente reducidas que actuarían como reserva del cobre.

En plantas angiospermas encontramos dos proteínas COX17, denominadas COX17-1 y COX17-2 (Attallah y col., 2007a). Si bien la localización de las proteínas COX17 en plantas aún no ha sido reportada, estas proteínas contienen los dominios de cisteínas necesarios para el transporte mediado por MIA<sub>40</sub> hacia el IMS (Figura 1). Las proteínas que son sustrato del sistema MIA<sub>40</sub>/ERV<sub>1</sub> presentan dos dominios CX<sub>3</sub>C o CX<sub>9</sub>C. COX17 presenta el segundo tipo de dominio denominado ITS (de sus siglas en inglés *IMS Targeting Signal*) (Sideris y col., 2009; Terziyska y col., 2007). El dominio ITS está constituido por un péptido interno de 9 aminoácidos localizado entre dos cisteínas, una de las cuáles es reconocida por MIA<sub>40</sub>. Este péptido tiene una estructura de hélice anfipática y se une por puentes disulfuro al otro dominio CX<sub>9</sub>C de la proteína, formando dos hélices antiparalelas (Milenkovic y col., 2007; Sideris y col., 2009). En forma similar a lo observado para otras proteínas menores a 15 KDa del IMS<sup>1</sup>, los programas de predicción de localización subcelular arrojan valores de probabilidad menores a 0,2 para

---

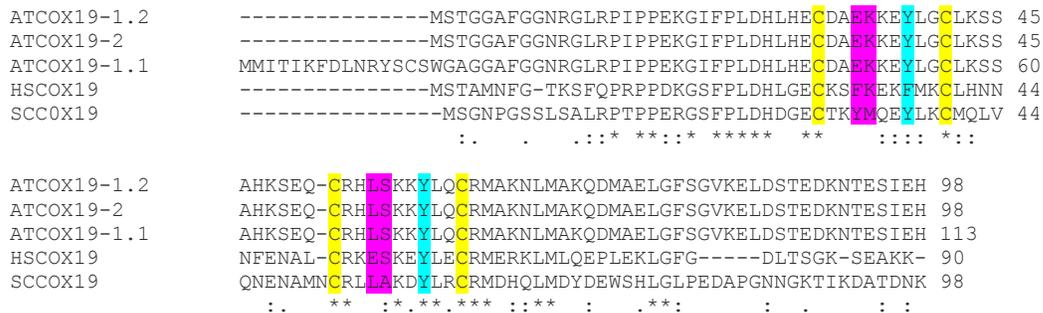
<sup>1</sup> La importación de proteínas mayores a 15 KDa al IMS se realiza mediante el mecanismo de presecuencia que las dirige a la matriz y luego ocurre una detención de la transferencia y son retenidas en el IMS (Chacinska y col., 2009).



COX19 entre el IMS y el citosol depende de la presencia de SCO1 y de una proteína ATP7A encargada del transporte de cobre desde el interior celular (Leary y col., 2013). En el aparato de Golgi existe una reserva de ATP7A que migra hacia la membrana plasmática cuando existe un aumento del cobre intracelular. En ausencia de ATP7A aumentan los niveles de cobre intracelular y COX19 se localiza fundamentalmente en el citosol (Leary y col., 2013).

En forma similar a lo observado para las proteínas COX17, las proteínas COX19 presentan los dominios de cisteína necesarios para ser transportadas al IMS mediante la acción de MIA40 (Figura 2). En células de mamífero se ha demostrado que la velocidad de ingreso de COX19 al IMS depende del potencial de la MI mitocondrial, de la relación GSH/GSSG y de la disponibilidad de MIA40 y de la sulfhidril oxidasa AUGMENTER OF LIVER REGENERATION (ALR, el homólogo de Erv1p en mamíferos) en el IMS (Fischer y col., 2013). La dependencia del potencial de membrana y de la disponibilidad de GSH en el IMS impone otro punto de regulación para la importación de COX19 dado que ambos parámetros se modifican frente a situaciones de estrés (Aranjuelo y col., 2014; Bricchi y col., 2012; Schwarzländer y col., 2012).

En plantas, nuestro grupo de investigación ha demostrado mediante ensayos de importación a mitocondrias de papa que AtCOX19-1 y AtCOX19-2 pueden ser importadas al IMS, lo que es congruente con la función reportada para sus homólogos en levaduras



**Figura 2. Dominio CX9C en proteínas COX19.** 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, involucradas en la unión de cobre y en la translocación a la mitocondria vía MIA40, están marcadas en amarillo. Los aminoácidos característicos de la secuencia ITS están marcados en púrpura y en celeste.

El estudio de la función de COX17 y COX19 en plantas de *Arabidopsis* requiere, como paso inicial, establecer apropiadamente la localización de ambas proteínas. A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de ensayos de microscopía confocal.

---

### 7.1.2. RESULTADOS.

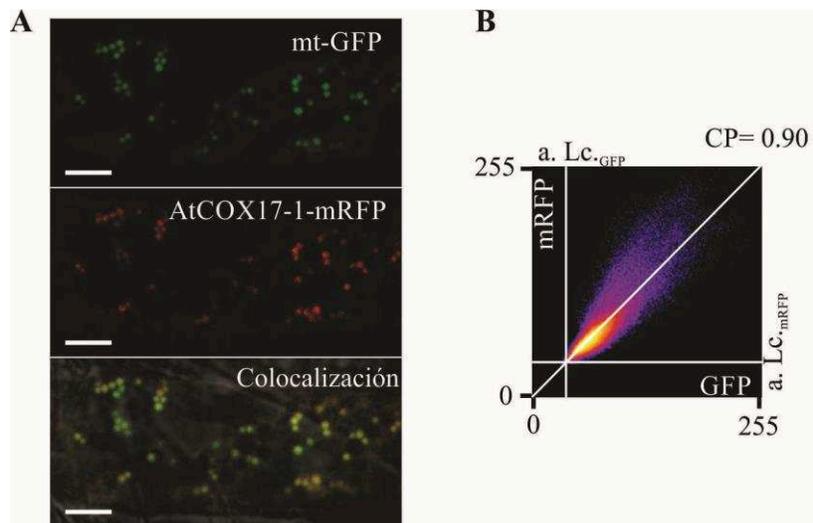
#### 7.1.2.1. LOCALIZACIÓN DE ATCOX17-1 EN PLANTAS DE ARABIDOPSIS.

Nos propusimos determinar la localización de AtCOX17 en plantas de *Arabidopsis*. Dado que la región C-terminal de AtCOX17-1 presenta un 65% de homología con AtCOX17-2 y esta región sería la determinante de su localización, los ensayos de localización fueron realizados para la proteína AtCOX17-1.

Los estudios de localización se realizaron mediante microscopía confocal, para lo cual se transformaron plantas que expresaban la proteína fluorescente verde (GFP, de sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) en la mitocondria (plantas mt-gk, ver Materiales y Métodos 6.1.2) con una construcción que permite expresar AtCOX17-1 fusionada a la proteína roja fluorescente (RFP, de sus siglas en inglés *Red Fluorescent Protein*) bajo el control de un promotor constitutivo (construcción 35S:COX17-1-RFP, ver Materiales y Métodos 6.2.9). Las raíces de cuatro líneas distintas fueron colocadas en el microscopio confocal para la realización de las medidas de localización.

En la figura 3A se muestran imágenes representativas de los campos observados en al menos 10 células de cada una de las líneas transgénicas evaluadas. En el panel superior se muestra la expresión de GFP (mt-GFP) en la mitocondria de células de raíz cuando el tejido es irradiado con luz de una longitud de onda de 488 nm. En el panel medio se muestra la expresión de la proteína de fusión AtCOX17-1-RFP cuando el tejido es irradiado con luz de una longitud de onda de 561 nm. En el panel inferior se muestra una superposición de ambas imágenes obtenidas (ver Materiales y Métodos 6.2.49). Como se puede observar, la señal de RFP colocaliza con la señal de GFP, sugiriendo que AtCOX17-1 se localiza en la mitocondria de células de raíz. Para evaluar el grado de

colocalización se calcularon las frecuencias de localización superpuestas para cada una de las emisiones. En el panel B de la figura 3 se grafican los valores de frecuencia para la emisión de RFP en función de los valores de frecuencia para la emisión de GFP. Se observa un alto grado de colocalización, dado que el coeficiente de correlación de Pearson (CP) obtenido es igual a 0,90, correspondiendo un coeficiente igual a 1 a una colocalización perfecta. En ningún campo se observó señal de RFP fuera de la mitocondria.



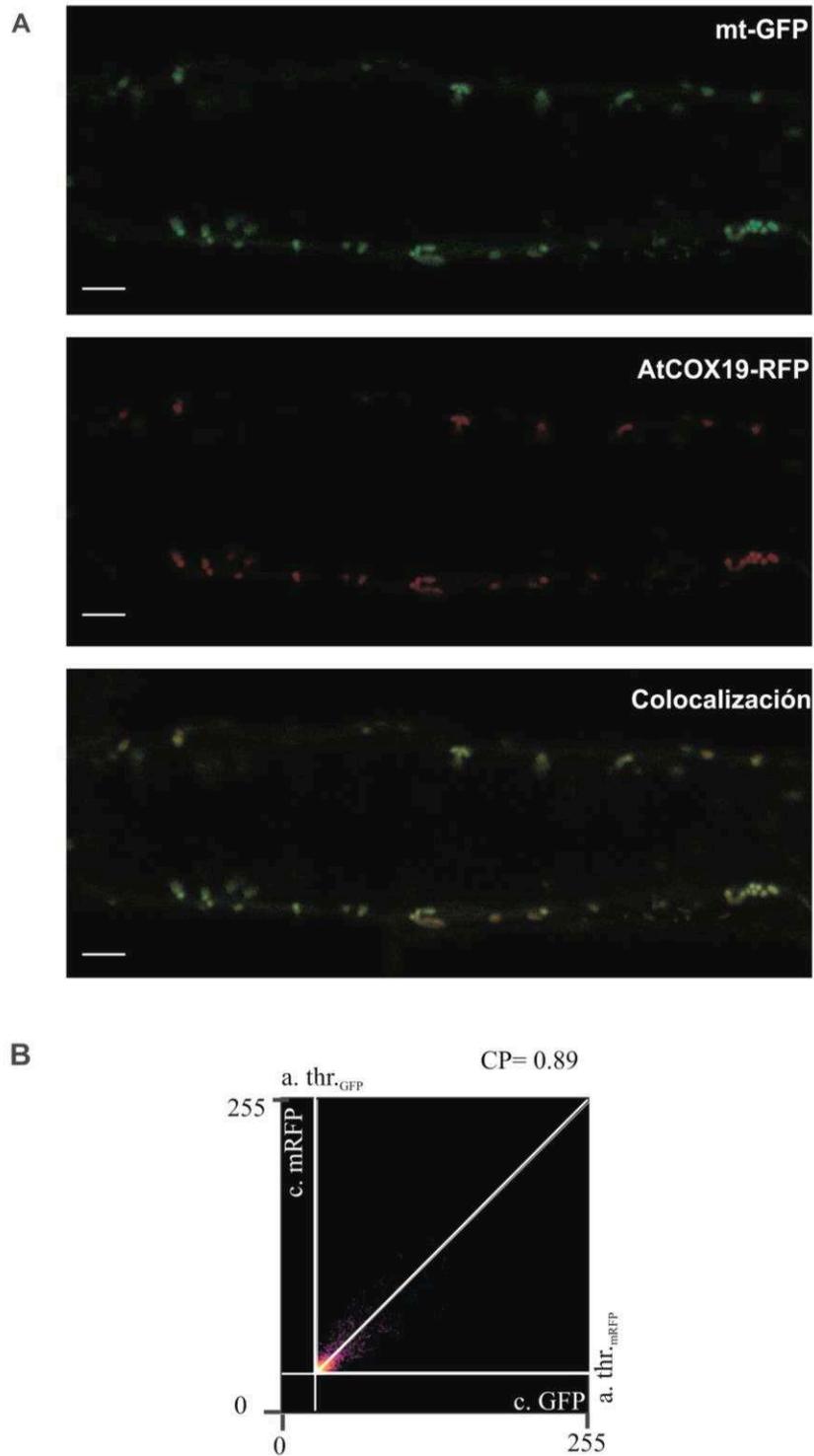
**Figura 3. AtCOX17-1 se localiza en la mitocondria de células de raíz de Arabidopsis.** **A.** Raíces de plantas de 7 días que sobreexpresan GFP en la mitocondria (mt-GFP) y AtCOX17-1-mRFP fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Se muestran campos representativos. La imagen de colocalización representa la superposición de los canales de detección de la fluorescencia emitida por GFP y RFP y la luz blanca transmitida. La señal amarilla indica colocalización de igual intensidad entre las señales verde (GFP) y roja (mRFP). Escala = 5  $\mu$ m. **B.** Las imágenes presentadas en A fueron analizadas con el programa libre Fiji para calcular la significancia de la colocalización mediante un gráfico de dispersión. Se grafican las intensidades detectadas para RFP (eje y) en función de las intensidades detectadas para GFP (eje x). Los valores de corte para las intensidades fueron ajustados automáticamente por el programa de análisis. Se asume colocalización cuando los píxeles provenientes de ambos canales se agrupan a lo largo de una línea recta con un coeficiente de Pearson (CP) mayor a 0,5.

Los resultados obtenidos sugieren que AtCOX17-1 se localiza en la mitocondria de plantas de Arabidopsis, en coincidencia con lo sugerido por su estructura de aminoácidos y la función reportada para los homólogos de levaduras y humanos. El grado de conservación existente entre AtCOX17-1y AtCOX17-2 permite proponer que esta última también poseería una localización mitocondrial, aunque esto deberá ser comprobado

experimentalmente. En cuanto a la localización en el citosol, las imágenes obtenidas no permitieron observar la presencia de AtCOX17-1 en dicho compartimiento, por lo que se postula que la localización mitocondrial en Arabidopsis es mayoritaria en los tejidos y condiciones ensayadas.

#### 7.1.2.2. LOCALIZACIÓN DE ATCOX19 EN CÉLULAS DE ARABIDOPSIS.

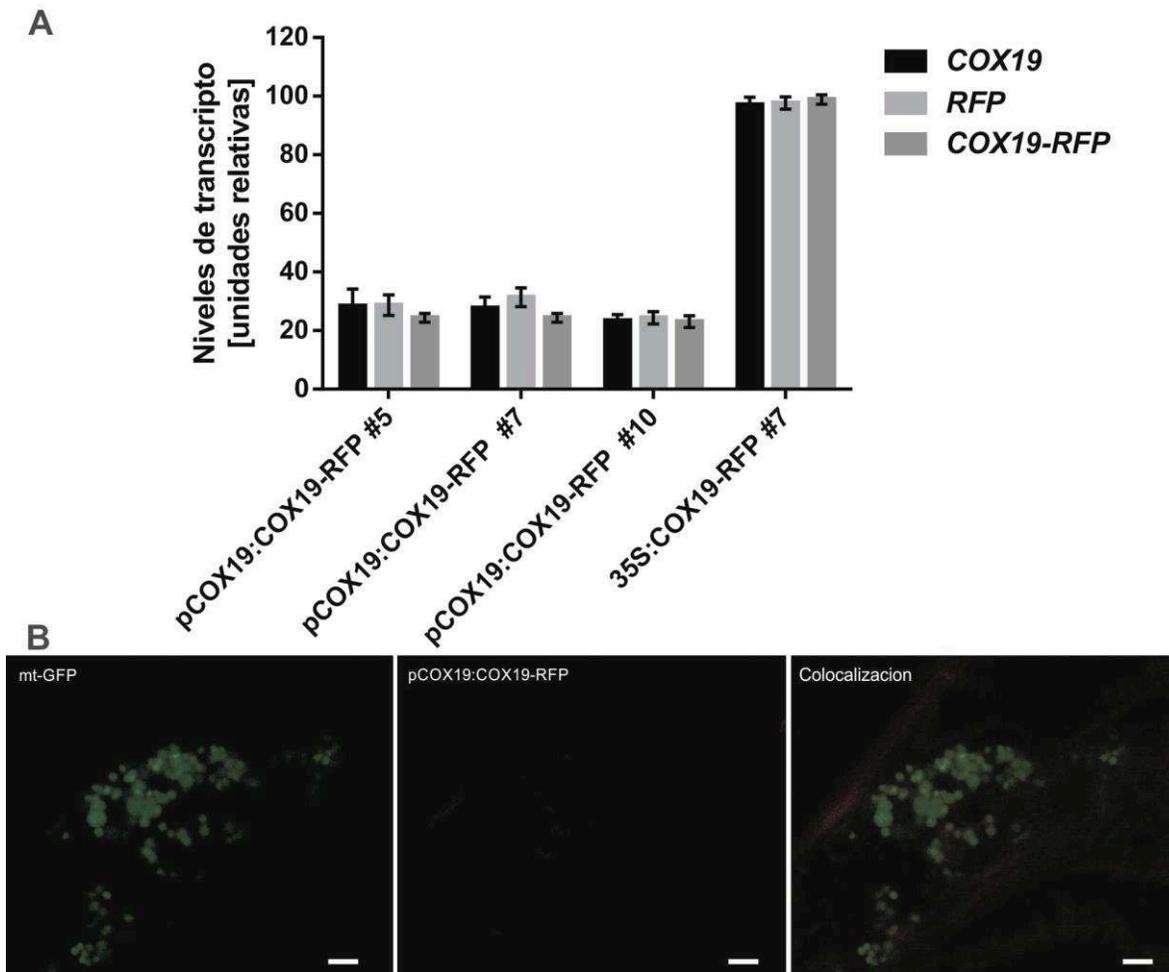
La localización de AtCOX19 en plantas de Arabidopsis se realizó empleando la misma estrategia descrita para la localización de AtCOX17-1. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal permitieron concluir que AtCOX19 también se localiza en la mitocondria de células de raíz de Arabidopsis. En la figura 4A se muestran imágenes representativas de los campos observados en al menos 8 células de tres líneas estudiadas. En el panel superior se muestra la expresión de GFP en la mitocondria (mt-GFP), en el panel medio la expresión de AtCOX19-mRFP y en el panel inferior el resultado de la superposición de los canales de detección para GFP y mRFP. En el panel B de la figura 4 se grafican los valores de frecuencia para la emisión de RFP en función de los valores de frecuencia para la emisión de GFP. La colocalización es estadísticamente significativa con un coeficiente de Pearson de 0,89. En ningún campo se observó señal de RFP fuera de la mitocondria.



**Figura 4. AtCOX19 se localiza en la mitocondria de células de raíces de Arabidopsis. A.** Raíces de plantas de 7 días que expresan GFP en la mitocondria (mt-GFP) y AtCOX19-mRFP fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Se muestran campos representativos. La imagen de colocalización representa la superposición de los canales de detección de la fluorescencia emitida por GFP y RFP y la luz blanca

transmitida. La señal amarilla indica colocalización de igual intensidad entre las señales verde (GFP) y roja (mRFP). Escala = 10  $\mu\text{m}$ . **B.** Las imágenes presentadas en A fueron analizadas con el programa libre Fiji para calcular la significancia de la colocalización mediante un gráfico de dispersión. Se grafican las intensidades detectadas para RFP (eje y) en función de las intensidades detectadas para GFP (eje x). Los valores de corte para las intensidades fueron ajustados automáticamente por el programa de análisis. Se asume colocalización cuando los píxeles provenientes de ambos canales se agrupan a lo largo de una línea recta con un coeficiente de Pearson (CP) mayor a 0,5.

Con el objetivo de evaluar si la localización de AtCOX19 es afectada por los niveles de expresión de la proteína se obtuvieron plantas que expresan GFP en la mitocondria y AtCOX19-mRFP bajo el control del promotor de AtCOX19-1. Esta construcción incluyó el intrón de la región 5'UTR necesario para la correcta transcripción del gen. Con el objetivo de evaluar los niveles de expresión conferidos por esta construcción, se obtuvo RNA de varias líneas transformadas y se analizaron los niveles de transcripto de AtCOX19-mRFP mediante RT-qPCR. En la figura 5A se muestran los resultados obtenidos. En las líneas denominadas #5, #7 y #10 se pudieron detectar los transcriptos mencionados con niveles entre 3 y 4 veces inferiores a los observados en plantas que expresan la fusión bajo el control del promotor 35SCaMV. Estas líneas fueron utilizadas para realizar los experimentos de localización en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, no siendo posible detectar señal de fluorescencia correspondiente a mRFP (Figura 5B).

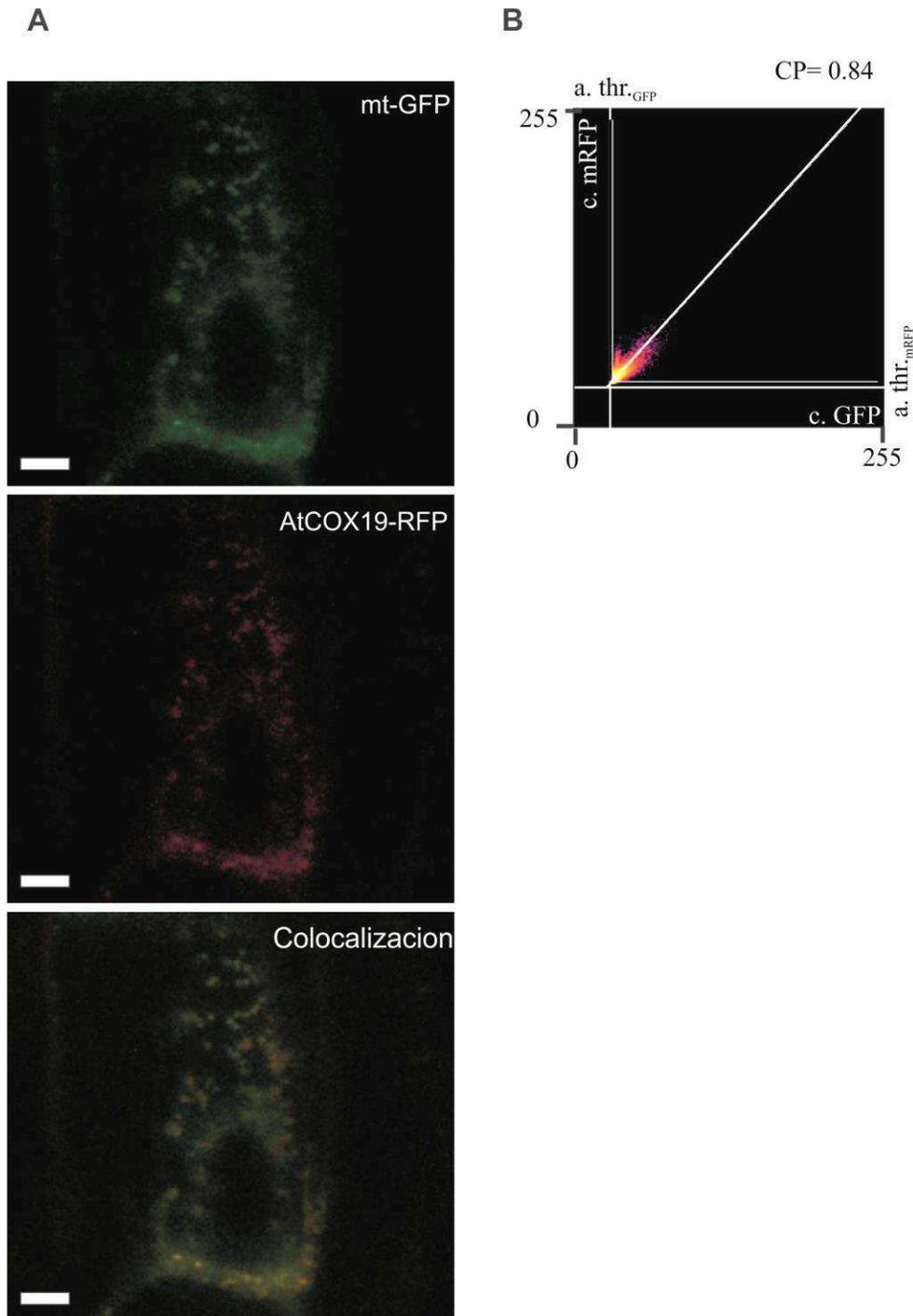


**Figura 5. Detección de COX<sub>19</sub>-RFP en las plantas pCOX<sub>19</sub>:COX<sub>19</sub>-RFP.** A. Niveles de transcritos de AtCOX<sub>19</sub>, RFP y AtCOX<sub>19</sub>-RFP medidos mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan en unidades relativas considerando 100% la expresión detectada en la planta 35S:COX<sub>19</sub>-RFP. Las barras de error representan la desviación estándar obtenida a partir de tres réplicas técnicas. B. Raíces de plantas de 7 días que expresan GFP en la mitocondria (mt-GFP) y AtCOX<sub>19</sub>-mRFP bajo el control del promotor de AtCOX<sub>19-1</sub> (pCOX<sub>19</sub>) fueron visualizadas mediante microscopía confocal. Se muestran campos representativos. La imagen de colocalización representa la superposición de los canales de detección de la fluorescencia emitida por GFP y RFP. Escala = 5 μm.

Resultados preliminares de nuestro grupo de investigación indicaron que la expresión de AtCOX<sub>19</sub> es inducida en condiciones de estrés. Se decidió, entonces, incubar las plantas pCOX<sub>19</sub>:COX<sub>19</sub>-RFP durante 120 minutos a 37°C y luego irradiarlas durante 60 minutos con luz UV-B. Luego de este tratamiento se recuperaron entre 6 y 10 raíces de las líneas #5 y #10 para realizar el ensayo de localización. En la figura 6A se muestra el resultado obtenido luego del tratamiento, permitiendo, en este caso, detectar fluorescencia proveniente de RFP en un patrón similar al observado para GFP

mitocondrial. En el panel B de la figura 6 se grafican los valores de frecuencia para la emisión de RFP en función de los valores de frecuencia para la emisión de GFP. La colocación de GFP y RFP es estadísticamente significativa dado que el coeficiente de Pearson (CP) obtenido es igual a 0,84. En ningún campo se observó señal de RFP fuera de la mitocondria.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que AtCOX19 se localiza en la mitocondria tanto cuando es expresada bajo el control de un promotor constitutivo como cuando su expresión es dirigida por su promotor propio e inducida ante una situación de estrés.



**Figura 6. AtCOX19 se localiza en la mitocondria de células de raíces de Arabidopsis sometidas a condiciones de estrés. A.** Raíces de plantas de 7 días que expresan GFP en la mitocondria (mt-GFP) y AtCOX19-mRFP bajo el control del promotor de AtCOX19-*z*fueron tratadas con una combinación de estrés por calor y exposición a luz UV-B y visualizadas mediante microscopía confocal. Se muestran campos representativos. La imagen de colocalización representa la superposición de los canales de detección de la fluorescencia emitida por GFP y RFP. La señal amarilla indica colocalización de igual intensidad entre las señales verde (GFP) y roja (mRFP). Escala = 10  $\mu$ m. **B.** Las imágenes presentadas en A fueron analizadas con el programa libre Fiji para calcular la significancia de la colocalización mediante un gráfico de dispersión. Se

grafican las intensidades detectadas para RFP (eje y) en función de las intensidades detectadas para GFP (eje x). Los valores de corte para las intensidades fueron ajustados automáticamente por el programa de análisis. Se asume colocalización cuando los píxeles provenientes de ambos canales se agrupan a lo largo de una línea recta con un coeficiente de Pearson (CP) mayor a 0,5.

Los resultados descritos en este capítulo nos permiten concluir que AtCOX17 y AtCOX19 se localizan en la mitocondria de células de raíz de Arabidopsis. La localización observada es coincidente con la función putativa de estas proteínas como chaperonas de cobre del CIV. En el caso de AtCOX19 la localización es mitocondrial, tanto en condiciones control como luego de un tratamiento con estrés. La expresión de ambas chaperonas en plantas sería distinta a la observada en levaduras y en mamíferos, organismos en los cuales se ha reportado una localización dual en mitocondria y citosol. Sin embargo, la localización en levaduras y mamíferos es mayoritariamente mitocondrial y solo se ha demostrado una función en el citosol para COX19 en células de fibroblastos en presencia de un exceso de cobre en el medio de cultivo. Ambas proteínas deben ingresar al IMS a través de un sistema dependiente del estado de oxidación, del potencial de membrana y de MIA40. Dado que la localización en levaduras y mamíferos se realizó mediante fraccionamiento subcelular y detección empleando anticuerpos anti-COX17 o antiCOX19, la señal de detección observada en la fracción citosólica podría provenir de proteína no plegada que aún no ha ingresado a la mitocondria.

---

---

## 7.2. CAPÍTULO II.

## 7.2. CAPÍTULO II

## ESTUDIO DEL ROL DE LAS PROTEÍNAS ATCOX17 EN LA BIOGÉNESIS DEL COMPLEJO CITOCROMO C OXIDASA (COX).

## 7.2.1. INTRODUCCIÓN.

Las proteínas COX17 han sido identificadas en los cuatro reinos del dominio *Eukarya* (ver árbol filogenético en Introducción inciso 4.6.1). La función de COX17 en la biogénesis de COX fue primero demostrada en levaduras (Glerum y col., 1996), ya que las mutantes en COX17 presentaban un fenotipo de deficiencia respiratoria evidenciado por la falta de los citocromos  $a$  y  $a_3$  y una disminución de la actividad COX. Considerando que las proteínas COX17 presentan dominios de unión a cobre y que ocurre una reversión del fenotipo de las mutantes cuando éstas son crecidas en presencia de cobre exógeno, los autores concluyeron que COX17 estaría involucrada en el transporte de cobre hacia los centros metálicos de COX (Glerum y col., 1996). Posteriormente, se demostró que COX17 es capaz de unir  $\text{Cu}^{+2}$  *in vivo* (Srinivasany col., 1998). Además, la disminución de la actividad COX en las levaduras mutantes *cox17* no estaría asociada a una modificación en la síntesis de las subunidades de COX. Esto sugiere que la formación de los centros prostéticos ocurriría durante el ensamblado de COX sin alterar la síntesis de las subunidades (Glerum y col., 1996). La importancia de la inserción de cobre en las subunidades de COX de levaduras es consistente con el hecho de que todas las levaduras mutantes en proteínas que participan en la inserción de cobre (*SCO1*, *SCO2*, *COX19*, *PET191* y *COX17*) requieren un sustrato fermentable para desarrollarse apropiadamente (Khalimonchuk y col., 2008; Nittis y col., 2001; Nobrega y col., 2002; Rigby y col., 2007). La función de COX17 en la biogénesis de COX también fue sugerida en el alga *Chlamydomonas reinhardtii*. El silenciamiento de *COX17* mediante ARN de interferencia (ARNi) produjo una disminución del 40% en la actividad COX. Sin embargo, la composición y la concentración de las subunidades del complejo no se vieron modificadas (Remacle y col., 2010). Además, el alga deficiente en COX17 presentó mayores niveles de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en luz y sensibilidad al tratamiento con cadmio. Los autores sugieren que COX17 podría tener funciones adicionales a su rol en la biogénesis de COX (Salinas y col., 2014).

En mamíferos, la ausencia de COX17 genera detención de la embriogénesis en el estadio E8/E10, es decir que estos embriones pueden sobrevivir hasta la etapa de gastrulación (Takahashi y col., 2002). Este fenotipo es similar al observado en ratones mutantes homocigotas para la proteína transportadora de cobre CTR1. En ambos casos se observó una disminución en la actividad COX sin modificaciones en la composición de los complejos respiratorios y sin alteración en la concentración y disponibilidad de las subunidades de COX (Takahashi y col., 2002). Sin embargo, un estudio posterior realizado en células HeLa, en las cuales la expresión de COX17 fue silenciada mediante ARNi, demostró que los niveles de COX2 disminuyen significativamente luego de 24 horas de transfección (Oswald y col., 2009). La disminución en la concentración de COX2 afectó la formación de los supercomplejos que incluyen COX, si bien la abundancia de las subunidades de los complejos II, III y V y la formación de los dímeros del CIV no se vieron afectadas (Oswald y col., 2009). Finalmente, los autores mostraron que la actividad COX, medida como consumo de oxígeno en presencia de citocromo *c*, disminuye como consecuencia del silenciamiento de COX17. Además, el silenciamiento de COX17 produjo la acumulación de un complejo de 150 kDa que contiene a COX1 pero no a COX2. Los autores sugirieron que COX17 estaría implicada en la inserción del cobre en COX2 y no en la formación del centro binuclear de Cu<sub>B</sub>-hemo $\alpha_3$  en COX1 (Oswald y col., 2009). Sin embargo, los autores reportaron una disminución transitoria de COX1.

En plantas no hay reportes de las consecuencias de la falta o de la disminución de proteínas COX17. Hasta la fecha no se han obtenido mutantes insercionales *knock out* (KO) para ninguno de los genes que codifican proteínas estructurales de los complejos III y CIV y las mutantes KO para el CII muestran fenotipo de letalidad (León y col., 2007) similar a lo observado en plantas mutantes en proteínas involucradas en la biogénesis del CIV (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). En plantas, solo el CI podría ser prescindible (Meyer y col., 2009; Meyer y col., 2005; Perales y col., 2005). El estudio de los complejos respiratorios en plantas se ha realizado a partir de la obtención de plantas con

niveles reducidos del CII o a partir del estudio de plantas mutantes en proteínas asociadas al CIII (Fuentes y col., 2011; León y col., 2007; Zsigmond y col., 2008). La mutación de las vías alternativas no genera fenotipos de letalidad (Giraud y col., 2008; Rasmusson y col., 2004). El CI ha sido uno de los complejos más estudiados en plantas. Plantas mutantes en genes que codifican subunidades del CI incluyen mutantes de *Arabidopsis* o *N. sylvestris* en las subunidades de 18 kDa (NDFUS<sub>4</sub>), CA<sub>2</sub> y NAD<sub>7</sub> y en factores de procesamiento involucrados en la expresión de los genes *NAD<sub>4</sub>*, *NAD<sub>1</sub>* y *NAD<sub>5</sub>* (Brangeon y col., 2000; des Francs-Small y col., 2014; Lee y col., 2002; Perales y col., 2005). Entre ellas, las plantas mutantes en *NAD<sub>7</sub>* de *N. sylvestris*, denominadas CMSII, han sido las más estudiadas. En estas mutantes, la ausencia del CI genera un retardo en el crecimiento, una disminución del metabolismo de oxidación de glicina y un incremento en la capacidad de la respiración alternativa (Gutierrez y col., 1997; Sabar y col., 2000). También se producen cambios asociados a la función del cloroplasto, ya que las mutantes CMSII muestran una reducción superior al 20% en la tasa fotosintética, mientras que la fotorrespiración se incrementa como consecuencia de una mayor resistencia a la difusión del CO<sub>2</sub> (Dutilleul y col., 2003; Priault y col., 2006). Un estudio de metabolómica mostró que estas mutantes acumulan aminoácidos ricos en nitrógeno. Finalmente, la expresión de distintos genes de respuesta a estrés se encuentra modificada, resultando en un fenotipo de tolerancia a ozono. La mutación de *NDFUS<sub>4</sub>* también genera plantas que carecen de CI con la consiguiente disminución de la translocación de protones y la síntesis de ATP (Meyer y col., 2009). Probablemente, esta reducción en la síntesis de ATP explique el fenotipo de crecimiento retardado observado. La falta de CI es compensada por una inducción en la expresión de AOX<sub>1a</sub> y una deshidrogenasa externa denominada NDB<sub>1</sub>. Dicha compensación explicaría que estas mutantes presenten la misma tasa de consumo de oxígeno que las plantas salvajes (Meyer y col., 2009). Ensayos de electroforesis de fluorescencia diferencial en gel (DIGE, de sus siglas en inglés *Difference Gel Electrophoresis*) muestran que la mutación de *NDFUS<sub>4</sub>* genera una disminución en los niveles de otras subunidades del CI sin provocar cambios en los restantes cuatro complejos respiratorios. En concordancia con la alteración del metabolismo mitocondrial, las plantas *ndfus<sub>4</sub>* acumulan ácidos orgánicos y

aminoácidos ramificados cuya oxidación durante la noche transfiere electrones directamente al pool de Q evitando el paso de electrones por el CI (Meyer y col., 2009).

Las plantas mutantes en el CII han sido pobremente estudiadas dado que la única mutante reportada es el resultado de una mutación en una de las subunidades de codificación nuclear (*SDH1-1*) que genera un fenotipo de letalidad alterando el desarrollo tanto del gametofito femenino como del gametofito masculino (León y col., 2007). Sin embargo, recientemente se identificó otra mutante en una región conservada de *SDH1-1* que no genera letalidad (Gleason y col., 2011). Estas mutantes presentan un fenotipo de sensibilidad a estrés biótico como consecuencia de una disminución en la expresión de genes que participan en la respuesta defensiva mediada por ácido salicílico. Las plantas *sdh1-1* o *dsr1* (de las siglas en inglés de *Disrupted Stress Response 1*) tienen menores niveles de mtEROs tanto en condiciones control como luego de la infección con patógenos (Gleason y col., 2011). Este resultado es coincidente con la teoría que propone que el CII es el principal productor de mtEROs dependientes de succinato (Moreno-Sanchez y col., 2013). No hay reportes sobre el comportamiento de la cadena transportadora de electrones en estas mutantes.

En relación con el CIII, no se han estudiado hasta la fecha plantas mutantes en las subunidades que lo componen. Sin embargo, las plantas mutantes en el gen *PPR40* son deficientes en la actividad de este complejo (Zsigmond y col., 2008). *PPR40* sería importante en el transporte de electrones desde la QH<sub>2</sub> hacia el CIII e interaccionaría con las subunidades del CIII en la MI de la mitocondria. La mutación en *PPR40* genera una disminución en el transporte de electrones a través de los complejos I y II mientras que el consumo de oxígeno en presencia de ascorbato se incrementa en más de un 50%. Este resultado implica que la actividad del CIV aumenta a expensas de la utilización de ascorbato como fuente de electrones. En las plantas *ppr40*, el ascorbato podría suplir parcialmente la deficiencia de electrones provenientes del CIII. La disminución de la actividad del CIII genera un aumento superior al 60% en la actividad AOX probablemente como respuesta a las EROs generadas por la acumulación de equivalentes reductores (Zsigmond y col., 2008). El incremento de ascorbato oxidado en la mitocondria genera un

aumento en la actividad del ciclo del glutatión y en la enzima GLDH, involucrada en la síntesis de ascorbato. Sin embargo, los niveles de ascorbato reducido se mantienen bajos tanto en la mitocondria como en células de plantas *ppr40* (Zsigmond y col., 2011). Finalmente, estas deficiencias en la actividad mitocondrial generan un fenotipo de plantas enanas, independientemente de la condición de crecimiento, y sensibilidad aumentada frente a situaciones de estrés como el crecimiento en presencia de sales o tratamientos con ácido abscísico, paraquat o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La sobreexpresión de *PPR40* genera un fenotipo de tolerancia al tratamiento con sales (Zsigmond y col., 2012).

Se postula que las mutantes homocigotas en proteínas del CIV son letales y por eso no se han obtenido hasta la fecha (Meyer y col., 2005). En *Zea mays* (maíz) se intentó desarrollar mutantes en la subunidad COX2 en una línea heteroplásmica. Sin embargo, ninguno de los callos homoplásmicos obtenidos pudo desarrollarse para estudiar el efecto de la disfunción del CIV en plantas (Gu y col., 1994). En *Arabidopsis*, se han publicado resultados en relación con la deficiencia de proteínas homólogas a las proteínas SCO de levaduras y humanos (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2014; Steinebrunner y col., 2011) y, recientemente, se obtuvieron plantas deficientes en la actividad del CIV como consecuencia de la mutación de una proteína perteneciente a la familia de proteínas con dominio PPR (Dahan y col., 2014).

Las proteínas SCO en levaduras y en mamíferos están involucradas en la inserción del cobre en la subunidad COX2 del CIV. En *Arabidopsis* existen dos proteínas homólogas, HCC1 y HCC2 (de sus siglas en inglés *Homologue of yeast Copper Chaperone*). La mutación de *HCC1* genera un fenotipo de letalidad embrionaria en plantas de *Arabidopsis*, mientras que la mutación de *HCC2* no genera un cambio de desarrollo evidente pero incrementa la expresión de genes de respuesta a estrés (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). El fenotipo de letalidad observado en plantas *hcc1/hcc1* no es revertido mediante la complementación con *HCC1* bajo el control del promotor específico de embrión *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)*, evidenciando la importancia de HCC1 a lo largo del desarrollo de la planta, más allá de la etapa embrionaria. HCC2, al igual que HCC1, se localiza en la mitocondria, si bien su función es evidentemente

diferente dado que las plantas *hcc2/hcc2* no presentan alteraciones en el desarrollo. Sin embargo, estas plantas son sensibles al estrés por UV-B (Steinebrunner y col., 2014). Finalmente, la actividad del CIV se encuentra disminuida en las plantas mutantes heterocigotas *hcc1/HCC1*, mientras que no se observa modificación de la actividad del CIV en las plantas *hcc2/hcc2* (Steinebrunner y col., 2014).

Las proteínas con dominios PPR constituyen una gran familia de proteínas de unión al ARN en plantas (alrededor de 450 genes en *Arabidopsis*). La mayoría de sus miembros se expresan en la mitocondria o en el cloroplasto y se ha propuesto que participan en procesos relacionados con el procesamiento de ARN (Barkan y Small, 2014). Dahan y col. (2014) demostraron que la mutación del gen *CYTOCHROME OXIDASE DEFECTIVE 1 (COD1, At2g35030)*, que codifica una proteína con dominio PPR, altera los eventos de edición de *COX2* y *NAD4*, generando la pérdida total de *COX2* y del CIV en las mutantes homocigotas. Los experimentos fueron realizados en mutantes homocigotas rescatadas a partir del cultivo de semillas en un medio rico en vitaminas, azúcares y aminoácidos. Las plantas *cod1/cod1* presentan fenotipo pleiotrópico y no desarrollan raíz. Los autores sugieren que las mutantes homocigotas reorganizan el metabolismo (aumentando las vías que consumen NADH) y sobreviven gracias a la traslocación de protones asociada al CI. La cadena transportadora de electrones se limitaría al CI, las NADH deshidrogenasas alternativas y la enzima AOX.

De los trabajos discutidos anteriormente, se desprende que la ausencia o la deficiencia de los complejos respiratorios genera cambios pleiotrópicos a nivel energético, metabólico y fenotípico. Además, la ausencia del CIV no genera plantas viables en condiciones normales de crecimiento.

De acuerdo al rol propuesto en otros organismos para las chaperonas de cobre *COX17* en la biogénesis de COX, decidimos estudiar si la alteración de los niveles de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* genera cambios en la actividad del CIV. Para poder desarrollar dicho objetivo fue necesario obtener plantas con niveles alterados de estas chaperonas.

---

### 7.2.2. RESULTADOS.

7.2.2.1. OBTENCIÓN DE LÍNEAS SILENCIADAS EN *ATCOX17-1* O EN *ATCOX17-2*.

Dado que no se encuentran disponibles mutantes insercionales o de otro tipo en el gen *AtCOX17-1*, se recurrió a una estrategia de silenciamiento. Si bien para el gen *AtCOX17-2* sí existen mutantes insercionales, se decidió emplear una línea mutante homocigota y generar, además, líneas silenciadas. La posición de la inserción para la planta *cox17-2* empleada se describe en la Figura 2 del Anexo I.

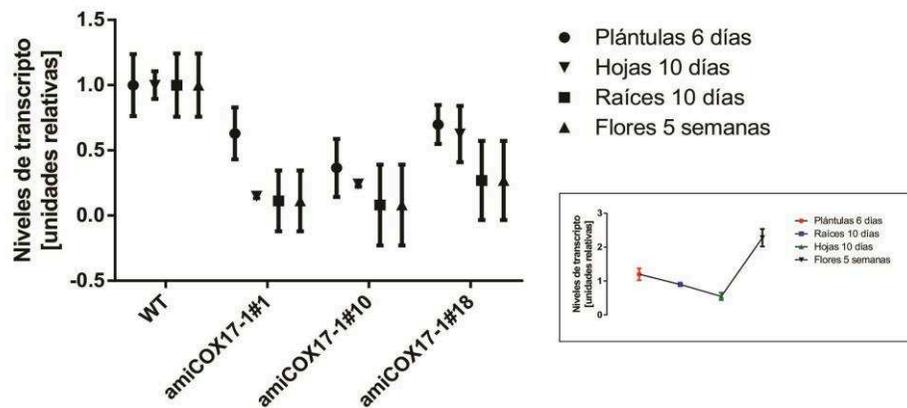
Con el objetivo de obtener plantas con niveles reducidos de *AtCOX17-1* y de *AtCOX17-2* se recurrió a una estrategia de silenciamiento mediada por microARNs artificiales (amiARNs). Se generaron amiARNs que permiten silenciar de manera específica cada uno de los genes *COX17* en Arabidopsis (ver Materiales y Métodos, 1.2.9). En la Tabla 1 se muestran los niveles de expresión de los genes *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en las plantas obtenidas. Los niveles de transcripto fueron cuantificados mediante reacción de transcriptasa reversa seguida de PCR en tiempo real (RT-qPCR) en muestras provenientes de hojas de plantas crecidas durante 10 días en placa de cultivo (ver Materiales y Métodos 1.2.18). En la Tabla 1 se observa que los amiARNs generados permitieron silenciar de manera específica cada uno de los genes blanco.

Gen silenciado	Niveles de Transcripto [unidades relativas]		Línea Silenciada
	<i>AtCOX17-1</i>	<i>AtCOX17-2</i>	amiCOX17-1, línea#
<i>AtCOX17-1</i>	0,214±0,015	0,641±0,032	1
	0,335±0,012	0,981±0,014	2
	0,364±0,023	1,23±0,019	10
	0,568±0,024	0,951±0,041	18
	0,648±0,011	1,42±0,018	31
	0,732±0,037	0,748±0,091	7
	0,795±0,023	1,324±0,015	9
<i>AtCOX17-2</i>			amiCOX17-2, línea#
	0,824±0,025	0,227±0,021	23
	0,712±0,032	0,357±0,041	8
	1,234±0,141	0,412±0,013	17
	1,412±0,054	0,432±0,024	28
	0,912±0,123	0,521±0,061	29
	1,096±0,104	0,641±0,028	1
1,235±0,201	0,658±0,012	3	

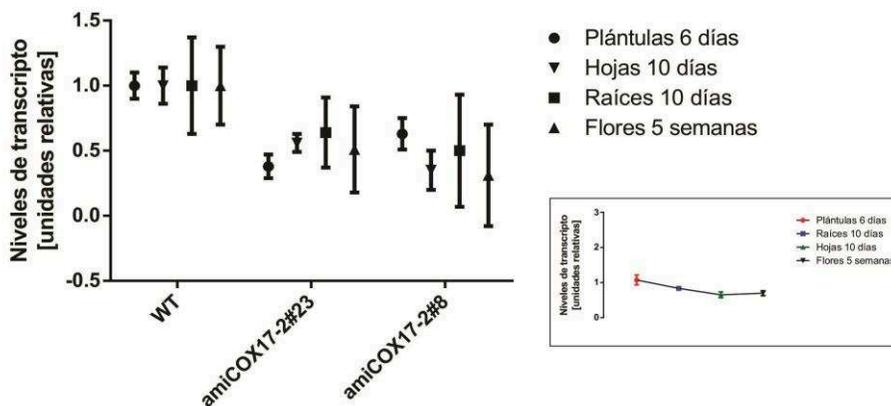
**Tabla 1.** Niveles de transcripto de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en plantas transformadas con construcciones que expresan amiARNs específicos para cada uno de los genes de interés. Los niveles de expresión fueron medidos mediante RT-qPCR en distintas líneas de plantas que fueron transformadas con la construcción

que permite silenciar *AtCOX17-1* (verde oscuro) o con la construcción que permite silenciar *AtCOX17-2* (verde claro).

Distintas líneas *amiCOX17-1* (#2, #10 y #18) y *amiCOX17-2* (#23 y #17) para las cuales la expresión del gen de interés resultó reducida en al menos un 30% fueron utilizadas para evaluar el silenciamiento en diferentes órganos y a través de tres filiales. Los niveles de silenciamiento en las plantas *amiCOX17-1* (Figura 1) y *amiCOX17-2* (Figura 2) no mostraron diferencias significativas a lo largo del desarrollo de la planta ni en distintos órganos. En ambas figuras se muestra en un recuadro la expresión de los genes en plantas salvajes (WT) en los estadios evaluados.

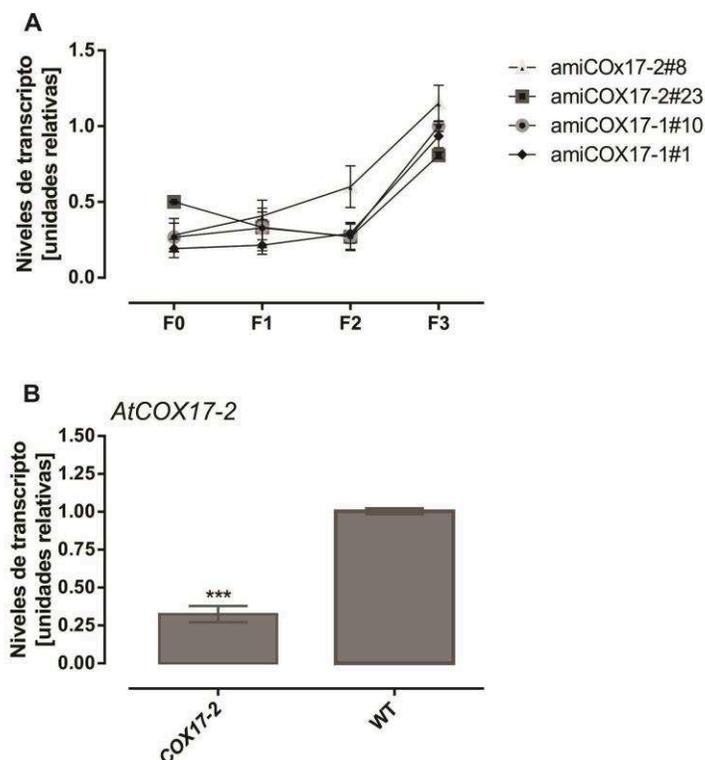


**Figura 1. Niveles de expresión de *AtCOX17-1* en distintos estadios de desarrollo y distintos órganos de plantas silenciadas.** Se evaluó la expresión de *AtCOX17-1* en plántulas de 6 días, hojas y raíces de plantas de 10 días y flores provenientes de plantas silenciadas y WT. Los resultados se expresan en unidades relativas de expresión con respecto a plantas WT. Las barras denotan la desviación estándar (SD) correspondiente al promedio obtenido para tres muestras independientes de cada línea, ensayadas en un mismo experimento de RT-qPCR.



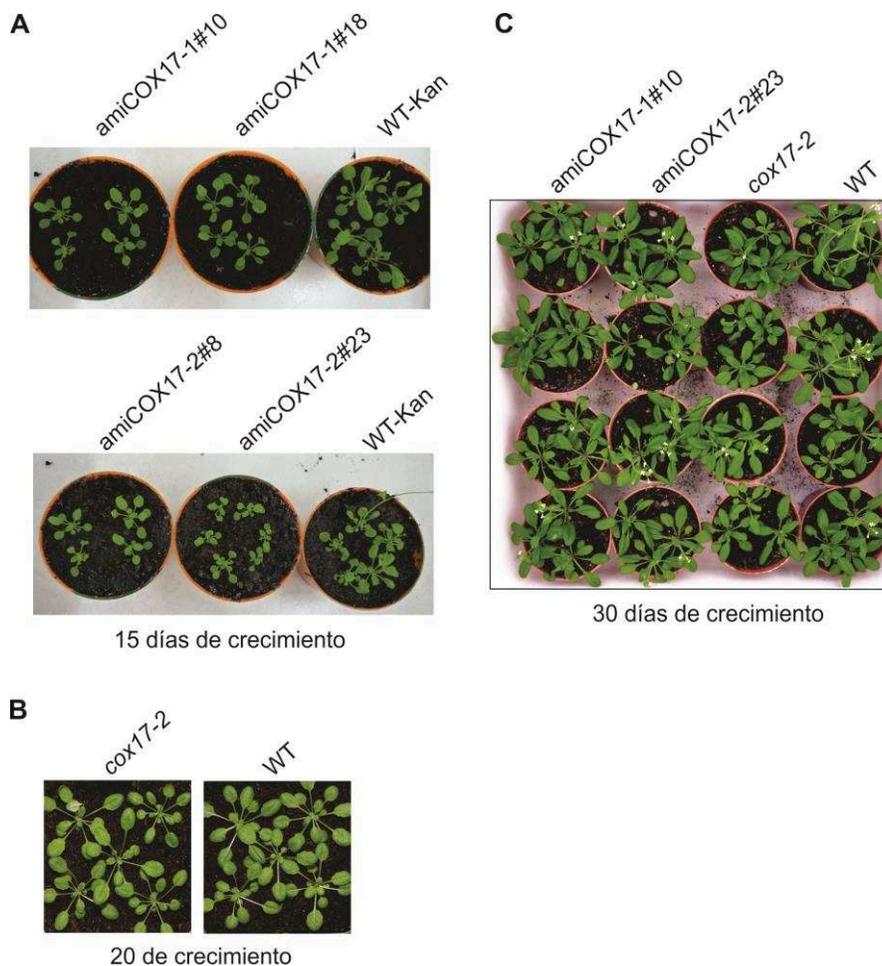
**Figura 2. Niveles de expresión de AtCOX17-2 en distintos estadios de desarrollo y distintos órganos de plantas silenciadas.** Se evaluó la expresión de AtCOX17-2 en plántulas de 6 días, hojas y raíces de plantas de 10 días y flores provenientes de plantas silenciadas y WT. Los resultados se expresan en unidades relativas de expresión con respecto a plantas WT. Las barras denotan la desviación estándar (SD) correspondiente al promedio obtenido para tres muestras independientes de cada línea, ensayadas en un mismo experimento de RT-qPCR.

Sin embargo, cuando se evaluaron los niveles de silenciamiento a través de distintas generaciones se observó que estos disminuían cuando se alcanzaba la tercera filial (Figura 3A). Frente a estos resultados, todos los experimentos realizados en esta tesis se realizaron con la segunda filial de cada una de las líneas ensayadas. Luego, se evaluaron los niveles de expresión de las plantas *cox17-2* (Figura 3B). Los niveles de transcripción, medidos mediante RT-qPCR, indican una disminución del 67,5% en la expresión de AtCOX17-2 en las plantas *cox17-2*.



**Figura 3. Niveles de silenciamiento en distintas filiales de plantas amiCOX17 y niveles de expresión en las plantas *cox17-2*.** **A.** Se muestran los niveles de expresión para dos líneas silenciadas en *AtCOX17-1* y para dos líneas silenciadas en *AtCOX17-2* en distintas filiales. El ARN se aisló de plantas de 10 días crecidas en placa de cultivo. Los resultados se expresan en unidades relativas de expresión respecto a plantas WT para cada una de las filiales. **B.** Niveles de expresión de *AtCOX17-2* medidos mediante RT-qPCR en plantas *cox17-2*. Las barras representan la SD obtenida en 3 mediciones independientes. Los asteriscos representan diferencia significativa ( $p < 0,05$ , Prueba t).

En la figura 4 se muestran imágenes representativas del fenotipo de las plantas amiCOX17 (F2) y de las plantas *cox17-2* en distintos momentos del desarrollo. Como puede apreciarse, no se observaron diferencias fenotípicas evidentes cuando las plantas fueron crecidas en condiciones estándares para el crecimiento de *Arabidopsis* en cámara de cultivo.



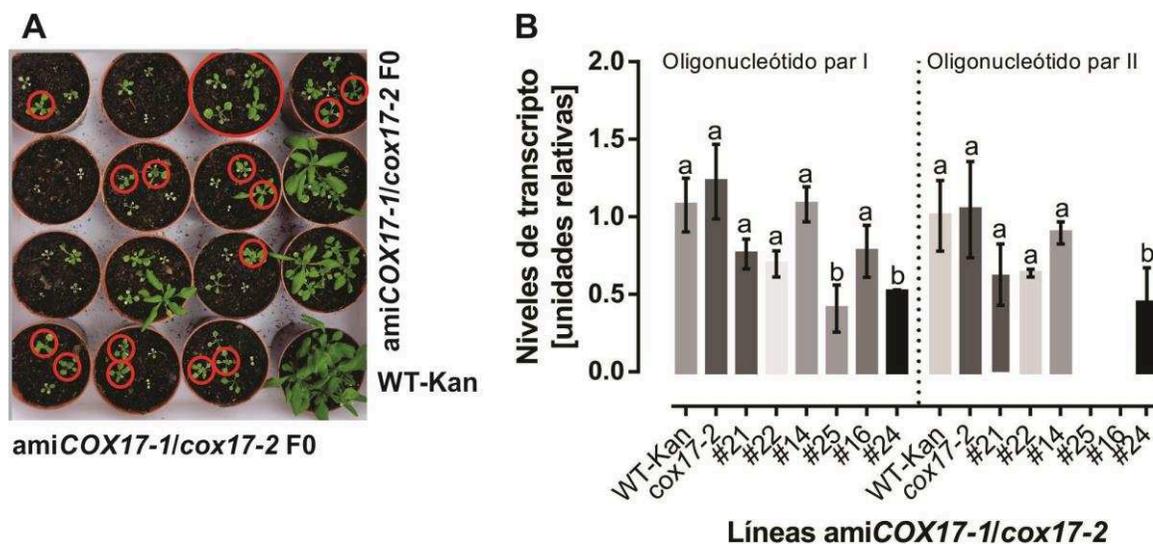
**Figura 4.** Fenotipo de plantas con niveles de expresión disminuidos de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2*. **A.** Plantas *amiCOX17-1*, *amiCOX17-2* y *WT-kan* (planta de *Arabidopsis* que expresa el *cassette* de resistencia a kanamicina) crecidas en medio MS 0.5x suplementado con antibiótico kanamicina fueron crecidas en placas de Petri en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) y luego transplantadas a sustrato sólido en las mismas condiciones. La fotografía fue tomada luego de 15 días de crecimiento. **B.** Plantas *cox17-2* y *WT* crecidas durante 20 días en sustrato sólido en las condiciones descritas en A. **C.** Plantas *amiCOX17* crecidas en medio MS 0.5x suplementado con kanamicina durante 10 días y luego transplantadas. Plantas *cox17-2* y *WT* crecidas en medio MS 0.5x durante 10 días y luego transplantadas. La fotografía fue tomada luego de 20 días de crecimiento en sustrato sólido.

#### 7.2.2.2. OBTENCIÓN DE LÍNEAS SILENCIADAS EN AMBOS GENES *ATCOX17*.

Dado que las líneas silenciadas en *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* de manera independiente no presentaban un fenotipo apreciable, quizás indicando la existencia de redundancia funcional, decidimos silenciar el gen *AtCOX17-1* en las plantas *cox17-2*. Con este objetivo, se transformó una línea mutante homocigota *cox17-2* con la construcción

amiCOX17-1(I) (ver Materiales y Métodos 1.2.g). Empleando esta estrategia y luego de tres eventos independientes de transformación solo pudieron obtenerse 24 líneas que resistieron el proceso de selección y presentaban el transgén de interés. Las plantas obtenidas presentaban un marcado retroceso en el desarrollo y eran de menor tamaño que las plantas WT cultivadas en las mismas condiciones. Seis de las líneas obtenidas desarrollaron clorosis en las hojas, lo que dificultó la extracción de ARN, y por lo tanto no fueron analizadas en más detalle. En la figura 5A se muestra una fotografía representativa del resultado del proceso de selección, en la que se señalan las líneas a partir de las cuales se obtuvo ARN de calidad para ensayos transcripcionales (círculos rojos). En la figura 5B se muestran los niveles de expresión de *AtCOX17-1* en 6 de las 18 líneas amiCOX17-1/cox17-2 obtenidas. Los niveles de expresión de *AtCOX17-1* en las plantas amiCOX17-1/cox17-2 se evaluaron empleando dos pares de oligonucleótidos diferentes. El par I, usado para evaluar las plantas silenciadas simples, es complementario a una región ubicada hacia el extremo 3' del gen *AtCOX17-1*, mientras que el par II es complementario a las secuencias flanqueantes al sitio de corte determinado por el amiCOX17-1(1). En estas seis líneas evaluadas, solo dos líneas (#24 y #25) presentaron una reducción significativa en la expresión de *AtCOX17-1* respecto de la planta WT cuando se empleó el par I de oligonucleótidos (Figura 5B). Los resultados obtenidos con el par II de oligonucleótidos indicarían que los niveles de silenciamiento de las líneas evaluadas son menores a los obtenidos con el par I (Figura 5B). Sin embargo, no se encontraron más líneas silenciadas que las determinadas con el par I, a excepción de la línea #16 en la cual no fue posible detectar los transcritos de *AtCOX17-1* utilizando los oligonucleótidos del par II (Figura 5B). Estos resultados podrían indicar que el par I de oligonucleótidos detecta fragmentos de ARNm no funcional que no son degradados.

Los experimentos realizados en esta tesis se realizaron empleando la línea amiCOX17-1/cox17-2#25 dado que la línea amiCOX17-1/cox17-2#24 nunca alcanzó el estadio reproductivo. Es conveniente aclarar que los ensayos de RT-qPCR descritos anteriormente se realizaron en las plantas pertenecientes a la primera filial.

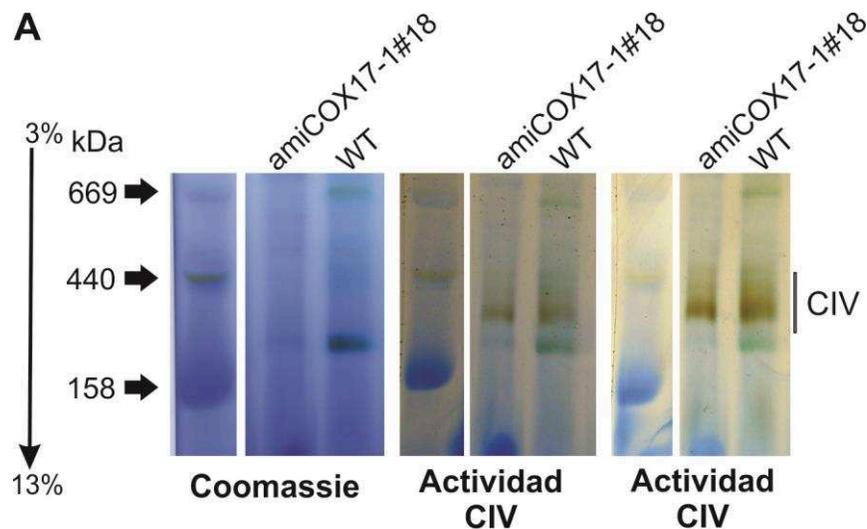


**Figura 5. Niveles de expresión de AtCOX17-1 en plantas *cox17-2* transformadas con la construcción amiCOX17-1(1).** **A.** Plantas *cox17-2* transformadas con la construcción amiCOX17-1(1) seleccionadas durante 22 días en kanamicina. La fotografía fue tomada 6 días después de que las plantas fueran transplantadas para su desarrollo en tierra. En círculos rojos se muestran las líneas que fueron utilizadas en los ensayos de RT-qPCR. **B.** Los niveles de expresión de AtCOX17-1 fueron medidos mediante RT-qPCR empleando dos pares de oligonucleótidos diferentes. El ARN se obtuvo de plantas que fueron seleccionadas en presencia de kanamicina durante 22 días y luego transplantadas a sustrato sólido para su desarrollo. Los niveles de transcritpo se expresan en unidades relativas a la expresión del gen en la planta WT. Las barras de error representan la SD correspondiente al promedio de réplicas técnicas para tres experimentos de RT-qPCR utilizando las mismas muestras. WT-Kan, planta de *Arabidopsis* que expresa el *cassette* de resistencia a Kanamicina. Esta línea es empleada como control de ensayo para las plantas amiCOX17-1/*cox17-2* ya que deben ser crecidas en presencia de kanamicina.

### 7.2.2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES EN PLANTAS CON NIVELES ALTERADOS DE ATCOX17-1 O DE ATCOX17-2.

Nos propusimos evaluar la actividad CIV en las plantas con expresión alterada de AtCOX17. Para ello, obtuvimos extractos enriquecidos en mitocondrias a partir de cultivos líquidos de plantas de *Arabidopsis* crecidas en un fotoperiodo de día largo. Se eligieron dos técnicas para cuantificar la actividad del CIV: actividad en geles en gradiente y consumo de oxígeno dependiente de citocromo c. En la primera técnica, los extractos mitocondriales obtenidos fueron solubilizados con digitonina y analizados mediante electroforesis en geles en gradiente en presencia de Coomassie (BN-PAGE, ver Materiales y Métodos 1.2.38) y posterior detección de la actividad en el gel.

Como puede observarse (Figura 6, panel izquierdo) la tinción con Coomassie obtenida luego de la separación electroforética no muestra diferencias en el patrón proteico entre las plantas *amiCOX17-1* y WT. En el panel medio de la figura 6A se muestra la actividad del CIV luego de 2 horas de reacción (panel medio) y luego de 12 horas de reacción (panel izquierdo). La tinción reveló que la actividad del CIV, en plantas de *Arabidopsis* crecidas en cultivo líquido y en condiciones de iluminación, ocurre en un amplio rango de pesos moleculares entre 300-450 kDa, apareciendo una banda de mayor intensidad en el menor peso molecular del área marcada (Figura 6, panel medio). Esto es coincidente con resultados recientes reportados para plantas de *Arabidopsis* crecidas en cultivo líquido pero en condiciones de oscuridad (Steinebrunner y col., 2014). Este amplio rango de actividad podría deberse a la detección de asociaciones diméricas de las dos isoformas de COX, una menor de 200 kDa y una mayor de 230 kDa.

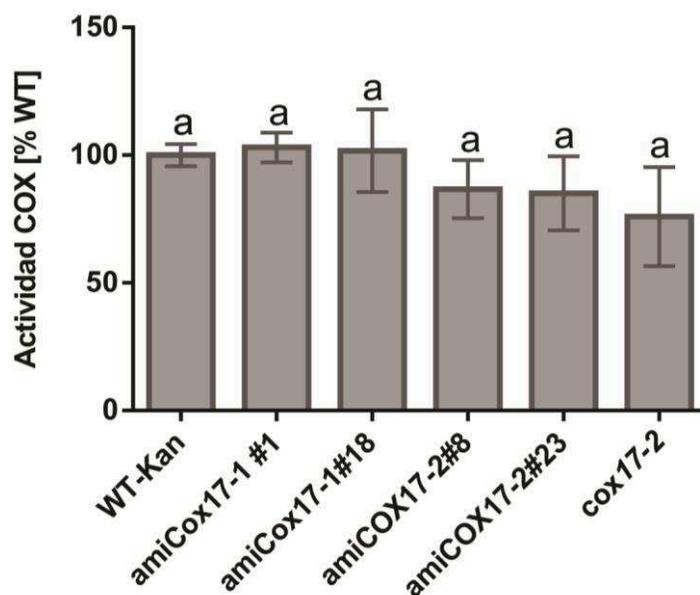


**Figura 6. Actividad COX en gel en extractos de plantas con niveles alterados de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2*.** Las fracciones mitocondriales (aproximadamente 200 µg) provenientes de cultivos líquidos de plantas WT y *amiCOX17-1#18*, equilibradas mediante actividad citrato sintasa (ver Materiales y Métodos 1.2.37), fueron solubilizadas usando digitonina y separadas en gels en gradiente (de 3% a 13%) mediante BN-PAGE. La tinción con Coomassie y la actividad del CIV fueron evidenciadas en el mismo gel como se describe en Materiales y Métodos 1.2.38 y 1.2.39. Tinción de Coomassie (panel izquierdo) y actividad del CIV luego de 2 horas de reacción (panel medio) y luego de 12 horas de reacción (panel derecho) en fracciones mitocondriales provenientes de plantas WT y *amiCOX17-1#18*.

La actividad del CIV en fracciones mitocondriales provenientes de plantas con niveles de expresión disminuidos de *AtCOX17-1* (Figura 7A) es similar a la observada en las plantas WT en los dos tiempos estudiados. Cabe destacar que luego de 12 horas de reacción se observan bandas de alto peso molecular que podrían ocurrir como consecuencia de asociaciones transitorias ocurridas durante el ensayo, como consecuencia de reacciones cruzadas con los fotosistemas o podrían ser asociaciones del CIV con otros complejos formando supercomplejos no descritos hasta el momento. Estos resultados no se muestran en esta tesis pero están siendo estudiados en mayor profundidad. Es importante aclarar que la composición de los supercomplejos en *Arabidopsis* solo ha sido estudiada en mitocondrias provenientes de cultivos de células (Klodmann y col., 2011; Klodmann y col., 2010).

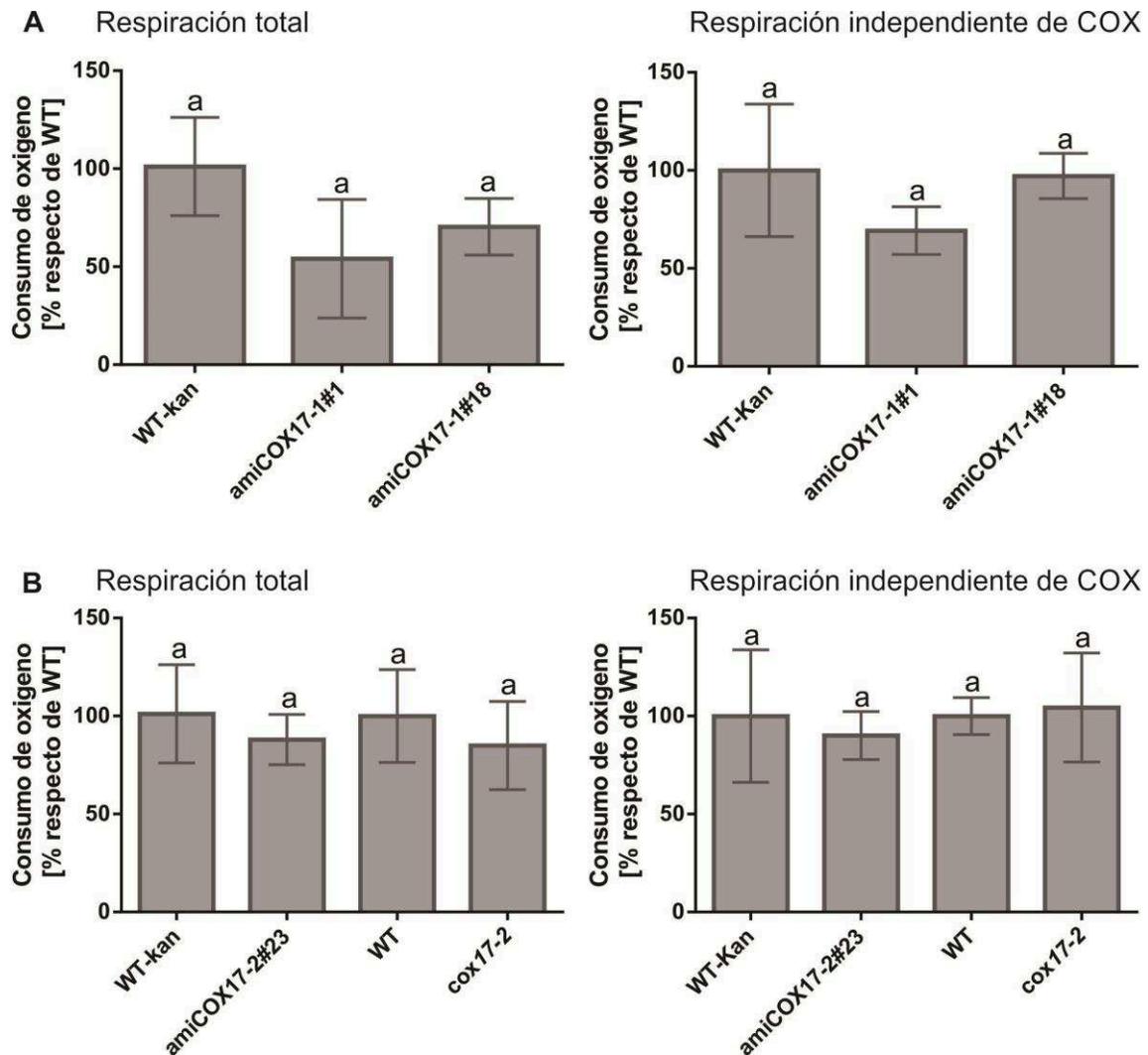
Con respecto a la actividad COX en plantas *cox17-2* y *amiCOX17-2*, la tinción obtenida en las cuatro corridas electroforéticas realizadas no permitieron obtener resultados concluyentes (resultados no mostrados).

Se recurrió a un segundo método que permite evaluar la actividad COX de manera cuantitativa utilizando como parámetro el consumo de oxígeno en los extractos mitocondriales en presencia de citocromo *c* reducido. En la figura 7 se muestra el porcentaje de actividad COX con respecto a plantas WT en extractos mitocondriales provenientes de plantas *amiCOX17-1*, *cox17-2* y *amiCOX17-2*. En forma similar a los resultados obtenidos mediante BN-PAGE, no se observaron diferencias significativas en la actividad COX entre mitocondrias provenientes de plantas *amiCOX17-1*, *amiCOX17-2* y *cox17-2* con respecto a lo observado en plantas WT.



**Figura 7. Actividad COX en plantas con niveles de expresión disminuidos de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2*.** La actividad COX en mitocondrias fue medida como el consumo de oxígeno registrado en un electrodo de Clark luego de la adición de citocromo c reducido. Los valores promedio derivan de valores obtenidos en dos preparaciones distintas de mitocondrias. Las barras de error indican desviación estándar (SD). La media de la actividad registrada en la planta WT entre las dos preparaciones (consumo de  $O_2 = 10,96 \pm 1,32 \mu\text{moles} \cdot L^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) fue definida como 100%. Letras iguales indican que las medias entre las diferentes muestras son iguales ( $p > 0,05$ , análisis de la varianza (ANOVA); prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

Resultados similares fueron obtenidos cuando se midió el consumo de oxígeno en hojas de plantas con niveles de expresión alterados de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* en ausencia (respiración total) y en presencia de KCN 1 mM (respiración independiente de COX). No se observaron diferencias significativas en estos parámetros en las plantas *amiCOX17-1* (Figura 8A), *amiCOX17-2* y *cox17-2* (Figura 8B) respecto de plantas WT.



**Figura 8. Consumo de oxígeno en hojas de plantas con niveles disminuidos de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2*.** **A.** Entre cinco y seis hojas de plantas WT y *amiCOX17-1* fueron incluidas de a una en la cámara de un oxígrafo para monitorear el consumo de oxígeno (Respiración Total;  $R_T$ ) durante 10 minutos. El consumo de oxígeno registrado en las hojas de plantas WT-Kan en tres experimentos independientes ( $2.6 \pm 0.6 \mu\text{moles} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) fue definido como el 100%. Los valores se normalizaron en función del peso fresco de cada hoja (panel izquierdo). A las mismas hojas de plantas WT y *amiCOX17-1*, luego del registro de la  $R_T$ , se les adicionó KCN 1 mM y se midió el consumo de oxígeno durante 7 minutos. Se muestra el consumo de oxígeno independiente de COX considerando el consumo de oxígeno medido en la planta WT en presencia de KCN ( $0,9 \pm 0,1 \mu\text{moles} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) como el 100% (panel derecho). Las barras de error representan la desviación estándar entre 5 hojas de una misma línea para tres experimentos independientes (WT-Kan, *amiCOX17-1#1* y *amiCOX17-1#18*). **B.** Experimento similar al descrito en A pero empleando las líneas *amiCOX17-2*, *cox17-2*, WT-Kan y WT. El consumo de oxígeno registrado en las hojas de la planta WT-Kan en tres experimentos independientes, ya sea en ausencia ( $2.1 \pm 0.3 \mu\text{moles} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) o en presencia de KCN ( $1,2 \pm 0,2 \mu\text{moles} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ), fue definido como el 100% en cada caso. Letras iguales indican que las medias entre las diferentes muestras son iguales ( $p > 0.05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples). WT-Kan, planta de *Arabidopsis* que expresa el *cassette* de resistencia a kanamicina. Esta línea es

empleada como control de ensayo para las plantas *amiCOX17* que deben ser crecidas en presencia de kanamicina.

Los resultados obtenidos indicarían que la disminución de la expresión de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* no modifica en forma significativa la actividad ni el ensamblado de COX en las condiciones ensayadas, sugiriendo que cada una de estas proteínas no es esencial para la biogénesis del CIV. Sería interesante evaluar si la disminución de la expresión de ambos genes disminuye la actividad COX. Esto nos permitiría analizar si la función de *AtCOX17-1* durante la biogénesis de COX puede ser cubierta por *AtCOX17-2* o viceversa.

Al momento de escribir este trabajo de tesis estamos evaluando la actividad COX mediante BN-PAGE en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* descritas anteriormente. La escasa disponibilidad de material, debida al retraso en el crecimiento observado en estas plantas, ha dificultado la preparación de extractos mitocondriales a partir de las mismas. Se puede especular que dicho retraso en el crecimiento podría estar relacionado con una deficiencia en la actividad del CIV que, de acuerdo a otros sistemas estudiados, es esencial para el desarrollo de las plantas. En plantas, se ha demostrado que mutantes *KO* en genes que codifican proteínas involucradas en la biogénesis del CIV generan arresto en el desarrollo embrionario (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). Esto indicaría que *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* tienen funciones redundantes en el ensamblado de COX. Otra alternativa es que las deficiencias observadas se deban a la participación de *AtCOX17* en otros procesos.

---

---

## 7.3. CAPÍTULO III

### 7.3. CAPÍTULO III

#### ESTUDIO DEL ROL DE LAS PROTEÍNAS ATCOX17 EN LA RESPUESTA A ESTRÉS EN ARABIDOPSIS.

##### 7.3.1. INTRODUCCIÓN.

La importancia de la función mitocondrial durante la respuesta a estrés ha sido revisada en diversas publicaciones (revisado en Jacoby y col., 2012). Distintos autores coinciden en que esta organela es un regulador clave de la respuesta estrés y que las características particulares que presentan las mitocondrias de plantas las capacitan para actuar durante situaciones desfavorables. Más importante aún, la regulación de la actividad respiratoria en situaciones adversas es fundamental para controlar la producción de biomasa, el crecimiento y la variabilidad en el desarrollo ante distintas situaciones ambientales (Araujo y col., 2014; Obata y col., 2011; Van Aken y col., 2009). El estudio de los factores que participan del control y la regulación del proceso respiratorio cobra importancia en el contexto de la ingeniería de plantas.

Distintas proteínas de localización mitocondrial han sido involucradas en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Gleason y col., 2011; Laluk y col., 2011; Zhang y col., 2014; Zsigmond y col., 2012). Las proteínas de las vías alternativas, en particular AOX, han sido las más estudiadas dado que incrementan su expresión ante distintas situaciones de estrés (Van Aken y col., 2009b; Wallstrom y col., 2014a). La inducción observada está de acuerdo con la teoría que postula que AOX actuaría mitigando los efectos tóxicos de las EROs generadas durante el estrés oxidativo (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2012, 2013; Vanlerberghe, 2013). La generación de EROs es una característica común de la respuesta a estrés y puede actuar como mecanismo de señalización o generando daño oxidativo (García de la Garma y col., 2015; Suzuki y col., 2012). De acuerdo con esto, AOX no solo disminuye la producción de EROs sino que actúa como un regulador de la respuesta a estrés mediando señales provenientes de la mitocondria (Arnholdt-Schmitt y col., 2006; Clifton y col., 2006; Vanlerberghe y col., 2009). Existe numerosa bibliografía que respalda la función de AOX durante la respuesta a estrés. Sin embargo, el rol de la respiración

dependiente de citocromo *c* no ha sido estudiado en profundidad (Van Aken y col., 2009b; Van Aken y col., 2009; Vanlerberghe, 2013; Vanlerberghe y col., 2009) . A excepción del CI, se ha estudiado la estructura de los complejos pero no su función durante situaciones adversas de crecimiento. Probablemente, la letalidad asociada a las mutaciones de genes que codifican proteínas que integran los complejos respiratorios sea una gran limitante para realizar estudios durante la respuesta a estrés (ver Introducción Resultados y Discusión Capítulo II). Recientemente, se han publicado resultados provenientes de un estudio que compara las respuestas transcripcionales entre plantas mutantes en AOX (*aox1a*) y plantas deficientes en una ARN polimerasa de localización mitocondrial y cloroplástica (*rpoTnp*) que presentan una reducción mayor al 15% en la actividad del CIV (Kuhn y col., 2009; Kuhn y col., 2015). Este estudio sugiere que en condiciones óptimas de crecimiento las modificaciones transcripcionales que ocurren como consecuencia de una deficiencia en AOX serían diferentes de aquellas observadas en las mutantes *rpoTnp*. Sin embargo, en condiciones de estrés las respuestas transcripcionales son similares entre ambas plantas (Kuhn y col., 2015). Esto indicaría que la respuesta a estrés en plantas se encuentra programada y no depende de cual vía respiratoria esté alterada (Kuhn y col., 2015).

Las proteínas mitocondriales AtCOX17-1 y AtCOX17-2, involucradas en la biogénesis del CIV, aumentarían su expresión en situaciones que generan EROs (Attallah y col., 2007; Balandin y Castresana, 2002). Nos pareció interesante indagar sobre el posible rol de estas proteínas durante la respuesta a estrés en Arabidopsis.

---

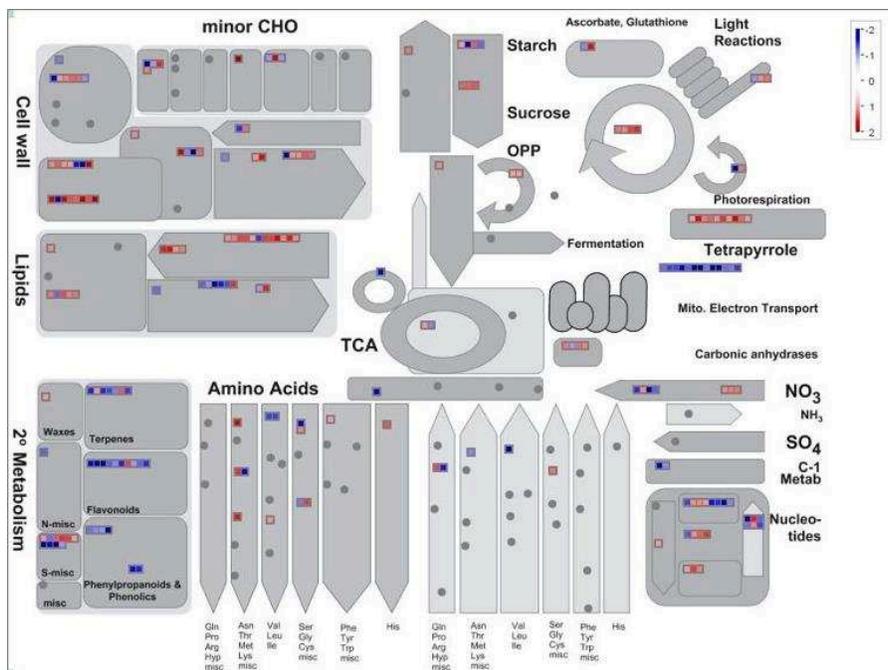
### 7.3.2. RESULTADOS.

#### PARTE A

#### 7.3.2.1. LA DEFICIENCIA DE ATCOX17-1 Y ATCOX17-2 ALTERA LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA ESTRÉS.

Con el objetivo de evaluar los cambios de expresión génica que ocurren como consecuencia de una disminución en los niveles de expresión de genes *AtCOX17*, se realizó un análisis global utilizando microarreglos y ARN preparado de plantas *amiCOX17-1/cox17-2* y WT.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que en las plantas deficientes en AtCOX17 está alterada la expresión de 1532 genes. En la figura 1 se muestra la distribución de los genes regulados diferencialmente en distintas rutas metabólicas. Se observa una disminución en la expresión de distintos genes asociados a la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Entre ellos, se encuentran genes que codifican proteínas de las vías alternativas como *NAD(P)H DEHYDROGENASE B2 (NDB2)*, *AOX1a*, *ALTERNATIVE OXIDASE 1D (AOX1d)*, distintas NADH-ubiquinoloxidorreductasas (Tipo I) putativas y el gen que codifica la proteína desacoplante UCP5. Por otro lado, los genes asociados a la síntesis de tetrapirroles para la síntesis de fotocromobilina se encuentran inducidos. Esto podría ser coincidente con el aumento en la expresión del gen que codifica la subunidad menor de Rubisco y genes que codifican proteínas vinculadas al ciclo de Calvin-Benson. En relación al metabolismo lipídico, los procesos de degradación estarían disminuidos mientras que los procesos de elongación y desaturación de ácidos grasos estarían aumentados. El incremento en la expresión de genes que codifican enzimas modificadoras de glucanos y pectinasas sugiere que las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* sufrirían una modificación en la estructura de la pared celular. En el metabolismo secundario se encuentra disminuida la expresión de genes de las rutas de síntesis de los derivados terpenoides y fenólicos. Se observa, además, un incremento en la expresión de genes relacionados con la degradación de aminoácidos ramificados. Las vías metabólicas modificadas son coincidentes con aquellas reportadas en plantas deficientes en la capacidad respiratoria (Kuhn y col., 2015), en las cuales la modificación del metabolismo secundario, la función cloroplástica y el metabolismo de la pared se encuentran alterados. El perfil transcripcional es coincidente con el observado en las plantas *rpoTmp* (Kuhn y col., 2015).



**Figura 1. Rutas metabólicas diferencialmente reguladas en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*.** El mapa metabólico se construyó empleando el programa libre MapMan a partir de los datos de expresión. De los 1532 genes incluidos en el análisis, 233 pudieron ser acomodados en las vías metabólicas mostradas. Los genes correspondientes se detallan en la Tabla 1 del Anexo III.

De los 1532 genes regulados diferencialmente en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*, 536 se encuentran inducidos mientras que 996 se encuentran reprimidos respecto de las plantas WT. En la figura 2 se muestra la categorización funcional (GO, de sus siglas en inglés *Gene Ontology*) de los genes inducidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. Los procesos celulares enriquecidos están vinculados con el metabolismo secundario, la síntesis de compuestos nitrogenados y la síntesis de ácidos carboxílicos (Figura 2).

En la figura 3 se muestra la categorización funcional de los genes reprimidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. En la figura 3A se muestran las frecuencias de las categorías enriquecidas significativamente en este grupo de genes. En la figura 3B se grafican las categorías de los procesos celulares enriquecidos según la significancia estadística reportada ( $p < 0.001$ ), pero haciendo una reducción de los términos GO redundantes. De este primer análisis se desprende que los procesos biológicos reprimidos con mayor significancia estadística son respuesta a estímulos (GO:0050896), respuesta a estímulos químicos (GO:0042221), metabolitos secundarios, localización de lípidos (GO:0010876),

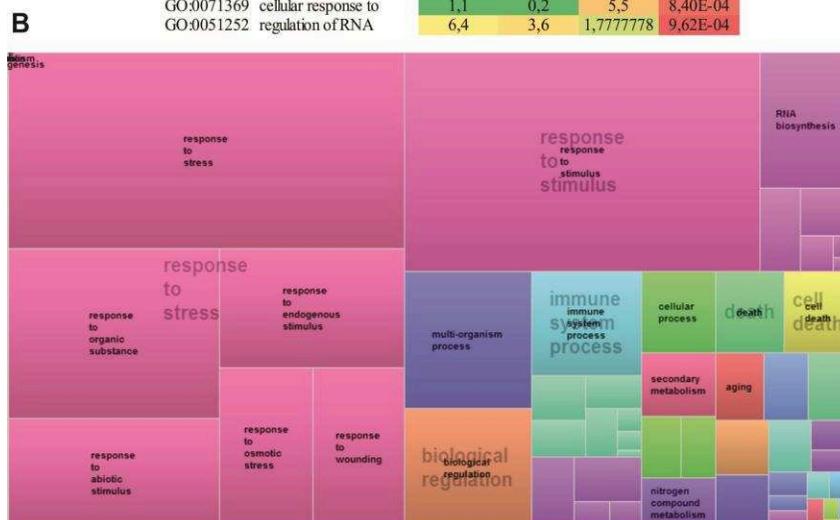
regulación biológica (GO:0065007), metabolismo secundario (GO:0019748), metabolismo de toxinas (GO:0009404) y envejecimiento (GO:0007568).

GO	Term	Fo	Fe	Fo/Fe	p-value
GO:0009987	cellular process	51,1	34,00	1,50	1,38E-11
GO:0044238	primary metabolic process	37,2	21,90	1,70	1,77E-11
GO:0006412	translation	7,5	1,80	4,17	1,73E-09
GO:0044249	cellular biosynthetic process	20,7	10,40	1,99	1,04E-08
GO:0044281	small molecule metabolic process	12,5	4,90	2,55	1,37E-08
GO:0009058	biosynthetic process	21,3	11,10	1,92	2,40E-08
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	6,1	1,40	4,36	2,40E-08
GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process	6,1	1,40	4,36	2,40E-08
GO:0044271	cellular nitrogen compound	6,5	1,80	3,61	2,60E-07
GO:0034641	cellular nitrogen compound	14,6	6,80	2,15	2,70E-07
GO:0006807	nitrogen compound metabolic	14,8	7,10	2,08	4,62E-07
GO:0006082	organic acid metabolic process	7,9	2,70	2,93	5,89E-07
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	7,9	2,70	2,93	5,89E-07
GO:0043436	oxoacid metabolic process	7,9	2,70	2,93	5,89E-07
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	7,1	2,20	3,23	5,89E-07
GO:0008152	metabolic process	44,5	32,10	1,39	7,98E-07
GO:0042180	cellular ketone metabolic process	7,9	2,80	2,82	8,73E-07
GO:0032787	monocarboxylic acid metabolic	4,6	1,20	3,83	1,75E-05
GO:0006633	fatty acid biosynthetic process	2,9	0,50	5,80	1,80E-05
GO:0007017	microtubule-based process	2,7	0,40	6,75	1,80E-05
GO:0044237	cellular metabolic process	34,2	24,00	1,43	1,80E-05
GO:0006629	lipid metabolic process	7,5	2,90	2,59	1,98E-05
GO:0006631	fatty acid metabolic process	3,5	0,80	4,38	2,32E-05
GO:0051726	regulation of cell cycle	2,7	0,50	5,40	3,90E-05
GO:0071841	cellular component organization or	8,6	3,80	2,26	7,63E-05
GO:0071840	cellular component organization or	10,4	5,10	2,04	1,01E-04
GO:0006259	DNA metabolic process	4,4	1,30	3,38	1,21E-04
GO:0006779	porphyrin biosynthetic process	1,7	0,20	8,50	1,64E-04
GO:0009309	amine biosynthetic process	3,1	0,70	4,43	1,64E-04
GO:0050896	response to stimulus	22,5	14,80	1,52	1,64E-04
GO:0006778	porphyrin metabolic process	1,9	0,20	9,50	1,90E-04
GO:0009628	response to abiotic stimulus	10,6	5,40	1,96	1,90E-04
GO:0033013	tetrapyrrole metabolic process	1,9	0,30	6,33	2,26E-04
GO:0033014	tetrapyrrole biosynthetic process	1,7	0,20	8,50	2,56E-04
GO:0010035	response to inorganic substance	5,4	2,00	2,70	2,84E-04
GO:0071844	cellular component assembly at	3,5	1,00	3,50	2,84E-04
GO:0022607	cellular component assembly	3,5	1,00	3,50	5,56E-04
GO:0006996	organelle organization	5,4	2,20	2,45	7,32E-04
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic	2,7	0,70	3,86	7,32E-04

Figura 2. Términos GO enriquecidos en el grupo de genes inducidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. Los términos GO enriquecidos se muestran ordenados según la mayor significancia estadística ( $p < 0,001$ ; prueba de Fisher). Las frecuencias se muestran como porcentajes de genes totales. Se muestran la frecuencia observada (Fo), la frecuencia esperada (Fe) y la relación Fo/Fe. Las frecuencias y las significancias fueron obtenidas empleando la herramienta "Pie GoTerms" del programa VirtualPlant.

**A**

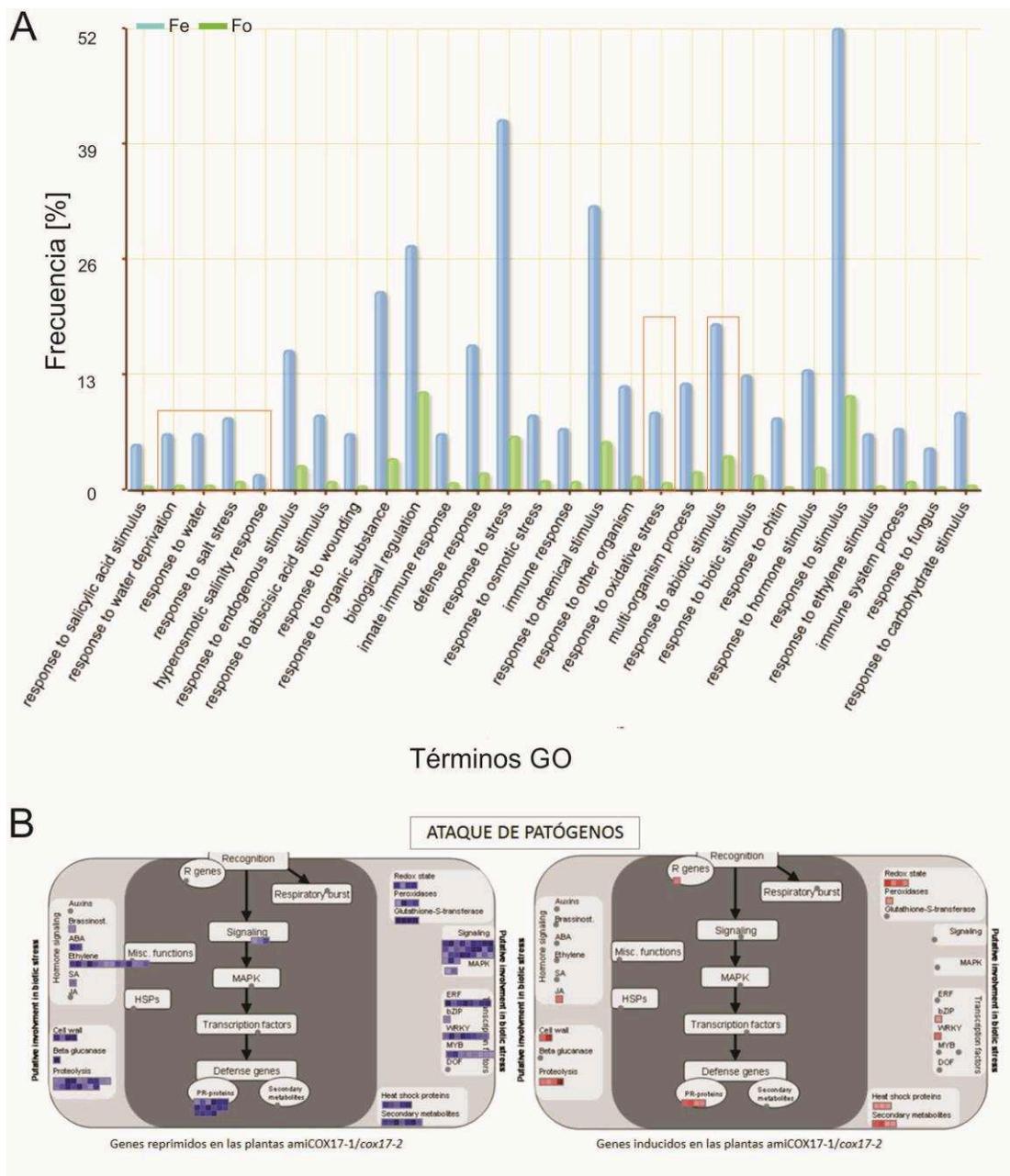
GO	Term	Fo	Fe	Fo/Fe	p-value
GO:0050896	response to stimulus	28,2	14,8	1,9054054	3,66E-21
GO:0042221	response to chemical	17,6	7,6	2,3157895	2,57E-19
GO:0006950	response to stress	17,9	8,4	2,1309524	4,52E-16
GO:0010033	response to organic	12,1	4,6	2,6304348	4,95E-16
GO:0010200	response to chitin	3,9	0,5	7,8	4,95E-16
GO:0009743	response to	4,2	0,8	5,25	9,11E-13
GO:0009607	response to biotic	7	2,4	2,9166667	1,45E-10
GO:0051707	response to other	6,4	2,2	2,9090909	2,35E-09
GO:0051704	multi-organism process	6,4	2,4	2,6666667	1,42E-08
GO:0009719	response to endogenous	8,3	3,7	2,2432432	5,88E-08
GO:0009723	response to ethylene	2,7	0,5	5,4	1,12E-07
GO:0006952	defense response	6,9	3	2,3	4,37E-07
GO:0009751	response to salicylic acid	2,7	0,6	4,5	4,80E-07
GO:0009725	response to hormone	7,5	3,4	2,2058824	5,73E-07
GO:0065007	biological regulation	21,9	14,7	1,4897959	6,81E-07
GO:0009737	response to abscisic acid	4,1	1,4	2,9285714	9,55E-07
GO:0006979	response to oxidative	3,6	1,1	3,2727273	2,60E-06
GO:0050794	regulation of cellular	18,5	12,2	1,5163934	3,82E-06
GO:0009404	toxin metabolic process	1,5	0,2	7,5	4,48E-06
GO:0009407	toxin catabolic process	1,5	0,2	7,5	4,48E-06
GO:0009628	response to abiotic	9,9	5,4	1,8333333	5,45E-06
GO:0009620	response to fungus	2,6	0,7	3,7142857	9,15E-06
GO:0019748	secondary metabolic	4	1,5	2,6666667	9,15E-06
GO:0009611	response to wounding	2,3	0,6	3,8333333	1,38E-05
GO:0009414	response to water	2,8	0,8	3,5	1,55E-05
GO:0009415	response to water	2,8	0,8	3,5	3,10E-05
GO:0009753	response to jasmonic	2,3	0,6	3,8333333	4,32E-05
GO:0031326	regulation of cellular	11,2	6,9	1,6231884	8,76E-05
GO:0050789	regulation of biological	19,4	13,8	1,4057971	9,21E-05
GO:0009889	regulation of biosynthetic	11,2	6,9	1,6231884	9,21E-05
GO:0045449	regulation of transcription	10,6	6,5	1,6307692	1,33E-04
GO:0050832	defense response to	2	0,5	4	1,38E-04
GO:0010556	regulation of	10,7	6,7	1,5970149	2,12E-04
GO:2000112	regulation of cellular	10,7	6,7	1,5970149	2,12E-04
GO:0009651	response to salt stress	3,8	1,6	2,375	2,43E-04
GO:0031323	regulation of cellular	11,6	7,4	1,5675676	2,63E-04
GO:0006970	response to osmotic	3,9	1,7	2,2941176	3,69E-04
GO:0010468	regulation of gene	11,2	7,2	1,5555556	4,80E-04
GO:0051171	regulation of nitrogen	10,7	6,9	1,5507246	5,63E-04
GO:0019219	regulation of nucleobase,	10,6	6,8	1,5588235	5,68E-04
GO:0080090	regulation of primary	11	7,2	1,5277778	6,59E-04
GO:0009873	ethylene mediated	1,1	0,2	5,5	7,74E-04
GO:0006355	regulation of	6,4	3,5	1,8285714	7,79E-04
GO:0007568	aging	1,5	0,3	5	7,79E-04
GO:0071369	cellular response to	1,1	0,2	5,5	8,40E-04
GO:0051252	regulation of RNA	6,4	3,6	1,7777778	9,62E-04



**Figura 3. Términos GO enriquecidos en el grupo de genes con expresión disminuida en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*.** **A.** Los términos GO enriquecidos se muestran ordenados según la mayor significancia estadística ( $p < 0,001$ ; prueba de Fisher). Las frecuencias se muestran como porcentajes de genes totales. Se muestran la frecuencia observada (Fo), la frecuencia esperada (Fe) y la relación Fo/Fe. Las frecuencias y las significancias fueron obtenidas empleando la herramienta "Pie GoTerms" del programa VirtualPlant. **B.** Procesos celulares enriquecidos en el grupo de genes reprimidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. El gráfico de árbol se realizó empleando el programa libre agriGO que permite la reducción de los

términos GO redundantes a través de la herramienta "REVIGO" empleando como factor de reducción 0.5 (Medium).

Un análisis con mayor profundidad indicó que, de los 1532 genes expresados diferencialmente, 433 pertenecen a la categoría de respuesta a estrés (GO:0006950), que se encuentra incluida en la categoría de respuesta a estímulos mencionada anteriormente (GO:0050896). La mayoría (332/433) de los genes que integran esta categoría se encuentran reprimidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. Tanto la categoría de respuesta a estrés biótico como la categoría de respuesta a estrés abiótico se encuentran enriquecidas entre los genes reprimidos. Con respecto a la respuesta a estrés abiótico, se observa un enriquecimiento en aquellas categorías que incluyen estrés salino, privación de agua, estrés osmótico y estrés por frío (Figura 4A y Tabla 2 del Anexo III). En relación con las vías metabólicas involucradas en la respuesta a estrés biótico, la señalización mediada por etileno se encuentra disminuida mientras que solo un gen (*LIPOXYGENASE 2*) perteneciente a la vía del ácido jasmónico se encuentra inducido (Figura 4B).



**Figura 4. Términos GO enriquecidos en genes de respuesta a estrés y vías metabólicas asociadas a los genes de respuesta a estrés biótico.** **A.** Términos GO enriquecidos en los 433 genes que integran el término GO “Respuesta a estrés”. Se resaltan en anaranjado los procesos celulares que están incluidos en estrés abiótico. **B.** Mapa de la distribución de los genes reprimidos (izquierda) e inducidos (derecha) en distintas vías que participan en la respuesta a estrés biótico. Los mapas fueron realizados con el programa MapMan.

Entre los genes reprimidos de respuesta a estrés encontramos genes que pertenecen a las vías de respiración alternativa como *AOX1a*, *AOX1d* y *NDB2*. Estos genes han sido involucrados en la regulación retrógrada mitocondrial y forman parte del regulón

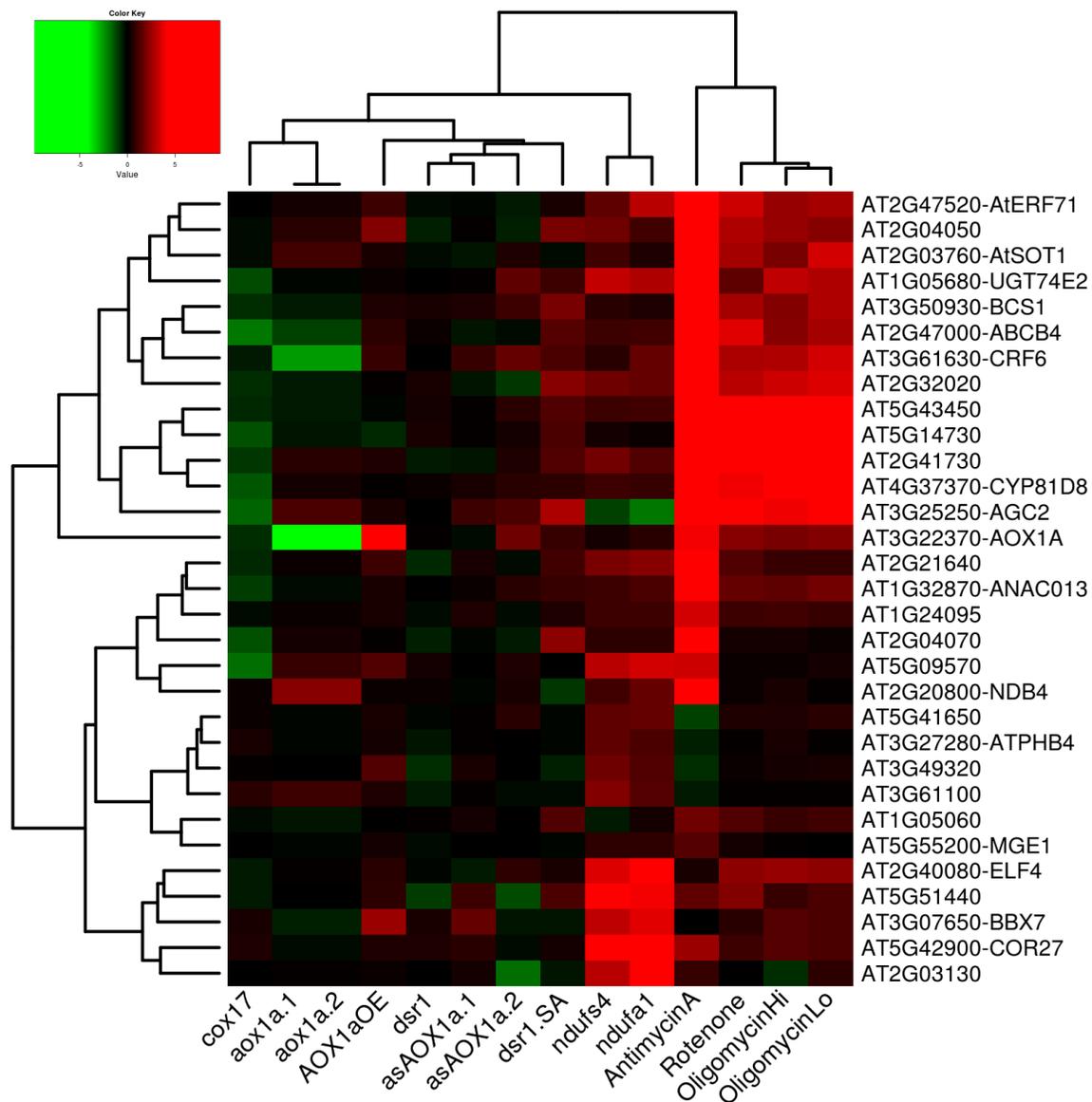
mitocondrial (Ng y col., 2014; Van Aken y col., 2010; Van Aken y col., 2013; Zhang y col., 2014). Recientemente se definió un grupo de 34 genes (genes *MRR*) que codifican proteínas, no exclusivamente mitocondriales, que participarían en la respuesta a estrés mitocondrial y serían regulados por ANACo17 (De Clercq y col., 2013). Entre los genes reprimidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*, encontramos 10 de los 34 genes que fueron definidos por De Clercq y col. (2013) y 7 de ellos presentan el motivo que sería unido por ANACo17 en sus regiones promotoras (Tabla 1). Por otro lado, ninguno de los 34 genes se halla entre los genes inducidos en plantas *amiCOX17-1/cox17-2*.

Dado que estos genes fueron agrupados a partir de su inducción luego del tratamiento con inhibidores de la cadena respiratoria y en plantas mutantes en proteínas asociadas a la cadena transportadora de electrones mitocondrial, decidimos comparar los cambios de expresión observados en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* con los resultados obtenidos en los microarreglos que permitieron definir los genes que integran el regulón mitocondrial. El solapamiento de todos los datos en un mismo agrupamiento jerárquico permite una comparación más rigurosa de los datos provenientes de distintos ensayos.

Genes reprimidos en plantas <i>amiCOX17-1/cox17-2</i>			
ID	Nombre del gen	logFC	valor p
AT3G0930	BCS1	-1,0797	0,006723
AT5G43450	2-OG	-1,0811	0,005462
AT1G05680	UGT74E2	-1,1954	0,004159
AT2G04070	MATE	-1,2908	0,003388
AT3G22370	AOX1A	-1,2933	0,00487
AT5G14730		-1,3486	0,003014
AT4G37370	CYP81D	-1,3908	0,003014
AT3G25250	AGCS	-1,6339	0,003388
AT5G09570		-1,7215	0,001961
AT2G47000	ABCB4	-2,0412	0,001131

Tabla 1. Genes de respuesta a disfunción mitocondrial reprimidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. FC; *fold change*.

En la figura 5 se muestran los resultados del agrupamiento jerárquico de los perfiles de expresión de 31 genes que incrementan su expresión en al menos 5 disfunciones mitocondriales según fue reportado por De Clerq y col. (2013).



**Figura 5. Agrupamiento jerárquico de la expresión de genes inducidos por disfunción mitocondrial en plantas *amiCOX17-1/cox17-2*, plantas que presentan una disfunción mitocondrial y plantas tratadas con inhibidores de los complejos CI, CIII y CV.** El código de colores representa la diferencia de expresión respecto de plantas control. En el agrupamiento se incluyeron datos provenientes de plantas *amiCOX17-1/cox17-2* (*cox17*), plantas deficientes en *AOX1a* (*aox1a*, *asAOX1a*), plantas mutantes en subunidades del CI (*ndufs4*, *ndufa1*), plantas mutantes en una subunidad del CII (*dsr1*, tratadas y no tratadas con ácido salicílico, SA) y plantas con niveles aumentados de *AOX1a* (*AOX1aOE*). Además, se incluyeron datos provenientes de plantas WT tratadas con inhibidores de los complejos respiratorios (antimicina A, rotenona y oligomicina en dos concentraciones).

Como se observa en la figura 5, un grupo de genes cuya expresión se encuentra disminuida en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* se encuentra inducido en algunas condiciones de disfunción mitocondrial, sobre todo aquellas derivadas del tratamiento con inhibidores, entre ellos antimicina A. El perfil transcripcional observado en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* sugiere que la deficiencia en *AtCOX17* no genera una disfunción mitocondrial relacionada con la inhibición del transporte de electrones a través de la vía dependiente de citocromo c. Por el contrario, el patrón de expresión de los genes MRR en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* muestra cierta similitud con el patrón de expresión observado en plantas deficientes en el gen de oxidasa alternativa *AOX1a* (Figura 5 y Figura 1 del Anexo III).

Considerando que, de acuerdo a la Figura 5, un porcentaje considerable de genes reprimidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* son inducidos por tratamiento con antimicina A, nos pareció interesante contrastar los patrones globales de expresión obtenidos en nuestro ensayo con los datos obtenidos a partir de plantas tratadas con este inhibidor (Ng y col., 2013). En el análisis se incluyeron, además, datos de plantas tratadas con  $H_2O_2$  (generador de estrés oxidativo) y de mutantes en el factor de transcripción *ANACo17*, que actuaría como un regulador primario de la expresión de *AOX1a* y de otros genes en respuesta a antimicina A y  $H_2O_2$  (Ng y col., 2013). Como puede observarse en la Figura 6, las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* muestran un perfil de expresión opuesto para varios de los genes tanto en las plantas WT como en las plantas mutantes en *ANACo17* (*rao2*) tratadas con antimicina A o  $H_2O_2$  (ver Figura 2 en Anexo III). Esto refuerza la idea de que las plantas deficientes en *AtCOX17* presentan una alteración en la expresión de genes de respuesta a estrés, originado tanto por una disfunción mitocondrial, como en el caso de antimicina A, como por un incremento en EROs (tratamiento con  $H_2O_2$ ). Por otra parte, no se observó una respuesta diferencial del grupo de genes dependientes de *ANACo17*. Esto implicaría que la disminución de la expresión de los genes de respuesta a estrés en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* no sería exclusivamente dependiente de *ANACo17*.

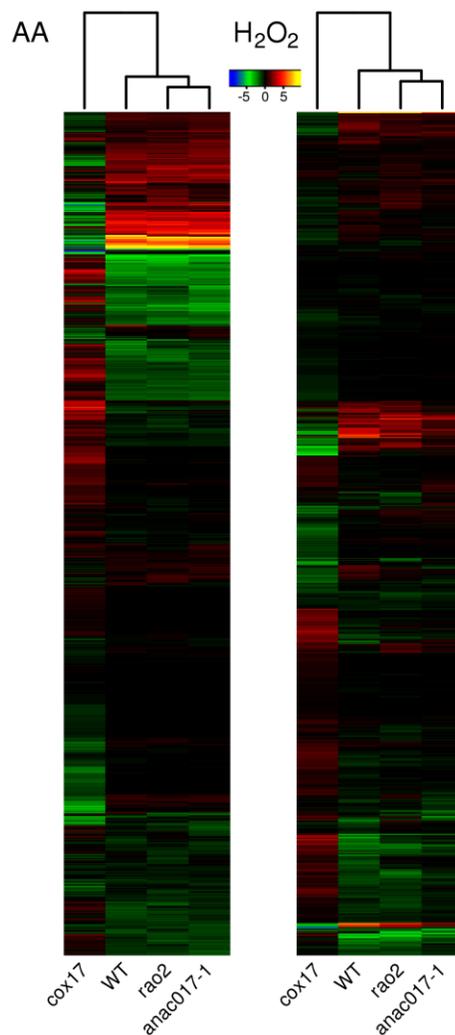
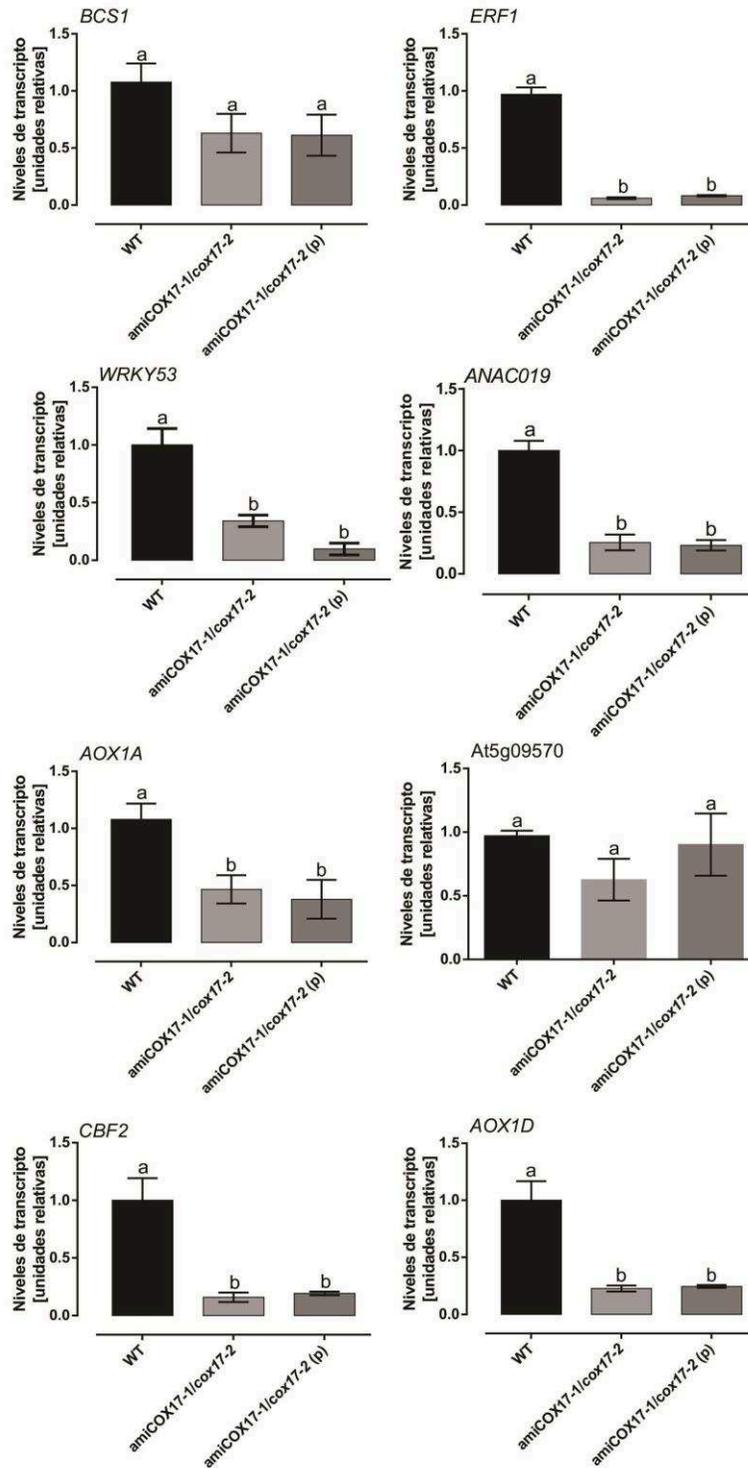


Figura 6. Agrupamiento jerárquico de la expresión de genes regulados en plantas *amiCOX17-1/cox17-2* y plantas WT o mutantes en *ANACo17 (rao2 y anac017-1)* tratadas con antimicina A o  $H_2O_2$ . El código de colores representa la diferencia de expresión respecto de plantas control.

Para corroborar los datos obtenidos a partir del ensayo de microarreglos se seleccionó un grupo de genes cuya expresión se encontraba reprimida en plantas *amiCOX17-1/cox17-2* y además presentaban un interés particular para el desarrollo de esta tesis, dado que muchos de ellos habían sido vinculados con la respuesta estrés. En la tabla 2 se muestran los genes seleccionados. Como puede observarse (Figura 7) la expresión de la mayoría de los genes estudiados fue concordante con el resultado obtenido en el ensayo de microarreglos. La expresión de *BCS1* y de *At5g09570* no mostró una diferencia significativa respecto del control, mientras la expresión de *WRKY63* y de *ANACo42* no pudo cuantificarse adecuadamente debido a problemas técnicos.

Genes elegidos para la validación del ensayo de microarreglos en las plantas <i>amiCOX17-1/cox17-2</i>				
ID	Nombre del gen	valor p	Función sugerida	Referencia
AT3G50930	<i>BCS1</i>	-1,0797	Proteína de localización mitocondrial que participa en la respuesta a estrés.	Ho y col., 2008
AT2G44840	<i>ERF1</i>	-1,1647	Factor de transcripción que participa en la respuesta a estrés salino y por sequía a través de la vía del etileno.	Cheng y col., 2013
AT1652890	<i>ANAC019</i>	-1,2918	Factor de transcripción que actuaría como regulador de los genes que presentan el dominio MDM en sus secuencias promotoras.	De Clerq y col., 2013
AT4G23810	<i>WRKY53</i>	-1,2947	Factor de transcripción que actúa como regulador clave del inicio de la senescencia, estrés biótico y estrés abiótico.	Zentgraf, Laun y Miao, 2010
AT3G22370	<i>AOX1a</i>	-1,2933	Proteína de localización mitocondrial que participa en la respuesta a estrés.	Van Aken y col., 2009
AT1G66600	<i>WRKY63</i>	-1,4350	Factor de transcripción central en la respuesta a sequía mediada por ABA.	Ren y col., 2012
AT5G09570		-1,7215	Proteína de localización mitocondrial involucrada en la respuesta a estrés.	Van Aken y Whelan, 2012
AT4G25470	<i>CBF2</i>	-2,0271	Factor de transcripción que participa en la respuesta a estrés por bajas temperaturas.	Sharabi-Schwager y col., 2010
AT2G43000	<i>ANAC042</i>	-2,1487	Factor de transcripción que participa en la respuesta a estrés por calor y en la síntesis de fitoalexinas.	Saga y col., 2012; Shahnejat-Bushehriy col., 2013
AT1G32350	<i>AOX1d</i>	-2,3195	Proteína de localización mitocondrial que participa en la respuesta a estrés.	Clifton y col., 2006

Tabla 2. Lista de genes cuya expresión fue analizada mediante RT-qPCR en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. Se muestran los logFC y el valor p obtenido luego del análisis estadístico de los datos del ensayo de microarreglos. Además, la función sugerida por la cual fueron elegidos y la referencia correspondiente.



**Figura 7. Medición de los niveles de transcritpos de genes seleccionados en plantas *amiCOX17-1/cox17-2*.** Los niveles de transcritpo fueron determinados mediante RT-qPCR en réplicas de las muestras empleadas para la realización del ensayo de microarreglos. Se incluyó en este ensayo, además, un grupo de plantas *amiCOX17-1/cox17-2 (p)* cuyo diámetro de roseta era menor que el de las plantas incluidas en el ensayo de microarreglos. Los resultados se expresan en unidades relativas a los niveles de expresión en

plantas WT. Las barras de error representan la SD obtenida entre dos grupos de plantas empleados en cada caso. El experimento se repitió cinco veces obteniéndose resultados similares. Letras distintas indican diferencias significativas con respecto a plantas WT ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

## PARTE B

7.4.3.2.2. LOS GENES *ATCOX17* SON INDUCIDOS POR ROTENONA Y ANTE DISTINTAS SITUACIONES DE ESTRÉS.

Informes previos indicaron que los genes *AtCOX17* son inducidos ante determinadas situaciones de estrés (Attallah y col., 2007; Balandin y Castresana, 2002). Para evaluar esto en mayor detalle, analizamos la expresión de estos genes luego del tratamiento con inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial y con agentes que imponen una situación de estrés celular global<sup>1</sup>.

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos para la expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en plantas tratadas con rotenona y antimicina A. Como se mencionó en el capítulo introductorio, la molécula de rotenona es un inhibidor del CI, mientras que la antimicina A es un inhibidor del CIII. El tratamiento con rotenona se realizó mediante infiltración o aspersión con una solución de rotenona 40  $\mu$ M. Para el tratamiento con infiltración se emplearon 2 grupos de 10 plantas crecidas durante 8 días en medio MS 0,5x, mientras que para la aplicación mediante aspersión se emplearon 2 grupos de 10 plantas crecidas durante 25 días en sustrato sólido. La aplicación de la solución de antimicina A 20  $\mu$ M se realizó con pincel en la cara adaxial de hojas de plantas adultas (ver Materiales y Métodos 6.2.24). Como control de la eficiencia de los tratamientos aplicados se cuantificó la expresión el gen *AOX1a*, cuya expresión se induce en las condiciones experimentales ensayadas (Umbach y col., 2012).

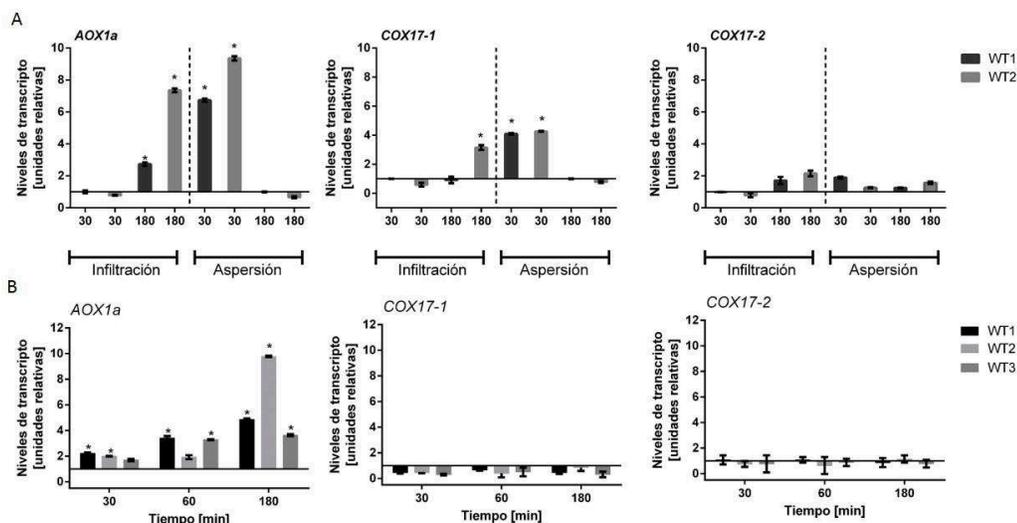
El tratamiento con rotenona produce la inducción de *AtCOX17-1* de manera significativa, aunque en menor medida respecto de lo observado para *AOX1a*, tanto cuando la aplicación se realizó mediante infiltración (180 minutos) como cuando se realizó mediante aspersión (30 minutos) (Figura 8A). La expresión de *AtCOX17-2* no es modificada luego del tratamiento con rotenona. Dado que el tratamiento con rotenona no produce cambios en la actividad COX (Meyer y col., 2009), sino un incremento en el

---

<sup>1</sup> Distintos autores proponen que las situaciones de estrés pueden clasificarse entre aquellas que afectan el funcionamiento de la mitocondria de aquellas situaciones que generan un estrés celular globalizado. La aplicación de inhibidores mitocondriales afectaría solo el funcionamiento de la cadena transportadora mientras que situaciones de estrés globalizados incluyen NaCl, sequía, UV-B, alta intensidad, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entre otras.

transporte de electrones a través de las vías alternativas, se puede postular que el incremento de la expresión de *AtCOX17-1* no está ligado a cambios en la actividad del CIV. Probablemente, el cambio de expresión esté asociado al aumento de EROs que tiene lugar como consecuencia de la disfunción del CI (Meyer et al, 2009). En el caso de antimicina A, si bien el tratamiento fue efectivo, dado que se incrementó la expresión de *AOX1a*, no se produjo una alteración de la expresión de *AtCOX17-1* ni de *AtCOX17-2* (Figura 8B). Esto indicaría que la expresión de los genes *AtCOX17* no responde a una inhibición del transporte de electrones a través de la vía dependiente de citocromo c. De hecho, la expresión de los genes *AtCOX17* no se encuentra modificada en plantas mutantes en proteínas accesorias al CIII, según la base de datos de microarreglos GENEVESTIGATOR.

La expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* no se encuentra inducida en plantas mutantes que presentan disfunción mitocondrial según Schwarzlander y col (2012). Sin embargo, sí se observa una inducción de la expresión de ambos genes luego del tratamiento con rotenona y oligomicina (ver Figura 3 en Anexo III). Esto podría indicar que la inducción de los genes *AtCOX17* está relacionada con los cambios rápidos que ocurren cuando se realiza un tratamiento con rotenona u oligomicina, como la inducción de las vías alternativas, la remodelación del metabolismo y, en el caso de oligomicina, la inducción de genes de respuesta a estrés biótico (Geisler y col., 2012; Meyer y col., 2009). La inducción de los genes *AtCOX17* luego de un estrés abiótico ha sido sugerida previamente y se observa al analizar las bases de datos de microarreglos (Attallah y col., 2007; Balandin y Castresana, 2002).



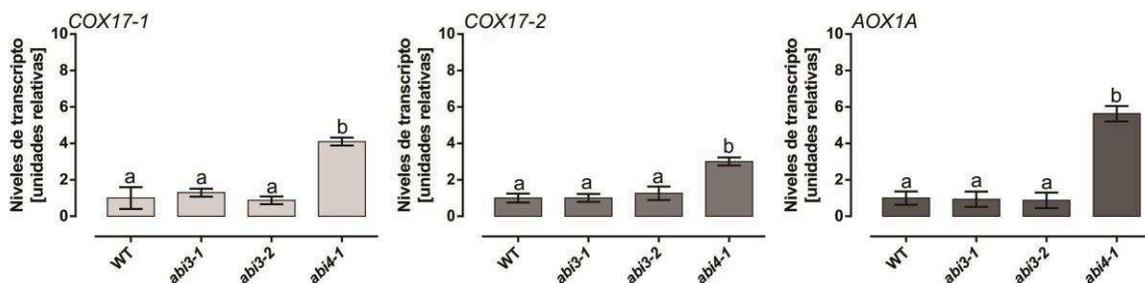
**Figura 8. Expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en plantas tratadas con inhibidores de la cadena respiratoria. A.** Efecto del tratamiento con rotenona sobre los niveles de expresión de *AOX1a*, *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en plantas crecidas durante 8 días (infiltración) o 25 días (aspersión). Las muestras fueron tomadas en los tiempos indicados luego de la aplicación del inhibidor. **B.** Niveles de expresión de *AOX1a*, *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en plantas crecidas durante 25 días y tratadas con antimicina A. Las muestras se tomaron en los tiempos indicados en el gráfico luego de la aplicación del tratamiento. Los resultados se expresan en unidades relativas a los niveles de expresión antes del tratamiento. Las barras de error representan la SD obtenida entre los dos grupos de plantas empleados para cada tipo de tratamiento. El experimento se repitió cinco veces obteniéndose resultados similares. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Fisher).

Entre los genes que pertenecen al regulón mitocondrial, *AOX1a* ha sido estudiado en mayor profundidad, habiéndose descrito distintos factores de transcripción que regulan su expresión. Además, el perfil de expresión de los genes regulados de forma positiva en plantas *amiCOX17-1/cox17-2* es muy similar al obtenido en las plantas mutantes *aox1a* (Figura 1, Anexo III). En base a esto, nos preguntamos si los genes *AtCOX17* podrían estar regulados por factores de transcripción descritos como reguladores de *AOX1a*.

El factor de transcripción *ABI4* participa en la respuesta de *AOX1a* a rotenona (Giraud y col., 2009). *ABI4*, perteneciente a la familia AP2/ERF (APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR), es un factor de transcripción versátil que regula diversos procesos celulares, habiendo sido identificado por su participación en la respuesta a ABA (Wind y col., 2013). Particularmente, actúa como un represor de *AOX1a* interactuando con un

elemento CE1 que interrumpe la caja G del promotor de *AOX1a*, necesaria para la activación transcripcional del mismo (Giraud y col., 2009; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). La anulación de la represión de *AOX1a* por *ABI4* es necesaria para que ocurra un incremento significativo en la expresión de este gen durante la respuesta a rotenona y ABA (Giraud y col., 2009). En función de estos antecedentes, decidimos investigar si *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* podrían compartir una vía de regulación similar a la observada para *AOX1a* en relación al factor de transcripción *ABI4*.

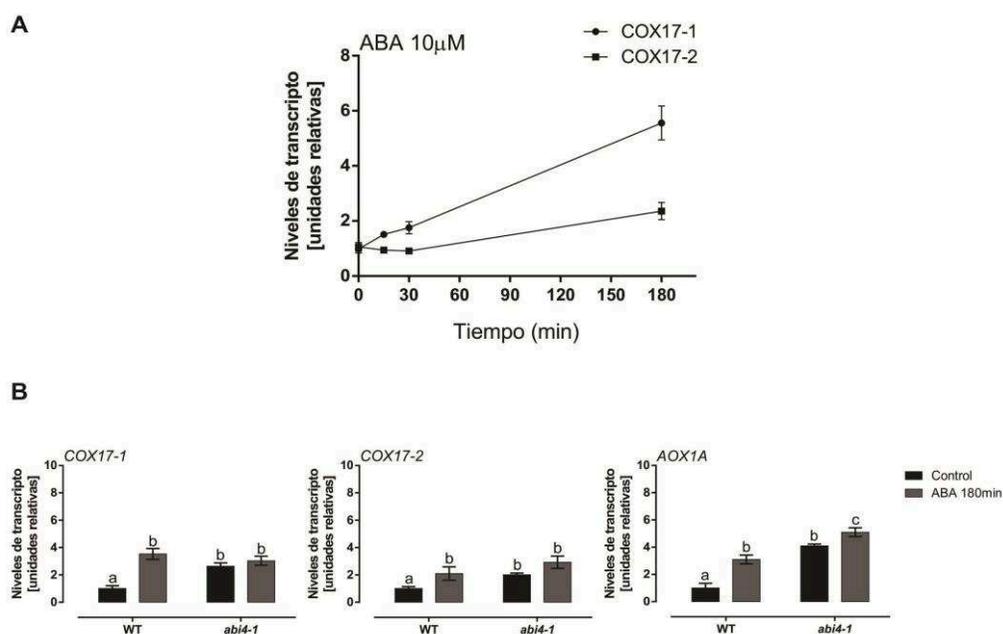
El primer experimento que decidimos realizar fue evaluar los niveles de expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en plantas mutantes en *ABI4* (*abi4-1*). Se evaluó también, a modo de control del experimento, la expresión de *AOX1a*, cuya expresión debe estar aumentada en las plantas *abi4-1* (Giraud y col., 2009). Como puede observarse en la figura 9, los niveles de expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* están aumentados en las plantas *abi4-1*. Este incremento sería específico para *abi4-1*, dado que no se observó el mismo comportamiento en las plantas mutantes en *ABI3* (*abi3-1* y *abi3-2*), que codifica otro factor de transcripción involucrado en la vía de señalización del ABA (Monke y col., 2012).



**Figura 9. Niveles de expresión de *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* y *AOX1a* en plantas *abi4-1*.** Los niveles de expresión de *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* y *AOX1a* fueron medidos mediante RT-qPCR en plantas *abi4-1*, *abi3-1*, *abi3-2* y WT. Las muestras de ARN fueron obtenidas a partir de plantas crecidas en medio MS 0,5x durante 4 días. Los resultados se expresan en unidades relativas a la expresión en la planta WT. Las barras de error representan la SD de cuatro muestras independientes (cada muestra incluye 5 plantas de cada genotipo) evaluadas en un mismo ensayo. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

Nos preguntamos entonces si los genes *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* estarían regulados por ABA y si su expresión depende de *ABI4* en presencia de ABA. En plantas

WT, la expresión de ambos genes aumenta luego de 180 minutos de incubación en medio MS 0,5x suplementado con 10  $\mu\text{M}$  ABA (Figura 10A). Por otra parte, en las plantas *abi4-1* el aumento de la expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* como consecuencia de la aplicación de ABA es menor que el incremento observado en las plantas WT (Figura 10B). En forma similar a lo reportado para la expresión de *AOX1a*, el aumento de la expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* mediado por ABA podría depender del factor de transcripción *ABI4*.



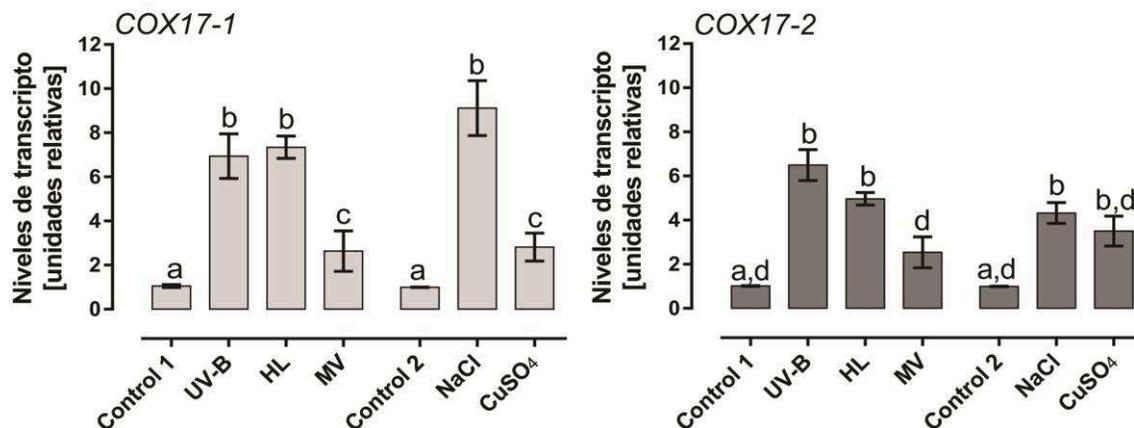
**Figura 10. Los genes *AtCOX17* serían regulados por ABA a través del factor de transcripción *ABI4*.** A. Niveles de expresión, medidos mediante RT-qPCR, de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en plantas WT crecidas en medio MS 0,5x durante 4 días y luego incubadas en medio MS 0,5x líquido en presencia de ABA 10  $\mu\text{M}$ . Los datos se expresan en unidades relativas respecto de la expresión del gen antes de la adición de ABA (t=0). Las barras representan la SD de dos ensayos independientes evaluados en un mismo ensayo de RT-qPCR. B. Niveles de expresión de *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* y *AOX1a* en plantas WT y *abi4-1* tratadas como se describió previamente. Los datos se expresan en unidades relativas a la expresión en plantas WT sin tratamiento. Las barras de error representan la SD entre dos ensayos independientes. El experimento se repitió cuatro veces obteniéndose resultados similares a los presentados en esta figura. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

En Arabidopsis, *ABI4* reconoce el elemento CE1 [CCAC(G)] en la secuencia promotora de sus genes blanco (Bossi y col., 2009; Niu y col., 2002; Yang y col., 2011). El 95% de los genes blancos de *ABI4* presenta la secuencia CCACG, mientras que el 80%

contiene la secuencia CACC en sus regiones promotoras (Reeves y col., 2011). El elemento CE1 se superpone con una región de 9 nucleótidos [GACACGTGT] que incluye la caja G de Arabidopsis. ABL<sub>4</sub> actuaría como un regulador negativo de la transcripción de genes regulados por cajas G (Acevedo-Hernandez y col., 2005; Koussevitzky y col., 2007; Wind y col., 2013). La interacción ABL<sub>4</sub>-AOX1a ocurre en una región que comprende al elemento B [CGTGAT] de la secuencia promotora de AOX1a, siendo el elemento B un regulador negativo de la transcripción de dicho gen (Giraud y col., 2009). Si bien AOX1a y los genes AtCOX17 podrían compartir una vía de regulación mediada por ABL<sub>4</sub>, la regulación de los genes AtCOX17 por ABL<sub>4</sub> sería indirecta dado que las secuencias promotoras (-3000 bp) de AtCOX17-1 y AtCOX17-2 no presentan el elemento CE1 en la posición correcta ni el elemento B al cual se une ABL<sub>4</sub> en la secuencia promotora de AOX1a (Giraud y col., 2009). Sin embargo, ensayos de simple híbrido sugieren que la secuencia reconocida por ABL<sub>4</sub> es más flexible que la secuencia canónica propuesta. El 40% de los genes sugeridos como blancos para ABL<sub>4</sub> en la señalización por ABA no contienen el sitio CE1 (Reeves y col., 2011). En relación a los sitios de respuesta a ABA que se encuentran en el promotor de AOX1a, las secuencias promotoras de AtCOX17-1 y AtCOX17-2 no contienen los sitios ABRE (de sus siglas en inglés *ABA-Responsive Element*) de respuesta a ABA, si bien tanto AtCOX17-1 como AtCOX17-2 son inducidos por ABA (Narusaka y col., 2003; Yoshida y col., 2010). La regulación de los genes AtCOX17 mediada por ABA podría ocurrir como consecuencia de la presencia de sitios MBS y MRE, cuyas secuencias son reconocidas por factores de transcripción de la familia MYB. Si bien los sitios MBS y MRE intervienen en la respuesta a deshidratación y a luz, los factores MYB que los unen están involucrados en las respuestas a ABA (Katiyar y col., 2012; Prouse y Campbell, 2012). Son necesarios más experimentos para determinar la vía a través de la cual ABL<sub>4</sub> regula la expresión de los genes AtCOX17.

También se procedió a estudiar la expresión de AtCOX17-1 y AtCOX17-2 en condiciones de estrés no directamente relacionadas con la inhibición de la cadena respiratoria. Los resultados obtenidos indican que tanto AtCOX17-1 (Figura 11A) como AtCOX17-2 (Figura 11B) se inducen en las distintas situaciones de estrés estudiadas:

tratamiento con NaCl 250 mM, exposición a radiación UV-B durante 15 minutos, tratamiento con alta intensidad lumínica o tratamiento con metil viológeno (MV) (Figura 11). Además, se evaluó la expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en plantas crecidas en medio MS 0,5x durante 15 días e incubadas con  $\text{CuSO}_4$  (Figura 11). Ambos genes respondieron de manera similar a las distintas condiciones evaluadas.



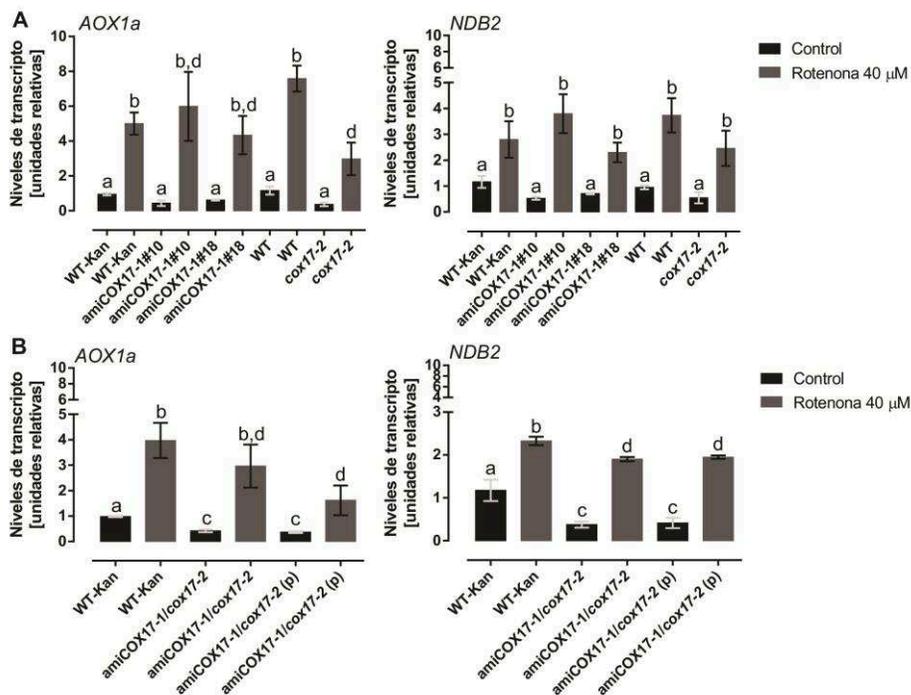
**Figura 11. Expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* durante distintas situaciones de estrés.** Las plantas fueron crecidas en sustrato sólido durante 15 días (Control 1) y luego tratadas con luz UV-B durante 15 minutos, expuestas a alta intensidad lumínica (HL) durante 4 horas o tratadas por aspersión con metil viológeno (MV) 10  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. En forma alternativa, las plantas fueron crecidas en medio MS 0,5x (Control 2) y luego incubadas en medio MS 0,5x líquido suplementado con NaCl 250 mM o con  $\text{CuSO}_4$  300  $\mu\text{M}$  durante 1 hora. Transcurridos los tiempos descriptos se tomaron las muestras para extracción de ARN y posterior análisis de la expresión de los genes de interés mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan en unidades relativas a la expresión en la condición Control correspondiente. Las barras de error representan la SD obtenida a partir de dos ensayos realizados de manera independiente. Los columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

#### 7.4.3.2.3. LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *ATCOX17* EN FORMA INDIVIDUAL MODIFICA LA RESPUESTA A DETERMINADAS CONDICIONES DE ESTRÉS.

Considerando los cambios de expresión observados en plantas *amiCOX17-1/cox17-2* y el hecho de que los genes *AtCOX17* son inducidos ante diversas condiciones de estrés, decidimos evaluar el comportamiento de plantas con niveles de expresión reducidos de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* en dichas condiciones. Para esto, analizamos el comportamiento de estas plantas luego de tratamientos con rotenona, NaCl y ABA.

A. El silenciamiento en forma individual de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* no modifica la expresión de genes que responden a una inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial.

Con el objetivo de determinar si cambios en los niveles de expresión de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* modifican la expresión de genes nucleares mediante la vía retrógrada, se cuantificó la expresión de dos genes de señalización retrógrada (*AOX1a* y *NDB2*) en plantas *amiCOX17-1*, *cox17-2* y *amiCOX17-1/cox17-2* luego de la generación de una disfunción mitocondrial mediante la inhibición del CI. En la figura 12 se muestran los niveles de expresión de *AOX1a* y *NDB2* en plantas WT y plantas con niveles de expresión disminuidos de los genes *AtCOX17* luego del tratamiento con rotenona. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de los genes estudiados luego del tratamiento con rotenona en las plantas *amiCOX17-1* y *cox17-2* respecto de las plantas WT (Figura 12A). Este resultado indicaría que la disminución de los niveles de expresión de los genes *AtCOX17* de manera individual no modifica la capacidad de las plantas de *Arabidopsis* para responder a una deficiencia mitocondrial, al menos cuando la disfunción ocurre a través del CI e involucra la regulación de la expresión de *AOX1a* y de *NDB2*. Sin embargo, cuando la disminución de la expresión de los genes *AtCOX17* ocurre de manera simultánea se observa una disminución en la inducción de *AOX1a* y de *NDB2* luego del tratamiento con rotenona (Figura 12B). Considerando que las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* tienen menores niveles de transcripto de *AOX1a* y *NDB2*, no podemos concluir que el cambio observado sea representativo de una modificación en la respuesta ante una inhibición del CI, ya que la magnitud de la respuesta no se vería modificada. Los resultados indican que *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* no participarían en la vía de señalización retrógrada mitocondrial que involucra a *AOX1a* que es, hasta la fecha, la más estudiada. Sin embargo, no puede descartarse su participación en otras vías de señalización retrógrada que involucren otros genes.



**Figura 12. Expresión de genes que participan en la señalización retrógrada mitocondrial en respuesta a rotenona en plantas con niveles de expresión disminuidos de los genes *AtCOX17*.** Los niveles de expresión fueron evaluados mediante RT-qPCR en plantas WT, *amiCOX17-1* y *cox17-2* crecidas durante 10 días en medio MS 0,5x (A) o en plantas *amiCOX17-1/cox17-2* crecidas durante 20 días junto con su respectivo control (B). Las plantas fueron incubadas en medio MS 0,5x suplementado con rotenona 40 μM durante 180 minutos o con etanol 80% (Control). Los resultados se expresan en unidades relativas a la expresión en la planta WT en la condición Control. Las barras de error representan la SD obtenida a partir de dos ensayos realizados de manera independiente. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

**B. El silenciamiento en forma individual de los genes *AtCOX17* modifica la expresión de genes de respuesta a estrés luego de un tratamiento con NaCl** Con el objetivo de analizar la posible participación de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* durante la respuesta a estrés, se evaluó la expresión de distintos genes de respuesta a estrés en plantas con niveles de expresión disminuidos de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* luego del tratamiento con NaCl 250 mM. Para seleccionar los genes marcadores de la respuesta a estrés a evaluar se consideraron tanto genes de respuesta a estrés globalizado cuya respuesta a NaCl había sido demostrada en la bibliografía, como genes de respuesta a estrés cuya expresión está modificada en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* de acuerdo al ensayo de microarreglos (Gupta y Huang, 2014; Msanne y col., 2011; Ozgur y col., 2014).

Dentro de los genes sugeridos por la literatura consideramos integrantes de los distintos sistemas detoxificadores de EROs (catalasas, superóxido dismutasas y miembros del ciclo ascorbato-glutatión) y genes reporteros de estrés por NaCl sin función fisiológica asociada. En la figura 13 se muestra la expresión de genes de respuesta a estrés cuya expresión es regulada por NaCl según la bibliografía y las bases de datos de microarreglos consultadas. Entre los genes de respuesta a estrés por NaCl estudiados en este trabajo, la expresión de *CATALASE 3 (CAT3)* no aumentó en las plantas amiCOX17 luego del tratamiento con NaCl 250 mM, mientras que se observó un incremento mayor a 5 veces ( $5,9 \pm 2,3$ ) en las plantas WT tratadas respecto de su control. Además, *L-ASCORBATE OXIDASE (ASO)* y *RESPONSIVE TO DEHYDRATION 29B (RD29B)* mostraron un incremento significativamente menor en las plantas amiCOX17-1 y amiCOX17-2 respecto de la planta WT luego del tratamiento con NaCl ( $1,3 \pm 0,2$ ,  $1,5 \pm 0,2$  y  $3,1 \pm 0,3$ , respectivamente). Entre los genes estudiados que respondieron al tratamiento con NaCl, *ASCORBATE PEROXIDASE 1 (APX1)*, *FERRITIN 3 (FER3)* y *PEROXIREDOXIN IIF (PERIIF)* no mostraron diferencias significativas en las plantas amiCOX17-1 o amiCOX17-2 respecto de plantas WT (Figura 13).

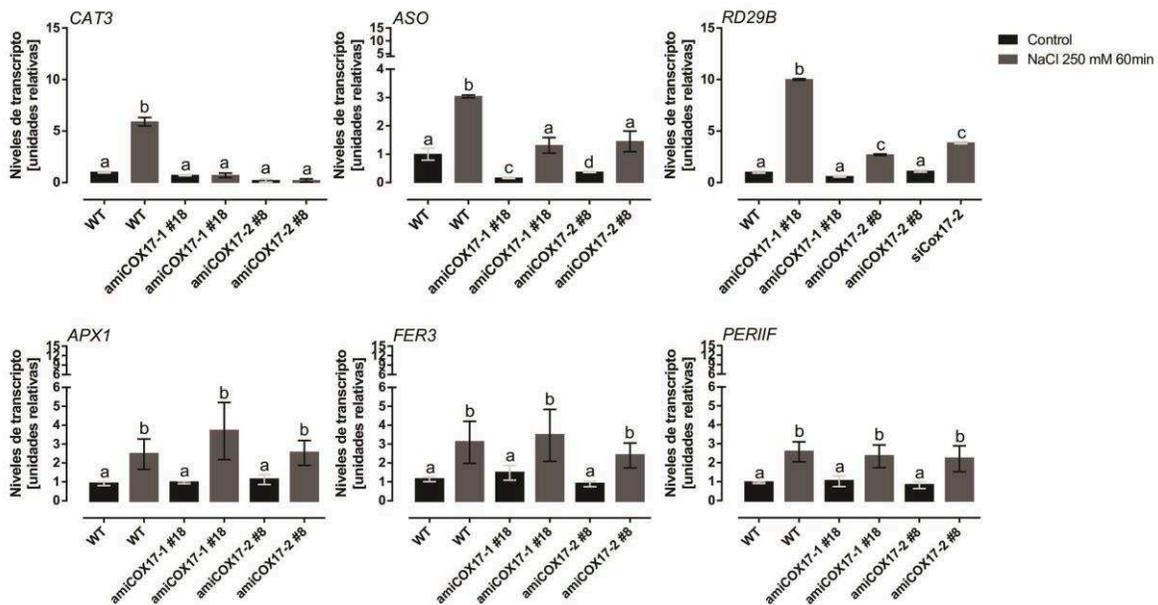
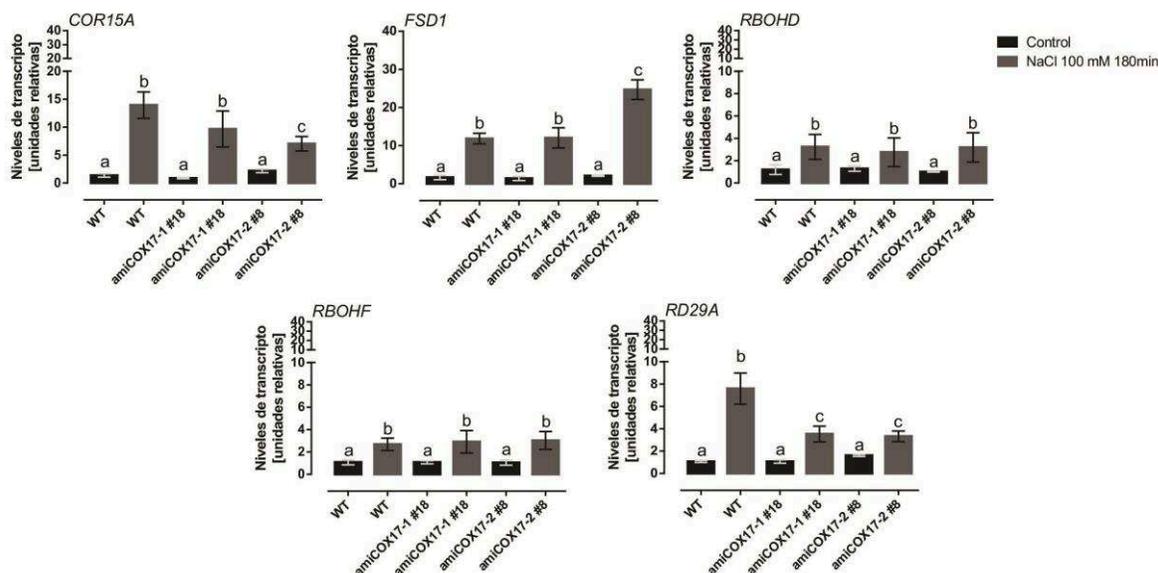


Figura 13. Expresión de genes de respuesta a estrés en plantas amiCOX17-1 y amiCOX17-2 luego del tratamiento con NaCl 250 mM. Los niveles de expresión fueron evaluados mediante RT-qPCR en plantas

WT, amiCOX17-1 y amiCOX17-2 crecidas durante 8 días en medio MS 0,5x e incubadas con NaCl 250 mM durante 60 minutos o incubadas en medio MS 0,5x (Control). Los resultados se expresan en unidades relativas a la expresión en la planta WT en la condición Control. Las barras de error representan la SD obtenida a partir de tres ensayos realizados de manera independiente. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

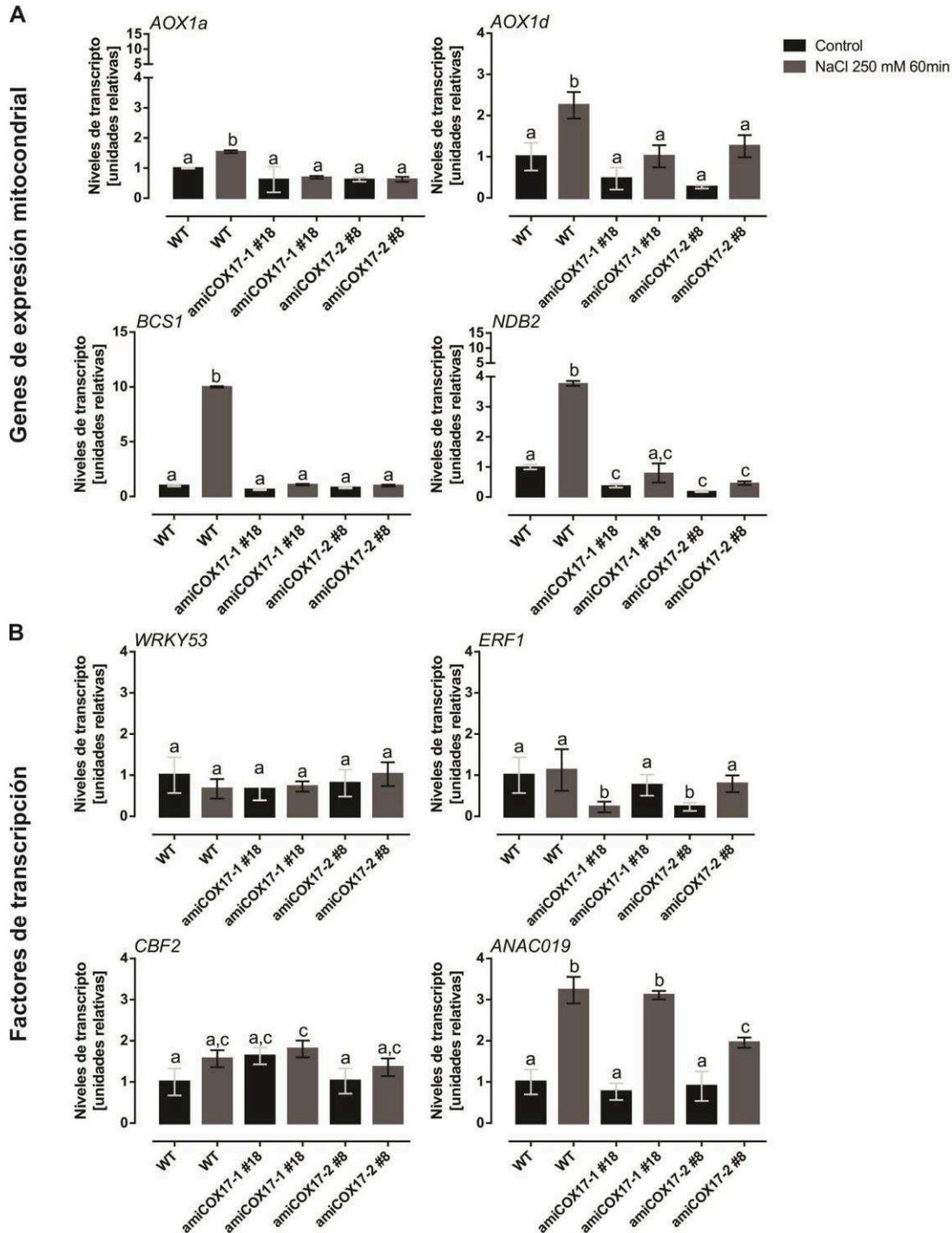
Dado que algunos de los genes evaluados no fueron inducidos mediante la aplicación de NaCl 250 mM, se decidió evaluar su expresión en otro diseño experimental. En esta oportunidad, se obtuvieron muestras de ARN provenientes de plantas crecidas en sustrato sólido durante 30 días y regadas con NaCl 100 mM (ver Materiales y Métodos 6.2.21A). Este nuevo diseño experimental permitió cuantificar el cambio de la expresión en plantas WT de *COLD-REGULATED 15A (COR15A)*, *Fe SUPEROXIDE DISMUTASE 1 (FSD1)*, *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D (RBOHD)*, *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE F (RBOHF)* y *RESPONSIVE TO DEHYDRATION 29A (RD29A)*. Entre estos genes, *COR15A* y *RD29A* mostraron una regulación diferencial en las plantas amiCOX17-1 y amiCOX17-2 con respecto a las plantas WT luego del riego con NaCl (Figura 14). En el caso de *COR15A*, se observó una respuesta disminuida sólo en plantas amiCOX17-2, mientras que la expresión de *RD29A* fue significativamente menor en ambos tipos de plantas luego del tratamiento con NaCl (Figura 14). *APX1*, *RBOHD* y *RBOHF* no presentaron diferencias significativas con plantas WT. Finalmente, el cambio en la expresión de *FSD1* en las plantas amiCOX17-2 fue significativamente mayor que en plantas WT (Figura 14).



**Figura 14.** Expresión de genes de respuesta a estrés en plantas *amiCOX17-1* y *amiCOX7-2* luego del tratamiento con NaCl 100 mM. Los niveles de expresión fueron evaluados mediante RT-qPCR en plantas WT, *amiCOX17-1* y *amiCOX17-2* crecidas durante 30 días en sustrato sólido y luego regadas con NaCl 100 mM. Las muestras se tomaron 180 minutos luego del riego. Los resultados se expresan en unidades relativas a la expresión en la planta WT en la condición Control. Las barras de error representan la SD obtenida a partir de tres ensayos realizados de manera independiente. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

También se evaluó la expresión de un grupo de genes de proteínas mitocondriales de respuesta a estrés cuya expresión está disminuida en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. En la figura 15 se muestran los niveles de expresión de estos genes luego del tratamiento con NaCl 250 mM. Como puede observarse, la expresión de los genes de proteínas mitocondriales evaluados se incrementó luego del tratamiento con NaCl en las plantas WT (Figura 15A). Sin embargo, la expresión de dichos genes en las plantas *amiCOX17* luego del tratamiento fue significativamente menor que la observada en plantas WT, ya que los mismos no fueron inducidos en las plantas silenciadas (Figura 15A). En particular, la expresión de *NDB2* está disminuida aún en la condición control. Este resultado nos permitiría sugerir que una disminución en los niveles de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* produciría una inhibición de la respuesta a estrés de un grupo de genes de proteínas mitocondriales de codificación nuclear. Este comportamiento se observa en respuesta a un estrés de tipo global, como es el caso del tratamiento con NaCl, pero no ante la

inhibición de la cadena transportadora de electrones (Figura 12). Además de este grupo de genes, también se observa una disminución en la respuesta de otros genes involucrados en la respuesta a estrés salino pero no relacionados con la función mitocondrial (Figuras 13 y 14).



**Figura 15. Expresión de genes de proteínas mitocondriales y de factores de transcripción en plantas con niveles de expresión reducidos de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* luego del tratamiento con NaCl 250 mM. A.** Niveles de expresión de genes de proteínas mitocondriales de respuesta a estrés. **B.** Niveles de expresión de genes que codifican factores de transcripción involucrados en la respuesta a estrés en plantas. Estos genes fueron evaluados dado que su expresión se encuentra disminuida en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. Las muestras de ARN fueron obtenidas a partir de plantas crecidas durante 8 días en medio MS 0,5x e incubadas con NaCl 250 mM durante 60 minutos o incubadas en MS 0,5x (Control). Los resultados se

expresan en unidades relativas a la expresión en la planta WT en la condición Control. Las barras de error representan la SD obtenida a partir de cuatro ensayos realizados de manera independiente. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

Finalmente, se evaluó un grupo de genes que codifican factores de transcripción involucrados en la respuesta a estrés cuya expresión está disminuida en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*. A diferencia de lo observado para los genes de respuesta a estrés que codifican proteínas de expresión mitocondrial, la expresión de los genes evaluados no se modificó significativamente luego del tratamiento con NaCl efectuado, excepto para el caso de *ANACo19*, cuya expresión se incrementó más de tres veces (Figura 15B). En este caso, se observó una respuesta reducida en las plantas *amiCOX17-2* pero no en las *amiCOX17-1*. Se debe notar, además, que la expresión del gen *ERF1* es menor en las plantas *amiCOX17* que en plantas WT en condiciones control (Figura 15B).

Estos resultados nos permitirían sugerir que la disminución en forma individual de los niveles de expresión de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* altera la respuesta a estrés por NaCl en plantas de *Arabidopsis*, generando plantas que no inducen todos los mecanismos de respuesta observados en plantas WT. Si bien sería necesario un estudio global de la transcripción en las plantas *amiCOX17* en condiciones de estrés para poder definir redes o vías que estén especialmente alteradas, podemos reconocer que los mecanismos detoxificantes y las vías mitocondriales alternativas estarían reprimidas, lo que podría originar una respuesta deficiente de las plantas ante una situación de estrés. La falta de inducción de *CAT3* podría indicar una deficiencia en el sistema de detoxificación de  $H_2O_2$  generado como consecuencia de la imposición del estrés (Jannat y col., 2011; Zhang y col., 2013). Sin bien *APX1* puede detoxificar  $H_2O_2$ , se ha propuesto que la enzima codificada por este gen actuaría como regulador de EROs en concentraciones fisiológicas mientras que *CAT3* actuaría cuando se genera el *burst* oxidativo (Mhamdi y col., 2010). Por otro lado, *APX1* requiere ascorbato (AA) como reductor para detoxificar  $H_2O_2$  (Caverzan y col., 2012; Miller y col., 2010; Shigeoka y col., 2002). La disminución de los niveles de *ASO* podría derivar en una alteración en los niveles de AA disponibles afectando la *performance* de las plantas *amiCOX17* frente a una situación de estrés. La

falta de activación de *RD29A* y de *RD29B* es llamativa, dado que estos genes son marcadores por excelencia de la presencia de un estrés osmótico, por frío o por NaCl (Msanne y col., 2011; Shinozaki y col., 2003). Los resultados obtenidos indicarían que las plantas *amiCOX17-1* y *amiCOX17-2* no perciben el estrés por NaCl a través de esta vía pero pueden activar algunos genes del sistema antioxidante.

La disminución en la expresión de los genes de proteínas mitocondriales es llamativa y permite extraer dos conclusiones. Primero, la disminución de forma individual en los niveles de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* modifica la regulación de la expresión de genes de expresión mitocondrial cuando el estrés es generalizado, mientras que no se observa modificación cuando el estrés se debe a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial. Podríamos pensar que la cascada de eventos que se desencadenan en el citosol y en otras organelas en una planta WT en condiciones de estrés deriva en el aumento de la expresión transcripcional de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* y que esa inducción es necesaria para activar o tal vez reforzar la activación de las vías alternativas.

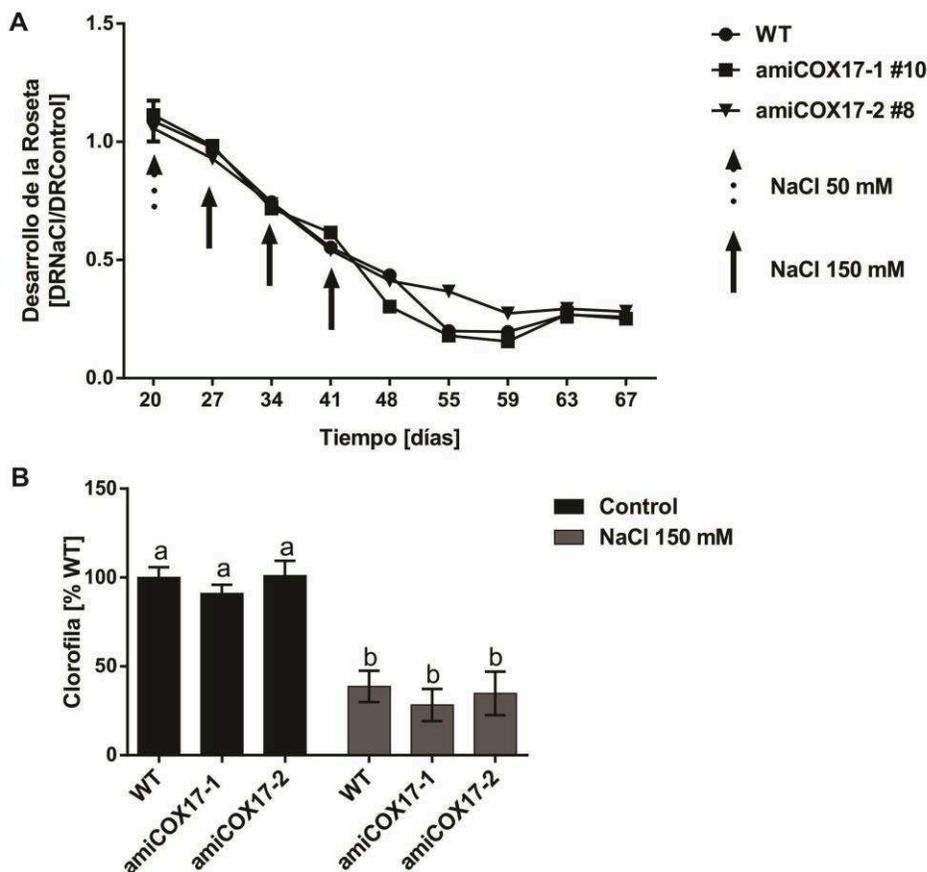
La disminución en forma individual de los niveles de expresión de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* no modifica la expresión de los factores de transcripción evaluados tanto en condición control como luego del estrés, con excepción de *ERF1*. De los factores de transcripción evaluados, solo los niveles de expresión de *ANAC019* se modificaron como consecuencia del tratamiento con NaCl. Esto es coincidente con su participación en vías de señalización mediadas por ABA y con el hecho de que los genes blanco de este factor de transcripción responden a NaCl, UV-B y privación de hierro (De Clercq y col., 2013; Hickman y col., 2013; Jensen y col., 2010; Lindemose y col., 2013). Dado que la mayor parte de los genes que codifican factores de transcripción evaluados no fueron regulados por el tratamiento con NaCl, no es posible concluir si la respuesta a estrés de los mismos está alterada en las plantas deficientes en *AtCOX17*. Para evaluar esto, se deberían analizar condiciones de estrés en las que dichos genes se induzcan. Por otra parte, para la mayoría de los genes estudiados no se observó una disminución en la expresión en condiciones control en las plantas silenciadas en forma individual, mientras que los niveles de expresión de estos genes sí se encuentran disminuidos en las plantas

amiCOX17-1/cox17-2 en esas condiciones. Esto podría deberse a la existencia de redundancia funcional entre AtCOX17-1 y AtCOX17-2. De este modo, el efecto del silenciamiento individual se pondría de manifiesto sólo en condiciones en que estas proteínas son requeridas en mayores cantidades, como por ejemplo en condiciones de estrés.

### C. El silenciamiento de los genes AtCOX17 tiene una consecuencia fisiológica durante la respuesta a estrés por NaCl.

Los resultados hasta aquí obtenidos nos permiten sugerir que cambios en los niveles de expresión de AtCOX17-1 o AtCOX17-2 producen un cambio en la regulación de la expresión génica en plantas de Arabidopsis sometidas a estrés por NaCl. En vista de estos resultados, nos preguntamos si las modificaciones transcripcionales observadas generan una consecuencia fenotípica en las plantas amiCOX17-1 y amiCOX17-2 cuando son sometidas a un estrés prolongado por NaCl. El tratamiento con NaCl se aplicó, como se detalla en la sección de Materiales y Métodos 6.2.21, en plantas de 20 días crecidas en condiciones de día corto.

Para evaluar el efecto del tratamiento, se midió el desarrollo de la roseta durante 47 días luego del inicio del tratamiento (Figura 16A) y el contenido de clorofila al día 45 (Figura 16B). La elección de estos parámetros como reporteros del estrés causado en plantas de Arabidopsis radica en que el estrés salino en plantas presenta dos fases: una fase rápida u osmótica que inhibe el crecimiento de las hojas jóvenes y una lenta o salina que acelera la senescencia de las hojas (Gupta y Huang, 2014). Se estudió el crecimiento de la roseta como indicador de la fase osmótica y el contenido de clorofila como indicador de la senescencia. Como se deduce de la figura 16, no se observaron diferencias significativas en el desarrollo de la roseta ni en el contenido de clorofila total entre las plantas amiCOX17 y las plantas WT. De acuerdo a esto, debemos concluir que la disminución de los niveles de expresión de AtCOX17-1 o de AtCOX17-2 no genera cambios evidentes en la sensibilidad al estrés por NaCl.



**Figura 16. Desarrollo de la roseta y contenido de clorofila en plantas amiCOX17 luego del tratamiento con NaCl. A.** El desarrollo de la roseta (DR) se calculó como la relación entre el diámetro mayor y el diámetro menor de cada una de las plantas evaluadas a partir del día 20 de crecimiento en condiciones de día corto. El valor de desarrollo de la roseta graficado se obtiene de la relación  $DR_{NaCl}/DR_{Control}$ . Este ensayo fue realizado empleando entre 20 y 32 plantas de cada genotipo. Los resultados se expresan como la media entre dos líneas para cada genotipo [amiCOX17-1 #18 (n=20) y #10 (n=23) y amiCOX17-2 #8 (n=29) y #23 (n=32)]. Las flechas indican los momentos de riego con NaCl. Flecha discontinua: aclimatación. Flecha continua: tratamiento. **B.** Contenido de clorofila en plantas amiCOX17 al día 45 de crecimiento. Este ensayo fue repetido dos veces. Las barras de error representan la SD entre tres líneas de cada genotipo para uno de los ensayos realizados. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

Sin embargo, si consideramos que muchos de los genes cuya expresión se encuentra disminuida en las plantas con menores niveles de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* codifican proteínas involucradas en la detoxificación de radicales de oxígeno, nos preguntamos si las plantas con niveles disminuidos de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* tenían una capacidad reducida para detoxificar las EROs generadas en exceso durante una situación de estrés. Para analizar esto, decidimos evaluar los niveles de EROs mediante

dos técnicas: una cuantitativa que permite evaluar la producción de EROs de manera indirecta mediante la cuantificación de lípidos peroxidados y una cualitativa que permite evaluar la producción de  $O_2^-$  mediante tinción con Nitroblue tetrazolium (NBT; ver Materiales y Métodos 6.2.50). La producción de lípidos peroxidados es una medición indirecta de los niveles de EROs dado que estos se generan como consecuencia de la reacción de los singuletes de oxígeno ( $^1O_2$ ) con ácidos grasos poliinsaturados. Entre los lípidos peroxidados generados, se produce en la célula malondialdehído (MDA). El MDA reacciona con ácido tiobarbitúrico produciendo un cromógeno rosado-rojo. En la figura 17A se muestran los niveles de lípidos peroxidados, expresados como equivalentes de MDA, en plantas *amiCOX17* sometidas a estrés por NaCl. Como puede observarse, las plantas con menores niveles de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* presentan mayores niveles de peroxidación lipídica cuando son expuestas a una situación de estrés por NaCl (Figura 17A). Esto podría indicar que la disminución de la expresión de los marcadores de estrés observados en las plantas *amiCOX17* se correlaciona con una disminución en la actividad de los sistemas de detoxificación de EROs.

La aplicación de una medida cualitativa para evaluar la producción de  $O_2^-$  nos permite aproximarnos a responder si los lípidos peroxidados son consecuencia de una mayor acumulación de  $O_2^-$ . En la figura 17B se muestra una imagen representativa del resultado de la tinción, luego de 5 y 16 horas de incubación con NBT. El reactivo NBT es reducido por el  $O_2^-$  generado en la planta, produciendo un precipitado azul-violeta. El resultado de la tinción mostrado en esta imagen nos permite interpretar que las plantas *amiCOX17-1* y *cox17-2* muestran mayores niveles de  $O_2^-$  luego del tratamiento con NaCl respecto de plantas WT. Esto es congruente con los mayores niveles de peroxidación lipídica observados. Desafortunadamente, no podemos distinguir con estas técnicas si la producción de EROs es de origen mitocondrial, cloroplástico o del citosol. Nos quedará responder si el incremento de EROs es una consecuencia de una falla en la actividad AOX mitocondrial o de una falencia en los sistemas detoxificadores asociados al peroxisoma o al citosol. Sin embargo, podemos sugerir que la producción de EROs en la mitocondria

podría estar aumentada dado que la actividad de la MnSOD, específica de la mitocondria, se encuentra disminuida luego del tratamiento con NaCl (Figura 17C).

Dado que las plantas con niveles de expresión disminuidos de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* contienen más  $O_2^-$  y presentan mayores niveles de lípidos peroxidados, nos pareció interesante evaluar la pérdida de iones (*ion leakage*) de estas plantas luego del estrés, como una medida de daño celular. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en este ensayo (Figura 17D).

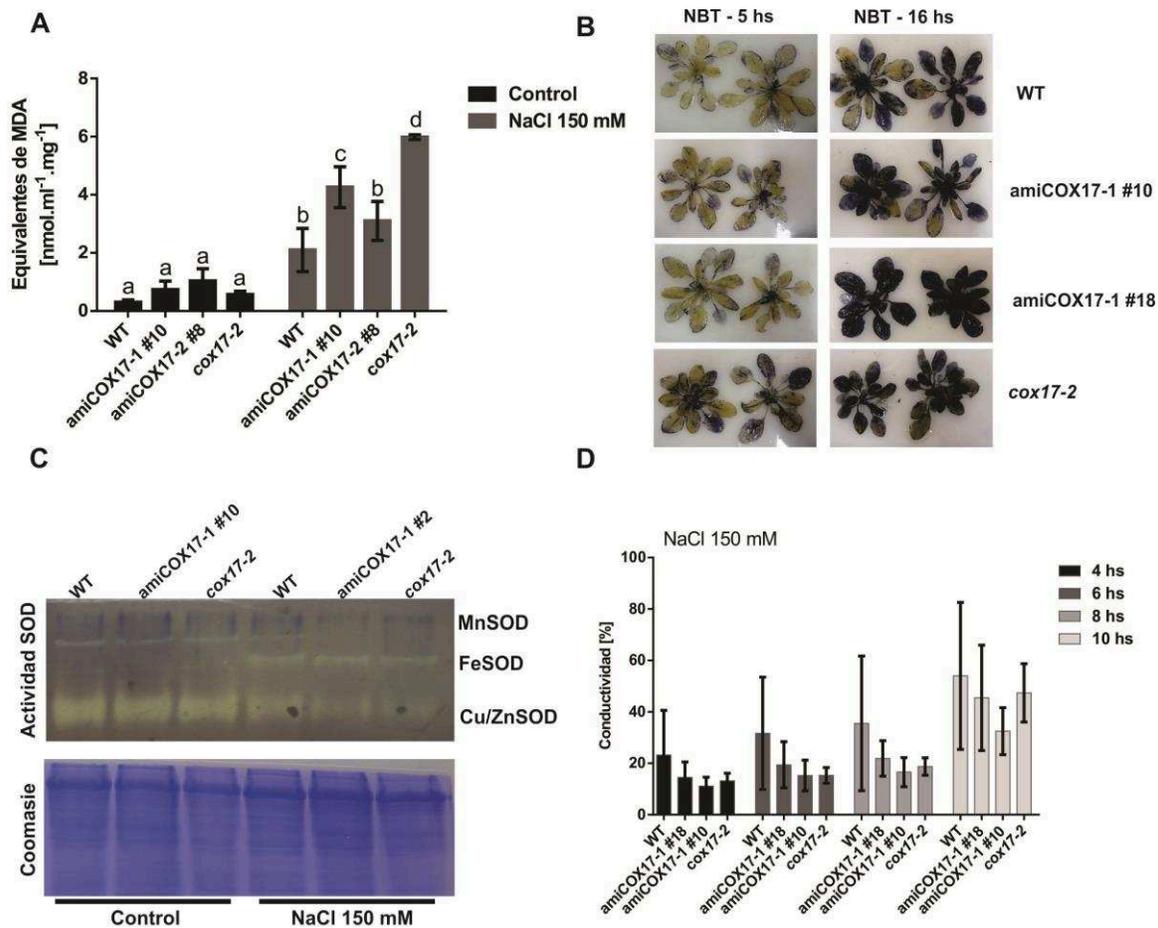
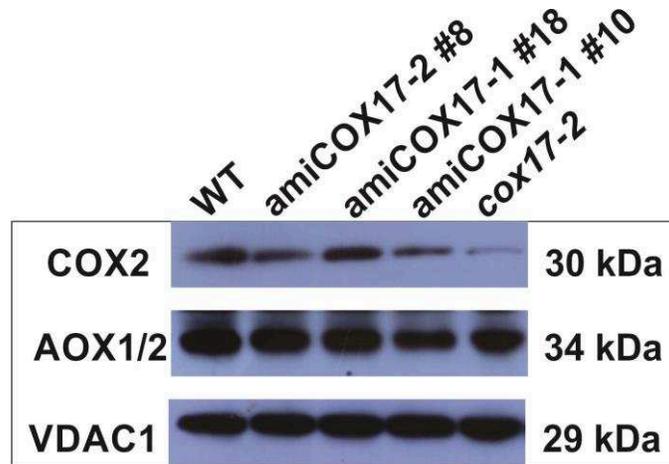


Figura 17. Parámetros relacionados con estrés en plantas con niveles de expresión alterados de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* luego del tratamiento con NaCl. **A.** Niveles de lípidos peroxidados al día 45 de crecimiento, en plantas regadas con agua (Control) o con NaCl 150 mM como se indica en la figura 16A. Los valores de lípidos peroxidados se expresan como equivalentes de MDA. Los datos se normalizaron en función del peso fresco. Este ensayo fue realizado empleando 15 plantas de cada genotipo y fue repetido tres veces. Las barras de error representan la SD entre tres líneas de cada genotipo para uno de los ensayos realizados. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples). **B.** Tinción con NBT para detectar  $O_2^-$  al día 45 de crecimiento. Las

plantas fueron tratadas con NaCl 150 mM como se indica en la figura 16A. **C.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) al día 45 de crecimiento en plantas regadas con agua (Control) o con NaCl 150 mM como se indica en la figura 16A. El ensayo permite la detección de las tres isoformas reportadas en plantas: Cu/ZnSOD, MnSOD y FeSOD. **D.** Pérdida de iones, medida como conductividad de la solución, al día 45 de crecimiento. Las plantas fueron regadas con NaCl 150 mM como se indica en la figura 16A. Los valores se expresan como porcentaje de la conductividad total para cada uno de los genotipos. La conductividad se midió luego de 4, 6, 8 y 10 horas de incubación de las plantas en la solución de medición.

Estos resultados nos permiten sugerir que la disminución de los niveles de expresión de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* resulta en un incremento significativo en los niveles de radicales del oxígeno y en la peroxidación lipídica. Posiblemente, esto sea consecuencia de una falla en la inducción de mecanismos de detoxificación celular y/o en la inducción de genes de la vía alternativa como *AOX1a* y *AOX1d*, entre otros. Sin embargo, estas deficiencias no parecen ser suficientes para producir cambios apreciables en la tolerancia de las plantas a las condiciones de estrés ensayadas.

Con el objetivo de determinar si el funcionamiento de la cadena respiratoria se encuentra modificado en plantas con niveles disminuidos de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2*, se obtuvieron extractos enriquecidos en mitocondrias a partir de plantas crecidas en sustrato sólido y tratadas con NaCl 150 mM como se describe en la figura 16A. En primer lugar, se evaluaron los niveles de proteína COX2 en los extractos mitocondriales. Las plantas deficientes en *AtCOX17* presentan menores niveles de COX2 (Figura 18). En cuanto a los niveles de AOX, el resultado de este experimento sugiere que las plantas *amiCOX17-1* (#18, #10), *amiCOX17-2*#18 y *cox17-2* también presentan una ligera reducción en los niveles de AOX luego del estrés por NaCl (Figura 18).

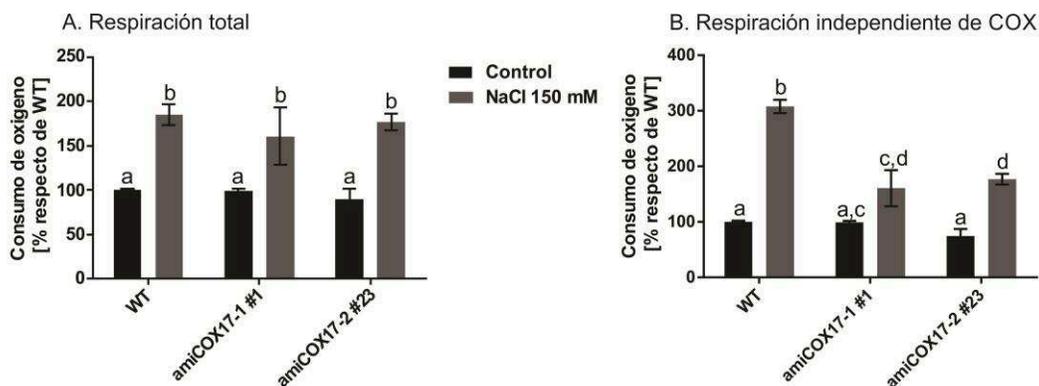


**Figura 18.** Niveles de proteínas mitocondriales en plantas con niveles de expresión disminuidos de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* luego del tratamiento con NaCl. Detección de COX2, AOX1/2 y VDAC1 mediante Western blot en extractos mitocondriales (25 µg) obtenidos a partir de plantas WT, *amiCOX17-1*, *amiCOX17-2* y *cox17-2* crecidas en sustrato sólido y regadas con NaCl 150 mM como se especifica en la figura 16A.

La reducción de los niveles de COX2 podría implicar que existen subunidades COX2 que no pueden ensamblarse correctamente y son degradadas (Bestwick et al, 2009). La disfunción en la maduración de COX2, que lleva a su degradación, podría estar asociada a una falencia en la distribución del cobre debida a la deficiencia en *AtCOX17*. En este punto es importante destacar que los niveles de COX2 no se modifican en condiciones control en las plantas *amiCOX17* (Figura 4, Anexo de Resultados III). Es decir, en condiciones control, la disponibilidad de cobre en las plantas *amiCOX17* sería suficiente para permitir la correcta maduración de COX2 y su ensamblaje en el CIV, mientras que este proceso se vería afectado, al menos parcialmente, luego del tratamiento con NaCl.

El estudio de la actividad del CIV y de la organización molecular de los complejos respiratorios en los extractos mitocondriales obtenidos debe estudiarse mediante geles BN como se mostró en el Capítulo II de Resultados y Discusión de este trabajo. Sin embargo, la calidad de los extractos mitocondriales obtenidos a partir de plantas crecidas en sustrato sólido tratadas con NaCl no nos permitió obtener datos claros y reproducibles. Debido a este impedimento técnico, el funcionamiento de la cadena respiratoria debió ser evaluado mediante el estudio del consumo de oxígeno en plantas

crecidas en medio MS 0,5x suplementado con NaCl 150 mM durante 8 días. En estas condiciones, se observó un incremento significativo en el consumo de oxígeno (Figura 19A). Este podría ser un primer indicio de un incremento en la actividad del CIV en la situación de estrés aplicada. Dado que el incremento observado es igual en todos los genotipos estudiados, debemos concluir que la disminución de los niveles de *AtCOX17-1* o de *AtCOX17-2* no genera una consecuencia en el transporte global de electrones. En la figura 21B se muestra el resultado obtenido cuando se evaluó el consumo de oxígeno en presencia de KCN (inhibidor del CIV). Como puede observarse, el tratamiento con NaCl incrementó el consumo de oxígeno independiente de COX en las plantas WT respecto del consumo observado en la condición control (Figura 19B). Sin embargo, el incremento en la respiración independiente de COX en las plantas *amiCOX17* fue menor que el observado en las plantas WT (Figura 19B). La falla que presentan las plantas *amiCOX17* en activar los mecanismos independientes de COX podría explicarse por la disminución de la inducción de *AOX1a* y *AOX1d*. Por otra parte, los resultados sugieren que la vía dependiente de COX no es limitante en estas condiciones.

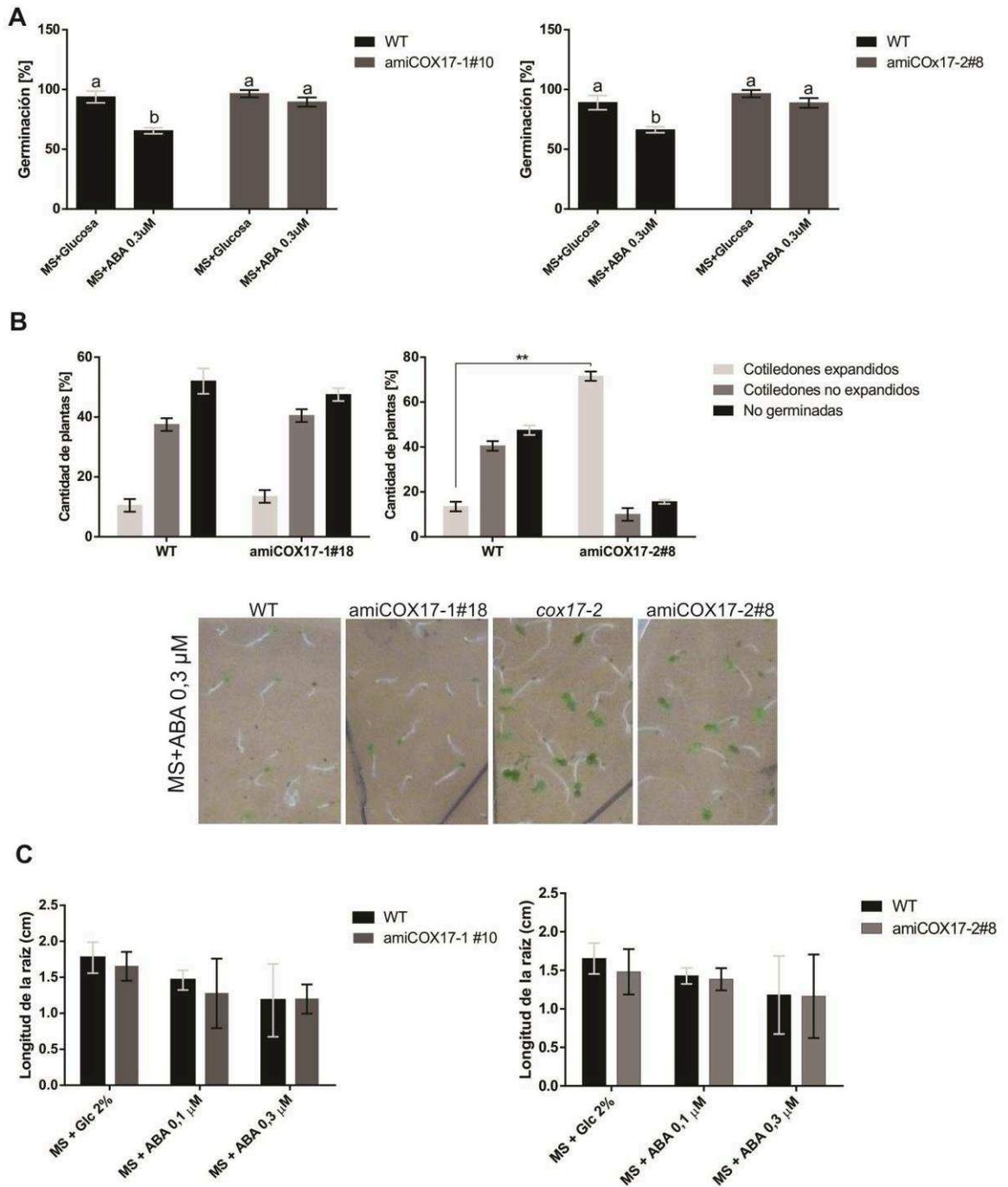


**Figura 19. Efecto del tratamiento con NaCl sobre el consumo de oxígeno en plantas WT, *amiCOX17-1* y *amiCOX17-2*.** **A.** Entre cinco y seis plantas de cada genotipo estudiado crecidas durante 8 días en medio MS 0,5x (Control) o en medio MS 0,5x suplementado con NaCl 150 mM fueron incluidas en la cámara de un oxígrafo para monitorear el consumo de oxígeno durante 10 minutos en ausencia de KCN. La media del consumo de oxígeno registrada en las plantas WT crecidas en condición Control en tres experimentos independientes ( $3,16 \pm 0,09 \mu\text{moles} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) fue definida como el 100% del consumo de oxígeno. Los valores se normalizaron en función del peso fresco del grupo de plantas incluido en la cámara. **B.** Al mismo grupo de plantas se le adicionó KCN 1 mM y se midió el consumo de oxígeno durante 7 minutos. Se muestra el consumo de oxígeno independiente de COX considerando como 100% el consumo de oxígeno obtenido en la planta WT en condición Control y en presencia de KCN ( $0,92 \pm 0,02 \mu\text{moles} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Las barras de

error representan la SD de los valores obtenidos en tres experimentos diferentes. Letras distintas implican medias significativamente diferentes ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

#### D. El silenciamiento en forma individual de los genes *AtCOX17* modifica la sensibilidad al ABA

Dada la participación de la hormona ABA en la respuesta a estrés (Lee y Luan, 2012), nos interesó estudiar si la respuesta a esta hormona estaba alterada en las plantas *amiCOX17-1* y *amiCOX17-2*. Para tal fin, se evaluó la tasa de germinación y el desarrollo de la raíz en presencia de ABA (ver Materiales y Métodos 6.2.27). La tasa de germinación de las plantas *amiCOX17-1* y *amiCOX17-2* fue mayor que la observada en plantas WT en presencia de ABA  $0,3 \mu\text{M}$  (Figura 20A). En el caso de las plantas *amiCOX17-2*, la falta de sensibilidad al ABA se prolongó a estadios posteriores de desarrollo (Figura 20B). No se observaron diferencias en el desarrollo de la raíz en presencia de ABA entre las plantas *amiCOX17* y WT (Figura 20C). Los resultados indican que la deficiencia en *AtCOX17* genera un fenotipo de menor sensibilidad al ABA. La insensibilidad a ABA es otro indicio de la incapacidad de las plantas *amiCOX17* para responder ante una situación de estrés.



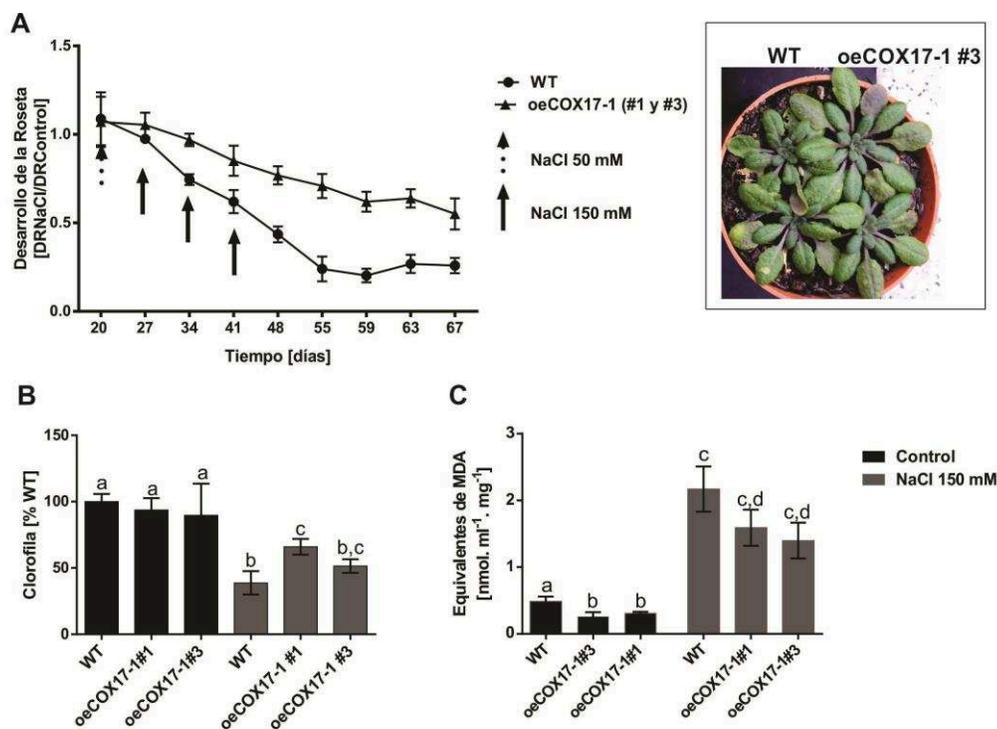
**Figura 20. Respuesta de plantas con menores niveles de expresión de AtCOX17-1 o de AtCOX17-2 a tratamientos con ABA. A.** Porcentaje de germinación de semillas WT, amiCOX17-1 y amiCOX17-2 sembradas en medio MS 0,5x suplementado con glucosa 2% (Control) o el mismo medio con el agregado de ABA 0,3 µM. En el gráfico se muestran los resultados obtenidos luego de transcurridas 18 horas desde la siembra. Las barras de error representan la SD obtenida a partir de tres placas sembradas con 300-350 semillas de cada uno de los genotipos. **B.** Las plantas WT, amiCOX17-1 y amiCOX17-2 fueron crecidas durante 7 días en placas con MS 0,5x, glucosa 2% y ABA 0,3 µM. Se contó la cantidad de plántulas que presentaban los cotiledones totalmente expandidos, cotiledones no expandidos o no presentaban radícula

(indicativo de germinación). Las barras de error representan la SD obtenida entre dos placas con 150-200 semillas de cada uno de los genotipos. Este experimento se repitió 3 veces de manera independiente obteniéndose resultados similares. En el panel inferior se muestra una imagen representativa del fenotipo observado. C. Longitud de la raíz en plantas WT y amiCOX17 luego de 10 días de crecimiento en placa vertical en presencia de ABA 0,3  $\mu$ M. Se muestra el resultado obtenido en un experimento que incluyó entre 50 y 60 plántulas por genotipo. El experimento se repitió dos veces. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

#### 7.4.3.2.4. LA SOBREENPRESIÓN DE ATCOX17-1 PODRÍA GENERAR UNA VENTAJA RESPECTO DE PLANTAS WT DURANTE LA RESPUESTA ESTRÉS POR NaCl.

Dado que el silenciamiento de los genes AtCOX17 incrementa los niveles de EROs y de lípidos peroxidados luego del tratamiento con NaCl, nos preguntamos si la sobreexpresión de AtCOX17 podría producir algún cambio en el comportamiento de las plantas ante condiciones de estrés salino. Para responder a esto, se aplicó un tratamiento similar al descrito para las plantas amiCOX17 a plantas que sobreexpresan AtCOX17-1 o AtCOX17-2. La obtención y el fenotipo de las plantas oeCOX17 se describe al final del Anexo III.

Para evaluar el efecto del tratamiento, se midieron el desarrollo de la roseta durante 47 días luego del inicio del mismo y el contenido de clorofila y los niveles de peroxidación lipídica al día 45. Las plantas oeCOX17-1#1 y oeCOX17-1#3 presentaron una menor inhibición del crecimiento, evaluado a partir del tamaño de la roseta (Figura 21A), un mayor contenido de clorofila (Figura 21B) y menores niveles de peroxidación lipídica (Figura 21C). Estos resultados nos permiten sugerir que la sobreexpresión de AtCOX17-1 genera plantas menos sensibles al estrés por NaCl 150 mM. En el caso de AtCOX17-2, no se observaron diferencias significativas con plantas WT.



**Figura 21. Desarrollo de la roseta, niveles de clorofila y niveles de lípidos peroxidados en plantas WT y oeCOX17-1 tratadas con NaCl 150 mM.** **A.** El desarrollo de la roseta (TR) se calculó como la relación entre el diámetro mayor y el diámetro menor de cada una de las plantas evaluadas a partir del día 20 de crecimiento. El valor de crecimiento de la roseta se obtiene de la relación  $TR_{NaCl}/TR_{control}$ . Este ensayo fue realizado empleando entre 15 y 20 plantas de cada genotipo. Los resultados se expresan como la media entre las dos líneas oeCOX17-1 [oeCOX17-1 #1 (n=21) y #3 (n=17)]. Se utilizaron 15 plantas WT. Las flechas indican los momentos de riego con NaCl. Flecha discontinua: aclimatación. Flecha continua: tratamiento. A la derecha se muestra una foto representativa de las diferencias observadas entre plantas WT y oeCOX17-1#3 al día 41 de crecimiento. **B.** Contenido de clorofila en plantas oeCOX17-1 al día 45 de crecimiento. Este ensayo fue realizado empleando entre 10 y 12 plantas de cada genotipo y fue repetido dos veces. Las barras de error representan la SD entre las 10-12 plantas empleadas para cada genotipo para uno de los ensayos realizados. **C.** Niveles de lípidos peroxidados en plantas WT y oeCOX17-1 al día 45 de crecimiento, regadas con agua (Control) o con NaCl 150 mM como se indica en A. Los valores de lípidos peroxidados se expresan como equivalentes de MDA. Los datos se normalizaron en función del peso fresco. Este ensayo fue repetido dos veces. Las barras de error representan la SD entre las 17-23 plantas de cada genotipo para uno de los ensayos realizados. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples en ensayo desbalanceado).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizó la cuantificación de distintos metabolitos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GS-MS) en plantas oeCOX17-1 crecidas en un fotoperiodo de día largo. Como puede observarse en el árbol de mínimo recorrido (Figura 22), la composición metabólica

de las plantas se modifica como consecuencia de la sobreexpresión de AtCOX17-1, tanto al final de la noche (Figura 22A) como en la mitad del día (Figura 22B). La sobreexpresión de AtCOX17-1 genera un aumento en los niveles de metabolitos osmoprotectores, como prolina, glucosa, manitol y manosa, tanto al final de la noche como en la mitad del día (Figura 23A). Particularmente, la prolina actúa como un osmoprotector manteniendo el balance osmótico, estabilizando las membranas, evitando la ruptura celular y manteniendo los niveles de EROs en rangos fisiológicos (revisado en Hayat y col., 2012). En concordancia con esto, los niveles de lípidos peroxidados en plantas oeCOX17-1 son menores que en plantas WT luego del tratamiento con NaCl, como puede observarse en la Figura 21.

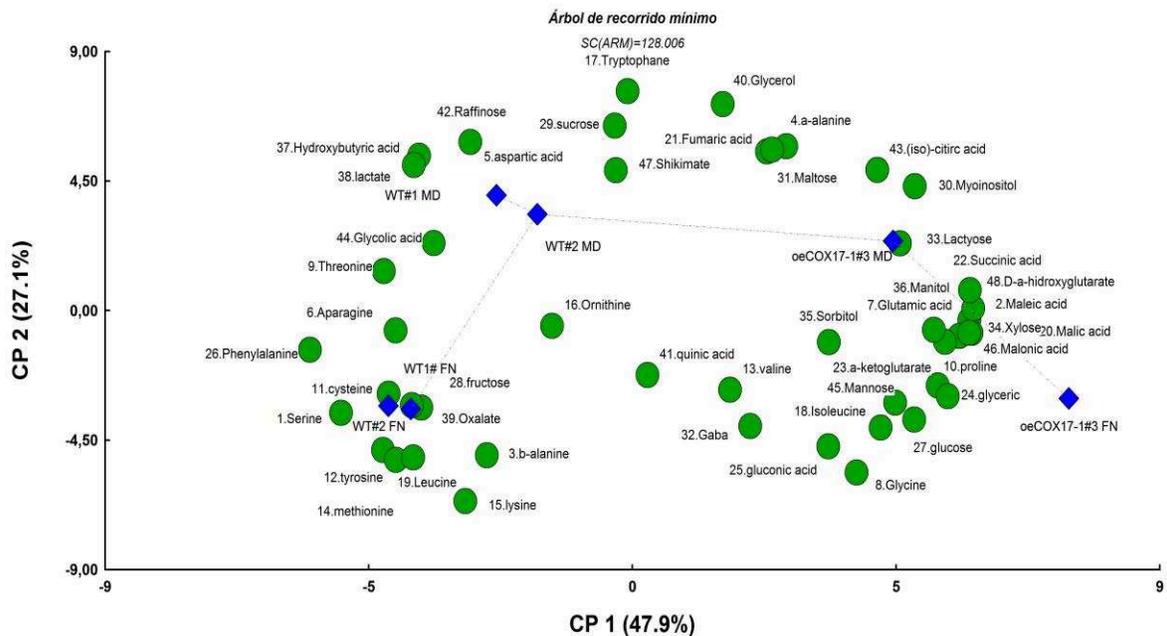
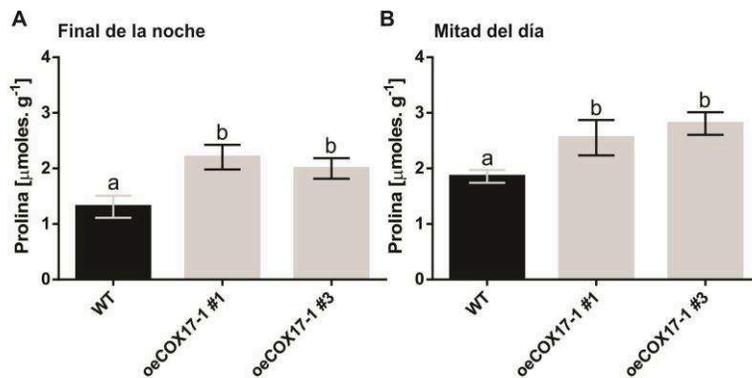


Figura 22. Análisis de componentes principales (ACP) para la cuantificación de los niveles de metabolitos en plantas WT y plantas oeCOX17-1. Se muestran los dos primeros componentes principales, los cuales constituyen la mayor variabilidad del grupo de datos. MD; mitad del día. FN; final de la noche.

Final de la noche	Mitad del día	ID
0,226127276	-0,055569871	a-alanine
-1,460455482	-0,250269223	Aparagine
-0,901409538	-0,450137639	aspartic acid
-0,202766908	-0,330145738	b-alanine
0,017626589	0,242607244	Gaba
0,409939218	0,366819702	Glutamic acid
0,99647188	0,739814506	Glycine
0,323955402	0,61186552	Isoleucine
-1,62178634	-0,251922625	lysine
-0,335099146	0,005083192	Ornithine
-0,474069295	-0,248708054	Phenylalanine
6,665427623	4,18605256	proline
-1,33569539	-0,881970457	Serine
-0,157451673	0,223562967	Shikimate
-0,100269885	0,060806212	Threonine
-0,147716319	-0,197969261	Tryptophane
-1,448744604	-0,662605333	tyrosine
0,159335209	-0,210294021	valine
-1,311807085	0,052992958	fructose
2,414910287	1,541052379	glucose
0,313192427	0,882692705	Maltose
1,653441432	0,823346261	Manitol
6,84694623	0,877344274	Mannose
0,983933599	0,305825881	Myoinositol
-1,899853213	-2,648014855	Raffinose
1,105300329	0,465906326	Sorbitol
0,749400839	-0,008328061	sucrose
1,030361191	0,821522431	Xylose
0,557060587	-0,120279662	Glycerol
0,724430944	0,53101372	Malonic acid
0,493876125	0,419848717	(iso)-citric acid
1,650354283	2,014079612	a-ketoglutarate
1,185736264	0,091326373	D-a-hidroxyglutarate
0,266239082	0,062086849	Fumaric acid
1,650354283	2,014079612	glyceric
-0,128856462	-0,010237338	Glycolic acid
-0,206845779	-0,484058815	lactate
0,940216251	0,669450769	Maleic acid
0,908878454	0,637619626	Malic acid
0,469203142	0,284135605	Succinic acid
-0,445439572	-0,70379803	cysteine
0,305766685	-0,00903813	gluconic acid
-0,275574263	-0,484058815	Hydroxybutyric acid
1,171061108	1,341551775	Lactose
-1,62178634	-0,251922625	Leucine
-1,200999121	-0,515703536	methionine
-3,857876068	-0,558047906	Oxalate

Figura 23. Perfil metabólico en plantas WT y oeCOX17-1. Perfil metabólico obtenido a partir de plantas WT y oeCOX17-1 crecidas en un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Se muestra el logFC (oeCOX17-1/WT) para cada uno de los metabolitos obtenidos.

La cuantificación de metabolitos en condiciones de estrés se encuentra en proceso de análisis y verificación. Con el objetivo de evaluar los niveles de prolina luego del estrés, se cuantificaron los mismos en plantas *oeCOX17-1* y WT luego del tratamiento con NaCl 150 mM mediante un método espectrofotométrico. Como puede observarse en la Figura 24, los niveles de prolina también son mayores en plantas *oeCOX17-1* luego del tratamiento con NaCl 150 mM.



**Figura 24. Niveles de prolina medidos mediante una técnica espectrofotométrica en plantas WT y *oeCOX17-1* luego del tratamiento con NaCl. A. Niveles de prolina en muestras tomadas al final de la noche. B. Niveles de prolina en muestras tomadas en la mitad del día. Las plantas WT y *oeCOX17-1* fueron crecidas en un fotoperiodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad durante 15 días. Las muestras se tomaron 7 días después del segundo riego con NaCl 150 mM. Este ensayo fue realizado empleando 6 grupos compuestos por 5 rosetas completas de cada genotipo. Se muestra el resultado de uno de los ensayos. Las barras de error representan la SD entre los 6 grupos de plantas empleados para cada genotipo. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).**

Se puede postular que la menor sensibilidad a estrés observada en las plantas *oeCOX17-1* podría deberse al incremento de los niveles de prolina y al control de la producción de lípidos peroxidados. El incremento en los niveles de prolina podría explicar la menor disminución en el desarrollo del tamaño de la roseta. Las plantas *oeCOX17-1* serían menos sensibles a la fase rápida de estrés osmótico producido por el NaCl. De acuerdo con este mecanismo defensivo, las plantas *oeCOX17-1* también muestran menor sensibilidad al estrés por sequía (Figura 5, Anexo III). El hecho de que las plantas *oeCOX17-1* presenten menores niveles de peroxidación lipídica en condiciones de estrés indica que estas plantas generan menos EROs o han desarrollado mecanismos que

permiten aliviar la actividad citotóxica de estas especies. Estos mecanismos no estarían relacionados con un cambio en la reserva de ascorbato total ni con la activación de genes de respuesta a estrés como *AOX1a*, *NDB2*, *CAT3* y *APX1*, dado que no hemos observado diferencias significativas en dichos parámetros en condiciones control o luego del tercer riego con NaCl (datos no mostrados). Sin embargo, es necesario realizar los estudios transcripcionales en distintas etapas de la aplicación del estrés para determinar si los genes de respuesta a estrés, que se encuentran reprimidos en las plantas con niveles disminuidos de *AtCOX17-1* luego del tratamiento con NaCl, son inducidos en forma diferencial en las plantas *oeCOX17-1* y WT. La menor disminución en los niveles de clorofila es otro indicativo de que las plantas *oeCOX17-1* son menos sensibles al estrés. Si bien en condiciones control la sobreexpresión no modifica la eficiencia del fotosistema II (datos no mostrados), sería interesante evaluar la respiración en raíces y hojas de las plantas *oeCOX17* sometidas a estrés por NaCl para estudiar si durante el estrés la relación respiración/fotosíntesis se modifica respecto de las plantas WT. Si bien la bibliografía no encuentra acuerdo respecto del aumento de la respiración durante el estrés salino, la relación respiración/fotosíntesis sí se modifica como consecuencia de una disminución en la fijación de CO<sub>2</sub>. Si bien es claro que son necesarios más experimentos para determinar las causas de la menor sensibilidad al estrés en las plantas *oeCOX17-1*, estos resultados refuerzan los obtenidos a partir de las plantas *amiCOX17* y apoyan la hipótesis de la participación de las proteínas *AtCOX17* durante la respuesta a estrés en plantas.

---

---

## 7.4. CAPÍTULO 4.

## 7.4. CAPÍTULO IV.

### ESTUDIO DEL ROL DE LAS PROTEÍNAS ATCOX<sub>17</sub> Y ATCOX<sub>19</sub> EN LA HOMEOSTASIS DE METALES.

#### 7.4.1. INTRODUCCIÓN.

##### 7.4.1.1. LA ESENCIALIDAD DEL COBRE.

La incorporación del cobre en los procesos biológicos es un suceso reciente que solo fue posible cuando la atmósfera se convirtió en un ambiente oxidante (Crichton y Pierre, 2001). Esto permitió la solubilización del cobre en su forma Cu<sup>+1</sup> y coincidió con la organización multicelular, proceso en el cual el cobre es esencial por su participación en el entrecruzamiento de matrices extracelulares (Fraústo da Silva y Williams, 2001). De hecho, la aparición de la mayor parte de las proteínas que utilizan cobre ocurrió hace unos 1500 millones de años (Andreini y col., 2008; Ridge y col., 2008).

El cobre es un metal que presenta una gran capacidad para formar complejos de coordinación con moléculas orgánicas debido a su capacidad redox (Cuillel, 2009; Kaufman Katz y col., 2003). Esta característica lo ha convertido en un elemento esencial para el correcto desarrollo de diversos procesos biológicos (Bertini, 2007). En la Tabla 1 se clasifican distintas proteínas que utilizan cobre en *Arabidopsis* según la base de datos pública "CuAtDB"<sup>1</sup>.

De la localización de las proteínas que emplean cobre (Tabla 1) se deduce que este metal es importante en diversos procesos celulares. El cobre es necesario en la mitocondria para formar los centros Cu<sub>A</sub> y Cu<sub>B</sub> de las subunidades del CIV (Yoshikawa y col., 2012), en la red del *trans*-Golgi para abastecer a las proteínas secretoras de cobre (Polishchuk y Lutsenko, 2013), en el cloroplasto para abastecer de cobre a la plastocianina (Tapken y col., 2012) y dentro del citosol dado que actúa como cofactor de diversas cuproproteínas, fundamentalmente vinculadas a los procesos antioxidantes. Entre las mencionadas en la

---

<sup>1</sup> Para ver una lista detallada que incluye proteínas putativas, el número AGI y el acceso a la vía KEGG (de sus siglas en inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) consultar [CuAtDB](#) (página de la Universidad de Valencia)

Tabla 1, encontramos Cu/Zn-superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD), lacasas, ascorbato y amino oxidasas, plantacianinas y polifenol oxidasas. Además, el cobre participa en el metabolismo del etileno, dado que el receptor de etileno utiliza cobre como cofactor (Binder y col., 2010a). Se lo ha involucrado en el metabolismo de la pared celular, en la defensa contra patógenos y en la biosíntesis de molibdeno (Burkhead y col., 2009; Chen y col., 2014; Morrison y col., 2007; Poschenrieder y col., 2006). Finalmente, su participación en la regulación del metabolismo del hierro ha sido sugerida en diversos trabajos (Puig y col., 2007; Ravet y Pilon, 2013).

**Tabla I. Proteínas que emplean cobre en Arabidopsis.** La información se obtuvo de la base de datos CuAtDB.

Categoría	Subcategoría	Nombre de la proteíns	Localización celular
<b>1. Transportadores</b>	1.2. Familia COPT	COPT1-6	membrana plasmática
	1.3. ATPasas de Cu	HMA1, HMA5-8	membrana plasmática
	1.4. Familia ZIPs	ZIP2 y ZIP4	membrana plasmática
	1.5. Otros	YSL1-8, FRDR	membrana plasmática
<b>2. Cuprochaperonas</b>		ATX1, CCH, CCs	citósol
		COX17, HCC1	mitocondria
		NAKR2-3	cloroplasto
<b>3. Quelantes</b>	3.1. Metalotioneínas	MET1A-C, MET2A-B, MET3	citósol, Golgi
	3.2 Otras	NAS2-4, ITP/LEA	citósol, cloroplasto
<b>4. Blancos</b>	Receptor de etileno 1	ETR1	retículo endoplasmático
	Superóxido dismutasa	CSD1-3	citósol, cloroplasto, peroxisoma
	4.1 Cuprodoxinas		
	Plastocianina	PETE1-2	cloroplasto
	Plantacianina	ARPN	extracelular
4.2 Otras	SAG14, UCC3, ENOD11-22	cloroplasto	
<b>5. Citocromo c oxidasa</b>		COX1-3, COX6B2, COX10, COX19-1, COX19-2, CYTC-1, CYTC-2	mitocondria
		CCMH, TG1, PPR40, SBP1-2, SURF1, CCD1, ABCI2-5, CCB382, CCB452, CCB203, COB	mitocondria
		AO1, LDL3, PAO1-5	extracelular
<b>6. Diamino oxidasa</b>			
<b>7. Oxidasas multicobre</b>	7.1 Ascorbato oxidasas	APX1-6, sAPX, tAPX	extracelular
	7.2. Lacasas	LAC1-17	extracelular
	7.3 Otras	LPR1-3, SKS1-18, SKU5	extracelular
<b>8. Reguladores</b>	8.1. Familia SPL	SPL1, SPL7, SPL12	membrana plasmática
	8.2. miRNAs	MIR397A-b, MIR398A-C, MIR408, MIR857A	
<b>9. Reductasas</b>		FRO2, FRO4, FRO5	membrana plasmática

Sin embargo, existe una jerarquía de esencialidad en las proteínas de cobre dependiendo de cada organismo. En plantas superiores se ha propuesto que la inserción

de cobre en la plastocianina del cloroplasto es un proceso esencial, mientras que la inserción del metal en la enzima Cu/Zn-SOD no lo sería dado que esta podría ser reemplazada por la isoforma que utiliza hierro (Cohu y Pilon, 2007; Ravet y col., 2011). Para el caso de levaduras, la mutación en chaperonas de cobre asociadas al CIV genera un fenotipo de deficiencia respiratoria, similar al fenotipo observado en levaduras mutantes en transportadores de cobre (Cobine y col., 2006).

La configuración electrónica de este metal, que lo convierte en un elemento esencial en la formación de centros metálicos, también le proporciona una gran capacidad oxidante (citotóxica) (Cuillel, 2009). En los estados de oxidación  $\text{Cu}^{+1}$  y  $\text{Cu}^{+2}$ , que son los habituales en el entorno celular, el cobre es capaz de reaccionar con intermediarios del metabolismo aerobio como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y producir radicales hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$  y  $\text{OH}^{\cdot-}$ ) (Tottey y col., 2008). Además del efecto citotóxico asociado a la generación de EROs, el cobre puede reaccionar con los átomos de nitrógeno de las histidinas ( $\text{Cu}^{+1}$ ) o con los sulfuros de las cisteínas ( $\text{Cu}^{2+}$ ), alterando centros catalíticos o generando plegamientos defectuosos (Allen y col., 2013; Palm-Espling y col., 2012).

Esta dualidad de esencialidad y toxicidad del cobre ha hecho que los organismos, tanto procariotas como eucariotas, generen diversos mecanismos para regular la disponibilidad (adquisición y distribución) de este metal (Pilon, 2011). En plantas, los mecanismos involucrados en la homeostasis de cobre pueden distinguirse entre aquellos que regulan el transporte a larga distancia y aquellos que regulan el transporte a corta distancia. La regulación de la captación del metal a partir del suelo y su distribución hacia los tejidos aéreos a través de los haces conductores corresponde al primer grupo, mientras que los mecanismos que determinan la ubicación subcelular del cobre, principalmente a partir de la regulación de chaperonas de cobre que dirigen el metal a sus proteínas o complejos enzimáticos blanco, actúan en la regulación a corta distancia (Marschner, 2012).

#### 7.4.1.2. FENOTIPOS ASOCIADOS A LA DISPONIBILIDAD DE COBRE EN ARABIDOPSIS.

Los niveles óptimos de cobre endógeno en plantas dependen de la especie, del entorno medioambiental que las aloje y del estadio de desarrollo de la planta (Marschner,

2012). Para *Arabidopsis*, los niveles de cobre adecuados en el tejido vegetativo rondan los 6  $\mu\text{g/g}$  de peso seco. Niveles menores a 5  $\mu\text{g/g}$  producen síntomas de deficiencia (Merschner, 2002; Shikanai y col., 2003). Dichos síntomas incluyen una reducción general de la velocidad de crecimiento, clorosis en hojas jóvenes, aserramiento del margen de las hojas, daño del meristema apical (Puig y col., 2007; Shin y Yeh, 2012), producción de polen inviable y disminución en la producción y en la viabilidad de las semillas (Sancenon y col., 2004). Los síntomas de exceso de cobre en *Arabidopsis* se observan cuando los niveles de cobre son mayores a 20-30  $\mu\text{g/g}$  de peso seco (Burkhead y col., 2009). La alteración del crecimiento de la raíz es uno de los parámetros más sensibles al exceso moderado del metal. El exceso de cobre produce en raíces de *Arabidopsis* un acortamiento severo de la raíz principal y, en algunos casos, un aumento de la densidad de los pelos laterales (Andres-Colas y col., 2006). El cobre en concentraciones tóxicas genera un estrés oxidativo que puede traducirse en la disminución del tamaño de la planta, del área foliar y del contenido de clorofila (Küpper y col., 2003). Además, puede observarse clorosis, necrosis y coloración violeta de las hojas como consecuencia del incremento de la peroxidación lipídica (Drazkiewicz y col., 2004).

#### 7.4.1.3. DISTRIBUCIÓN DEL COBRE EN ARABIDOPSIS.

El cobre disponible en el suelo se encuentra como  $\text{Cu}^{2+}$  acompañado con moléculas orgánicas. El ingreso del cobre a la célula requiere la reducción del mismo a partir de la acción de bombas de protones de la familia de  $\text{H}^+$ -ATPasas AHA (de sus siglas en inglés *Arabidopsis H<sup>+</sup>-ATPase*) y de la familia de reductasas FRO (de sus siglas en inglés *Ferric Reductase Oxidase*) (Pilon, 2011). Una vez que el cobre es reducido, es movilizado en las células de la raíz gracias a la diferencia de potencial entre la rizósfera y la atmósfera. En *Arabidopsis*, dos miembros de la familia de transportadores COPT (de su nombre en inglés *Copper Transporter*), COPT<sub>1</sub> y COPT<sub>2</sub>, se han identificado como transportadores de membrana plasmática de alta afinidad para iones  $\text{Cu}^{+1}$ . Una vez que el  $\text{Cu}^{+1}$  es incorporado al simplasto puede alcanzar los tejidos aéreos a través de los haces conductores (Perea-García y col., 2013; Sancenon y col., 2004; Sancenon y col., 2003). La regulación de la

movilización de este metal hacia el tejido aéreo o su permanencia en el tejido subterráneo no ha sido muy estudiada.

La conducción del cobre entre células a través del floema estaría mediada por los transportadores pertenecientes a la familia YSL (de sus siglas en inglés *Yellow Stripe-Like*) mientras que el transporte a través del xilema dependería de la reductasa férrica FRD<sub>3</sub> (de sus siglas en inglés *Ferric Reductase Defective 3*) (Abdel-Ghany y col., 2005; Durrett y col., 2007; Krüger y col., 2002). El transporte del cobre en su configuración de Cu<sup>2+</sup> en el floema dependería de su asociación con aminoácidos modificados como las nicotianaminas (NAs) o con la proteína ITP (de sus siglas en inglés *Iron Transport Protein*).

Una vez adquirido del medio, la red homeostática del cobre deriva el transporte del metal a través de las membranas intracelulares y la cesión a las apo-cuproproteínas mencionadas en la Tabla 1. Dichas proteínas derivan el cobre a las enzimas blanco. Dado que la incorporación del cobre al interior celular es uno de los primeros pasos de la homeostasis del metal, los organismos cuentan con una amplia gama de transportadores que regulan los niveles de cobre intracelular. Las familias de transportadores de cobre se describen a continuación en el contexto de la regulación de la homeostasis de cobre.

#### 7.4.1.4. MECANISMOS MOLECULARES REGULATORIOS DE LA HOMEOSTASIS DE COBRE.

Las estrategias moleculares que permiten la regulación de la disponibilidad de cobre en plantas superiores pueden clasificarse en dos grupos. El primer grupo involucra la regulación de la expresión de proteínas transportadoras de cobre pertenecientes a las familias COPT, FRO e YSL, que determinan el ingreso de cobre a la célula. El segundo grupo involucra la relocalización del cobre intracelular en enzimas cuya función es irremplazable o vital para la planta mediante la expresión de microARNs (miARNs). En *Arabidopsis*, ambas vías están reguladas por el factor de transcripción SPL7 (de sus siglas en inglés *SQUAMOSA Promoter Binding Protein Like 7*) (García-Molina y col., 2014b; Yamasaki y col., 2009). SPL7 presenta un dominio SBP (de sus siglas en inglés *SQUAMOSA Promoter Binding Protein*) que une elementos CuRE (de sus siglas en inglés *Cu Responsive Elements*) que presentan la secuencia GTAC (Sommer y col., 2010). La interacción de los dominios SBP

con los elementos CuRE se demostró primero en *Chlamydomonas* (Kropat y col., 2005). En deficiencia de cobre, las proteínas SBP unen los elementos CuRE de la secuencia promotora del gen que codifica la proteína CYTC6 (del inglés *Cytochrome c6*) (Castruita y col., 2011). CYTC6 es una hemoproteína independiente de cobre que puede actuar en la cadena fotosintética en reemplazo de la plastocianina (Quinn y Merchant, 1995). Además, las plantas superiores no reemplazan la plastocianina pero disminuyen la expresión de cuproproteínas no esenciales como se describe más adelante (Abdel-Ghany, 2009; Wintz y col., 2003).

Recientemente se ha demostrado que SPL7 en *Arabidopsis* presentaría una localización dual entre el RE y el núcleo (García-Molina y col., 2014b). De acuerdo con esto, SPL7 se localizaría inicialmente en el sistema de endomembranas y se activaría durante la respuesta a estrés proveniente del RE como consecuencia de una deficiencia de cobre. Además, la interacción de SPL7 con los elementos CuRE estaría regulada por la disponibilidad de cobre en el medio. La presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$  inhibe la interacción proteína-ADN como consecuencia de la homodimerización de SPL7 (García-Molina y col., 2014b). Finalmente, la acción de SPL7 en el metabolismo de cobre requiere la participación de una proteína KIN17 asociada a la respuesta a estrés oxidativo, generándose una vía de convergencia entre la deficiencia de cobre y la respuesta a estrés oxidativo (García-Molina y col., 2014a).

#### 7.4.1.4.1. HOMEOSTASIS DE COBRE DEPENDIENTE DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS.

En *Arabidopsis*, cuatro familias de transportadores se han reportado como reguladores de la homeostasis de cobre: las familias de transportadores COPT, FRO, YSL y ZIP (de sus siglas en inglés *Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter Protein*) (Jain y col., 2014; Puig, 2014; Wintz y col., 2003). Si bien todos los genes de miembros de las familias de transportadores presentan elementos CuRE en sus secuencias promotoras, solo algunos de ellos serían regulados por SPL7 (DiDonato y col., 2004; Yamasaki y col., 2009). Los transportadores COPT han sido los más estudiados dado que se descubrieron por homología de secuencia con los transportadores CTR de *Saccharomyces* (Dancis y col.,

1994; Pena y col., 2000). Existen seis proteínas COPT (COPT1-6) caracterizadas en *Arabidopsis* (Sancenon y col., 2003). El estudio de mutantes de pérdida de función en cada uno de los respectivos genes ha permitido determinar funciones específicas para cada miembro de la familia en la distribución del metal (Puig, 2014). COPT1, el primer miembro caracterizado, participa en la captación del cobre a través de la raíz (Sancenon y col., 2004) y permite una conexión entre el transporte de cobre, el desarrollo de la planta y el reloj circadiano (Andres-Colas y col., 2010). El transportador COPT5 estaría involucrado en el transporte del cobre desde la raíz hacia los tejidos aéreos, permitiendo la movilización del mismo desde la vacuola de células de la raíz hacia la organela fotosintética en los tejidos aéreos (García-Molina y col., 2011; Klaumann y col., 2011). COPT6 permite la distribución del metal en los tejidos aéreos (García-Molina y col., 2013) mientras que COPT2 actuaría como un conector entre el metabolismo del cobre y el metabolismo del hierro (Perea-García y col., 2013).

Distintos estudios han demostrado que la familia de transportadores COPT presenta elevada afinidad por los iones  $\text{Cu}^{+1}$  ( $K_m = 1-5 \mu\text{M}$ ) pero no presenta afinidad por los iones  $\text{Cu}^{2+}$  (Hassett y Kosman, 1995; Lee y col., 2002; Sancenon y col., 2003). Consecuentemente, la actividad de los transportadores COPT debe estar íntimamente asociada a la actividad de las metalorreductasas de la familia FRO (Puig y col., 2007). En situaciones deficitarias del metal, SPL7 activa tanto la expresión de miembros de la familia COPT (COPT1, COPT2 y COPT6) (Jung y col., 2012; Yamasaki y col., 2009) como miembros de la familia FRO (FRO3, FRO4 y FRO5) (Bernal y col., 2012; Yamasaki y col., 2009) y de un miembro de la familia ZIP (ZIP2) (Yamasaki y col., 2009). Como se mencionó antes, este mecanismo permite el ingreso del cobre al citosol.

#### 7.4.1.4.2. HOMEOSTASIS DE COBRE DEPENDIENTE DE MICROARNs

Mediante herramientas bioinformáticas se han descrito diversos microARNs (ver Tabla I) que actuarían en la homeostasis de cobre en *Arabidopsis*, los denominados microARNs de cobre (Cu-microARNs) (Abdel-Ghany y Pilon, 2008; Sunkar y Zhu, 2004). Sin embargo, la regulación mediada por el microRNA398 (miR398) ha sido la más estudiada

(Beauclair y col., 2010; Yamasaki y col., 2007). En *Arabidopsis*, el miR398 es codificado por tres genes denominados *MIR398a*, *MIR398b* y *MIR398c*. Los miARNs producidos por *MIR398b* y *MIR398c* son idénticos y solo difieren en un nucleótido del producido por *MIR398a* (Yamasaki y col., 2007). El miR398 tiene cuatro genes blanco conservados en distintos ecotipos de *Arabidopsis*. Dos genes blanco corresponden a dos isoformas de la enzima Cu/Zn-SOD (*CSD1*; citosol) y *CSD2* (cloroplasto) (Juszczak y Baier, 2012). Los dos restantes corresponden a *COX5b* (subunidad del CIV en la mitocondria) y a la chaperona de cobre para *CSD1*, *CSD2* y *CSD3* (*CCS1*) (Beauclair y col., 2010; Yamasaki y col., 2007). Las enzimas Cu/Zn-SOD son importantes en el sistema de detoxificación dado que son capaces de convertir los aniones superóxido en peróxido de hidrogeno. El centro catalítico de las mismas requiere la formación de dos puentes disulfuro para la coordinación con un átomo de cobre (Markossian y Kurganov, 2003). *CCS1* participa tanto en la formación de los puentes disulfuro como en la inserción del cobre. Esta doble funcionalidad de *CCS1* podría explicar el requerimiento de glutatión reducido en el proceso de activación (Huang y col., 2012).

Las plantas superiores regulan la expresión del miR398 en función de los niveles de cobre disponibles. En situaciones deficitarias del metal, el factor de transcripción *SPL7* se une a un motivo CuRE de la región promotora de los genes *MIR398* activando la transcripción de los mismos. De esta forma, el miR398 dirige el clivaje y la inhibición traduccional de los miARNs de *CCS*, *CSD1* y *CSD2* (Yamasaki y col., 2009). De esta forma la expresión del miR398 puede inhibir tanto la traducción de *CSD1* como la activación de *CSD1* y *CSD2* mediada por *CCS1*. En forma coincidente con este modelo, las plantas mutantes en *SPL7* son sensibles a la deficiencia de cobre (Yamasaki y col., 2009). El fenotipo de las plantas mutantes en *MIR398a*, *MIR398b*, *MIR398c*, *CSD1* y *CSD2* en distintas condiciones de cobre no ha sido reportado. Por otro lado, la disminución en los niveles de *CSD1* sería compensada por el incremento de los niveles de la isoforma de hierro, Fe-SOD (*FSD1*) (Abdel-Ghany, 2009).

Además del miR398, dentro de los Cu-microARNs se ha demostrado que los miR408, miR397 y miR805 regulan la expresión de distintos genes que codifican lacasas y,

además, el miR408 regula la expresión de *ARPN* (*PLANTACYANIN*) (Abdel-Ghany y Pilon, 2008).

#### 7.4.1.5. HOMEOSTASIS DE COBRE Y METALOCHAPERONAS.

La función de distintos transportadores de metales, los fenotipos asociados a su deficiencia o exceso y la dinámica de la interacción han sido ampliamente estudiados en bacterias, levaduras, células de mamíferos e incluso en *Arabidopsis* (Jordan y col., 2000; Llanos y Mercer, 2002; Robinson y Winge, 2010). Sin embargo, la consecuencia de la falta de las metalochaperonas de cobre encargadas de definir el destino final del metal ha sido poco explorada, si bien se ha propuesto que actuarían definiendo los niveles intracelulares de cobre (Pang y col., 2013). La principal vía de transporte de cobre para *CSD1* está mediada por la chaperona de cobre *CCS1*, mientras que *ATX1* media el transporte de cobre a cuproproteínas involucradas en la vía secretoria del *trans*-Golgi o localizadas en plástidos mediante la transferencia a proteínas de la familia de ATPasas de tipo P (Robinson y Winge, 2010). La delección del gen de la metalochaperona *ATX1* en células de mamífero deriva en el incremento de los niveles intracelulares de cobre y en la sobreexpresión del transportador de cobre *ATP7A* del *trans*-Golgi. Se ha postulado que *ATX1* participaría, no solo en el tráfico de cobre, sino también en el almacenamiento del cobre lábil, la modificación de la transcripción y la defensa antioxidante mediada por glutatión (Hatori y Lutsenko, 2013). La ATPasa de tipo P *RAN1* transfiere el cobre a la vía secretoria para que luego sea incorporado en cuproproteínas como el receptor de etileno mientras que *PAA1* permite la incorporación del cobre citosólico al cloroplasto (Binder y col., 2010b; Shikanai y col., 2003b). Cómo ocurre la transferencia del cobre hacia las cuproproteínas mitocondriales aún no ha sido determinado.

Como se mencionó en capítulos anteriores, se cree que en la mitocondria existe un reservorio de cobre encargado de abastecer los centros metálicos del CIV (Cobine y col., 2004). Esta idea es consistente con el hecho de que las metalochaperonas de cobre mitocondriales cumplirían su función cuando se las restringe al IMS y no actuarían como transportadores de cobre desde el citosol al interior mitocondrial (Maxfield y col., 2004).

Sin embargo, evidencias obtenidas en mamíferos sugieren que debe existir una conexión entre los niveles de cobre del citosol y las metalochaperonas de cobre de la mitocondria (Hatori y Lutsenko, 2013; Leary y col., 2013). En forma similar a lo observado para ATX1 en mamíferos, la metalochaperona de cobre COX19 actuaría en el citosol para regular la expresión de ATP7A en condiciones de deficiencia de cobre (Leary y col., 2013). El hecho de que el transporte de COX19 mediado por MIA40 esté regulado por los niveles de glutatión sugiere una función en la defensa antioxidante asociada a la disponibilidad de cobre (Fischer y col., 2013). Estos antecedentes sugieren que la función de las metalochaperonas, más allá de su participación en el tráfico de cobre, influye sobre la actividad de distintos reguladores de metales, los niveles de cobre en el medio y los sistemas biológicos de defensa.

En función de los resultados obtenidos en levaduras y mamíferos y habiéndose explorado gran parte de la red homeostática del cobre en Arabidopsis queda la pregunta de cómo se integra la actividad mitocondrial en esta red. Entonces nos preguntamos si las metalochaperonas mitocondriales AtCOX17 y AtCOX19 estarían involucradas en la homeostasis de cobre.

---

#### 7.4.2. RESULTADOS

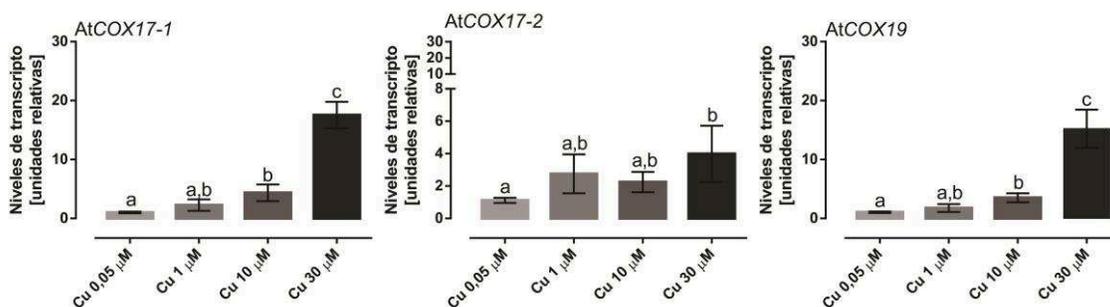
##### PARTE A

##### 7.4.2.1. LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ATCOX17 Y ATCOX19 SON REGULADOS POR CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE COBRE.

Antes de comenzar con el estudio de la influencia de AtCOX17 y AtCOX19 en la homeostasis de cobre nos pareció necesario determinar si los niveles de cobre modifican la expresión de AtCOX17 o de AtCOX19. Los ensayos mostrados en el capítulo III de esta Tesis indican que AtCOX17-1 y AtCOX17-2 se inducen en presencia de CuSO<sub>4</sub> 30 µM. Dado que esta condición se ha reportado como una concentración que genera estrés oxidativo, evaluamos la expresión en concentraciones menores de cobre con el objetivo de analizar cambios relacionados con los niveles fisiológicos de cobre y con la existencia de condiciones de estrés. La concentración óptima de cobre en la planta varía entre 5 y 20-30 µg/g de peso seco. Se definen tres niveles de cobre basados en dichos rangos: deficiencia

(< 5  $\mu\text{g/g}$ ), suficiencia (5-20  $\mu\text{g/g}$ ) y exceso (> 20-30  $\mu\text{g/g}$ ). La literatura consultada reporta que el medio estándar de crecimiento para *Arabidopsis* (MS 0,5x), que contiene  $\text{CuSO}_4$  0,05  $\mu\text{M}$ , genera una situación deficitaria del metal (~ 4  $\mu\text{g/g}$ ) mientras que el crecimiento en medio MS 0,5x suplementado con  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{M}$  produce una situación de exceso del metal (~ 30  $\mu\text{g/g}$ ). Sin embargo, en ambas condiciones de crecimiento no se observan alteraciones por deficiencia o toxicidad del metal en plantas de *Arabidopsis* (Nuria Andrés Colás, 2010). En base a esto, se evaluó la expresión de los genes de interés en plantas crecidas durante 8 días en el medio estándar de crecimiento para *Arabidopsis* (MS 0,5x) y el mismo medio suplementado con  $\text{CuSO}_4$  1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ . En coincidencia con reportes previos, no se observaron diferencias en los niveles de clorofila y en el peso seco de plantas crecidas en  $\text{CuSO}_4$  0,05  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . Superados los 10  $\mu\text{M}$  de cobre en el medio de crecimiento las plantas disminuyeron el peso seco y los niveles de clorofila (resultados no mostrados).

Como puede observarse en la Figura 1, la mayor inducción en la expresión de *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* y *AtCOX19* se observó a la concentración tóxica de cobre ( $\text{CuSO}_4$  30  $\mu\text{M}$ ). Además, se observaron diferencias significativas en la expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX19* en presencia de  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{M}$  (Figura 1). En la condición de  $\text{CuSO}_4$  1  $\mu\text{M}$ , si bien se observó una tendencia al incremento de la expresión de los tres genes evaluados, no se obtuvieron diferencias significativas.



**Figura 1. Expresión de *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* y *AtCOX19* en plantas crecidas en distintas concentraciones de cobre.** Los niveles de expresión de los genes de interés fueron evaluados en plantas crecidas durante 8 días en placas de Petri con medio MS 0,5x (Cu 0,05  $\mu\text{M}$ ) o con medio MS 0,5x suplementado con  $\text{CuSO}_4$  1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  o 30  $\mu\text{M}$ . Los niveles de expresión fueron medidos mediante RT-qPCR y se expresan en unidades relativas respecto de la expresión de cada gen en la condición de  $\text{CuSO}_4$  0,05  $\mu\text{M}$ . Las barras de error representan la SD obtenida de seis muestras en cada condición y en dos experimentos

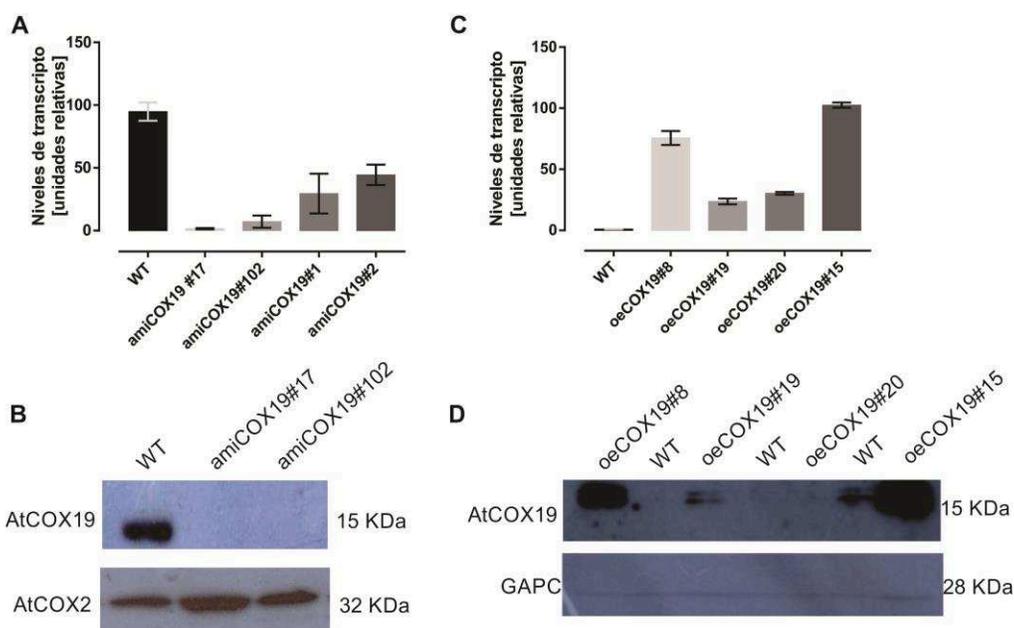
independientes. Las columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Tukey para comparaciones múltiples).

Los resultados obtenidos indican que la expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX19* se modifica en función de los niveles de cobre incluso cuando este se encuentra en concentraciones que no generan un estrés en plantas de *Arabidopsis*. La expresión de *AtCOX17-2* no sería sensible a modificaciones en la disponibilidad de cobre dentro del rango de tolerancia fisiológica de cobre evaluado para *Arabidopsis*. La inspección de los niveles de expresión de *AtCOX17-2* en bases de datos de microarreglos indica que la expresión de este gen se encontraría disminuida en plantas de *Arabidopsis* crecidas en medio MS 0,5x suplementado con  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{M}$  durante 8 días respecto de plantas crecidas en medio MS 0,5x. Durante la búsqueda en bases de microarreglos advertimos que la expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* se encuentra inducida en las plantas mutantes en el factor de transcripción *SPL7* en condiciones control. Dado que *SPL7* es uno de los principales reguladores de las respuestas a la disponibilidad de cobre, la modificación de la expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* resulta otra evidencia de la posible participación de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en el metabolismo de cobre.

#### 7.4.2.2 CAMBIOS EN LOS NIVELES DE *ATCOX17* Y *ATCOX19* MODIFICAN LA HOMEOSTASIS DE COBRE EN *ARABIDOPSIS*.

Con el objetivo de evaluar la influencia de *AtCOX17* y *AtCOX19* en la homeostasis de cobre se estudiaron plantas con niveles alterados de estas chaperonas. Las plantas con niveles alterados de *AtCOX17* fueron presentadas en el capítulo II de esta Tesis. Para obtener plantas con niveles disminuidos de *AtCOX19* se recurrió a una estrategia similar a la empleada para *AtCOX17*. En esta oportunidad, se diseñaron amiARNs que permitieron silenciar *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2* de manera simultánea, dado que ambos genes tienen secuencias casi idénticas. Como puede observarse (Figura 2A), esta estrategia permitió obtener plantas silenciadas (*amiCOX19*) con niveles de expresión de *AtCOX19* menores al 50% respecto de plantas WT. Si bien pudo detectarse el transcripto de *AtCOX19* en las plantas *amiCOX19*, los niveles de proteína *AtCOX19* medidos mediante Western fueron

prácticamente indetectables (Figura 2B). La obtención de plantas con mayores niveles de *AtCOX19* se logró mediante la expresión de la secuencia codificante de *AtCOX19-1* (ver Materiales y Métodos 6.2.9) bajo el control del promotor *35SCaMV*. En la figura 2C-D se muestran los niveles de transcripto y proteína de *AtCOX19* en plantas que sobreexpresan *AtCOX19-1* (*oeCOX19*). Como puede observarse, los niveles de transcripto se correlacionan con los niveles de proteína en las líneas *oeCOX19#8* y *oeCOX19#15*. En las líneas *oeCOX19#19* y *oeCOX19#20* no se observó un aumento en los niveles de proteína comparable con los niveles de transcripto obtenidos.

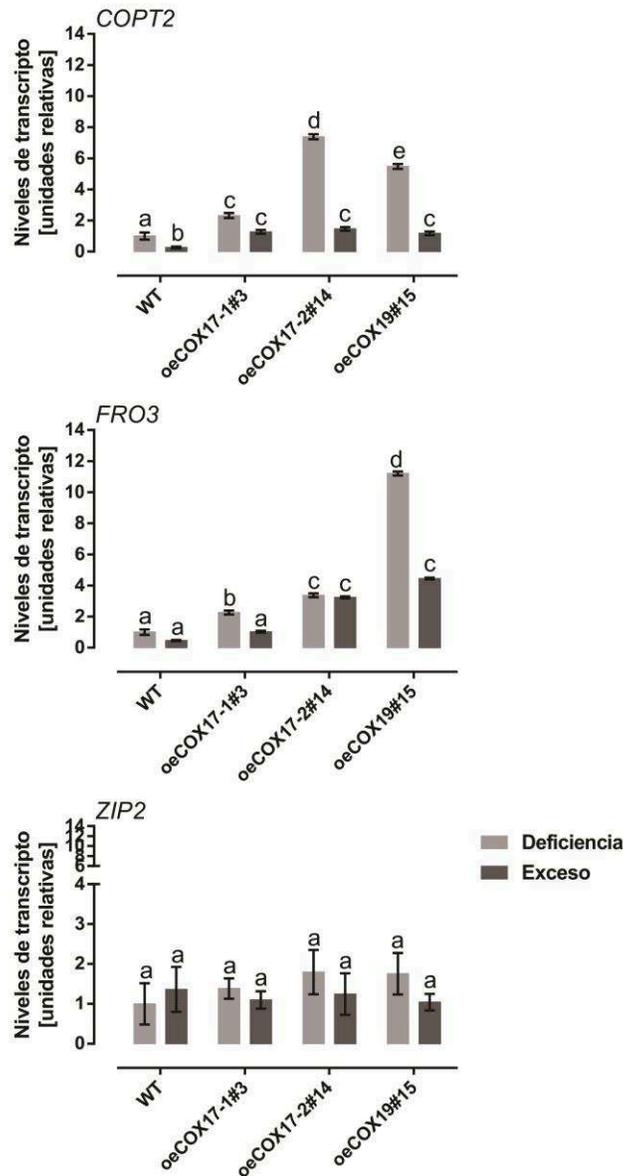


**Figura 2. Niveles de transcripto y de proteína *AtCOX19* en plantas *amiCOX19* y *oeCOX19*.** **A.** Niveles de transcripto en plantas *amiCOX19* crecidas en medio MS 0,5x durante 8 días. **B.** Niveles de proteína *AtCOX19* en extractos obtenidos a partir plantas WT y *amiCOX19* crecidas durante 10 días en tierra. **C.** Niveles de transcripto de *AtCOX19* en plantas WT y *oeCOX19* crecidas durante 15 días en tierra. **D.** Niveles de proteína *AtCOX19* en plantas WT y *oeCOX19* crecidas en tierra durante 15 días. Los niveles de transcripto fueron medidos mediante RT-qPCR. Los resultados se expresan en unidades relativas considerando la línea con mayor expresión como el 100%. Los niveles de proteína fueron medidos mediante Western blot con un anticuerpo preparado contra *AtCOX19-1*.

En las plantas obtenidas se evaluó la expresión de un miembro de cada una de las familias de transportadores de *Arabidopsis* relacionados con la adquisición de cobre en la

raíz. Concretamente, se cuantificó la expresión de *COPT2*, *FRO3* y *ZIP2* en raíces de plantas crecidas durante 8 días en distintas concentraciones de cobre.

Como puede observarse (Figura 3), las raíces de plantas *oeCOX17* y *oeCOX19* presentan mayores niveles de expresión de *COPT2* y *FRO3* respecto de plantas WT en MS 0,5X (Figura 3). En presencia de cobre 10  $\mu$ M, los niveles de expresión de *COPT2* son también mayores que en plantas WT para todos los genotipos estudiados, mientras que los niveles de *FRO3* son mayores solo en plantas *oeCOX17-2* y *oeCOX19* (Figura 3). Los niveles de *ZIP2* fueron similares en todos los genotipos y condiciones estudiados (Figura 3). Si bien la sobreexpresión de *AtCOX19* o de *AtCOX17* modifica la expresión de genes que codifican proteínas transportadoras, el silenciamiento de los genes *AtCOX17* o *AtCOX19* no produce cambios en la expresión de estos genes respecto de plantas WT (resultados no mostrados).



**Figura 3. Expresión de *COPT2*, *FRO3* y *ZIP2* en plantas *oeCOX17-1*, *oeCOX17-2* y *oeCOX19*.** Los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas transportadoras fueron medidos mediante RT-qPCR. Las muestras de ARN se obtuvieron a partir de raíces de plantas crecidas durante 8 días en medio MS 0,5x (Deficiencia) o en medio MS 0,5x suplementado con CuSO<sub>4</sub> 10 μM (Exceso). Las barras de error representan la SD obtenida a partir de seis muestras para cada genotipo. El experimento se repitió dos veces. Diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0,05, ANOVA; prueba de Mann-Whitney para comparaciones múltiples en distribución no paramétrica).

Con el objetivo de evaluar la expresión del miR398, se realizaron cruces de las plantas con niveles alterados de AtCOX17 o AtCOX19 con plantas que expresan el gen reportero *GUS* bajo el control del promotor del gen *MIR398b* (*pMIR398b*). Posteriormente,

se analizó la expresión del gen reportero en las cruzas obtenidas mediante detección histoquímica de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, codificada por el gen *GUS* (Jefferson y col., 1987). En primer lugar se analizó el patrón de expresión de *GUS* generado por la sobreexpresión de *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* o *AtCOX19*. La tinción obtenida indica que la expresión de *MIR398b* se encuentra inducida en plantas *oeCOX17* y *oeCOX19* cuando son crecidas en medio MS 0,5x durante 8 días (Figura 4). En las cruzas con plantas *oeCOX17* la tinción se observa en cotiledones, mientras que en las cruzas con plantas *oeCOX19* la tinción se observa tanto en cotiledones como en el primer par de hojas verdaderas. En la planta control (*pMIR398*) solo se observa tinción en las nervaduras de los cotiledones. La expresión de *GUS* fue cuantificada mediante un ensayo fluorométrico (Figura 4B). Este ensayo mostró diferencias significativas en la expresión de *GUS* en plantas *oeCOX19* y *oeCOX17-2* respecto de plantas WT. Sin embargo, para plantas *oeCOX17-1* no se obtuvieron diferencias significativas.

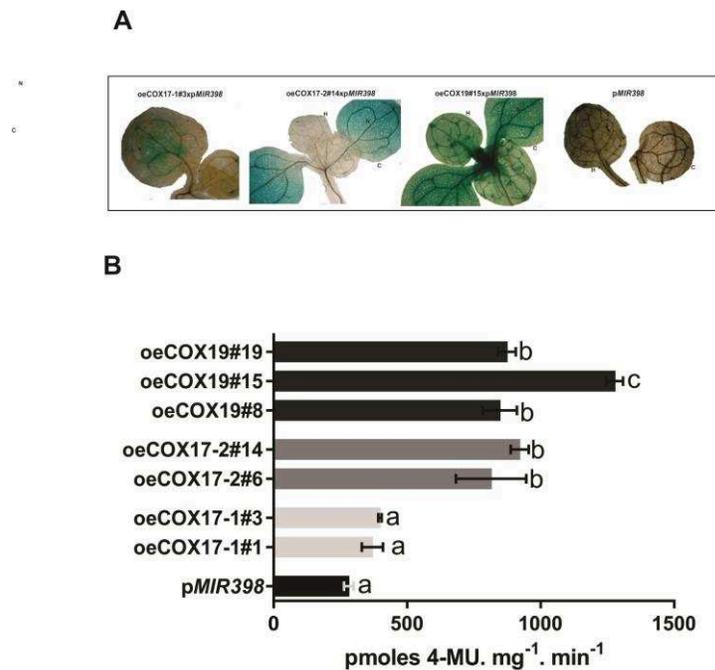


Figura 4. Actividad *GUS* en plantas *oeCOX17-1*, *oeCOX17-2* y *oeCOX19* cruzadas con plantas que expresan el gen *GUS* bajo el control del promotor de *MIR398b*. **A**. Las plantas fueron crecidas en medio MS 0,5x durante 8 días y luego incubadas durante 30 minutos con el sustrato de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. H; primer par de hojas. C; cotiledones. **B**. Se determinó la actividad *GUS* en extractos proteicos de plantas *oeCOX17* y *oeCOX19* cruzadas con plantas que expresan el gen *GUS* bajo el control del promotor de *MIR398b*

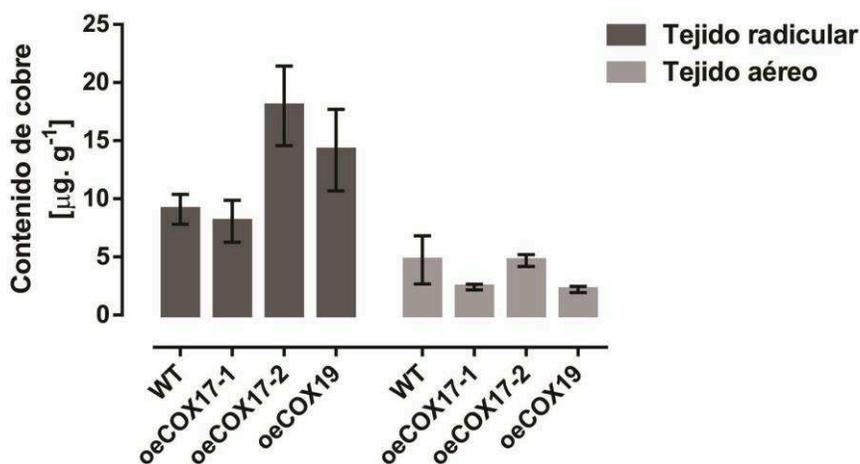
(p*MIR398*). Los valores de actividad se expresan en pmol 4-MU. mg<sup>-1</sup>. min<sup>-1</sup>. Las barras de error representan la SD de tres mediciones independientes. Los columnas con diferentes letras implican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; prueba de Mann-Whitney para comparaciones múltiples en distribución no paramétrica).

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el aumento en los niveles de AtCOX17 o de AtCOX19 altera la expresión de genes involucrados en la homeostasis de cobre en Arabidopsis, produciendo un estado de deficiencia del metal.

En vista de estos resultados nos preguntamos si el cambio en la expresión de los genes de transportadores y *MIR398* es consecuencia o no de un cambio en el contenido de cobre total. Es decir, nos preguntamos si la alteración de los niveles de las chaperonas modifica el contenido de cobre total o solo altera la percepción de los niveles del mismo.

#### 7.4.2.3. EL AUMENTO DE LOS NIVELES DE ATCOX17-2 Y ATCOX19 MODIFICA EL CONTENIDO DE COBRE TOTAL EN RAÍCES DE ARABIDOPSIS.

Con el objetivo de cuantificar el contenido de cobre total en plantas con niveles alterados de AtCOX17 o AtCOX19 se recurrió a la técnica de absorción atómica de llama en cámara de grafito. Se emplearon plantas crecidas durante 8 días en MS 0,5X. Como puede observarse (Figura 5), la sobreexpresión de AtCOX17-1 no produce cambios en el contenido de cobre en el tejido radicular ni en el tejido aéreo. Sin embargo, las plantas oeCOX17-2 y oeCOX19 presentan mayores niveles de cobre total en el tejido radicular pero no modifican el contenido de cobre en el tejido aéreo (Figura 5).



**Figura 5. Contenido de cobre en plantas oeCOX17-1, oeCOX17-2 y oeCOX19.** El contenido de cobre fue medido por espectroscopía de absorción atómica en cámara de grafito en raíces y tejido aéreo de plantas crecidas durante 8 días en placas con medio MS 0,5x. Las barras de error representan la SD de medidas realizadas por triplicado. Las muestras se normalizaron en función del peso seco.

El aumento en los niveles de cobre en la raíz de plantas oeCOX17-2 y oeCOX19 y el incremento de los niveles de expresión de genes que codifican proteínas transportadoras de metales indicarían que el aumento de los niveles de AtCOX17-2 y AtCOX19 genera un estado deficitario de cobre que encuentra como respuesta la activación de COPT2 y FRO3 como mecanismo de ingreso del metal. Si se comparan los niveles de expresión de COPT2 entre plantas oeCOX19, oeCOX17-1 y oeCOX17-2, los mismos son significativamente mayores en las plantas oeCOX17-2 y oeCOX19 (Figura 3). Este incremento diferencial podría explicar el mayor contenido de cobre en las raíces de las plantas oeCOX17-2 y oeCOX19 respecto de las plantas oeCOX17-1, para las cuales la expresión de COPT2 también es mayor si se compara con la planta WT pero es menor comparada con la expresión en las plantas oeCOX19 y oeCOX17-2 (Figura 3). Dado que el contenido de cobre no se modifica en la parte aérea pero sí se observó inducción de MIR398 en esta región, podríamos pensar que estas plantas presentan una alteración en los mecanismos de distribución del cobre hacia los tejidos aéreos. Sería interesante evaluar la expresión de COPT6, como principal transportador de cobre entre raíces y tejido aéreo, y de COPT1, que es el principal transportador de cobre en células de raíz. Por otra parte, la inducción de MIR398 podría no estar estrictamente relacionada con el metabolismo de cobre. Se ha demostrado que la expresión de este gen es regulada por diversos factores ambientales y no solo por la disponibilidad de cobre en el medio en plantas (Zhu y col., 2011). La expresión de MIR398 es reprimida durante la infección de hojas de Arabidopsis con *Pseudomonas syringae* avirulenta y luego del tratamiento con el herbicida paraquat, mientras que la misma se incrementa luego del estrés causado por tratamiento con ozono, NaCl o calor (Guan y col., 2013; Jagadeeswaran y col., 2009). Curiosamente, no existe siempre una correlación negativa entre los niveles de CSD1 o CSD2 y la expresión del miR398 luego de un estrés abiótico (Jagadeeswaran y col., 2009). En las plantas oeCOX17

y *oeCOX19* no hemos podido detectar una disminución significativa de los niveles de expresión de *CSD1* (datos no mostrados). Finalmente, el contenido de cobre en las plantas *oeCOX19* en tejido aéreo muestra una tendencia a la disminución. Tal vez la técnica empleada no permite la detección del cambio en el contenido de cobre entre plantas WT y *oeCOX19* en el tejido aéreo.

Los resultados obtenidos indicarían que el incremento en los niveles de *AtCOX19* o *AtCOX17-2* modifica el contenido y posiblemente la distribución del cobre en plantas de *Arabidopsis*. El incremento en la expresión de *AtCOX17-1* no tendría un efecto en el contenido de cobre.

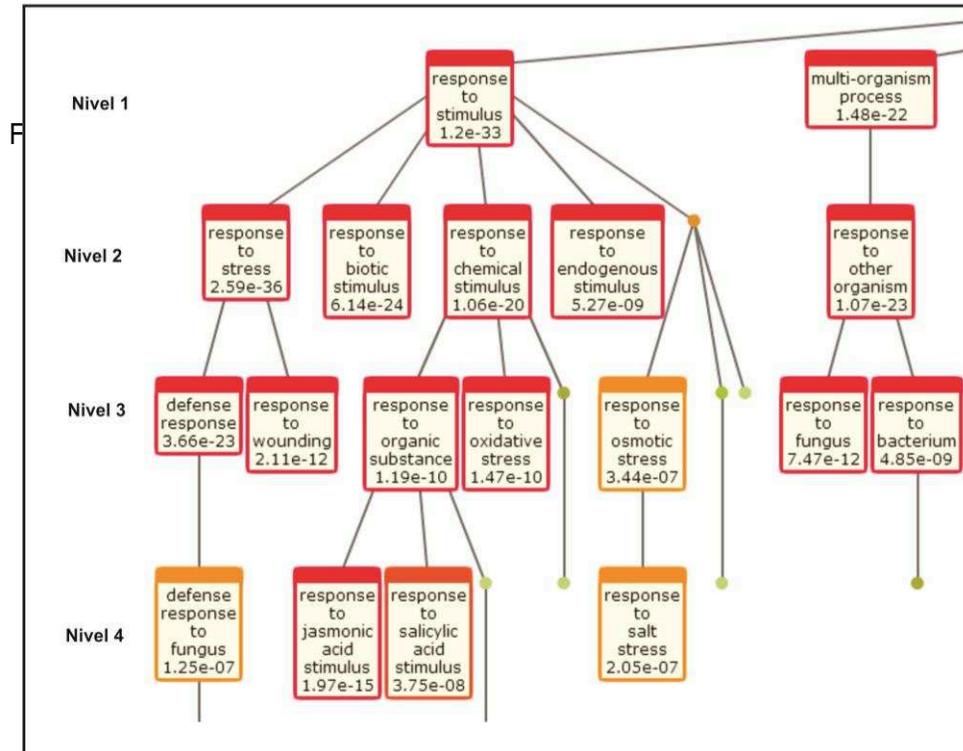
No pudieron obtenerse resultados respecto de la expresión de *MIR398b* o el contenido de cobre en raíces y parte aérea de las plantas *amiCOX17* y *amiCOX19*. Resultados preliminares obtenidos en plantas completas indicarían que el contenido de cobre no difiere de manera significativa en estas plantas respecto del observado en plantas WT. La expresión de *MIR398b* estaría disminuida, en coincidencia con un incremento en la expresión de *CSD1*. La expresión de los transportadores de cobre no estaría alterada. Se requieren más estudios para confirmar estos resultados.

PARTE B

7.4.2.4. EL SILENCIAMIENTO DE *ATCOX19* MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES QUE RESPONDEN A LA DEFICIENCIA DE HIERRO Y A PATÓGENOS.

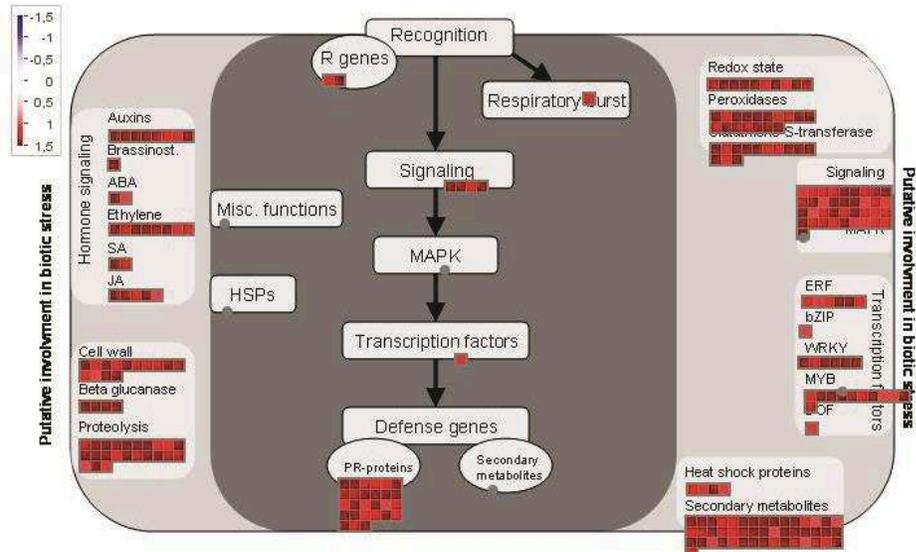
En función de los resultados obtenidos para *AtCOX19*, decidimos realizar un análisis global de la expresión en plantas *amiCOX19* con el objetivo de profundizar en el estudio del rol de esta proteína en plantas.

El silenciamiento de *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2* modifica la expresión de 889 genes, de los cuales 737 se encuentran regulados positivamente mientras que 152 son regulados negativamente. La categorización de los genes en función de los términos GO asociados a los procesos biológicos indica que la disminución de los niveles de *AtCOX19* regula de manera positiva genes involucrados en las categorías de respuesta a estímulo y procesos asociados a la interacción con otros organismos (Figura 9A, nivel 1). Dentro de la categoría de respuesta a estímulo se observa un enriquecimiento en genes de respuesta a estrés, respuesta a estímulo biótico, respuesta a estímulo químico y respuesta a estímulo endógeno (Figura 9, nivel 2). Finalmente, estas categorías derivan en el enriquecimiento de genes que integran las categorías de respuesta defensiva, respuesta a daño y respuesta mediada por ácido jasmónico (Figura 9, niveles 3 y 4).



**Figura 9. Términos GO enriquecidos en el grupo de genes inducidos en las plantas amiCOX19.** Los términos GO enriquecidos se muestran en un árbol cuyas ramas (Niveles) se ordenan según la significancia estadística. El árbol se realizó con herramientas del sitio Virtual Plant. Los círculos llenos indican significancias menores a  $1 \times 10^{-7}$ .

Dentro de la categoría de interacción con otros organismos, se observa un enriquecimiento en genes asociados a la respuesta a hongos y a bacterias. Si se agrupan los genes según las vías metabólicas asociadas al estrés biótico, genes de proteínas de defensa (*PATHOGENESIS RELATED; PR*) y genes que participan en la señalización de patógenos bacterianos avirulentos (*AVRRPT1/2-INDUCED; AIG1* y *AIG2*) se encuentran representados (Figura 10). No es posible diferenciar si la respuesta es contra patógenos biótrofos o necrótrofos. Sin embargo, cuando se comparan todos los genes inducidos en las plantas amiCOX19 correspondientes a estrés biótico con los genes regulados en distintos tratamientos con patógenos, la respuesta a hongos parecería estar más representada. Si se categoriza a los genes considerando la función molecular, se destacan las actividades glutatión transferasa y peroxidasa y genes asociados a la unión de hierro y de grupos hemo.



**Figura 10.** Mapa de la distribución de los genes involucrados en distintas vías que participan en la respuesta a estrés biótico y cuya expresión está inducida en plantas amiCOX19. El mapa fue realizado con el programa MapMan.

Con respecto a los genes reprimidos en las plantas amiCOX19, no fue posible agrupar los genes según procesos biológicos considerando la misma significancia que para los genes inducidos. El agrupamiento según las categorías funcionales descritas por el MIPS sugiere que las categorías enriquecidas están vinculadas a la respuesta a estímulos externos y al desarrollo embrionario (Tabla 1).

Término	Fo	Fe	valor p
cellular sensing and response to external stimulus	15,50%	4,90%	6,15E-05
embryonal development	6,80%	1,00%	8,39E-05
plant development	9,90%	2,50%	0,000167
cold shock response	5%	0,60%	0,000223
chemoperception and response	9,90%	2,90%	0,000582
temperature perception and response	5,60%	0,90%	0,000582
abscisic acid response	4,30%	0,60%	0,00109
DEVELOPMENT (Systemic)	9,90%	3,10%	0,00109
plant / fungal specific systemic sensing and response	8,10%	2,20%	0,0014
plant hormonal regulation	7,50%	2,00%	0,00191
nucleus	16,80%	8,20%	0,00417
response to biotic stimulus	4,30%	0,80%	0,00534
metabolism of secondary products derived from L-methionine	1,90%	0,10%	0,00632
auxin response	4,30%	0,90%	0,00632
nucleus	9,90%	3,90%	0,00632
organization of chromosome structure	9,90%	3,90%	0,00632
water response	3,10%	0,40%	0,00724
DNA conformation modification (e.g. chromatin)	9,30%	3,70%	0,0081
lipid/fatty acid transport	3,10%	0,50%	0,0081
stress response	8,10%	3,00%	0,00884
disease, virulence and defense	5,60%	1,60%	0,00884
DNA restriction or modification	9,30%	3,80%	0,00932

**Tabla 1. Términos GO enriquecidos en el grupo de genes reprimidos en las plantas amiCOX19.** Los términos GO enriquecidos se muestran ordenados según la mayor significancia estadística. Las frecuencias se muestran como porcentajes de genes totales. Se muestran la frecuencia observada (Fo) y la frecuencia esperada (Fe). Las frecuencias y las significancias fueron obtenidas con el programa libre PageMan.

#### 7.4.2.5. LA DISMINUCIÓN DE ATCOX19 MODIFICA EL METABOLISMO DEL HIERRO.

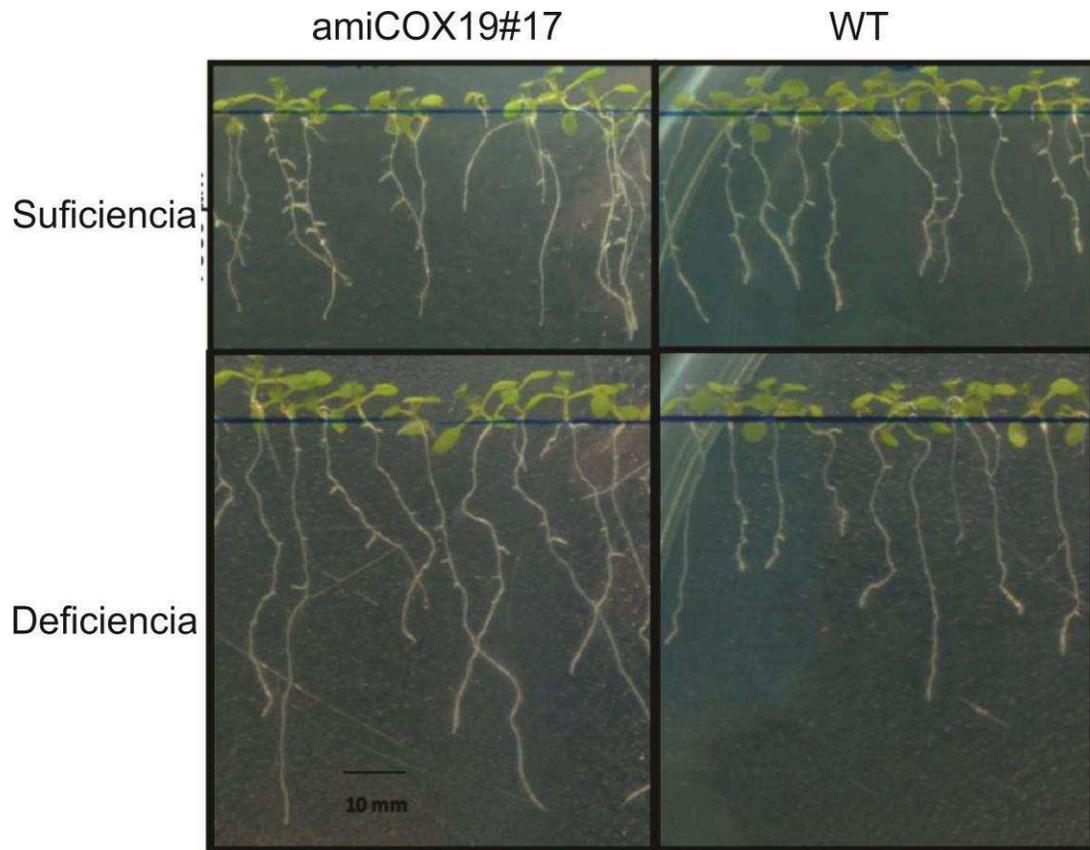
La comparación jerárquica de los genes inducidos en las plantas amiCOX19 contra todos los tratamientos disponibles en la base de datos GENEVESTIGATOR muestra similitud con el perfil transcripcional de plantas infectadas con distintos patógenos, plantas crecidas en deficiencia de hierro, deficiencia de nitrógeno y deficiencia de fósforo y plantas tratadas con frío o a las que se les ha aplicado un daño. Curiosamente, el metabolismo del cobre no parece estar modificado en las plantas amiCOX19. Sin embargo, sí habría una inducción de genes que participan en la homeostasis de hierro. La

idea de un rol de AtCOX19 en la homeostasis de distintos metales tendría lógica más allá de su función putativa en el transporte de cobre hacia las subunidades de COX. En relación con esto, se ha sugerido una posible función de la metalochaperona COX19 en el transporte de metales en levaduras (Noctor y col., 2004; Rigby y col., 2007) y la existencia de interacciones entre los metabolismos de cobre y de hierro ha sido descrita en levaduras, algas y mamíferos y estudios recientes proponen una regulación similar en plantas superiores (Perea-García y col., 2013; Puig y col., 2007; Waters y col., 2012). Dentro de los genes que se incluyen en la categoría de unión a hierro o al grupo hemo se observan genes que participan en la homeostasis de este metal (Tabla 2). Entre los genes inducidos en las plantas *amiCOX19* cuya participación en la homeostasis de hierro está demostrada encontramos cuatro miembros del clado Ib de la familia bHLH: *bHLH038*, *bHLH039*, *bHLH100* y *bHLH101*. Estos genes se inducen ante una deficiencia de hierro y de manera independiente de *FER-LIKE FE DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT)* (Colangelo y Guerinot, 2004), uno de los principales reguladores de las respuestas a deficiencia de hierro. Los genes *ORG1* y *NAS4* son necesarios durante el déficit de hierro en *Arabidopsis* (Koen y col., 2013; Sivitz y col., 2012) y se encuentran inducidos en las plantas *amiCOX19*. Llamativamente, *ORG1* y *NAS4* tampoco responden a la vía regulada por *FIT* pero serían regulados por *bHLH100* o *bHLH101* (Sivitz y col., 2012; Brumbarova y col., 2015). Curiosamente, el 24% (23/97) de un grupo de genes que se inducen en deficiencia del metal y cuya respuesta a hierro está desregulada en las plantas mutantes *bhlh100/bhlh101* se encuentran inducidos en las plantas *amiCOX19*. Sin embargo, de este grupo de genes solo encontramos un miembro cuya función ha sido demostrada en el metabolismo del hierro (*CYP82C3*). Finalmente, la expresión de dos de los genes que actúan de manera concertada con *FIT* (Yuan y col., 2008) y son necesarios para la regulación mediada por este factor de transcripción, *ETHYLENE INSENSITIVE3* y *ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1* (Lingam y col., 2011), no se encuentra alterada en las plantas *amiCOX19*. Las vías controladas por *BRUTUS (BTS)* y *POPEYE (PYE)* tampoco estarían modificadas en las plantas *amiCOX19* (Long y col., 2010).

ID	Nombre del gen	logFC	valor p
AT5G53450	ORG1	1,45871699	1,38883E-08
AT1G56430	NAS4	2,09310608	4,91173E-07
AT5G04150	bHLH101	2,54213918	3,17246E-06
AT3G56970	bHLH038	5,18616081	1,30141E-05
AT3G56980	bHLH039	2,86664787	8,98947E-05
AT2G41240	bHLH100	3,97810699	0,000429182

**Tabla 2.** Genes que son inducidos en deficiencia de hierro en plantas WT y se hallan inducidos en plantas *amiCOX19*. Se muestran los niveles de expresión (logFC) en plantas *amiCOX19*#17 crecidas en condiciones control.

Nos preguntamos si los cambios de expresión observados eran suficientes para alterar la respuesta al hierro en plantas *amiCOX19*. Para evaluar la homeostasis de hierro, crecimos las plantas en condiciones deficitarias y de suficiencia del metal y evaluamos la longitud de la raíz principal. Como puede observarse (Figura 11), las plantas *amiCOX19* presentan raíces más largas cuando son crecidas en un medio sin el agregado de hierro ( $72,25 \pm 14,72$  mm vs.  $51,07 \pm 13,69$  mm, Figura 6, Anexo III). Se ha reportado para *Arabidopsis* que condiciones moderadas de deficiencia de hierro provocan el incremento de la longitud de la raíz, mientras que en deficiencias severas de este metal se produce un acortamiento brusco, así como también reducción de la parte aérea (Gruber et. al., 2013). Estos resultados nos permiten concluir que en las condiciones ensayadas, las plantas *amiCOX19* presentarían una respuesta aumentada (sensibilidad) a un déficit moderado de hierro. En concordancia con esto, las plantas *amiCOX19* presentan un menor contenido de hierro (Figura 7, Anexo III).



**Figura 11. Desarrollo de la raíz en plantas con niveles alterados de AtCOX19. A.** Plantas amiCOX19#17 y WT crecidas durante 9 días en suficiencia (Fe 50  $\mu$ M) o deficiencia de hierro (sin agregado de Fe al medio de crecimiento). Esta imagen fue modificada de la tesina de la Licenciada Ma. Natacha Ocampos.

Los resultados obtenidos en el ensayo de microarreglos sugieren que la disminución de los niveles de AtCOX19 induce un grupo selecto de genes que participan en el metabolismo del hierro. Genes que serían inducidos en deficiencia de nitrógeno, en deficiencia de fósforo y en deficiencia de azufre también se encuentran inducidos en las plantas amiCOX19. Los resultados transcripcionales obtenidos plantean el interrogante de si la alteración del metabolismo de hierro es consecuencia directa de la disminución de los niveles de AtCOX19 o está relacionada con cambios en la actividad del CIV o la función mitocondrial. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que la actividad COX disminuye en condiciones de deficiencia de cobre o de hierro. Por otro lado, la disponibilidad de nutrientes condiciona la respuesta a patógenos (Zhou y col., 2012). Además, la búsqueda en bases de datos de microarreglos sugiere que los genes

*bHLH100*, *bHLH101* y *bHLH039* aumentarían su expresión ante la infección con patógenos necrotróficos. Los resultados obtenidos sugieren nuevas vías de estudio en las cuales podrían actuar los factores de ensamblaje de COX, ya sea porque afectan la actividad del CIV o porque actúan como moléculas de señalización entre la mitocondria y el entorno.

---

---

## 8. CONCLUSIONES

## 9. CONCLUSIONES

En este trabajo de Tesis nos propusimos estudiar la función de un grupo de proteínas vegetales vinculadas con la formación de los centros metálicos de las subunidades COX<sub>1</sub> y COX<sub>2</sub> del Complejo IV (citocromo *c* oxidasa o COX) de *Arabidopsis thaliana*. Concretamente, se estudió la función de los factores de ensamblaje de COX AtCOX<sub>17</sub> y AtCOX<sub>19</sub>.

La localización de AtCOX<sub>17-1</sub> en *Arabidopsis* se restringe a la mitocondria en las células de la raíz, incluso cuando la misma es expresada en altos niveles. No se determinó la localización subcelular para AtCOX<sub>17-2</sub>. Sin embargo, dado que ambas proteínas son capaces de complementar levaduras mutantes *cox17* se puede sugerir que AtCOX<sub>17-2</sub> probablemente es también una proteína mitocondrial. En forma similar a lo observado para AtCOX<sub>17-1</sub>, la localización subcelular de AtCOX<sub>19</sub> se restringe a la mitocondria tanto en condiciones control como luego de la aplicación de un estrés. La localización mitocondrial está de acuerdo con la función prevista para estas proteínas, que actuarían como chaperonas de cobre durante el ensamblado de COX. Con respecto a la localización de AtCOX<sub>19</sub>, sería interesante evaluar si la misma se modifica en función de la concentración de metales.

La disminución de los niveles de expresión de AtCOX<sub>17-1</sub> o de AtCOX<sub>17-2</sub> en forma individual no produce cambios fenotípicos evidentes respecto de las plantas WT. Además, ni la actividad COX ni el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones se ven afectadas en estas plantas. Estos resultados indican que, probablemente, las proteínas AtCOX<sub>17</sub> presentan redundancia funcional respecto de la biogénesis de COX y que mínimos niveles de AtCOX<sub>17</sub> serían necesarios para cumplir con la inserción de cobre en los centros metálicos. El hecho de que las plantas deficientes en ambos genes presenten retraso en el crecimiento y que la recuperación de líneas deficientes en ambos genes haya sido muy baja (en comparación con la recuperación de plantas silenciadas simples) apoya la idea de una posible redundancia funcional entre AtCOX<sub>17-1</sub> y AtCOX<sub>17-2</sub>, si bien dicha función podría no estar estrictamente asociada a la biogénesis de COX.

AtCOX17-1 y AtCOX17-2 serían necesarias para que la planta desarrolle una respuesta a estrés eficiente, dado que el silenciamiento de uno de los genes AtCOX17 es suficiente para generar plantas incapaces de inducir genes de respuesta a estrés luego del tratamiento con NaCl. La disminución de la expresión de genes de respuesta a estrés en las plantas deficientes en ambos genes crecidas en condiciones control apoya la idea del rol de AtCOX17-1 y AtCOX17-2 como moduladoras de la respuesta a estrés en Arabidopsis.

El enriquecimiento de genes de respuesta a estrés oxidativo entre los genes regulados negativamente en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* sugiere que AtCOX17-1 y AtCOX17-2 formarían parte de vías de señalización asociadas a la producción de EROs durante el estrés. El incremento de EROs en las plantas silenciadas en cada uno de los genes AtCOX17 luego de una situación de estrés refuerza esta idea. Dado que la producción de EROs es una respuesta común a diversas situaciones de estrés, es complejo distinguir si estas proteínas serían relevantes para la defensa ante un estrés específico o podrían incluirse como proteínas mitocondriales moduladoras de la respuesta a diversas situaciones de estrés. Dado que los genes AtCOX17 no muestran una inducción diferencial entre las situaciones de estrés estudiadas y que genes de respuesta a diversos tipos de estrés tienen expresión reducida en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2*, es probable que AtCOX17 participe en la respuesta a distintos tipos de estrés.

La disminución de la expresión de los genes AtCOX17 en forma individual no produce cambios en la expresión de los genes de respuesta a estrés que se encuentran reprimidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* en condiciones basales. Esto podría implicar redundancia funcional entre ambas proteínas. De esta manera, el efecto del silenciamiento individual solo sería observable en condiciones en donde fueran necesarias mayores cantidades de estas proteínas, es decir luego del estrés.

ABI4 regularía la expresión de los genes AtCOX17 en respuesta al tratamiento con ABA. La regulación por ABI4 sustenta la función de los genes AtCOX17 en la respuesta a estrés y muestra una vía de señalización que podría ser compartida con AOX1a. El hecho de que los perfiles transcripcionales de plantas deficientes en AOX1a y AtCOX17 tengan similitudes sugiere que podrían existir vías de regulación comunes a estas proteínas.

AtCOX19 estaría involucrada en la homeóstasis de metales y en la defensa a estrés biótico. Los resultados transcripcionales obtenidos indican que la deficiencia de AtCOX19 genera plantas que presentan un estado deficitario de hierro. El fenotipo observado en raíces y la disminución del contenido del metal en estas plantas apoyan esta conclusión. La función de AtCOX19 en la respuesta a estrés biótico aún no ha sido confirmada.

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan información novedosa sobre la función de factores de ensamblaje de COX en plantas y sugieren nuevos espacios de conocimiento que deberían ser explorados.

---

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdel-Ghany, S.E. (2009). *Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in Arabidopsis thaliana grown at different copper regimes*. *Planta* 229(4): 767-779.
- Abdel-Ghany, S.E. y Pilon, M. (2008). *MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* 283(23): 15932-15945.
- Abdel-Ghany, S.E., Muller-Moule, P., Niyogi, K.K., Pilon, M. y Shikanai, T. (2005). *Two P-type ATPases are required for copper delivery in Arabidopsis thaliana chloroplasts*. *The Plant cell* 17(4): 1233-1251.
- Acevedo-Hernandez, G.J., Leon, P. y Herrera-Estrella, L.R. (2005). *Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 43(4): 506-519.
- Allen, S., Badarau, A. y Dennison, C. (2013). *The influence of protein folding on the copper affinities of trafficking and target sites*. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* 42(9): 3233-3239.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P. y col. (2003). *Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana*. *Science* 301(5633): 653-657.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990). *Basic local alignment search tool*. *Journal of molecular biology* 215(3): 403-410.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. y Rosato, A. (2008). *Occurrence of copper proteins through the three domains of life: A bioinformatic approach*. *Proteome Res* 7: 7.
- Andres-Colas, N., Perea-Garcia, A., Puig, S. y Penarrubia, L. (2010). *Deregulated copper transport affects Arabidopsis development especially in the absence of environmental cycles*. *Plant physiology* 153(1): 170-184.
- Andres-Colas, N., Sancenon, V., Rodriguez-Navarro, S., Mayo, S., Thiele, D.J., Ecker, J.R. y col. (2006). *The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45(2): 225-236.
- Aranjuelo, I., Doustaly, F., Cela, J., Porcel, R., Müller, M., Aroca, R. y col. (2014). *Glutathione and transpiration as key factors conditioning oxidative stress in Arabidopsis thaliana exposed to uranium*. *Planta* 239(4): 817-830.
- Araujo, W.L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T.R., Tohge, T., Krahnert, I. y col. (2010). *Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria*. *The Plant cell* 22(5): 1549-1563.

- Araujo, W.L., Nunes-Nesi, A. y Fernie, A.R. (2014). *On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions*. *Photosynthesis research* 119(1-2): 141-156.
- Araujo, W.L., Nunes-Nesi, A., Osorio, S., Usadel, B., Fuentes, D., Nagy, R. y col. (2011). *Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture*. *The Plant cell* 23(2): 600-627.
- Arnholdt-Schmitt, B., Costa, J.H. y de Melo, D.F. (2006). *AOX--a functional marker for efficient cell reprogramming under stress?* *Trends in plant science* 11(6): 281-287.
- Attallah, C.V., Welchen, E. y Gonzalez, 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* 1290: 11.
- Attallah, C.V., Welchen, E. y Gonzalez, D.H. (2007a). *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* 1290: 11.
- Attallah, C.V., Welchen, E., Martin, A.P., Spinelli, S.V., Bonnard, G., Palatnik, J.F. y col. (2011). *Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis*. *Journal of experimental botany* 62(12): 4281-4294.
- Attallah, C.V., Welchen, E., Pujol, C., Bonnard, G. y Gonzalez, D.H. (2007b). *Characterization of Arabidopsis thaliana genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome c oxidase biogenesis*. *Plant molecular biology* 65(3): 343-355.
- Backert, S., Lurz, R., Oyarzabal, O.A. y Borner, T. (1997). *High content, size and distribution of single-stranded DNA in the mitochondria of Chenopodium album (L.)*. *Plant molecular biology* 33(6): 1037-1050.
- Balandin, T. y Castresana, C. (2002). *AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17*. *Plant physiology* 129(4): 1852-1857.
- Barkan, A. y Small, I. (2014). *Pentatricopeptide repeat proteins in plants*. *Annual review of plant biology* 65: 415-442.
- Barrientos, A., Gouget, K., Horn, D., Soto, I.C. y Fontanesi, F. (2009). *Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: insights into the COX assembly process*. *Biochimica et biophysica acta* 1793(1): 97-107.
- Bartoli, C.G., Pastori, G.M. y Foyer, C.H. (2000). *Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV*. *Plant physiology* 123(1): 335-344.

- Bartoli, C.G., Yu, J., Gomez, F., Fernandez, L., McIntosh, L. y Foyer, C.H. (2006). *Interrelationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in Arabidopsis thaliana leaves*. Journal of experimental botany 57(8): 1621-1631.
- Baudouin, E. y Hancock, J. (2014). *Nitric Oxide Signalling in Plants*. Frontiers in Plant Science 4.
- Beale, Samuel I. (2011). *Chloroplast Signaling: Retrograde Regulation Revelations*. Current Biology 21(10): R391-R393.
- Beauclair, L., Yu, A. y Bouche, N. (2010). *microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis*. The Plant journal : for cell and molecular biology 62(3): 454-462.
- Beers, J., Glerum, D.M. y Tzagoloff, A. (1997). *Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle*. The Journal of biological chemistry 272(52): 33191-33196.
- Begcy, K., Mariano, E.D., Mattiello, L., Nunes, A.V., Mazzafera, P., Maia, I.G. y col. (2011). *An Arabidopsis Mitochondrial Uncoupling Protein Confers Tolerance to Drought and Salt Stress in Transgenic Tobacco Plants*. PloS one 6(8): e23776.
- Bernal, M., Casero, D., Singh, V., Wilson, G.T., Grande, A., Yang, H. y col. (2012). *Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in Arabidopsis*. The Plant cell 24(2): 738-761.
- Bertini, I. (2007). En: *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*. Sausalito, CA. p.
- Binder, B.M., Rodriguez, F.I. y Bleecker, A.B. (2010). *The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in Arabidopsis*. The Journal of biological chemistry 285(48): 37263-37270.
- Birnboim, H. y Doly, J. (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nuc. Acids. Res. 7: 2.
- Blokhina, O. y Fagerstedt, K.V. (2010). *Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems*. Physiologia plantarum 138(4): 447-462.
- Blum, A.a.E., A. (1981). *Cell Membrane Stability as a Measure of Drought and Heat Tolerance in Wheat*. Crop Science 21(1): 4.
- Bossi, F., Cordoba, E., Dupre, P., Mendoza, M.S., Roman, C.S. y Leon, P. (2009). *The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling*. The Plant journal : for cell and molecular biology 59(3): 359-374.

- Bourens, M., Fontanesi, F., Soto, I.C., Liu, J. y Barrientos, A. (2013). *Redox and Reactive Oxygen Species Regulation of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis*. *Antioxidants & redox signaling* 19(16): 1940-1952.
- Brangeon, J., Sabar, M., Gutierrez, S., Combettes, B., Bove, J., Gendy, C. y col. (2000). *Defective splicing of the first nad4 intron is associated with lack of several complex I subunits in the Nicotiana sylvestris NMS1 nuclear mutant*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 21(3): 269-280.
- Bricchi, I., Berteza, C.M., Occhipinti, A., Paponov, I.A. y Maffei, M.E. (2012). *Dynamics of membrane potential variation and gene expression induced by Spodoptera littoralis, Myzus persicae, and Pseudomonas syringae in Arabidopsis*. *PloS one* 7(10): e46673.
- Brown, R.E., Jarvis, K.L. y Hyland, K.J. (1989). *Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances*. *Analytical biochemistry* 180(1): 136-139.
- Brumbarova, T., Bauer, P. y Ivanov, R. (2015). *Molecular mechanisms governing Arabidopsis iron uptake*. *Trends in plant science* 20(2): 124-133.
- Brunori, M., Giuffrè, A. y Sarti, P. (2005). *Cytochrome c oxidase, ligands and electrons*. *Journal of inorganic biochemistry* 99(1): 324-336.
- Burke, P.V. y Poyton, R.O. (1998). *Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase*. *J. Exp. Biol.* 201: 8.
- Burkhead, J.L., Reynolds, K.A., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M. y Pilon, M. (2009). *Copper homeostasis*. *The New phytologist* 182(4): 799-816.
- Cabello, J.V. y Chan, R.L. (2012). *The homologous homeodomain-leucine zipper transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer tolerance to drought and salinity stresses via the induction of proteins that stabilize membranes*. *Plant biotechnology journal* 10(7): 815-825.
- Carrie, C., Giraud, E., Duncan, O., Xu, L., Wang, Y., Huang, S. y col. (2010a). *Conserved and novel functions for Arabidopsis thaliana MIA40 in assembly of proteins in mitochondria and peroxisomes*. *The Journal of biological chemistry* 285(46): 36138-36148.
- Carrie, C., Murcha, M.W. y Whelan, J. (2010b). *An in silico analysis of the mitochondrial protein import apparatus of plants*. *BMC plant biology* 10: 249.
- Carrie, C., Murcha, M.W., Giraud, E., Ng, S., Zhang, M.F., Narsai, R. y col. (2013). *How do plants make mitochondria?* *Planta* 237(2): 429-439.
- Carrie, C., Murcha, M.W., Kuehn, K., Duncan, O., Barthet, M., Smith, P.M. y col. (2008). *Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 582(20): 3073-3079.
- Castruita, M., Casero, D., Karpowicz, S.J., Kropat, J., Vieler, A., Hsieh, S.I. y col. (2011). *Systems biology approach in Chlamydomonas reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps*. *The Plant cell* 23(4): 1273-1292.

- Catalá, R., Medina, J. y Salinas, J. (2011). *Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(39): 16475-16480.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F. y Margis-Pinheiro, M. (2012). *Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection*. Genetics and Molecular Biology 35(4 Suppl): 1011-1019.
- Ceh-Pavia, E., Spiller, M.P. y Lu, H. (2013). *Folding and biogenesis of mitochondrial small Tim proteins*. International journal of molecular sciences 14(8): 16685-16705.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. y Pfanner, N. (2009). *Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms*. Cell 138(4): 628-644.
- Chacinska, A., van der Laan, M., Mehnert, C.S., Guiard, B., Mick, D.U., Hutu, D.P. y col. (2010). *Distinct forms of mitochondrial TOM-TIM supercomplexes define signal-dependent states of preprotein sorting*. Mol Cell Biol 30(1): 307-318.
- Chan, N.C. y Lithgow, T. (2008). *The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis*. Molecular biology of the cell 19(1): 126-136.
- Charrier, B., Champion, A., Henry, Y. y Kreis, M. (2002). *Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Plant physiology 130(2): 577-590.
- Chatzi, A. y Tokatlidis, K. (2013). *The mitochondrial intermembrane space: a hub for oxidative folding linked to protein biogenesis*. Antioxidants & redox signaling 19(1): 54-62.
- Chen, C.C., Chien, W.F., Lin, N.C. y Yeh, K.C. (2014). *Alternative functions of Arabidopsis Yellow Stripe-Like3: from metal translocation to pathogen defense*. PloS one 9(5): e98008.
- Cheng, M.C., Liao, P.M., Kuo, W.W. y Lin, T.P. (2013). *The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals*. Plant physiology 162(3): 1566-1582.
- Clifton, R., Millar, A.H. y Whelan, J. (2006). *Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses*. Biochimica et biophysica acta 1757(7): 730-741.
- Cobine, P.A., McKay, R.T., Zangger, K., Dameron, C.T. y Armitage, I.M. (2004a). *Solution structure of Cu6 metallothionein from the fungus Neurospora crassa*. European journal of biochemistry / FEBS 271(21): 4213-4221.
- Cobine, P.A., Ojeda, L.D., Rigby, K.M. y Winge, D.R. (2004b). *Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix*. The Journal of biological chemistry 279(14): 14447-14455.

- Cobine, P.A., Pierrel, F., Bestwick, M.L. y Winge, D.R. (2006). *Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase*. The Journal of biological chemistry 281(48): 36552-36559.
- Cohu, C.M. y Pilon, M. (2007). *Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability*. Physiologia plantarum 129(4): 9.
- Colombatti, F., Gonzalez, D.H. y Welchen, E. (2014). *Plant mitochondria under pathogen attack: A sigh of relief or a last breath?* Mitochondrion.
- Comelli, R.N. y Gonzalez, D.H. (2009a). *Divergent regulatory mechanisms in the response of respiratory chain component genes to carbohydrates suggests a model for gene evolution after duplication*. Plant Signal Behav 4(12): 1179-1181.
- Comelli, R.N. y Gonzalez, D.H. (2009b). *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(3): 213-224.
- Comelli, R.N., Viola, I.L. y Gonzalez, D.H. (2009c). *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 molecular biology 69(6): 729-743.
- Comelli, R.N., Welchen, E., Kim, H.J., Hong, J.C. y Gonzalez, D.H. (2012). *Delta subclass HD-Zip proteins and a B-3 AP2/ERF transcription factor interact with promoter elements required for expression of the Arabidopsis cytochrome c oxidase 5b-1 gene*. Plant molecular biology 80(2): 157-167.
- Considine, M.J. y Foyer, C.H. (2014). *Redox regulation of plant development*. Antioxidants & redox signaling 21(9): 1305-1326.
- Considine, M.J., Holtzapffel, R.C., Day, D.A., Whelan, J. y Millar, A.H. (2002). *Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots*. Plant physiology 129(3): 949-953.
- Crichton, R.R. y Pierre, J.L. (2001). *Old iron, young copper: from Mars to Venus*. Biometals 14: 4.
- Cuillel, M. (2009). *The dual personality of ionic copper in biology*. J Incl Phenom Macrocycl Chem 65(1-2): 165-170.
- Cvetkovska, M. y Vanlerberghe, G.C. (2012). *Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide*. The New phytologist 195(1): 32-39.
- Cvetkovska, M. y Vanlerberghe, G.C. (2012). *Coordination of a mitochondrial superoxide burst during the hypersensitive response to bacterial pathogen in Nicotiana tabacum*. Plant Cell Environ 35(6): 1121-1136.

- Cvetkovska, M. y Vanlerberghe, G.C. (2013). *Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species*. *Plant, cell & environment* 36(3): 721-732.
- Cvetkovska, M., Alber, N.A. y Vanlerberghe, G.C. (2013). *The signaling role of a mitochondrial superoxide burst during stress*. *Plant Signaling & Behavior* 8(1): e22749.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. y Scheible, W.R. (2005). *Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis*. *Plant physiology* 139(1): 5-17.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. y Scheible, W.R. (2005). *Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis*. *Plant physiology* 139(1): 5-17.
- Dahan, J., Tcherkez, G., Macherel, D., Benamar, A., Belcram, K., Quadrado, M. y col. (2014). *Disruption of the CYTOCHROME C OXIDASE DEFICIENT<sub>1</sub> gene leads to cytochrome c oxidase depletion and reorchestrated respiratory metabolism in Arabidopsis*. *Plant physiology* 166(4): 1788-1802.
- Dancis, A., Yuan, D.S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C. y col. (1994). *Molecular characterization of a copper transport protein in S. cerevisiae: an unexpected role for copper in iron transport*. *Cell* 76(2): 393-402.
- Dangl, J.L. y Jones, J.D. (2001). *Plant pathogens and integrated defence responses to infection*. *Nature* 411(6839): 826-833.
- De Clercq, I., Vermeirssen, V., Van Aken, O., Vandepoele, K., Murcha, M.W., Law, S.R. y col. (2013). *The membrane-bound NAC transcription factor ANACo13 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in Arabidopsis*. *The Plant cell* 25(9): 3472-3490.
- De Vleeschauwer, D., Gheysen, G. y Hofte, M. (2013). *Hormone defense networking in rice: tales from a different world*. *Trends in plant science* 18(10): 555-565.
- Depuydt, S. y Hardtke, Christian S. (2011). *Hormone Signalling Crosstalk in Plant Growth Regulation*. *Current Biology* 21(9): R365-R373.
- des Francs-Small, C.C., de Longevialle, A.F., Meyer, E.H., Andres, C., Taylor, N.L., Lurin, C. y col. (2014). *The pentatricopeptide repeat gene OTP43 is required for trans-splicing of the mitochondrial nad1 Intron 1 in Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 19(10): 3256-3265.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2011). *InfoStat*.
- Di Donato, R.J., Jr., Roberts, L.A., Sanderson, T., Eisley, R.B. y Walker, E.L. (2004). *Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma*

- membrane transporter of nicotianamine-metal complexes*. The Plant journal : for cell and molecular biology 39(3): 403-414.
- Dietz, K.J., Jacob, S., Oelze, M.L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M. y col. (2006). *The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism*. Journal of experimental botany 57(8): 1697-1709.
- Dojcinovic, D., Krosting, J., Harris, A.J., Wagner, D.J. y Rhoads, D.M. (2005). *Identification of a region of the Arabidopsis AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression*. Plant molecular biology 58(2): 159-175.
- Drazkiewicz, M., Skorzyńska-Polit, E. y Krupa, Z. (2004). *Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in Arabidopsis thaliana*. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine 17(4): 379-387.
- Dubinina, J., Braun, H.P., Schmitz, U. y Colditz, F. (2011). *The mitochondrial proteome of the model legume Medicago truncatula*. Biochimica et biophysica acta 1814(12): 1658-1668.
- Duncan, O., Murcha, M.W. y Whelan, J. (2013). *Unique components of the plant mitochondrial protein import apparatus*. Biochimica et biophysica acta 1833(2): 304-313.
- Duncan, O., Taylor, N.L., Carrie, C., Eubel, H., Kubiszewski-Jakubiak, S., Zhang, B. y col. (2011). *Multiple lines of evidence localize signaling, morphology, and lipid biosynthesis machinery to the mitochondrial outer membrane of Arabidopsis*. Plant physiology 157(3): 1093-1113.
- Durrett, T.P., Gassmann, W. y Rogers, E.E. (2007). *The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation*. Plant physiology 144(1): 197-205.
- Dutilleul, C., Driscoll, S., Cornic, G., De Paepe, R., Foyer, C.H. y Noctor, G. (2003). *Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients*. Plant physiology 131(1): 264-275.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. y col. (2006). *Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics*. The Plant journal : for cell and molecular biology 45(4): 616-629.
- Eckers, E., Petrunzaro, C., Gross, D., Riemer, J., Hell, K. y Deponte, M. (2013). *Divergent molecular evolution of the mitochondrial sulfhydryl:cytochrome C oxidoreductase Erv in opisthokonts and parasitic protists*. The Journal of biological chemistry 288(4): 2676-2688.
- Elhafez, D., Murcha, M.W., Clifton, R., Soole, K.L., Day, D.A. y Whelan, J. (2006). *Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in*

- Arabidopsis: intraorganelle location and expression*. Plant & cell physiology 47(1): 43-54.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. y von Heijne, G. (2000). *Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence*. J Mol Biol 300(4): 11.
- Esmon, C.A., Pedmale, U.V., Liscum E. (2005). Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. Int J Dev Biol. 49(5-6):665-74.
- Estavillo, G.M., Crisp, P.A., Pornsiriwong, W., Wirtz, M., Collinge, D., Carrie, C. y col. (2011). *Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis*. The Plant cell 23(11): 3992-4012.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S. y Braun, H.P. (2004). *Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria*. Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale 42(12): 937-942.
- Eubel, H., Jansch, L. y Braun, H.P. (2003). *New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II*. Plant physiology 133(1): 274-286.
- Fernie, A.R., Carrari, F. y Sweetlove, L.J. (2004). *Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport*. Current opinion in plant biology 7(3): 254-261.
- Fischer, M., Horn, S., Belkacemi, A., Kojer, K., Petrunaro, C., Habich, M. y col. (2013). *Protein import and oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space of intact mammalian cells*. Molecular biology of the cell 24(14): 2160-2170.
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2011). *Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub*. Plant physiology 155(1): 2-18.
- Fraga, H., Bech-Serra, J.J., Canals, F., Ortega, G., Millet, O. y Ventura, S. (2014). *The mitochondrial intermembrane space oxireductase Mia40 funnels the oxidative folding pathway of the cytochrome c oxidase assembly protein Cox19*. The Journal of biological chemistry 289(14): 9852-9864.
- Fraústo da Silva, J.J.R. y Williams, R.J.P. (2001). En: *The Biological Chemistry of the Elements*. Oxford, UK. p.
- Fuentes, D., Meneses, M., Nunes-Nesi, A., Araujo, W.L., Tapia, R., Gomez, I. y col. (2011). *A deficiency in the flavoprotein of Arabidopsis mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen-limiting conditions*. Plant physiology 157(3): 1114-1127.
- Gagliardi, D. y Binder, S. (2007). *Expression of the Plant Mitochondrial Genome*. En: *Annual Plant Reviews Volume 31: Plant Mitochondria* (Eds.: John Wiley & Sons, Inc., p. 50-96.

- Garcia de la Garma, J., Fernandez-Garcia, N., Bardisi, E., Pallol, B., Asensio-Rubio, J.S., Bru, R. y col. (2015). *New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system*. The New phytologist 205(1): 216-239.
- Garcia-Molina, A., Andres-Colas, N., Perea-Garcia, A., Del Valle-Tascon, S., Penarrubia, L. y Puig, S. (2011). *The intracellular Arabidopsis COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency*. The Plant journal : for cell and molecular biology 65(6): 848-860.
- Garcia-Molina, A., Andres-Colas, N., Perea-Garcia, A., Neumann, U., Dodani, S.C., Huijser, P. y col. (2013). *The Arabidopsis COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions*. Plant & cell physiology 54(8): 1378-1390.
- Garcia-Molina, A., Xing, S. y Huijser, P. (2014a). *A conserved KIN17 curved DNA-binding domain protein assembles with SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE7 to adapt Arabidopsis growth and development to limiting copper availability*. Plant physiology 164(2): 828-840.
- Garcia-Molina, A., Xing, S. y Huijser, P. (2014b). *Functional characterisation of Arabidopsis SPL7 conserved protein domains suggests novel regulatory mechanisms in the Cu deficiency response*. BMC plant biology 14: 231.
- Garlid, K.D., Orosz, D.E., Modrianský, M., Vassanelli, S. y Jezek, P. (1996). *On the Mechanism of Fatty Acid-induced Proton Transport by Mitochondrial Uncoupling Protein*. Journal of Biological Chemistry 271(5): 2615-2620.
- Geisler, D.A., Pöpke, C., Obata, T., Nunes-Nesi, A., Matthes, A., Schneitz, K. y col. (2012). *Downregulation of the  $\delta$ -Subunit Reduces Mitochondrial ATP Synthase Levels, Alters Respiration, and Restricts Growth and Gametophyte Development in Arabidopsis*. The Plant Cell Online 24(7): 2792-2811.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S. y col. (2004). *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome biology 5(10): R80.
- Gibala, M., Kicia, M., Sakamoto, W., Gola, E.M., Kubrakiewicz, J., Smakowska, E. y col. (2009). *The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters Arabidopsis leaf morphology at the late stage of rosette development under short-day photoperiod*. The Plant journal : for cell and molecular biology 59(5): 685-699.
- Giege, P. y Brennicke, A. (2001). *From gene to protein in higher plant mitochondria*. Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie 324(3): 209-217.
- Giegé, P., Sweetlove, L.J. y Leaver, C.J. (2003). *Identification of mitochondrial protein complexes in Arabidopsis using two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis*. Plant Mol Biol Rep 21: 11.

- Giege, P., Sweetlove, L.J., Cognat, V. y Leaver, C.J. (2005). *Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in Arabidopsis*. The Plant cell 17(5): 1497-1512.
- Giraud, E., Ho, L.H., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y.F. y col. (2008). *The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in Arabidopsis results in acute sensitivity to combined light and drought stress*. Plant physiology 147(2): 595-610.
- Giraud, E., Ng, S., Carrie, C., Duncan, O., Low, J., Lee, C.P. y col. (2010). *TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in Arabidopsis thaliana*. The Plant cell 22(12): 3921-3934.
- Giraud, E., Van Aken, O., Ho, L.H. y Whelan, J. (2009). *The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a*. Plant physiology 150(3): 1286-1296.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L.F., Foley, R.C., Anderson, C.R., Carroll, A.J. y col. (2011). *Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108(26): 10768-10773.
- Glerum, D.M., Shtanko, A. y Tzagoloff, A. (1996). *Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase*. The Journal of biological chemistry 271(24): 14504-14509.
- Gonzalez, D.H., Welchen, E., Attallah, C.V., Comelli, R.N. y Mufarrege, E.F. (2007). *Transcriptional coordination of the biogenesis of the oxidative phosphorylation machinery in plants*. The Plant journal : for cell and molecular biology 51(1): 105-116.
- Gu, J., Dempsey, S. y Newton, K.J. (1994). *Rescue of a maize mitochondrial cytochrome oxidase 8o6 mutant by tissue culture*. The Plant journal : for cell and molecular biology 6: 7.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y. y Zhu, J. (2013). *Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis*. The Plant journal : for cell and molecular biology 74(5): 840-851.
- Gupta, B. y Huang, B. (2014). *Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization*. International journal of genomics 2014: 701596.
- Gutierrez, S., Sabar, M., Lelandais, C., Chetrit, P., Diolez, P., Degand, H. y col. (1997). *Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in Nicotiana glauca mitochondrial deletion mutants*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94(7): 3436-3441.

- Hamanaka, R.B. y Chandel, N.S. (2010). *Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes*. Trends in biochemical sciences 35(9): 505-513.
- Hanahan, D. (1983). *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. Journal of molecular biology 166(4): 557-580.
- Hassett, R. y Kosman, D.J. (1995). *Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry 270(1): 128-134.
- Hatori, Y. y Lutsenko, S. (2013). *An expanding range of functions for the copper chaperone/antioxidant protein Atox1*. Antioxidants & redox signaling 19(9): 945-957.
- Heaton, D.N., George, G.N., Garrison, G. y Winge, D.R. (2001). *The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex*. Biochemistry 40(3): 743-751.
- Heazlewood, J.L., Howell, K.A. y Millar, A.H. (2003b). *Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits*. Biochimica et biophysica acta 1604(3): 159-169.
- Heazlewood, J.L., Howell, K.A., Whelan, J. y Millar, A.H. (2003a). *Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome*. Plant physiology 132(1): 230-242.
- Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J.S., Gout, A.M., Day, D.A., Whelan, J. y Millar, A.H. (2004). *Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins*. The Plant cell 16(1): 241-256.
- Herrmann, J.M. (2011). *MINOS is plus: a Mitofilin complex for mitochondrial membrane contacts*. Developmental cell 21(4): 599-600.
- Hickman, R., Hill, C., Penfold, C.A., Breeze, E., Bowden, L., Moore, J.D. y col. (2013). *A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in Arabidopsis leaves*. The Plant journal : for cell and molecular biology 75(1): 26-39.
- Hiltscher, H., Rudnik, R., Shaikhali, J., Heiber, I., Mellenthin, M., Meirelles Duarte, I. y col. (2014). *The radical induced cell death protein 1 (RCD1) supports transcriptional activation of genes for chloroplast antioxidant enzymes*. Front Plant Sci 5: 475.
- Ho, L.H., Giraud, E., Lister, R., Thirkettle-Watts, D., Low, J., Clifton, R. y col. (2007). *Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development*. Plant physiology 143(4): 1519-1533.

- Ho, L.H., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A. y col. (2008). *Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in Arabidopsis*. *Plant physiology* 147(4): 1858-1873.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F. y Prange, R.K. (1999). *Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds*. *Planta* 207(4): 604-611.
- Howell, K.A., Cheng, K., Murcha, M.W., Jenkin, L.E., Millar, A.H. y Whelan, J. (2007). *Oxygen initiation of respiration and mitochondrial biogenesis in rice*. *The Journal of biological chemistry* 282(21): 15619-15631.
- Howell, K.A., Millar, A.H. y Whelan, J. (2006). *Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with pro-mitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus*. *Plant molecular biology* 60(2): 201-223.
- Huang, C.-H., Kuo, W.-Y., Weiss, C. y Jinn, T.-L. (2012). *Copper Chaperone-Dependent and -Independent Activation of Three Copper-Zinc Superoxide Dismutase Homologs Localized in Different Cellular Compartments in Arabidopsis*. *Plant physiology* 158(2): 737-746.
- Huang, S., Taylor, N.L., Narsai, R., Eubel, H., Whelan, J. y Millar, A.H. (2010). *Functional and composition differences between mitochondrial complex II in Arabidopsis and rice are correlated with the complex genetic history of the enzyme*. *Plant molecular biology* 72(3): 331-342.
- Huang, S., Taylor, N.L., Stroher, E., Fenske, R. y Millar, A.H. (2013). *Succinate dehydrogenase assembly factor 2 is needed for assembly and activity of mitochondrial complex II and for normal root elongation in Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 73(3): 429-441.
- Humphries, A.D., Streimann, I.C., Stojanovski, D., Johnston, A.J., Yano, M., Hoogenraad, N.J. y col. (2005). *Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40*. *The Journal of biological chemistry* 280(12): 11535-11543.
- Hunte, C., Zickermann, V. y Brandt, U. (2010). *Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I*. *Science (New York, N.Y.)* 329(5990): 448-451.
- Hyde, B.B., Twig, G. y Shirihai, O.S. (2010). *Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics*. *Seminars in cell & developmental biology* 21(6): 575-581.
- Islam, M.S. y Takagi, S. (2010). *Co-localization of mitochondria with chloroplasts is a light-dependent reversible response*. *Plant Signal Behav* 5(2): 146-147.
- Ivanova, A., Law, S.R., Narsai, R., Duncan, O., Lee, J.H., Zhang, B. y col. (2014). *A Functional Antagonistic Relationship between Auxin and Mitochondrial Retrograde Signaling*

- Regulates Alternative Oxidase1a Expression in Arabidopsis*. *Plant physiology* 165(3): 1233-1254.
- Jacoby, R.P., Li, L., Huang, S., Pong Lee, C., Millar, A.H. y Taylor, N.L. (2012). *Mitochondrial composition, function and stress response in plants*. *Journal of integrative plant biology* 54(11): 887-906.
- Jagadeeswaran, G., Saini, A. y Sunkar, R. (2009). *Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in Arabidopsis*. *Planta* 229(4): 1009-1014.
- Jain, A., Wilson, G.T. y Connolly, E.L. (2014). *The diverse roles of FRO family metalloreductases in iron and copper homeostasis*. *Frontiers in plant science* 5: 100.
- Jannat, R., Uraji, M., Morofuji, M., Islam, M.M., Bloom, R.E., Nakamura, Y. y col. (2011). *Roles of intracellular hydrogen peroxide accumulation in abscisic acid signaling in Arabidopsis guard cells*. *Journal of plant physiology* 168(16): 1919-1926.
- Jänsch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K. y Braun, H.P. (1996). *New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria*. *Planta* 9: 11.
- Jarvis, P., Chen, L.J., Li, H., Peto, C.A., Fankhauser, C. y Chory, J. (1998). *An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus*. *Science* 282(5386): 100-103.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W. (1987). *GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. *The EMBO journal* 6(13): 3901-3907.
- Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C. y col. (2010). *The Arabidopsis thaliana NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling*. *The Biochemical journal* 426(2): 183-196.
- Jordan, I.K., Natale, D.A. y Galperin, M.Y. (2000). *Copper chaperones in bacteria: association with copper-transporting ATPases*. *Trends in biochemical sciences* 25(10): 480-481.
- Jung, C., Higgins, C.M.J. y Xu, Z. (2000). *Measuring the Quantity and Activity of Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes in Tissues of Central Nervous System Using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*. *Analytical biochemistry* 286(2): 214-223.
- Jung, H.-i., Gayomba, S.R., Rutzke, M.A., Craft, E., Kochian, L.V. y Vatamaniuk, O.K. (2012). *COPT6 Is a Plasma Membrane Transporter That Functions in Copper Homeostasis in Arabidopsis and Is a Novel Target of SQUAMOSA Promoter-binding Protein-like 7*. *Journal of Biological Chemistry* 287(40): 33252-33267.
- Juszczak, I. y Baier, M. (2012). *The strength of the miR398-Csd2-CCS1 regulon is subject to natural variation in Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 586(19): 3385-3390.

- Juszczuk, I.M., Szal, B. y Rychter, A.M. (2012). *Oxidation-reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction*. *Plant, cell & environment* 35(2): 296-307.
- Kadowaki, K., Kubo, N., Ozawa, K. y Hirai, A. (1996). *Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signal*. *EMBO Journal* 15: 9.
- Kakizaki, Y., Moore, A.L. y Ito, K. (2012). *Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homoeothermic spadices of *Symplocarpus renifolius* and the transiently thermogenic appendices of *Arum maculatum**. *The Biochemical journal* 445(2): 237-246.
- Karkonen, A. y Kuchitsu, K. (2014). *Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants*. *Phytochemistry*.
- Katari, M.S., Nowicki, S.D., Aceituno, F.F., Nero, D., Kelfer, J., Thompson, L.P. y col. (2010). *VirtualPlant: a software platform to support systems biology research*. *Plant physiology* 152(2): 500-515.
- Katari, M.S., Nowicki, S.D., Aceituno, F.F., Nero, D., Kelfer, J., Thompson, L.P. y col. (2010). *VirtualPlant: a software platform to support systems biology research*. *Plant physiology* 152(2): 500-515.
- Katiyar, A., Smita, S., Lenka, S.K., Rajwanshi, R., Chinnusamy, V. y Bansal, K.C. (2012). *Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis*. *BMC genomics* 13: 544.
- Kaufman Katz, A., Shimon-Livny, L., Navon, O., Navon, N., Bock, C.H. y Glusker, J.P. (2003). *Copper-Binding Motifs: Structural and Theoretical Aspects*. *HCA* 86: 18.
- Kerscher, S.J. (2000). *Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases*. *Biochimica et biophysica acta* 1459(2-3): 274-283.
- Khalimonchuk, O. y Rodel, G. (2005). *Biogenesis of cytochrome c oxidase*. *Mitochondrion* 5(6): 363-388.
- Khalimonchuk, O., Rigby, K., Bestwick, M., Pierrel, F., Cobine, P.A. y Winge, D.R. (2008). *Pet191 is a cytochrome c oxidase assembly factor in *Saccharomyces cerevisiae**. *Eukaryotic cell* 7(8): 1427-1431.
- Klaumann, S., Nickolaus, S.D., Furst, S.H., Starck, S., Schneider, S., Ekkehard Neuhaus, H. y col. (2011). *The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana**. *The New phytologist* 192(2): 393-404.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A. y Last, R.L. (1998). *Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization*. *Plant physiology* 118(2): 637-650.

- Klodmann, J. y Braun, H.P. (2011). *Proteomic approach to characterize mitochondrial complex I from plants*. *Phytochemistry* 72(10): 1071-1080.
- Klodmann, J., Senkler, M., Rode, C. y Braun, H.P. (2011). *Defining the protein complex proteome of plant mitochondria*. *Plant physiology* 157(2): 587-598.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., Jansch, L. y Braun, H.-P. (2010). *Internal Architecture of Mitochondrial Complex I from Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online* 22(3): 797-810.
- Koch, J.R. y Schmid, F.X. (2014). *Mia40 targets cysteines in a hydrophobic environment to direct oxidative protein folding in the mitochondria*. *Nat Commun* 5: 3041.
- Koen, E., Besson-Bard, A., Duc, C., Astier, J., Gravot, A., Richaud, P. y col. (2013). *Arabidopsis thaliana nicotianamine synthase 4 is required for proper response to iron deficiency and to cadmium exposure*. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 209: 1-11.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T.C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M. y col. (2007). *Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression*. *Science* 316(5825): 715-719.
- Krause, F., Reifschneider, N.H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S. y Dencher, N.A. (2004). *"Respirasome"-like Supercomplexes in Green Leaf Mitochondria of Spinach*. *Journal of Biological Chemistry* 279(46): 48369-48375.
- Kristensen, B.K., Askerlund, P., Bykova, N.V., Egsgaard, H. y Moller, I.M. (2004). *Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Phytochemistry* 65(12): 1839-1851.
- Kropat, J., Tottey, S., Birkenbihl, R.P., Depège, N., Huijser, P. y Merchant, S. (2005). *A regulator of nutritional copper signaling in Chlamydomonas is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(51): 18730-18735.
- Kruft, V., Eubel, H., Jansch, L., Werhahn, W. y Braun, H.P. (2001). *Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis*. *Plant physiology* 127(4): 1694-1710.
- Krüger, C., Berkowitz, O., Stephan, U.W. y Hell, R. (2002). *A Metal-binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of Ricinus communis L.* *Journal of Biological Chemistry* 277(28): 25062-25069.
- Kuhn, K., Richter, U., Meyer, E.H., Delannoy, E., de Longevialle, A.F., O'Toole, N. y col. (2009). *Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 21(9): 2762-2779.

- Kuhn, K., Yin, G., Duncan, O., Law, S.R., Kubiszewski-Jakubiak, S., Kaur, P. y col. (2015). *Decreasing electron flux through the cytochrome and/or alternative respiratory pathways triggers common and distinct cellular responses dependent on growth conditions*. *Plant physiology* 167(1): 228-250.
- Küpper, H., Setlík, I., Setliková, E., Ferimazova, N., Spiller, M. y Küpper, F.C. (2003). *Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in Scenedesmus quadricauda*. *Funct Plant Biol* 30 30: 9.
- Kwasniak, M., Majewski, P., Skibior, R., Adamowicz, A., Czarna, M., Sliwinska, E. y col. (2013). *Silencing of the nuclear RPS10 gene encoding mitochondrial ribosomal protein alters translation in arabidopsis mitochondria*. *The Plant cell* 25(5): 1855-1867.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laluk, K., Abuqamar, S. y Mengiste, T. (2011). *The Arabidopsis mitochondria-localized pentatricopeptide repeat protein PGN functions in defense against necrotrophic fungi and abiotic stress tolerance*. *Plant physiology* 156(4): 2053-2068.
- Law, S.R., Narsai, R., Taylor, N.L., Delannoy, E., Carrie, C., Giraud, E. y col. (2012). *Nucleotide and RNA metabolism prime translational initiation in the earliest events of mitochondrial biogenesis during Arabidopsis germination*. *Plant physiology* 158(4): 1610-1627.
- Leary, S.C., Cobine, P.A., Nishimura, T., Verdijk, R.M., de Krijger, R., de Coo, R. y col. (2013). *COX19 mediates the transduction of a mitochondrial redox signal from SCO1 that regulates ATP7A-mediated cellular copper efflux*. *Molecular biology of the cell* 24(6): 683-691.
- Lee, B.H., Lee, H., Xiong, L. y Zhu, J.K. (2002). *A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression*. *The Plant cell* 14(6): 1235-1251.
- Lee, C.P., Eubel, H., O'Toole, N. y Millar, A.H. (2011). *Combining proteomics of root and shoot mitochondria and transcript analysis to define constitutive and variable components in plant mitochondria*. *Phytochemistry* 72(10): 1092-1108.
- Lee, C.P., Taylor, N.L. y Millar, A.H. (2013). *Recent advances in the composition and heterogeneity of the Arabidopsis mitochondrial proteome*. *Front Plant Sci* 4: 4.
- Lee, J., Pena, M.M., Nose, Y. y Thiele, D.J. (2002). *Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1*. *The Journal of biological chemistry* 277(6): 4380-4387.
- Lee, S.C. y Luan, S. (2012). *ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses*. *Plant Cell Environ* 35(1): 53-60.
- Leister, D. y Shikanai, T. (2013). *Complexities and protein complexes in the antimycin A-sensitive pathway of cyclic electron flow in plants*. *Frontiers in plant science* 4: 161.

- Leister, D., Wang, X., Haberer, G., Mayer, K.F.X. y Kleine, T. (2011). *Intracompartmental and Intercompartmental Transcriptional Networks Coordinate the Expression of Genes for Organellar Functions*. *Plant physiology* 157(1): 386-404.
- Lenaz, G. y Genova, M.L. (2012). *Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation*. *Advances in experimental medicine and biology* 748: 107-144.
- León, G., Holuigue, L. y Jordana, X. (2007). *Mitochondrial Complex II Is Essential for Gametophyte Development in Arabidopsis*. *Plant physiology* 143(4): 1534-1546.
- Liere, K., Weihe, A. y Borner, T. (2011). *The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation*. *Journal of plant physiology* 168(12): 1345-1360.
- Lindemose, S., O'Shea, C., Jensen, M.K. y Skriver, K. (2013). *Structure, Function and Networks of Transcription Factors Involved in Abiotic Stress Responses*. *International journal of molecular sciences* 14(3): 5842-5878.
- Lister, R., Carrie, C., Duncan, O., Ho, L.H., Howell, K.A., Murcha, M.W. y col. (2007). *Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria*. *The Plant cell* 19(11): 3739-3759.
- Lister, R., Chew, O., Lee, M.N., Heazlewood, J.L., Clifton, R., Parker, K.L. y col. (2004). *A transcriptomic and proteomic characterization of the Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction*. *Plant physiology* 134(2): 777-789.
- Lister, R., Murcha, M.W. y Whelan, J. (2003). *The Mitochondrial Protein Import Machinery of Plants (MPIMP) database*. *Nucleic acids research* 31(1): 325-327.
- Liu, Y.J., Norberg, F.E., Szilagyi, A., De Paepe, R., Akerlund, H.E. y Rasmusson, A.G. (2008). *The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio in transgenic Nicotiana sylvestris*. *Plant & cell physiology* 49(2): 251-263.
- Llanos, R.M. y Mercer, J.F. (2002). *The molecular basis of copper homeostasis copper-related disorders*. *DNA and cell biology* 21(4): 259-270.
- Locato, V., de Pinto, M.C. y De Gara, L. (2009). *Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate-glutathione redox enzymes in heat shock responses*. *Physiologia plantarum* 135(3): 296-306.
- Logan, D.C. y Leaver, C.J. (2000). *Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells*. *Journal of experimental botany* 51(346): 865-871.
- Long, T.A., Tsukagoshi, H., Busch, W., Lahner, B., Salt, D.E. y Benfey, P.N. (2010). *The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots*. *The Plant cell* 22(7): 2219-2236.

- Lotz, C., Lin, A.J., Black, C.M., Zhang, J., Lau, E., Deng, N. y col. (2014). *Characterization, design, and function of the mitochondrial proteome: from organs to organisms*. Journal of proteome research 13(2): 433-446.
- Mackenzie, S. y McIntosh, L. (1999). *Higher plant mitochondria*. The Plant cell 11(4): 571-586.
- Markossian, K.A. y Kurganov, B.I. (2003). *Copper chaperones, intracellular copper trafficking proteins. Function, structure, and mechanism of action*. Biochemistry. Biokhimiia 68(8): 827-837.
- Martin, V., Villarreal, F., Miras, I., Navaza, A., Haouz, A., González-Lebrero, R.M. y col. (2009). *Recombinant plant gamma carbonic anhydrase homotrimers bind inorganic carbon*. FEBS Letters 583(21): 3425-3430.
- Maxfield, A.B., Heaton, D.N. y Winge, D.R. (2004). *Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane*. The Journal of biological chemistry 279(7): 5072-5080.
- Meyer, E.H., Giege, P., Gelhaye, E., Rayapuram, N., Ahuja, U., Thony-Meyer, L. y col. (2005). *AtCCMH, an essential component of the c-type cytochrome maturation pathway in Arabidopsis mitochondria, interacts with apocytochrome c*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(44): 16113-16118.
- Meyer, E.H., Taylor, N.L. y Millar, A.H. (2008). *Resolving and identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis*. Journal of proteome research 7(2): 786-794.
- Meyer, E.H., Tomaz, T., Carroll, A.J., Estavillo, G., Delannoy, E., Tanz, S.K. y col. (2009). *Remodeled respiration in ndufs4 with low phosphorylation efficiency suppresses Arabidopsis germination and growth and alters control of metabolism at night*. Plant physiology 151(2): 603-619.
- Meyer, E.H., Tomaz, T., Carroll, A.J., Estavillo, G., Delannoy, E., Tanz, S.K. y col. (2009). *Remodeled respiration in ndufs4 with low phosphorylation efficiency suppresses Arabidopsis germination and growth and alters control of metabolism at night*. Plant physiology 151(2): 603-619.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. y Noctor, G. (2010). *Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models*. Journal of experimental botany 61(15): 4197-4220.
- Michel, A.H. y Kornmann, B. (2012). *The ERMES complex and ER-mitochondria connections*. Biochemical Society transactions 40(2): 445-450.
- Milenkovic, D., Gabriel, K., Guiard, B., Schulze-Specking, A., Pfanner, N. y Chacinska, A. (2007). *Biogenesis of the Essential Tim9–Tim10 Chaperone Complex of Mitochondria:*

- SITE-SPECIFIC RECOGNITION OF CYSTEINE RESIDUES BY THE INTERMEMBRANE SPACE RECEPTOR Mia40*. Journal of Biological Chemistry 282(31): 22472-22480.
- Millar, A.H. y Leaver, C.J. (2000). *The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria*. FEBS Lett 481(2): 117-121.
- Millar, A.H., Eubel, H., Jansch, L., Krufft, V., Heazlewood, J.L. y Braun, H.P. (2004). *Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits*. Plant molecular biology 56(1): 77-90.
- Millar, A.H., Sweetlove, L.J., Giege, P. y Leaver, C.J. (2001). *Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome*. Plant physiology 127(4): 1711-1727.
- Millar, A.H., Trend, A.E. y Heazlewood, J.L. (2004b). *Changes in the mitochondrial proteome during the anoxia to air transition in rice focus around cytochrome-containing respiratory complexes*. The Journal of biological chemistry 279(38): 39471-39478.
- Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L. y Day, D.A. (2011). *Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants*. Annual review of plant biology 62: 79-104.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R. (2010). *Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses*. Plant Cell Environ 33(4): 453-467.
- Mitra, P., Pal, A.K., Basu, D. y Hati, R.N. (1994). *A staining procedure using Coomassie brilliant blue G-250 in phosphoric acid for detection of protein bands with high resolution in polyacrylamide gel and nitrocellulose membrane*. Analytical biochemistry 223(2): 327-329.
- Moller, I.M. (2001). *PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species*. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 52: 561-591.
- Moller, I.M. y Sweetlove, L.J. (2010). *ROS signalling--specificity is required*. Trends in plant science 15(7): 370-374.
- Monke, G., Seifert, M., Keilwagen, J., Mohr, M., Grosse, I., Hahnel, U. y col. (2012). *Toward the identification and regulation of the Arabidopsis thaliana ABI3 regulon*. Nucleic acids research 40(17): 8240-8254.
- Moore, A.L. y Albury, M.S. (2008). *Further insights into the structure of the alternative oxidase: from plants to parasites*. Biochemical Society transactions 36(Pt 5): 1022-1026.
- Moore, A.L., Shiba, T., Young, L., Harada, S., Kita, K. y Ito, K. (2013). *Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase*. Annual review of plant biology 64: 637-663.
- Moreno-Sanchez, R., Hernandez-Esquivel, L., Rivero-Segura, N.A., Marin-Hernandez, A., Neuzil, J., Ralph, S.J. y col. (2013). *Reactive oxygen species are generated by the*

- respiratory complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I.* The FEBS journal 280(3): 927-938.
- Moreno-Sanchez, R., Hernandez-Esquivel, L., Rivero-Segura, N.A., Marin-Hernandez, A., Neuzil, J., Ralph, S.J. y col. (2013). *Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I.* The FEBS journal 280(3): 927-938.
- Morgan, M.J., Lehmann, M., Schwarzlander, M., Baxter, C.J., Sienkiewicz-Porzucek, A., Williams, T.C. y col. (2008). *Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis.* Plant physiology 147(1): 101-114.
- Morrison, M.S., Cobine, P.A. y Hegg, E.L. (2007). *Probing the role of copper in the biosynthesis of the molybdenum cofactor in Escherichia coli and Rhodospirillum rubrum.* Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry 12(8): 1129-1139.
- Msanne, J., Lin, J., Stone, J.M. y Awada, T. (2011). *Characterization of abiotic stress-responsive Arabidopsis thaliana RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes.* Planta 234(1): 97-107.
- Mufarrege, E.F., Curi, G.C. y 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 physiology 50(7): 1393-1399.
- Murcha, M.W., Lister, R., Ho, A.Y.Y. y Whelan, J. (2003). *Identification, Expression, and Import of Components 17 and 23 of the Inner Mitochondrial Membrane Translocase from Arabidopsis.* Plant physiology 131(4): 1737-1747.
- Murcha, M.W., Wang, Y. y Whelan, J. (2012). *A molecular link between mitochondrial preprotein transporters and respiratory chain complexes.* Plant Signal Behav 7(12): 1594-1597.
- Murcha, M.W., Wang, Y., Narsai, R. y Whelan, J. (2014). *The plant mitochondrial protein import apparatus - the differences make it interesting.* Biochimica et biophysica acta 1840(4): 1233-1245.
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K. y col. (2007). *Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants.* Bioscience, biotechnology, and biochemistry 71(8): 2095-2100.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z.K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H. y col. (2003). *Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses.* The Plant journal : for cell and molecular biology 34(2): 137-148.

- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. y Jacquot, J.-P. (2007). *Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria*. *Physiologia plantarum* 129(1): 185-195.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. y Ehrhardt, W. (1988). *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. *Electrophoresis* 9(6): 255-262.
- Ng, S., De Clercq, I., Van Aken, O., Law, S.R., Ivanova, A., Willems, P. y col. (2014). *Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress*. *Mol Plant* 7(7): 1075-1093.
- Ng, S., Giraud, E., Duncan, O., Law, S.R., Wang, Y., Xu, L. y col. (2013a). *Cyclin-dependent kinase E1 (CDKE1) provides a cellular switch in plants between growth and stress responses*. *The Journal of biological chemistry* 288(5): 3449-3459.
- Ng, S., Ivanova, A., Duncan, O., Law, S.R., Van Aken, O., De Clercq, I. y col. (2013). *A membrane-bound NAC transcription factor, ANACo17, mediates mitochondrial retrograde signaling in Arabidopsis*. *The Plant cell* 25(9): 3450-3471.
- Nittis, T., George, G.N. y Winge, D.R. (2001). *Yeast Sco1, a protein essential for cytochrome c oxidase function is a Cu(I)-binding protein*. *The Journal of biological chemistry* 276(45): 42520-42526.
- Niu, X., Helentjaris, T. y Bate, N.J. (2002). *Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes*. *The Plant cell* 14(10): 2565-2575.
- Nobrega, M.P., Bandeira, S.C., Beers, J. y Tzagoloff, A. (2002). *Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase*. *The Journal of biological chemistry* 277(43): 40206-40211.
- Noctor, G., Dutilleul, C., De Paepe, R. y Foyer, C.H. (2004). *Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism*. *Journal of experimental botany* 55(394): 49-57.
- Obata, T., Matthes, A., Koszior, S., Lehmann, M., Araujo, W.L., Bock, R. y col. (2011). *Alteration of mitochondrial protein complexes in relation to metabolic regulation under short-term oxidative stress in Arabidopsis seedlings*. *Phytochemistry* 72(10): 1081-1091.
- O'Connell, J. (2002). *The basics of RT-PCR. Some practical considerations*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 193: 19-25.
- Ooms, G., Hooykaas, P.J., Van Veen, R.J., Van Beelen, P., Regensburg-Tuink, T.J. y 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.

- Ostaszewska, M., Juszczuk, I.M., Kolodziejek, I. y Rychter, A.M. (2014). *Long-term sulphur starvation of Arabidopsis thaliana modifies mitochondrial ultrastructure and activity and changes tissue energy and redox status*. Journal of plant physiology 171(7): 549-558.
- Oswald, C., Krause-Buchholz, U. y Rodel, G. (2009). *Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase*. Journal of molecular biology 389(3): 470-479.
- Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B. y Sekmen, A.H. (2014). *Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of Arabidopsis thaliana*. Journal of experimental botany 65(5): 1377-1390.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Stojanovski, D. y Ryan, M.T. (2011). *The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery*. Cellular signalling 23(10): 1534-1545.
- Palm-Espling, M.E., Niemiec, M.S. y Wittung-Stafshede, P. (2012). *Role of metal in folding and stability of copper proteins in vitro*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1823(9): 1594-1603.
- Palumaa, P., Kangur, L., Voronova, A. y Sillard, R. (2004). *Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase*. The Biochemical journal 382(Pt 1): 307-314.
- Pang, W.L., Kaur, A., Ratushny, A.V., Cvetkovic, A., Kumar, S., Pan, M. y col. (2013). *Metallochaperones regulate intracellular copper levels*. PLoS computational biology 9(1): e1002880.
- Pena, M.M., Puig, S. y Thiele, D.J. (2000). *Characterization of the Saccharomyces cerevisiae high affinity copper transporter Ctr3*. The Journal of biological chemistry 275(43): 33244-33251.
- Perales, M., Eubel, H., Heinemeyer, J., Colaneri, A., Zabaleta, E. y Braun, H.P. (2005). *Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I + III<sub>2</sub> levels and alters mitochondrial physiology in Arabidopsis*. Journal of molecular biology 350(2): 263-277.
- Perea-Garcia, A., Garcia-Molina, A., Andres-Colas, N., Vera-Sirera, F., Perez-Amador, M.A., Puig, S. y col. (2013). *Arabidopsis copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling*. Plant physiology 162(1): 180-194.
- Pilon, M. (2011). *Moving copper in plants*. The New phytologist 192(2): 305-307.
- Polishchuk, R. y Lutsenko, S. (2013). *Golgi in copper homeostasis: a view from the membrane trafficking field*. Histochemistry and cell biology 140(3): 285-295.
- Poschenrieder, C., Tolrá, R. y Barceló, J. (2006). *Can metals defend plants against biotic stress?* Trends Plant Sci. 11: 7.

- Priault, P., Tcherkez, G., Cornic, G., De Paepe, R., Naik, R., Ghashghaie, J. y col. (2006). *The lack of mitochondrial complex I in a CMSII mutant of Nicotiana sylvestris increases photorespiration through an increased internal resistance to CO<sub>2</sub> diffusion*. Journal of experimental botany 57(12): 3195-3207.
- Prouse, M.B. y Campbell, M.M. (2012). *The interaction between MYB proteins and their target DNA binding sites*. Biochimica et biophysica acta 1819(1): 67-77.
- Puig, S. (2014). *Function and Regulation of the Plant COPT Family of High-Affinity Copper Transport Proteins*. Advances in Botany 2014: 9.
- Puig, S., Andres-Colas, N., Garcia-Molina, A. y Penarrubia, L. (2007). *Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications*. Plant Cell Environ 30(3): 271-290.
- Punter, F.A., Adams, D.L. y Glerum, D.M. (2000). *Characterization and localization of human COX17, a gene involved in mitochondrial copper transport*. Human genetics 107(1): 69-74.
- Quinn, J.M. y Merchant, S. (1995). *Two copper-responsive elements associated with the Chlamydomonas Cyc6 gene function as targets for transcriptional activators*. The Plant cell 7(5): 623-628.
- Ramirez-Aguilar, S.J., Keuthe, M., Rocha, M., Fedyaev, V.V., Kramp, K., Gupta, K.J. y col. (2011). *The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability*. The Journal of biological chemistry 286(50): 43045-43053.
- Rasmusson, A.G. y Wallstrom, S.V. (2010). *Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels*. Biochemical Society transactions 38(2): 661-666.
- Rasmusson, A.G., Fernie, A.R. y van Dongen, J.T. (2009). *Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations?* Physiologia plantarum 137(4): 371-382.
- Ravet, K. y Pilon, M. (2013). *Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress*. Antioxidants & redox signaling 19(9): 919-932.
- Ravet, K., Danford, F.L., Dihle, A., Pittarello, M. y Pilon, M. (2011). *Spatiotemporal analysis of copper homeostasis in Populus trichocarpa reveals an integrated molecular remodeling for a preferential allocation of copper to plastocyanin in the chloroplasts of developing leaves*. Plant physiology 157(3): 1300-1312.
- Reeves, W.M., Lynch, T.J., Mobin, R. y Finkelstein, R.R. (2011). *Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive(ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors*. Plant molecular biology 75(4-5): 347-363.
- Remacle, C., Coosemans, N., Jans, F., Hanikenne, M., Motte, P. y Cardol, P. (2010). *Knock-down of the COX3 and COX17 gene expression of cytochrome c oxidase in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Plant molecular biology 74(3): 223-233.

- Ren, X., Chen, Z., Liu, Y., Zhang, H., Zhang, M., Liu, Q. y col. (2010). *ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis*. The Plant journal : for cell and molecular biology 63(3): 417-429.
- Rhoads, D.M., Umbach, A.L., Subbaiah, C.C. y Siedow, J.N. (2006). *Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling*. Plant physiology 141(2): 357-366.
- Ribichich, K.F., Tioni, M.F., Chan, R.L. y Gonzalez, D.H. (2001). *Cell-type-specific expression of plant cytochrome c mRNA in developing flowers and roots*. Plant physiology 125(4): 1603-1610.
- Ridge, P.G., Zhang, Y. y Gladyshev, V.N. (2008). *Comparative genomic analyses of copper transporters and cuproproteomes reveal evolutionary dynamics of copper utilization and its link to oxygen*. PloS one 3(1): e1378.
- Riemer, J., Bulleid, N., and Herrmann, J.M. (2009). *Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process*. Science 324: 3.
- Rigby, K., Zhang, L., Cobine, P.A., George, G.N. y Winge, D.R. (2007). *Characterization of the cytochrome c oxidase assembly factor Cox19 of Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry 282(14): 10233-10242.
- Rigby, K., Zhang, L., Cobine, P.A., George, G.N. y Winge, D.R. (2007). *characterization of the cytochrome c oxidase assembly factor Cox19 of Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry 282(14): 10233-10242.
- Rintamaki, E., Lepisto, A. y Kangasjarvi, S. (2009). *Implication of chlorophyll biosynthesis on chloroplast-to-nucleus retrograde signaling*. Plant Signal Behav 4(6): 545-547.
- Robinson, N.J. y Winge, D.R. (2010). *Copper metallochaperones*. Annual review of biochemistry 79: 537-562.
- Rurek, M. (2014). *Plant mitochondria under a variety of temperature stress conditions*. Mitochondrion 19, Part B(0): 289-294.
- Sabar, M., De Paepe, R. y de Kouchkovsky, Y. (2000). *Complex I impairment, respiratory compensations, and photosynthetic decrease in nuclear and mitochondrial male sterile mutants of Nicotiana sylvestris*. Plant physiology 124(3): 1239-1250.
- Saga, H., Ogawa, T., Kai, K., Suzuki, H., Ogata, Y., Sakurai, N. y col. (2012). *Identification and characterization of ANACo42, a transcription factor family gene involved in the regulation of camalexin biosynthesis in Arabidopsis*. Molecular plant-microbe interactions : MPMI 25(5): 684-696.
- Saish, D., Nakazono, M., Lee, K.H., Tsutsumi, N., Akita, S. y Hirai, A. (2001). *The gene for alternative oxidase-2 (AOX2) from Arabidopsis thaliana consists of five exons unlike other AOX genes and is transcribed at an early stage during germination*. Genes & genetic systems 76(2): 89-97.

- Salinas, T., Larosa, V., Cardol, P., Marechal-Drouard, L. y Remacle, C. (2014). *Respiratory-deficient mutants of the unicellular green alga Chlamydomonas: a review*. *Biochimie* 100: 207-218.
- Sambrook, J.F., E. y Maniatis, . (1989). En: *Molecular cloning. A laboratory manual*. (Second ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. p.
- Sancenon, V., Puig, S., Mateu-Andres, I., Dorcey, E., Thiele, D.J. y Penarrubia, L. (2004). *The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development*. *The Journal of biological chemistry* 279(15): 15348-15355.
- Sancenon, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D.J. y Penarrubia, L. (2003). *Identification of a copper transporter family in Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* 51(4): 577-587.
- Schertl, P. y Braun, H.P. (2014). *Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria*. *Front Plant Sci* 5: 163.
- Scholl, R.L., May, S.T. y Ware, D.H. (2000). *Seed and molecular resources for Arabidopsis*. *Plant physiology* 124(4): 1477-1480.
- Scholl, R.L., May, S.T. y Ware, D.H. (2000). *Seed and molecular resources for Arabidopsis*. *Plant physiology* 124(4): 1477-1480.
- Schwarzländer, M. y Finkemeier, I. (2013). *Mitochondrial Energy and Redox Signaling in Plants*. *Antioxidants & redox signaling* 18(16): 2122-2144.
- Schwarzlander, M., König, A.C., Sweetlove, L.J. y Finkemeier, I. (2012). *The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses*. *Journal of experimental botany* 63(4): 1735-1750.
- Schwarzländer, M., Logan, D.C., Johnston, I.G., Jones, N.S., Meyer, A.J., Fricker, M.D. y col. (2012). *Pulsing of Membrane Potential in Individual Mitochondria: A Stress-Induced Mechanism to Regulate Respiratory Bioenergetics in Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*.
- Sena, L.A. y Chandel, N.S. (2012). *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. *Molecular cell* 48(2): 158-167.
- Shahnejat-Bushehri, S., Mueller-Roeber, B. y Balazadeh, S. (2013). *Arabidopsis NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 affects thermomemory-associated genes and enhances heat stress tolerance in primed and unprimed conditions*. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 7(12): 3.
- Shaikhali, J., Heiber, I., Seidel, T., Stroher, E., Hiltcher, H., Birkmann, S. y col. (2008). *The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes*. *BMC plant biology* 8: 48.
- Shaikhali, J., Noren, L., de Dios Barajas-Lopez, J., Srivastava, V., König, J., Sauer, U.H. y col. (2012). *Redox-mediated mechanisms regulate DNA binding activity of the G-group of*

- basic region leucine zipper (bZIP) transcription factors in Arabidopsis*. The Journal of biological chemistry 287(33): 27510-27525.
- Sharabi-Schwager, M., Samach, A. y Porat, R. (2010). *Overexpression of the CBF2 transcriptional activator in Arabidopsis suppresses the responsiveness of leaf tissue to the stress hormone ethylene*. Plant biology (Stuttgart, Germany) 12(4): 630-638.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. y col. (2002). *Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes*. Journal of experimental botany 53(372): 1305-1319.
- Shikanai, T., Muller-Moule, P., Munekage, Y., Niyogi, K.K. y Pilon, M. (2003a). *PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts*. The Plant cell 15(6): 1333-1346.
- Shikanai, T., Müller-Moulé, P., Munekage, Y., Niyogi, K.K. y Pilon, M. (2003b). *PAA1, a P-Type ATPase of Arabidopsis, Functions in Copper Transport in Chloroplasts*. The Plant Cell Online 15(6): 1333-1346.
- Shin, L.-J. y Yeh, K.-C. (2012). *Overexpression of Arabidopsis ATX1 retards plant growth under severe copper deficiency*. Plant signaling & behavior 7(9): 1082-1083.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Seki, M. (2003). *Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses*. Current opinion in plant biology 6(5): 410-417.
- Sideris, D.P., Petrakis, N., Katrakili, N., Mikropoulou, D., Gallo, A., Ciofi-Baffoni, S. y col. (2009). *A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding*. The Journal of cell biology 187(7): 1007-1022.
- Sideris, D.P., Petrakis, N., Katrakili, N., Mikropoulou, D., Gallo, A., Ciofi-Baffoni, S. y col. (2009). *A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding*. The Journal of cell biology 187(7): 1007-1022.
- Sierla, M., Rahikainen, M., Salojarvi, J., Kangasjarvi, J. y Kangasjarvi, S. (2013). *Apoplasmic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses*. Antioxidants & redox signaling 18(16): 2220-2239.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W. y col. (2011). *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. Molecular systems biology 7: 539.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W. y col. (2011). *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. Molecular systems biology 7: 539.
- Silver, J.D., Ritchie, M.E. y Smyth, G.K. (2009). *Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution*. Biostatistics 10(2): 352-363.

- Silver, J.D., Ritchie, M.E. y Smyth, G.K. (2009). *Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution*. *Biostatistics* 10(2): 352-363.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A. y Levi-Schaffer, F. (2000). *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 5(5): 415-418.
- Sivitz, A.B., Hermand, V., Curie, C. y Vert, G. (2012). *Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 Control Iron Homeostasis via a FIT-Independent Pathway*. *PLoS one* 7(9).
- Skiryecz, A., De Bodt, S., Obata, T., De Clercq, I., Claeys, H., De Rycke, R. y col. (2010). *Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress*. *Plant physiology* 152(1): 226-244.
- Smith, A.M.O., Ratcliffe, R.G. y Sweetlove, L.J. (2004). *Activation and Function of Mitochondrial Uncoupling Protein in Plants*. *Journal of Biological Chemistry* 279(50): 51944-51952.
- Sommer, F., Kropat, J., Malasarn, D., Grosseohme, N.E., Chen, X., Giedroc, D.P. y col. (2010). *The CRR1 nutritional copper sensor in Chlamydomonas contains two distinct metal-responsive domains*. *The Plant cell* 22(12): 4098-4113.
- Soto, I.C., Fontanesi, F., Liu, J. y Barrientos, A. (2012). *Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core*. *Biochimica et biophysica acta* 1817(6): 883-897.
- Soubannier, V. y McBride, H.M. (2009). *Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades*. *Biochimica et biophysica acta* 1793(1): 154-170.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Künkele, K.-P., Nussberger, S., Neupert, W. y col. (2000). *Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria*. *The EMBO Journal* 19(18): 4895-4902.
- Staneloni, R.J., Rodriguez-Batiller, M.J. y Casal, J.J. (2008). *Abscisic acid, high-light, and oxidative stress down-regulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation*. *Mol Plant* 1(1): 75-83.
- Steinebrunner, I., Gey, U., Andres, M., Garcia, L. y Gonzalez, D.H. (2014). *Divergent functions of the Arabidopsis mitochondrial SCO proteins: HCC1 is essential for COX activity while HCC2 is involved in the UV-B stress response*. *Frontiers in plant science* 5: 87.
- Steinebrunner, I., Landschreiber, M., Krause-Buchholz, U., Teichmann, J. y Rödel, G. (2011). *HCC1, the Arabidopsis homologue of the yeast mitochondrial copper chaperone SCO1, is essential for embryonic development*. *Journal of experimental botany* 62(1): 319-330.
- Stuart, R.A. (2008). *Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria*. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 40(5): 411-417.

- Sunderhaus, S., Dudkina, N.V., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M. y col. (2006). *Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants*. The Journal of biological chemistry 281(10): 6482-6488.
- Sunkar, R. y Zhu, J.K. (2004). *Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis*. The Plant cell 16(8): 2001-2019.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R. y Miller, G. (2012). *ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress*. Plant, cell & environment 35(2): 259-270.
- Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P. y Iwata, S. (2002). *The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from Rhodospirillum rubrum*. J Mol Biol 321(2): 329-339.
- Sweetlove, L.J., Beard, K.F., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R. y Ratcliffe, R.G. (2010). *Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle*. Trends in plant science 15(8): 462-470.
- Sweetlove, L.J., Taylor, N.L. y Leaver, C.J. (2007). *Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant Arabidopsis thaliana*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 372: 125-136.
- Sweetlove, L.J., Taylor, N.L. y Leaver, C.J. (2007). *Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant Arabidopsis thaliana*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 372: 125-136.
- Szabados, L. y Savoure, A. (2010). *Proline: a multifunctional amino acid*. Trends in plant science 15(2): 89-97.
- Szarka, A., Banhegyi, G. y Asard, H. (2013). *The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration*. Antioxidants & redox signaling 19(9): 1036-1044.
- Takahashi, Y., Kako, K., Kashiwabara, S., Takehara, A., Inada, Y., Arai, H. y col. (2002). *Mammalian copper chaperone Cox17p has an essential role in activation of cytochrome C oxidase and embryonic development*. Molecular and cellular biology 22(21): 7614-7621.
- Talla, S., Riazunnisa, K., Padmavathi, L., Sunil, B., Rajsheel, P. y Raghavendra, A.S. (2011). *Ascorbic acid is a key participant during the interactions between chloroplasts and mitochondria to optimize photosynthesis and protect against photoinhibition*. Journal of biosciences 36(1): 163-173.
- Tamarit, J., Irazusta, V., Moreno-Cermeno, A. y Ros, J. (2006). *Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast*. Analytical biochemistry 351.
- Tapken, W., Ravet, K. y Pilon, M. (2012). *Plastocyanin controls the stabilization of the thylakoid Cu-transporting P-type ATPase PAA2/HMA8 in response to low copper in Arabidopsis*. The Journal of biological chemistry 287(22): 18544-18550.

- Taylor, N.L., Heazlewood, J.L. y Millar, A.H. (2011). *The Arabidopsis thaliana 2-D gel mitochondrial proteome: Refining the value of reference maps for assessing protein abundance, contaminants and post-translational modifications*. Proteomics 11(9): 1720-1733.
- Taylor, N.L., Howell, K.A., Heazlewood, J.L., Tan, T.Y., Narsai, R., Huang, S. y col. (2010). *Analysis of the rice mitochondrial carrier family reveals anaerobic accumulation of a basic amino acid carrier involved in arginine metabolism during seed germination*. Plant physiology 154(2): 691-704.
- Team, R.C. (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Terziyska, N., Grumbt, B., Bien, M., Neupert, W., Herrmann, J.M. y Hell, K. (2007). *The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway*. FEBS Letters 581(6): 1098-1102.
- Tottey, S., Waldron, K.J., Firbank, S.J., Reale, B., Bessant, C., Sato, K. y col. (2008). *Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding*. Nature 455(7216): 1138-1142.
- Truscott, K.N., Wiedemann, N., Rehling, P., Müller, H., Meisinger, C., Pfanner, N. y col. (2002). *Mitochondrial Import of the ADP/ATP Carrier: the Essential TIM Complex of the Intermembrane Space Is Required for Precursor Release from the TOM Complex*. Molecular and Cellular Biology 22(22): 7780-7789.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K. y col. (1995). *Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å*. Science (New York, N.Y.) 269(5227): 1069-1074.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K. y col. (1996). *The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å*. Science (New York, N.Y.) 272(5265): 1136-1144.
- Uberti-Manassero, N.G., Lucero, L.E., Viola, I.L., Vegetti, A.C. y Gonzalez, D.H. (2012). *The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins*. Journal of experimental botany 63(2): 809-823.
- Uberti-Manassero, N.G., Viola, I., Welchen, E. y Gonzalez, D.H. (2013). *TCP transcription factors: architectures of plant form*. Biomolecular Concepts 4: 6.
- Umbach, A.L. y Siedow, J.N. (2000). *The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi Pichia stipitis and Neurospora crassa are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme*. Archives of biochemistry and biophysics 378(2): 234-245.
- Umbach, A.L., Fiorani, F. y Siedow, J.N. (2005). *Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue*. Plant physiology 139(4): 1806-1820.

- Umbach, A.L., Ng, V.S. y Siedow, J.N. (2006). *Regulation of plant alternative oxidase activity: A tale of two cysteines*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1757(2): 135-142.
- Umbach, A.L., Zarkovic, J., Yu, J., Ruckle, M.E., McIntosh, L., Hock, J.J. y col. (2012). *Comparison of intact Arabidopsis thaliana leaf transcript profiles during treatment with inhibitors of mitochondrial electron transport and TCA cycle*. PloS one 7(9): e44339.
- Van Aken, O. y Whelan, J. (2012). *Comparison of transcriptional changes to chloroplast and mitochondrial perturbations reveals common and specific responses in Arabidopsis*. Front Plant Sci 3: 281.
- Van Aken, O., Giraud, E., Clifton, R. y Whelan, J. (2009a). *Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses*. Physiologia plantarum 137(4): 354-361.
- Van Aken, O., Whelan, J. y Van Breusegem, F. (2010). *Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response*. Trends in plant science 15(5): 275-282.
- Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E. y col. (2009b). *Defining the mitochondrial stress response in Arabidopsis thaliana*. Mol Plant 2(6): 1310-1324.
- Van Aken, O., Zhang, B., Law, S., Narsai, R. y Whelan, J. (2013). *AtWRKY40 and AtWRKY63 Modulate the Expression of Stress-Responsive Nuclear Genes Encoding Mitochondrial and Chloroplast Proteins*. Plant physiology 162(1): 254-271.
- Van Aken, O., Zhang, B., Law, S., Narsai, R. y Whelan, J. (2013). *AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins*. Plant physiology 162(1): 254-271.
- van der Laan, M., Hutu, D.P. y Rehling, P. (2010). *On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase*. Biochimica et biophysica acta 1803(6): 732-739.
- van Dongen, J.T., Gupta, K.J., Ramirez-Aguilar, S.J., Araujo, W.L., Nunes-Nesi, A. y Fernie, A.R. (2011). *Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways*. Journal of plant physiology 168(12): 1434-1443.
- Vanderauwera, S., Vandenbroucke, K., Inze, A., van de Cotte, B., Muhlenbock, P., De Rycke, R. y col. (2012). *AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109(49): 20113-20118.
- Vanlerberghe, G.C. (2013). *Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants*. International journal of molecular sciences 14(4): 6805-6847.

- Vanlerberghe, G.C. y McIntosh, L. (1996). *Signals Regulating the Expression of the Nuclear Gene Encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria*. *Plant physiology* 111(2): 589-595.
- Vanlerberghe, G.C., Cvetkovska, M. y Wang, J. (2009). *Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase?* *Physiologia plantarum* 137(4): 392-406.
- Vercesi, A.E., Borecky, J., Maia Ide, G., Arruda, P., Cuccovia, I.M. y Chaimovich, H. (2006). *Plant uncoupling mitochondrial proteins*. *Annual review of plant biology* 57: 383-404.
- Vercesi, A.E., Martins, I.S., Silva, M.A.P., Leite, H.M.F., Cuccovia, I.M. y Chaimovich, H. (1995). *PUMPing plants*. *Nature* 375(6526): 24-24.
- Vestergaard, C.L., Flyvbjerg, H. y Moller, I.M. (2012). *Intracellular signaling by diffusion: can waves of hydrogen peroxide transmit intracellular information in plant cells?* *Front Plant Sci* 3: 295.
- Vickers, C.E., Gershenzon, J., Lerda M. y Loreto F. (2009). *A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress*. *Nat Chem Biol* (5)283 - 291
- Viola, I.L., Guttlein, L.N. y Gonzalez, D.H. (2013). *Redox modulation of plant developmental regulators from the class I TCP transcription factor family*. *Plant physiology* 162(3): 1434-1447.
- Vogtle, F.N., Wortelkamp, S., Zahedi, R.P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K. y col. (2009). *Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability*. *Cell* 139(2): 428-439.
- Voronova, A., Kazantseva, J., Tuuling, M., Sokolova, N., Sillard, R. y Palumaa, P. (2007a). *Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase: expression, purification, and formation of mixed disulphide adducts with thiol reagents*. *Protein expression and purification* 53(1): 138-144.
- Voronova, A., Meyer-Klaucke, W., Meyer, T., Rompel, A., Krebs, B., Kazantseva, J. y col. (2007b). *Oxidative switches in functioning of mammalian copper chaperone Cox17*. *The Biochemical journal* 408(1): 139-148.
- Wallstrom, S.V., Florez-Sarasa, I., Araujo, W.L., Aidemark, M., Fernandez-Fernandez, M., Fernie, A.R. y col. (2014a). *Suppression of the external mitochondrial NADPH dehydrogenase, NDB1, in Arabidopsis thaliana affects central metabolism and vegetative growth*. *Mol Plant* 7(2): 356-368.
- Wallstrom, S.V., Florez-Sarasa, I., Araujo, W.L., Escobar, M.A., Geisler, D.A., Aidemark, M. y col. (2014b). *Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis thaliana modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport*. *Plant & cell physiology* 55(5): 881-896.

- Wang, Y., Carrie, C., Giraud, E., Elhafez, D., Narsai, R., Duncan, O. y col. (2012). *Dual location of the mitochondrial preprotein transporters B14.7 and Tim23-2 in complex I and the TIM17:23 complex in Arabidopsis links mitochondrial activity and biogenesis*. The Plant cell 24(6): 2675-2695.
- Waters, B.M., McInturf, S.A. y Stein, R.J. (2012). *Rosette iron deficiency transcript and microRNA profiling reveals links between copper and iron homeostasis in Arabidopsis thaliana*. Journal of experimental botany 63(16): 5903-5918.
- Welchen, E. y Gonzalez, D.H. (2005). *Differential expression of the Arabidopsis cytochrome c genes Cytc-1 and Cytc-2*. Plant Physiol. 139: 2.
- Welchen, E. y 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 physiology 141(2): 540-545.
- Welchen, E., Chan, R.L. y Gonzalez, D.H. (2002). *Metabolic regulation of genes encoding cytochrome c and cytochrome c oxidase subunit Vb in Arabidopsis*. Plant, cell & environment 25(12): 1605-1615.
- Welchen, E., Chan, R.L. y 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*. Journal of experimental botany 55(405): 1997-2004.
- Welchen, E., Garcia, L., Mansilla, N. y Gonzalez, D.H. (2014). *Coordination of plant mitochondrial biogenesis: keeping pace with cellular requirements*. Front Plant Sci 4: 551.
- Welchen, E., Hildebrandt, T.M., Lewejohann, D., Gonzalez, D.H. y Braun, H.P. (2012). *Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III*. Biochimica et biophysica acta 1817(7): 990-1001.
- Welchen, E., Viola, I.L., Kim, H.J., Prendes, L.P., Comelli, R.N., Hong, J.C. y col. (2009). *A segment containing a G-box and an ACGT motif confers differential expression characteristics and responses to the Arabidopsis Cytc-2 gene, encoding an isoform of cytochrome c*. Journal of experimental botany 60(3): 829-845.
- Werhahn, W. y Braun, H.P. (2002). *Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from Arabidopsis thaliana by three-dimensional gel electrophoresis*. Electrophoresis 23(4): 640-646.
- Wind, J.J., Peviani, A., Snel, B., Hanson, J. y Smeekens, S.C. (2013). *ABI4: versatile activator and repressor*. Trends in plant science 18(3): 125-132.
- Wintz, H. y Vulpe, C. (2002). *Plant copper chaperones*. Biochemical Society transactions 30(4): 732-735.

- Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.-Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.-S. y col. (2003). *Expression Profiles of Arabidopsis thaliana in Mineral Deficiencies Reveal Novel Transporters Involved in Metal Homeostasis*. Journal of Biological Chemistry 278(48): 47644-47653.
- Wittig, I., Carozzo, R., Santorelli, F.M. y Schagger, H. (2007). *Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines*. Electrophoresis 28(21): 3811-3820.
- Xu, L., Carrie, C., Law, S.R., Murcha, M.W. y Whelan, J. (2013). *Acquisition, conservation, and loss of dual-targeted proteins in land plants*. Plant physiology 161(2): 644-662.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2006). *Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses*. Annual review of plant biology 57: 781-803.
- Yamamoto, H., Fukui, K., Takahashi, H., Kitamura, S., Shiota, T., Terao, K. y col. (2009). *Roles of Tom70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins*. The Journal of biological chemistry 284(46): 31635-31646.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T. y Pilon, M. (2007). *Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis*. The Journal of biological chemistry 282(22): 16369-16378.
- Yamasaki, H., Hayashi, M., Fukazawa, M., Kobayashi, Y. y Shikanai, T. (2009). *SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in Arabidopsis*. The Plant cell 21(1): 347-361.
- Yang, Y., Yu, X., Song, L. y An, C. (2011). *ABI4 activates DGAT1 expression in Arabidopsis seedlings during nitrogen deficiency*. Plant physiology 156(2): 873-883.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. y Madden, T.L. (2012). *Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC bioinformatics 13: 134.
- Yoshida, K. y Noguchi, K. (2011). *Interaction Between Chloroplasts and Mitochondria: Activity, Function, and Regulation of the Mitochondrial Respiratory System during Photosynthesis*. En: *Plant Mitochondria* (Eds.: Kempken, F.). Springer New York, p. 383-409.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J. y col. (2010). *AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation*. The Plant journal : for cell and molecular biology 61(4): 672-685.
- Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K. y Mochizuki, M. (2012). *Structural studies on bovine heart cytochrome c oxidase*. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics 1817(4): 579-589.

- Yoshinaga, K., Arimura, S., Niwa, Y., Tsutsumi, N., Uchimiya, H. y Kawai-Yamada, M. (2005). *Mitochondrial behaviour in the early stages of ROS stress leading to cell death in Arabidopsis thaliana*. *Annals of botany* 96(2): 337-342.
- Zentgraf, U., Laun, T. y Miao, Y. (2010). *The complex regulation of WRKY53 during leaf senescence of Arabidopsis thaliana*. *European journal of cell biology* 89(2-3): 133-137.
- Zerbes, R.M., van der Klei, I.J., Veenhuis, M., Pfanner, N., van der Laan, M. y Bohnert, M. (2012). *Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture*. *Biological chemistry* 393(11): 1247-1261.
- Zhang, B., Liu, K., Zheng, Y., Wang, Y., Wang, J. y Liao, H. (2013). *Disruption of AtWINK8 Enhances Tolerance of Arabidopsis to Salt and Osmotic Stresses via Modulating Proline Content and Activities of Catalase and Peroxidase*. *International journal of molecular sciences* 14(4): 7032-7047.
- Zhang, B., Van Aken, O., Thatcher, L., De Clercq, I., Duncan, O., Law, S.R. y col. (2014). *The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 80(4): 709-727.
- Zhu, C., Ding, Y. y Liu, H. (2011). *MiR398 and plant stress responses*. *Physiologia plantarum* 143(1): 1-9.
- Zottini, M., Barizza, E., Bastianelli, F., Carimi, F. y Lo Schiavo, F. (2006). *Growth and senescence of Medicago truncatula cultured cells are associated with characteristic mitochondrial morphology*. *The New phytologist* 172(2): 239-247.
- Zsigmond, L., Rigo, G., Szarka, A., Szekely, G., Otvos, K., Darula, Z. y col. (2008). *Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport*. *Plant physiology* 146(4): 1721-1737.
- Zsigmond, L., Szepesi, A., Tari, I., Rigo, G., Kiraly, A. y Szabados, L. (2012). *Overexpression of the mitochondrial PPR40 gene improves salt tolerance in Arabidopsis*. *Plant science* 182: 87-93.
- Zsigmond, L., Tomasskovics, B., Deak, V., Rigo, G., Szabados, L., Banhegyi, G. y col. (2011). *Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient Arabidopsis*. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 49(8): 809-815.



## 10. ANEXOS



10.1. ANEXO I

**TABLA 1. Oligonucleótidos empleados para clonado.**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Descripción
GateCOX171F	CCGAGATCTTCGCCGACATTTTCACCG	Amplificación de <i>AtCOX17-1</i> a partir de ADN genómico para sobreexpresar este gen como fusión a mRFP
GateCOX171R	GCCCTCGAGACGTTGAAACCTTCTGC	
GateCOX171STOPR	GCCTCGAGTCAGACGTTGAAACCTTCT	Usado con el oligonucleótido GateCOX171F permite amplificar la secuencia de <i>AtCOX17-1</i> a partir de ADN genómico necesaria para sobreexpresar este gen en plantas
GateCOX171P	GGCGGATCCAGTTTTGGTTTCAGATACATA	Usado con el oligonucleótido GateCOX171R permite amplificar la secuencia promotora y codificante de <i>AtCOX17-1</i>
GateCOX172F	CCCGGATCCCTTTCCTTGCTCGCCCAA	Amplificación de <i>AtCOX17-2</i> a partir de ADN genómico para sobreexpresar este gen como fusión a mRFP
GateCOX172R	GGCCTCGAGACTTTGAAACCCTCTGAT	
GateCOX172STOPR	GGCCTCGAGTCAAACCTTTGAAACCCTCTG	Usado con el oligonucleótido GateCOX172F permite amplificar la secuencia de <i>AtCOX17-2</i> a partir de ADN genómico necesaria para sobreexpresar este gen en plantas
GateCOX172P	GGCAGATCTTGCTTTTGAATGTC	Usado con el oligonucleótido GateCOX172R permite amplificar la secuencia promotora y codificante de <i>AtCOX17-2</i>
GateCOX19F	GGCAGATCTAAGAGGCAAATCTCCCAA	Amplificación de <i>AtCOX19</i> a partir de ADN genómico para sobreexpresar este gen como fusión a mRFP
GateCOX19R	GCCCCTCGAGTGTCGATACTCTCTGTA	
GateCOX19STOPR	GCCCTTCGAGGTCAACCTTTCAATGTTT	Usado con el oligonucleótido GateCOX19 permite amplificar la secuencia de <i>AtCOX19</i> a partir de ADN genómico necesaria para sobreexpresar este gen en plantas
GateCOX19P	GGCAGATCTTTTTAGGGGATCACTAA	Usado con el oligonucleótido GateCOX19 permite amplificar la secuencia promotora y codificante de <i>AtCOX19</i>
AbCOX17-1F	CCCGGATCCATGACTGATCAGCCAGC	Amplificación de la secuencia codificante de <i>AtCOX17-1</i> para obtener la proteína recombinante GST-COX17
AbCOX19-F	CCCGGATCCATGATGATCACTATAAAGTTC	Amplificación de la secuencia codificante de <i>AtCOX19</i> para obtener la proteína recombinante GST-COX19
AHL1	TAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGC	Adición de los sitios de recombinación para el clonado empleando tecnología Gateway.
AHL2	CAGAGCTGCAGCTGGATGGC	
amiCOX171a*	GAAAGACAATTTTATGAGCTGCTACATATATA TTCT	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo izquierdo amiRNA(1) para silenciar <i>COX17-1</i>
amiCOX171a	GAGCGGCTCATAAAATTTGTCTATCAAAGAGAAT CAATGA	Este par de oligonucleótidos permite amplificar el <i>hairpin</i> del amiRNA(1) para silenciar <i>AtCOX17-1</i>
amiCOX171s*	GAGCAGCTCATAAAATTTGTCTTTACAGGTCGT GATATG	
amiCOX171s	GATAGACAAATTTTATGAGCCGCTCTCTTTTGT ATTCC	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo derecho amiRNA(1) para silenciar <i>AtCOX17-1</i>
amiCOX172a*	GAAACACAATATATGAGCTTTGTCTACATATATA TTCT	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo izquierdo amiRNA(1) para silenciar <i>COX17-2</i>
amiCOX172a	GAACGAAGCTCATATTTTGTGTATCAAAGAGAAT CAATGA	Este par de oligonucleótidos permite amplificar el <i>hairpin</i> del amiRNA(1) para silenciar <i>AtCOX17-2</i>
amiCOX172s*	GAACAAAGCTCATATATTGTGTTTACAGGTCGT GATATG	
amiCOX172s	GATACACAAAATATGAGCTTCGTTCTCTTTTGT ATTCC	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo derecho amiRNA(1) para silenciar <i>AtCOX17-2</i>
amiCOX19a*	GAAAGTTCTAAGCCATGCGGTACTCTACATATATT CCT	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo izquierdo amiRNA(1) para silenciar <i>COX17-1</i>
amiCOX19a	GAGTGCCGCATGGCTAAGAATCAAAAGAGAAT CAATGA	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el <i>hairpin</i> del amiRNA(1) para silenciar <i>AtCOX17-1</i>
amiCOX19s*	GAGTACCGCATGGCTTAGAACTTTTACAGGTCGT GATATG	

Continúa en la página siguiente

amiCOX19s	GATAGTCTTAGCCATGCGGCACTCTCTTTTGTG TTCC	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo derecho amiRNA(1) para silenciar <i>AtCOX17-1</i>
amiCOX171a*(2)	GAAATACCCAAAACCGATACTTGCTACATATATA TTCCT	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo izquierdo amiRNA(2) para silenciar <i>COX17-1</i>
amiCOX171a(2)	GACAGGTATCGGTTTAGGGTATATCAAAGAGAAT CAATGA	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el <i>hairpin</i> del amiRNA(2) para silenciar <i>AtCOX17-1</i>
amiCOX171s*(2)	GACAAGTATCGGTTTTGGGTATTTACAGGTCGT GATATG	
amiCOX171s(2)	GATATACCTAAACCGATACCTGTCTCTCTTTTGT ATTCC	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo derecho amiRNA(2) para silenciar <i>COX17-1</i>
amiCOX172a*(2)	GAAGTATCTTGAGTTTTGAGTAATCTACATATATA TTCCT	Used with NB47F to amplify the left arm of the amiRNA(2) coding sequence to silence <i>COX17-2</i>
amiCOX172a(2)	GATTGCTCAAAACTCTAGATACATCAAAGAGAAT CAATGA	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el <i>hairpin</i> del amiRNA(2) para silenciar <i>AtCOX17-2</i>
amiCOX172s*(2)	GATTACTCAAAACTCAAGATACTTACAGGTCGT GATATG	
amiCOX172s(2)	GATGTATCTAGAGTTTTGAGCAATCTCTCTTTTGT ATTCC	Usando el oligonucleótido NB47F permite amplificar el brazo derecho amiRNA(2) para silenciar <i>COX17-2</i>
NB47F	CATTTCAATTTGGAGAGAACACG	Amplificación de la secuencia completa del amiRNA(1 y 2)
NB47R	CGAAACCGATGATACGAACG	

**TABLA 2. Oligonucleótidos empleados para verificación de la presencia de un transgén o de una inserción de T-DNA.**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' -> 3')	Descripción	Dirección
CheamiCOX17-1(1)	GCAGCTCATAAAAAAT	Usado en conjunto con el oligonucleótido NB47R permite verificar de la presencia del amiRNACOX17-1(1) en el genoma de Arabidopsis	directa
CheamiCOX17-2(1)	ACAAGCTCATCATATTGTG	Usado en conjunto con el oligonucleótido NB47R permite la verificación de la presencia del amiRNACOX17-2(1) en el genoma de Arabidopsis	directa
CheqamiCOX19(1)	GTACCGCATGGCTTAGAAC	Usado en conjunto con el oligonucleótido NB47R permite la verificación de la presencia del amiRNACOX19(1) en el genoma de Arabidopsis	directa
CheqamiCOX17-1(2)	CAAGTATCGGTTTTGGGT	Usado en conjunto con el oligonucleótido NB47R permite la verificación de la presencia del amiRNACOX17-1(2) en el genoma de Arabidopsis	directa
CheqamiCOX17-2(2)	TTACTCAAAACTCAAGATAC	Usado en conjunto con el oligonucleótido NB47R permite la verificación de la presencia del amiRNACOX17-2(2) en el genoma de Arabidopsis	directa
CheqamiCOX19(2)	TAAGGCCCAAAACGCAAC	Usado en conjunto con el oligonucleótido NB47R permite la verificación de la presencia del amiRNACOX19(2) en el genoma de Arabidopsis	directa
Gate100-R	CTCGCATATCTCATTAAAGCAGGAC	Amplifica un fragmento del vector pEarlgate. En combinación con los oligonucleótidos RTCOX17-1F, RTCOX17-2F o RTCOX19F permite evaluar la presencia del transgén de interés en el genoma de Arabidopsis.	reversa
mCherryR1	AAGCGCATGAACTCCTTGAT	Amplifica un fragmento de la RFPm permitiendo verificar la fusión al gen de interés con el correspondiente oligo.	reversa
GateCOX172F	CCCGGATCCCTTCTTGCTGCCCCAA	En conjunto con el oligonucleótido 172SALK se empleó para verificar la ausencia del gen salvaje en mutantes SALK_0602110C ( <i>cox17-1</i> )	
172SALK	ATGATAGGTCGGAGGG		directa
Lbb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Verificación de la inserción de T-DNA en la mutante SALK_0602110C ( <i>cox17-2</i> )	reversa

Nota: amiRNA(1) y amiRNA(2) denotan el primer y segundo amiRNA utilizado para silenciar *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2* o *AtCOX19* para confirmar los resultados de expresión génica.

**TABLA 3. Oligonucleótidos empelados en reacciones de RT-qPCR**

Nombre del primer	Gene	Locus	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
RTACTIN	<i>ACT2/ACT8</i>	At3g18780/At1g49240	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTG G	AACGACCTTAATCTTCATGCTG C
RTANAC019	<i>ANAC019</i>	At1g52890	TCTCGTAGAAACGGAAGCACT	GTCGTGGACGAAGTACCGTT
RTAOX1a	<i>AOX1a</i>	At3g22370	GGAGGCTTCCTGCTGATGCGA CA	AGCTGGAGCTTCCTTTAGTTCA CGACC
RTAOX1d	<i>AOX1d</i>	At1g32350	CGATTACTGGCGTTGCCTA	ATAGGAGCCGGAGCTTCCTT
RTAPX2	<i>APX1</i>	At1g07890	ACGCTGAGGCCACATGAAGC	ACAATGCGACCCCTCCAGCCC
RTBCS1	<i>BCS1</i>	At3g50930	GAACAGCTAGTGAGGAATGAC CGTGT	TGTTTGGCTTTATCTTGGTCGT CCTCG
RTCAT3	<i>CAT3</i>	At1g20620	GGGACCAGACAGGCAAGACA	CCAAGGATCGATCAGCCTGAG ACCA
RTCBF2	<i>CBF2</i>	At4g25470	CGAGGGAGATGATGACGTGT	CCATTTACATTCGTTTCTCACAA CC
RTCOPT2	<i>COPT2</i>	At3g46900	CGCCGGCTATGGCGTTGGTT	CGAGCCTGAAGACGGCGGAAG
RTCOX171 (1)	<i>COX17-1 (1)</i>	At3g15352	CTGATCAAGCCAGCTTTTTGGA T	CTCAGCTTCTTGGTATCAGGGC
RTCOX171 (2)	<i>COX17-1 (2)</i>	At3g15352	CAGCCAGCACAAAATGGA	GGCAGCAGCCTTGCTTGGCT
RTCOX171ami	<i>COX17-1</i>	At3g15352	CAGCCAGCACAAAATGGA	GAAACCTTCTGCTCGGAGAC
RTCOX172	<i>COX17-2</i>	At1g53030	CGATCAAAGGGTCGGAGGGAT GAG	GTCTCTGTGGCAACTACATC
RTCOX172ami	<i>COX17-2</i>	At1g53030	AATCCGCTTGACGAAATGG	TCAAACCTTTGAAACCCTCTG
RTCOX19	<i>COX19</i>	At1g66590	GTCGAATGGCTAAGAACTTGAT GG	CTCTCTGTATTCTTATCTTCAGT GG
RTERF1	<i>ERF1</i>	At3g23240	CGATGAGAGGGTCCTCGGCG	CGCCACAACCGGAGAACAACC
RTFER3	<i>FER3</i>	At5g01600	CGTTGAGAGTGAATTTCTGGGA GAGCA	CAAACCTCGTGGCCTTTGCCGA TCAT
RTFRO3	<i>FRO3</i>	At1g23020	AGAGCTCGCCAGATCAGTTGCT ACC	ACGCTCGAACCTTTAAACCAA CTAGG
RTASO	<i>ASO</i>	At4g39830	GGCTGGACGGCGTTGCGTTT	CCGACTCGAACACAATCCCCA TTCCC
RTNDB2	<i>NDB2</i>	At4g05020	TGGACACAGCAGCCAGTGGC	TGTGTATTGGAGCCTTGGAGG
RTPP2AA3	<i>PP2AA3</i>	At1g13320	CCTGCGGTAATAACTGCATCT	CTTCACTTAGCTCCACCAAGCA

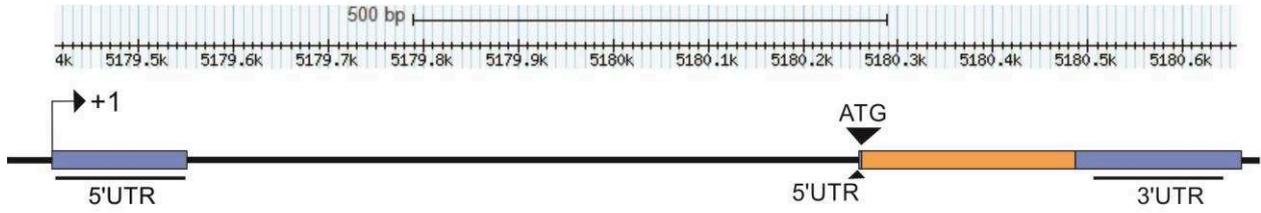
Continúa en la página siguiente

RTPRXIIF	<i>PRXIIF</i>	At3g06050	CGGGCCACGGTCTGAGAGATG G	TGCCCCTGTAACCTTGAAGTCA GACG
RTRD29a	<i>RD29A</i>	At5g52310	TTCGGTGGTGGTGC GACTGAT G	CCGGAACAACAGTGGAGCCAA GT
RTRD29b	<i>RD29B</i>	At5g52300	GGAGCGGTCACCTTCTGGCTC G	AACTCCCTTACCTCCGCCACTG C
RTWRKY53	<i>WRKY53</i>	At4g23810	TTTGCCGATGGAGGAGGTTTC	TCTAAGCCTCTCTCTGGGCT
RTFSD1	<i>FSD1</i>	At4g25100	TGAGTTCTGCATCACCGAAGTC T	GACACGCGCATGTTTAATTGTT CA
RTCOR15	<i>COR15A</i>	At2g42540	GAAAGCGAAAGACTACGTTGTT GAA	AGACCCTACTTTGTGGCATCCT TAG
RTRBOHD	<i>RBOHD</i>	At5g47910	ACGGTGTGGATGTTGTGTCGG G	TCCTGGCATTCCACAGTAGAAG ACT
RTRBOHF	<i>RBOHF</i>	At1g6406	ACGTTTAGCTCCACACGTTCTA GGT	CCCTGCAGCTGTATTGCACTTC C

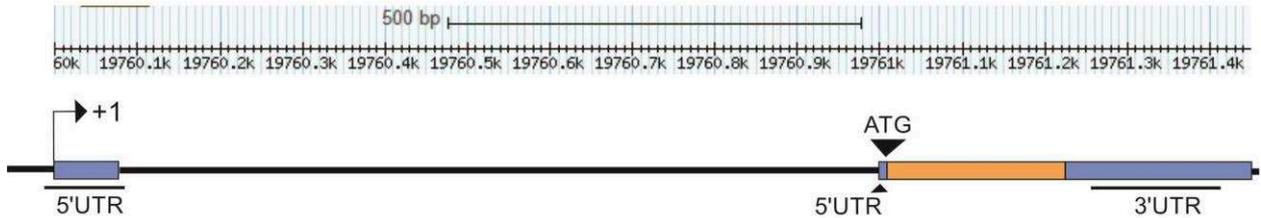
**FIGURA 1. Estructura de los genes estudiados en esta tesis.**

Se muestran las estructuras de los genes *AtCOX17-1*, *AtCOX17-2*, *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2*. Las regiones codificantes se muestran en anaranjado y las regiones no codificantes (UTR) en azul. La línea negra representa los intrones. La regla sobre cada una de las estructuras señala su posición en el cromosoma correspondiente e incluye la escala de los esquemas. Para el gen *AtCOX19-1* las flechas con números indican los sitios de *splicing* alternativo que dan origen a las isoformas *AtCOX19-1.1* y *AtCOX19-1.2*. En la parte inferior se muestra un esquema correspondiente a *AtCOX19-2*, que origina una proteína idéntica a la codificada por *AtCOX19-1.1*.

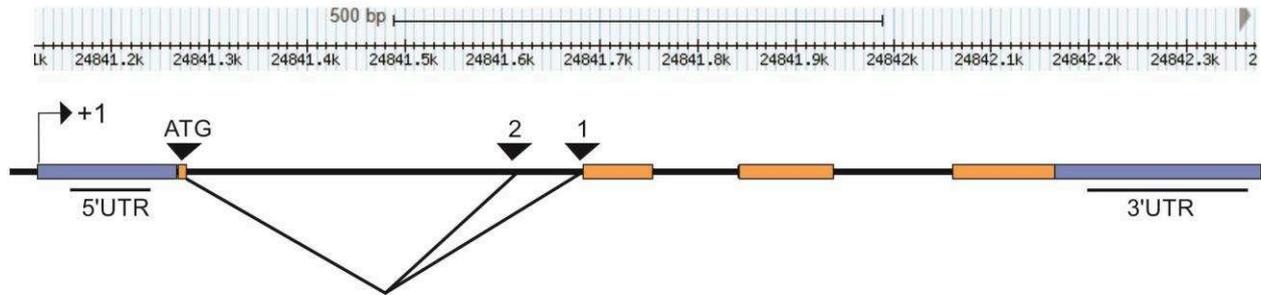
COX17-1 (At3g15352)



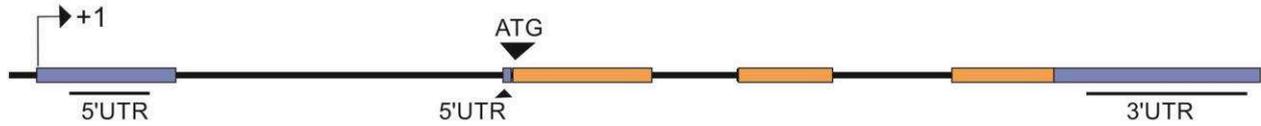
COX17-2 (At1g53030)



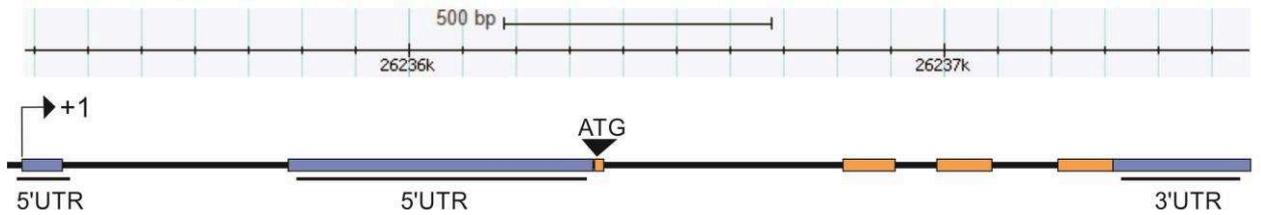
COX19-1.2 (At1g66590)

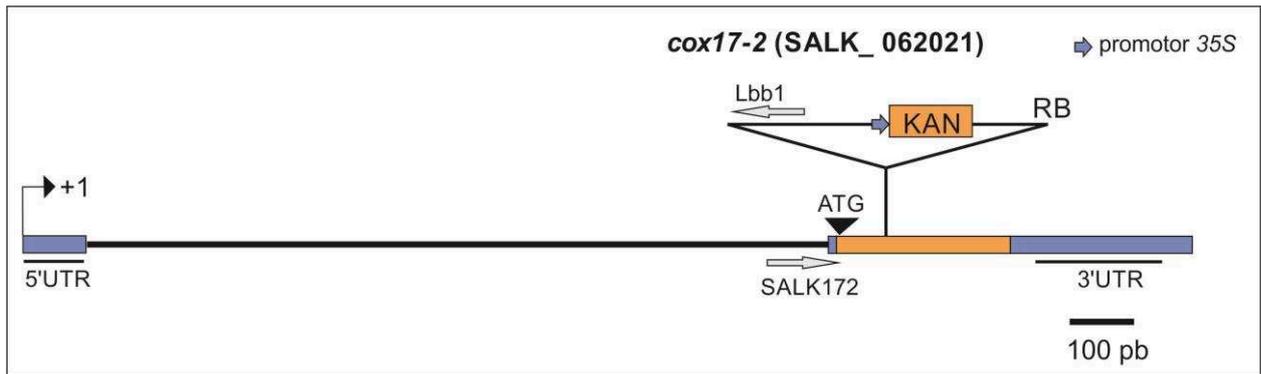


COX19-1.2 (At1g66590)



COX19-2 (At1g69750)

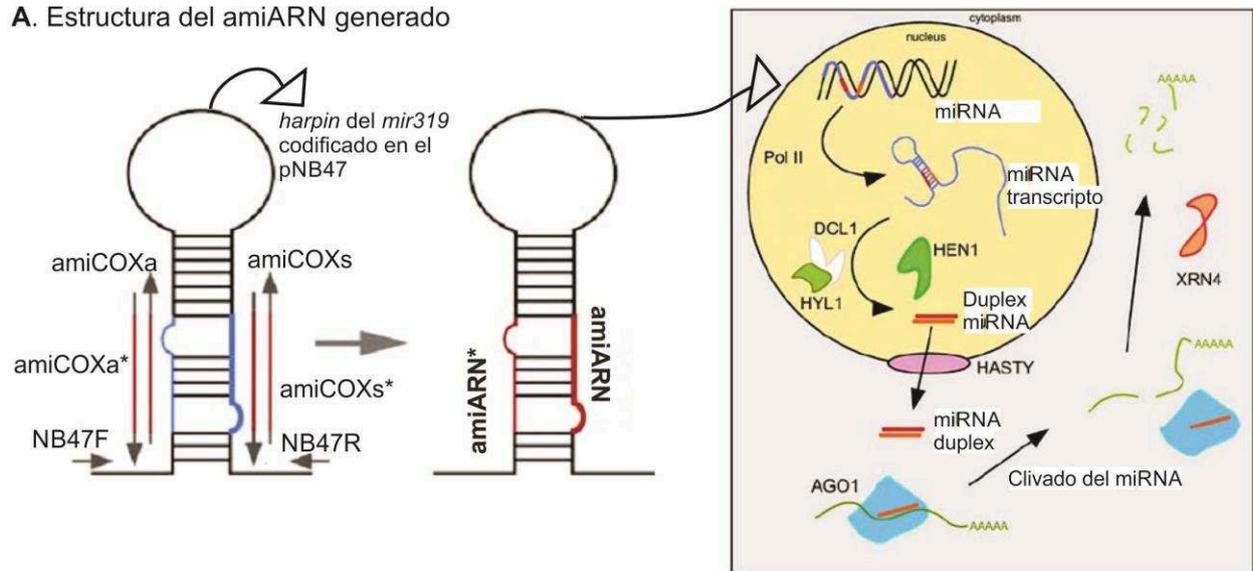




**FIGURA 2. Mutante en AtCOX17-2 (posición de la inserción).**

Se muestra la estructura del gen AtCOX17-2y la posición de la inserción que se simboliza con un triángulo en la planta *cox17-2* (SALK\_062021). Además se señalan los oligonucleótidos empelados en PCR para verificar la presencia de la inserción. Las regiones codificantes se muestran en anaranjado y las regiones no codificantes (UTR) en azul. La línea negra representa los intrones.

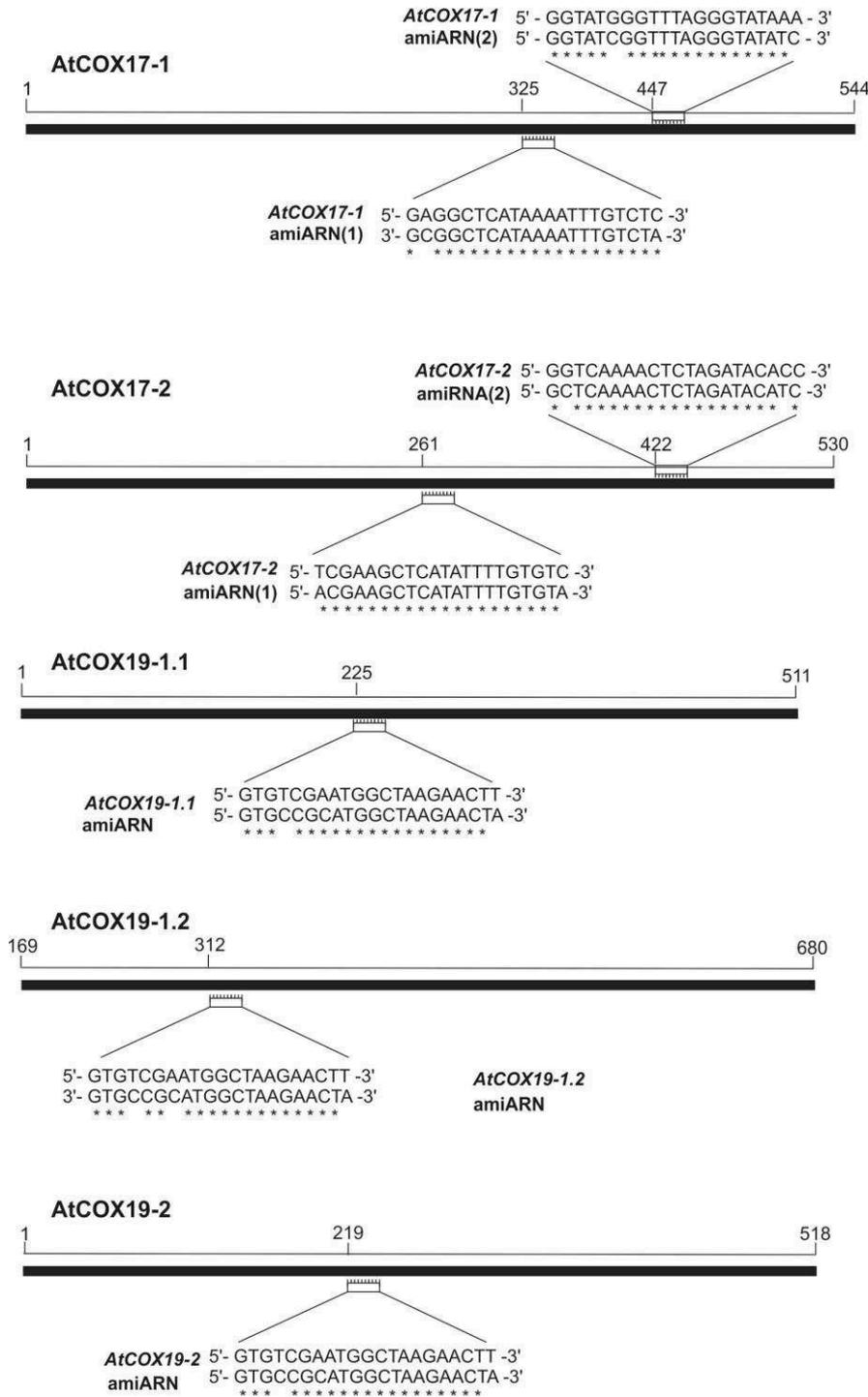
**A. Estructura del amiARN generado**



**B. Ciclos de PCR overlapping**

	MOLDE	OLIGONUCLEÓTIDOS	PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN
<b>PCR 1</b>	pNB47 (5ng.µL <sup>-1</sup> )	NB47F/amiCOXa	95° x 2 min / 30x(92° 45 s, 40° 30 s, 72° 45) /72° 10 min
<b>PCR 2</b>	pNB47 (5ng.µL <sup>-1</sup> )	NB47R/amiCOXs	95° x 2 min / 30x(92° 45 s, 40° 30 s, 72° 45) /72° 10 min
<b>PCR 3</b>	pNB47 (5ng.µL <sup>-1</sup> )	amiCOXa*/amiCOXs*	95° x 2 min / 30x(92° 45 s, 42° 30 s, 72° 45) /72° 10 min
<b>PCR 4</b>	P(1), P(2) y P(3)	NB47F/NB47R	95° x 2 min / 30x(92° 45 s, 42° 30 s, 72° 45) /72° 10 min

**C. Secuencia y posición de los amiARNs empleados en esta Tesis.**



**FIGURA 3. Mecanismo de silenciamiento mediante amiARNs y reacciones de PCR utilizadas para la obtención de las construcciones ami(1) y ami(2).** A. Se muestra, de forma general, la estructura del amiARN empleado para obtener las plantas silenciadas y un esquema general del mecanismo de silenciamiento a partir del amiARN construido. COX implica COX17-1, COX17-2 o COX19. B. En la tabla se describen los pasos de PCR realizados para obtener dicha estructura y las condiciones de amplificación para cada una de las reacciones realizadas. C. Secuencia y posición de los amiARNs elegidos.

## 10.2. ANEXO II

Soluciones utilizadas en electroforesis de ADN en agarosa (1.2.2-Materiales y Métodos).

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

**Solución de siembra de ADN en geles de agarosa:** Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v), SyBr Green dilución 1:20.

**Solución Stock de SyBr Green:** El reactivo comercial se diluyó 1000 veces en agua H<sub>2</sub>O-MQ.

Composición de los medios de cultivo utilizados y soluciones de conservación *Arabidopsis*.

**Medio Murashige y Skoog:** KNO<sub>3</sub> 1,9 g.L<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,65 g.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,44 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,37 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17 g.L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>EDTA 37,3 mg.L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 27,8 mg.L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 22,3 mg.L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 6,2 mg.L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 8,6 mg.L<sup>-1</sup>; KI 0,83 mg.L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,25 mg.L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,025 mg.L<sup>-1</sup>; CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,025 mg.L<sup>-1</sup>. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añade 8 g/l de agar.

**Solución Hoaglands 1x:** NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM; KNO<sub>3</sub> 6mM; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4mM; MgSO<sub>4</sub> 2mM; EDTAFe(II) 50 μM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 50 μM; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1 μM; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 μM; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0,32 μM; H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,1μM. Para reducir al mínimo la contaminación por metales, cuando fue necesario solidificar el medio se empleó agarosa en una concentración final de 10 g/L.

Composición de las soluciones empeladas para mini preparación (Miniprep) de ADN plasmídico (1.2.8-Materiales y Métodos) y ADN genómico de *Arabidopsis* (1.2.13-Materiales y Métodos).

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

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

**Solución amortiguadora de extracción de ADN de Arabidopsis:** Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%(P/P).

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

Soluciones empleadas para la determinación de lípidos peroxidados (1.2.28-Materiales y Métodos).

**Solución de BHT:** BHT 10%(p/v) en TCA 6%(p/v).

**Solución control:** BHT 0,01%(p/v) en TCA 6%(p/v).

**Solución positiva:** BHT 0,01%(p/v) y ácido tiobarbitúrico 1%(p/v) en TCA 6%(p/v).

Soluciones empleadas para la determinación de actividad SOD (1.2.34-Materiales y Métodos).

**Solución de extracción:**  $K_2PO_4$  10mM pH 7,5, PVP insoluble 10%, Tritón X-100 0,01%.

**Solución de reacción incompleta:**  $K_2PO_4$  10mM pH 7,5.

**Solución de reacción completa:**  $K_2PO_4$  10mM pH 7,5, 10 mM NBT y 25 mM de Riboflavina.

Soluciones empleadas para la obtención de extractos crudos de mitocondrias, para electroforesis de geles BN, actividad COX en geles y medición de la actividad COX en oxígrafo (1.2.38-Materiales y Métodos; 1.2.39-Materiales y Métodos, 1.2.40-Materiales y Métodos y 1.2.40-Materiales y Métodos).

**Solución de extracción:** Sacarosa 0,3M, TES 60 mM, EDTA 2 mM,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_4O_7P_2 \cdot 10H_2O$ , glicina 1 mM, PVP-40. Los siguientes reactivos deben agregarse al momento de hacer la extracción: BSA 1 % (P/V), ascorbato de sodio 50 mM, cisteína 20 mM, AEBSF 1 mM.

**Solución de lavado:** Sacarosa 0,3 M, TES 10 mM,  $KH_2PO_4$  10 mM.

**Solución de lisis:** NaCl 50 mM, 6-Aminocaproico 5 mM, Imidazol 50 mM.

**Digitonina:** Para prepara la solución de detergente 10 % (P/V), la droga sólida se debe disolver en solución de lisis preparada al momento de usarla. Para lograra disolución completa se debe incubar 5 minutos a 95°C.

**Solución de siembra BN:** Rojo Ponceau 0.01 % (P/V), glicerol 10 % (V/V).

**Solución amortiguadora BN-I 3x:** 6-Aminocaproico 1.5 M, Imidazol 75 mM pH 7.

**Solución de cátodo BN-I:** Tricina 50 mM, Serva Blue G-250 0.02 %, pH 7.

**Solución de cátodo BN-II:** Tricina 50 mM, Serva Blue G-250 0.002 %, pH 7

**Solución de ánodo BN:** Imidazol 250 mM pH7

**Solución de reacción I:** NADH 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>, NBT 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> en solución Tris-HCl 2 mM pH 7,4

**Solución de reacción IV:** DAB 1 mg.mL<sup>-1</sup>, citocromo c oxidado 1 mg.mL<sup>-1</sup> en solución amortiguadora  $K_2PO_4$  50 mM pH 7,4.

Soluciones empleadas en electroforesis de proteínas en acrilamida (1.2.41-Materiales y Métodos) y western blot (1.2.44-Materiales y Métodos).

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

**Solución de siembra para proteínas en geles desnaturalizantes:** Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 2 mM pH 8,0; SDS 2 % (P/V);  $\beta$ -mercaptoetanol 0,5% (P/V); azul de bromofenol 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

**Solución de siembra para proteínas en geles nativos:** Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 2 mM pH 8,0; azul de bromofenol 0,5 mg/ml.

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

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

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

**Solución bloqueante:** leche descremada 5 % (P/V) en TBS 1x.

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

**TBS-Tween:** TBS 1X, Tween-20 0.05 % (P/V).

**TBS-Leche:** TBS 1X, leche descremada 0,5%.

**Tabla 1.** Factor de dilución y tiempo de incubación para los anticuerpos utilizados.

Proteína blanco	Dilución	Tiempo de incubación (h)
COX17	1:25	12
COX19	1:50	6
COX2	1:2000	1
AOX1a	1:1000	1
VDAC1	1:5000	2
GAPC	1:200	2
ANHIDRASA CARBÓNICA	1:1000	1

**Solución amortiguadora para medición del consumo de oxígeno** (1.2.35-Materiales y Métodos): 300 mM mannitol, 1% (w/v) BSA, 10 mM potassiumphosphate pH 7,2, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

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

**Solución alcohólica para extracción de metabolitos:** H<sub>2</sub>O:Metanol:CHCl<sub>3</sub> en proporción 1:2:5, conteniendo Ribitol 50 mM.

## 10.3. ANEXO III

**Tabla 1.** Vías metabólicas destacadas entre los genes regulados diferencialmente en las plantas amiCOX17-2/cox17-2 según el programa MapMan.

Metabolismo de Lípidos			Reacciones en luz		
Código BIN	ID del gen	logFC	Código	ID del	logFC
11.1.1	at5g35360	1.08	1.1.1.2	at1g67740	-1.025
11.1.2	at2g30200	1.169	1.1.1.2	at2g01918	1.087
11.1.3	at5g46290	1.429	1.1.5.3	at1g20020	1.222
11.1.6	at2g05990	1.404	<b>Metabolismo secundario</b>		
11.1.7	at3g25110	1.012	<b>Código</b>	<b>ID del</b>	<b>logFC</b>
11.1.8	at3g23790	-1.429	<i>Tetrapirroles</i>		
11.1.8	at1g75960	1.436	19.1	at3g25660	1.013
11.1.11	at4g34250	1.412	19.3	at3g48730	1.628
11.1.11	at2g15090	1.68	19.3	at5g63570	1.172
11.1.15	at1g43800	1.134	19.4	at1g69740	1.271
11.1.31	at3g25860	1.557	19.7	at3g14930	1.064
11.1.31	at4g16155	1.09	19.10	at4g18480	1.474
11.9.3.1	at3g15730	-1.272	19.10	at5g45930	1.072
11.9.3.1	at3g05630	-1.047	19.14	at4g27440	1.678
11.9.3.2	at1g68620	-3.024	19.30	at5g40850	1.257
11.9.3.3	at1g66970	-1.539	19.40	at3g14110	1.039
11.9.3.3	at3g02040	-1.349	<i>Flavonoides</i>		
11.9.3.3	at5g41080	1.49	16.8.1	at2g38240	-1.634
<b>Modificaciones de la pared celular</b>			16.8.1	at3g55970	-2.34
<b>Código BIN</b>	<b>ID del gen</b>	<b>logFC</b>	16.8.1	at1g56650	-2.169
10.7	at1g10550	1.719	16.8.1.21	at3g29670	-1.282
10.7	at2g18660	-1.884	16.8.1.21	at5g39050	-1.093
10.7	at1g11545	1.741	16.8.1.21	at5g39090	-1.508
10.7	at3g45970	1.359	16.8.2	at1g53520	1.407
10.7	at2g06850	1.282	16.8.3	at5g54060	-1.003
10.7	at4g03210	1.876	16.8.3	at5g24530	-1.271
10.7	at4g38400	1.366	16.8.4	at1g17020	-1.478
10.7	at3g23730	1.897	<i>Fenilpropanoides</i>		
<b>Transporte de electrones mitocondrial</b>			16.2	at1g31490	-1.195
<b>Código BIN</b>	<b>ID del gen</b>	<b>logFC</b>	16.2.1	at3g50740	-1.101
9.1.2	at2g07751	-1.224	16.2.1.6	at1g67980	-1.029
9.1.2	at2g07689	-1.4	16.2.1.10	at4g37990	-3.316
9.1.2	at2g07785	-1.377	<i>Aminoácidos</i>		
9.2.2	at4g05020	-1.622	13.1.4.1.1	at3g48560	-1.401
9.4	at3g22370	-1.293	13.1.4.1.4	at1g10070	-1.402
9.4	at1g32350	-2.319	13.1.3.1.1	at5g65010	1.714
9.5	at2g07727	-2.035	13.1.3.4	at5g17920	1.466
9.5	at5g25450	-1.184	13.1.3.4.13	at1g15125	-1.629
9.7	at2g07687	-1.834	13.2.2.2	at3g30775	1.372
9.7	at1g53030	-6.342	13.2.2.2	at5g38710	-1.542
9.7	at2g07695	-1.215			
9.8	at4g24570	-1.156			
9.9	at2g07698	-1.44			
<b>Ciclo de Clavin-Benson</b>					
<b>Código BIN</b>	<b>ID del gen</b>	<b>logFC</b>			
1.3.2	at1g67090	1.203			
1.3.3	at1g56190	1.116			
1.3.13	at2g28000	1.429			
1.3.13	at1g55490	1.523			

Tabla 2. Frecuencias de enriquecimiento en las categorías de privación de agua, estrés osmótico y estrés salino. Los datos fueron obtenidos empleando la herramienta "REVIGO" del programa libre agriGO.

GO	Término	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	Valor p
GO:0009414	Respuesta a privación de agua	2,8% (25/896)	0,8% (202/24961)	1,55E-05
GO:0009651	Respuesta a estrés salino	3,8% (34/896)	1,6% (397/24961)	0,000243
GO:0006970	Respuesta a estrés osmótico	3,9% (35/896)	1,7% (425/24961)	0,000369

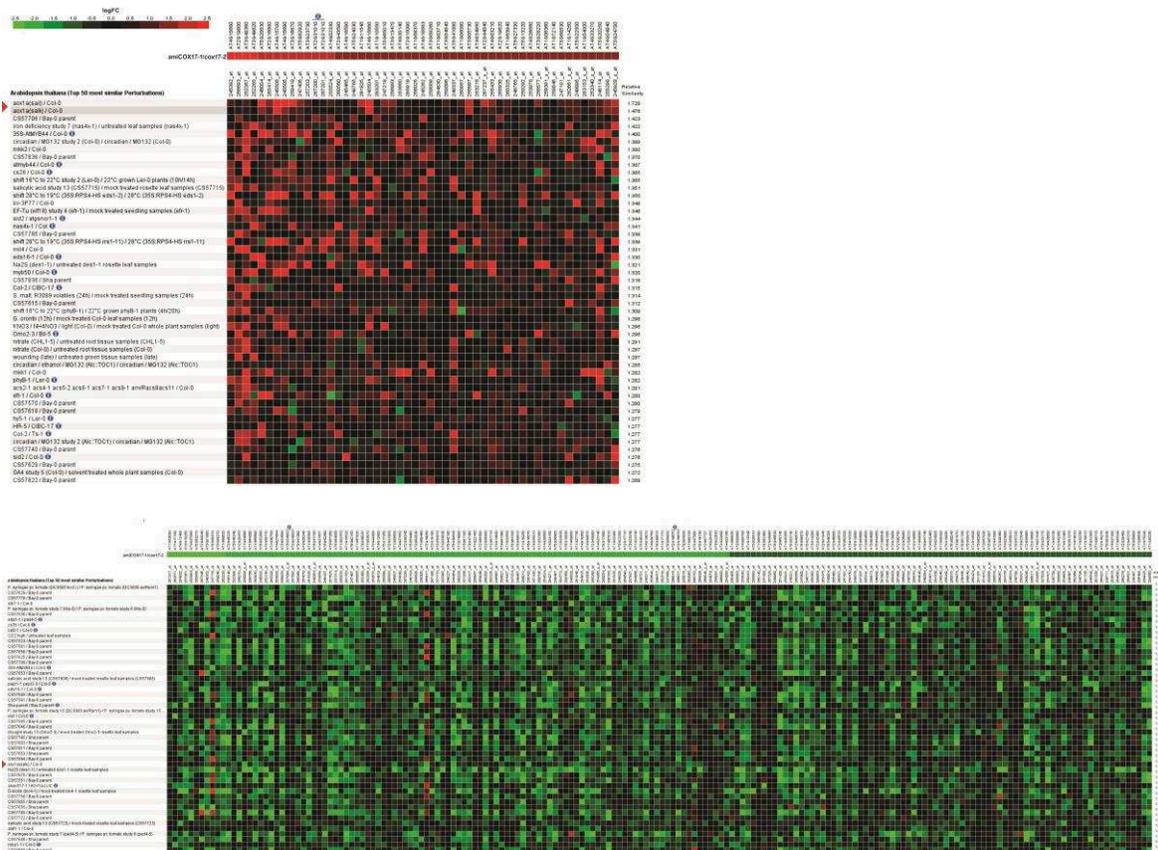


Figura 1. Comparación entre los perfiles de expresión de las plantas amiCOX17-1/cox17-2 y plantas deficientes en AOX1a. Se muestran los genes con expresión aumentada (panel superior) o disminuida (panel inferior) en plantas amiCOX17-1/cox17-2 y los cambios de expresión de esos genes en plantas deficientes en AOX1a (filas marcadas con triángulos). La comparación fue realizada con la herramienta "Signature" del programa GENVESTIGATOR.

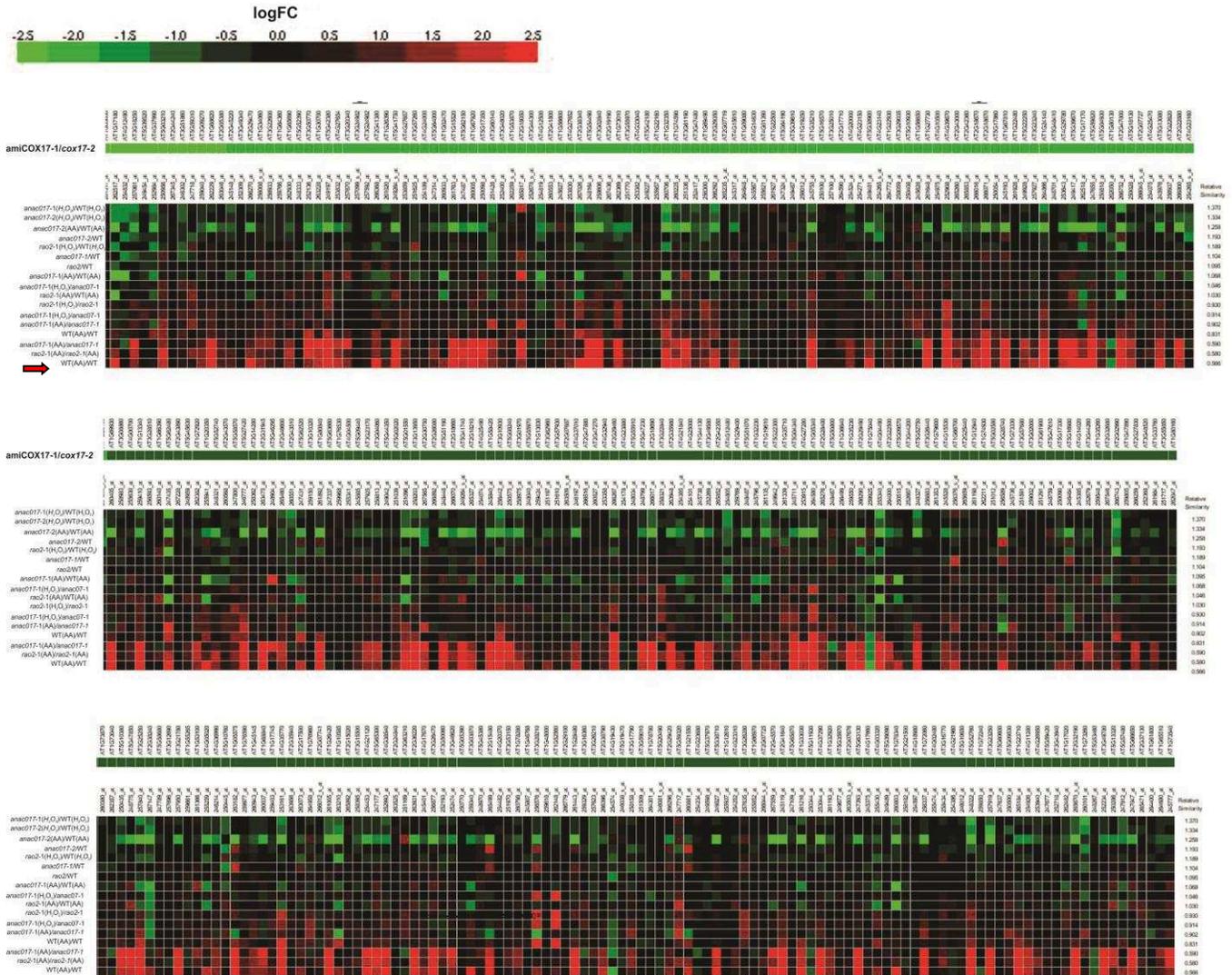


Figura 2. Comparación entre genes reprimidos en las plantas *amiCOX17-1/cox17-2* y los niveles de expresión de esos mismos genes en las plantas mutantes en *ANACO17*, ya sea en condiciones control o tratadas con antimicina A (AA) o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La comparación fue realizada con la herramienta "Signature" del programa GENVESTIGATOR. Plantas mutantes en *ANACO17*: *anaco17-1*, *anaco17-2* y *rao2-1*. Se muestran los genes que presentaron un logFC < -1.47.

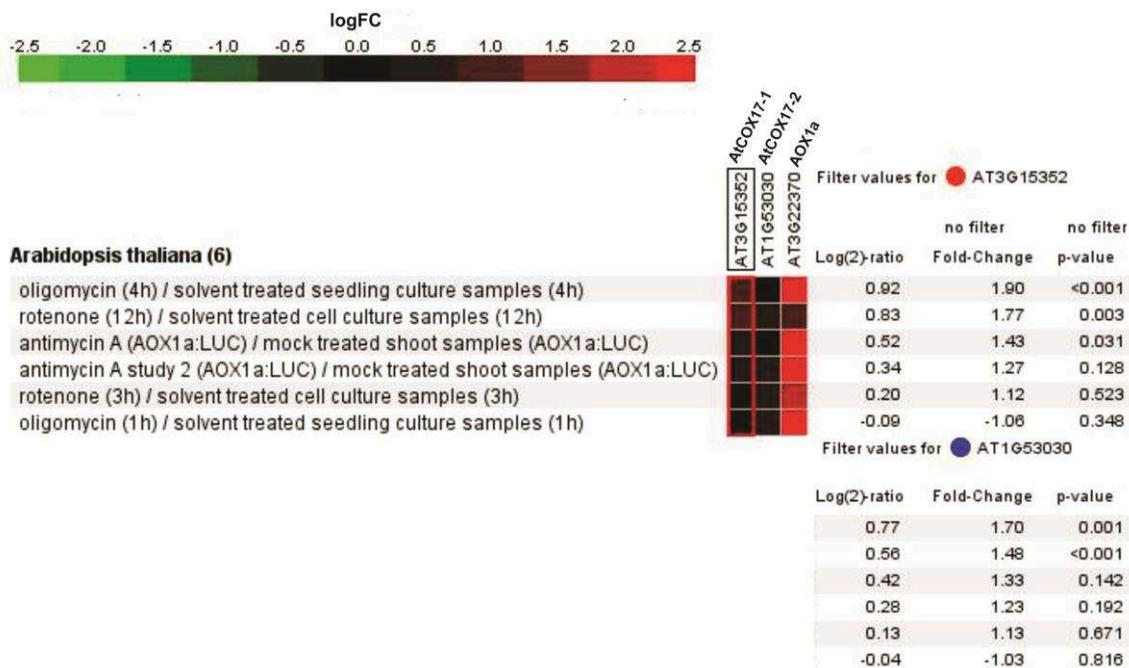


Figura 3. Expresión de *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en cultivos celulares provenientes de líneas WT tratados con rotenona u oligomicina. El perfil de expresión fue obtenido de la base de datos GENVESTIGATOR. La expresión de *AOX1a* se incluyó a modo de comparación

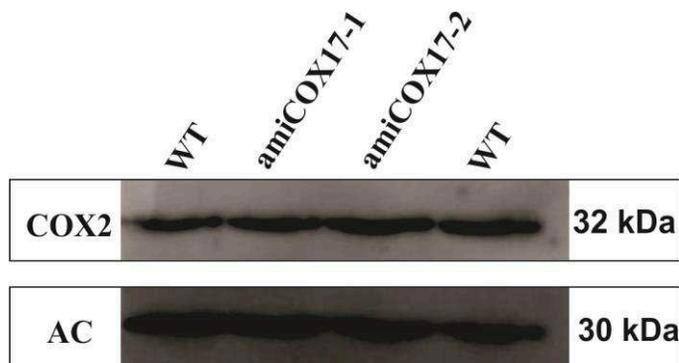
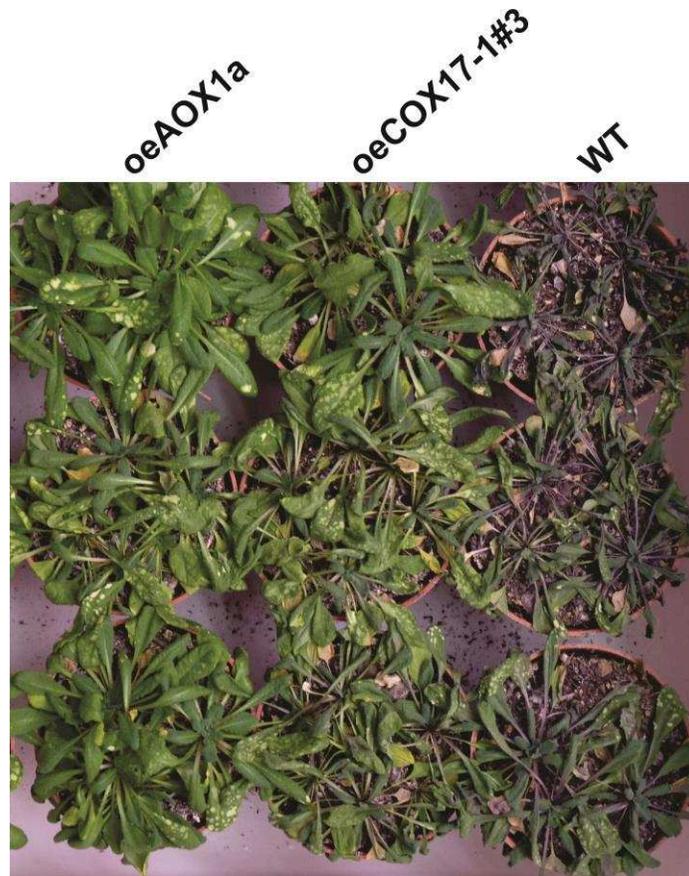


Figura 4. Niveles de COX2 en plantas con niveles de expresión disminuidos de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2*. La detección de COX2 se realizó mediante Western blot en extractos de proteínas totales (50 µg) obtenidos a partir de hojas de plantas WT, *amiCOX17-1* y *amiCOX17-2* crecidas en sustrato sólido. Se utilizó gamma anhidrasa carbónica (Perales et al., 2004) como normalizador.



**Figura 5. Fenotipo de plantas *oeAOX1a*, *oeCOX17-1* y WT luego de un estrés por sequía.** Plantas *oeAOX1a*, *oeCOX17-1* y WT fueron crecidas en un fotoperiodo de 8 horas de luz/16 horas de oscuridad durante 30 días y regadas con 70 mL de agua por maceta cada 7 días (4 plantas por maceta). Luego se suspendió el riego. La foto fue tomada luego de 10 días sin agua. El genotipo *oeAOX1a* (Eg) fue incluido a modo control dado que está demostrado que la sobreexpresión de *AOX1a* genera tolerancia al estrés por sequía (Feng et al., 2009; Wang and Vanlerberghe, 2013).

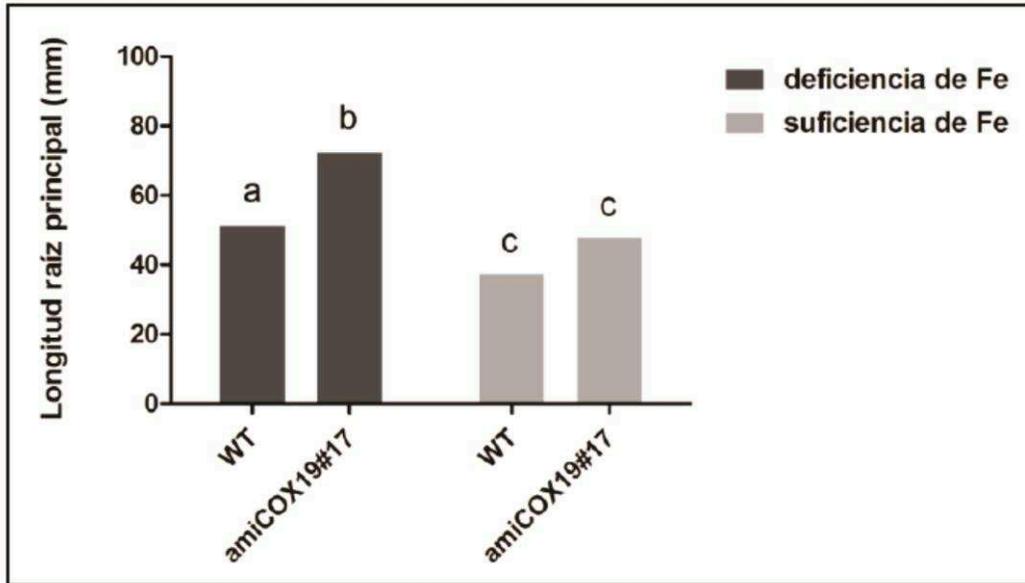


Figura 6. Cuantificación de la longitud de la raíz en plantas *amiCOX19#17* y WT crecidas en distintas concentraciones de hierro. Las plantas fueron crecidas durante 9 días en placas dispuestas verticalmente en condiciones de deficiencia (Fe 0  $\mu$ M) o de suficiencia (Fe 50  $\mu$ M) de hierro. Las raíces fueron medidas empleando el *software* libre Rootdetection ([www.rootdetection.de](http://www.rootdetection.de)). Letras distintas denotan diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA; Prueba de Tukey) entre las medias obtenidas a partir de 50 plantas. Esta figura fue tomada del trabajo de Tesina de la Licenciada Ma. Natacha Ocampos.

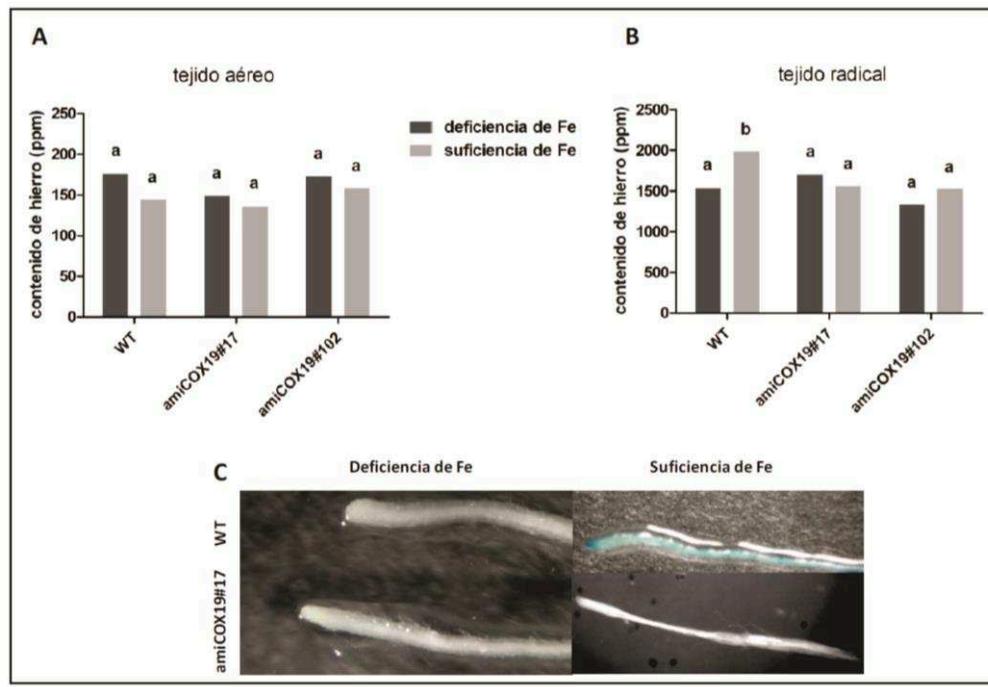


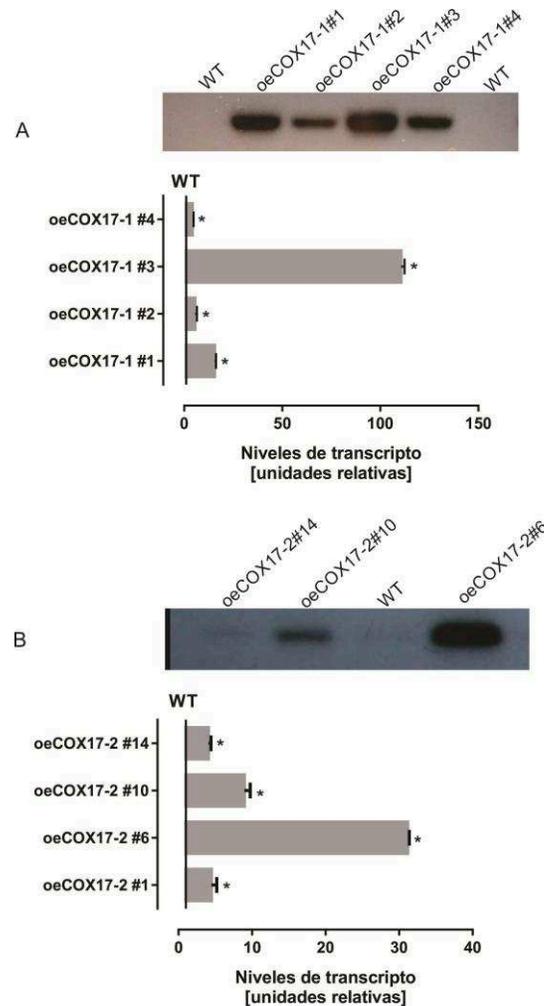
Figura 7. Contenido de hierro en plantas *amiCOX19*. A. Contenido de hierro total en tejido aéreo proveniente de plantas crecidas durante 15 días en condiciones de deficiencia (Fe 0  $\mu$ M) o suficiencia (Fe 50

$\mu\text{M}$ ) de hierro. **B.** Contenido de hierro total en raíces provenientes de plantas crecidas durante 9 días en las condiciones de suficiencia y deficiencia descritas en A. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ , ANOVA; Prueba de Tukey) entre las medias obtenidas en 3 ensayos distintos. **C.** Contenido de  $\text{Fe}^{3+}$  en raíces revelado mediante tinción de Pearl. Las raíces se obtuvieron de plantas crecidas durante 9 días en las condiciones de suficiencia y deficiencia descritas en A. Esta figura fue tomada del trabajo de Tesina de la Licenciada Ma. Natacha Ocampos.

---

### OBTENCIÓN DE PLANTAS CON NIVELES AUMENTADOS DE *ATCOX17-1* O *ATCOX17-2*.

Se obtuvieron plantas con niveles aumentados de *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2* (*oeCOX17*) mediante la expresión de la secuencia codificante de cada uno de los genes de interés bajo el control del promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (*35S*CaMV). En la figura 9 se muestran los niveles de expresión de los transgenes en las plantas utilizadas en los experimentos de esta tesis, medidos mediante northern blot (panel superior en A y B) y RT-qPCR (panel inferior en A y B).

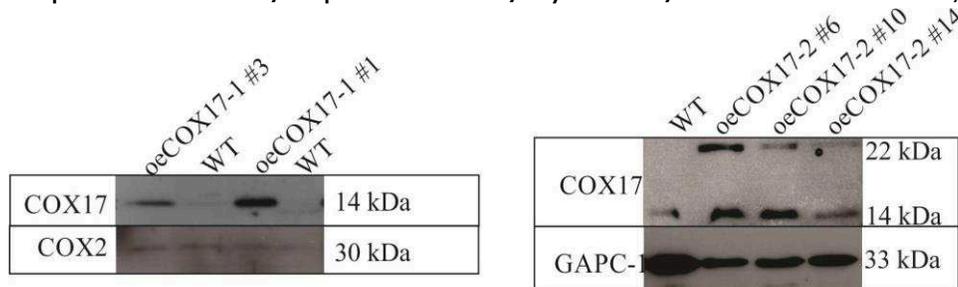


**Figura 9.** Niveles de expresión de los genes *AtCOX17* en plantas transformadas con construcciones que permiten sobreexpresar *AtCOX17-1* o *AtCOX17-2*. **A.** Niveles de expresión de *AtCOX17-1* medidos mediante northern blot (panel superior) o RT-qPCR (panel inferior). El ARN fue obtenido de plantas seleccionadas en herbicida durante 25 días. Los resultados de RT-qPCR se expresan en unidades relativas a los niveles de expresión en la planta WT (WT=1). Las barras de error (SD) corresponden a cuatro muestras independientes. **B.** Niveles de expresión de *AtCOX17-2* medidos mediante northern blot o RT-qPCR en forma similar a lo indicado en A.

Los niveles de expresión de *AtCOX17* en las plantas *oeCOX17-1* y *oeCOX17-2* pudieron también evaluarse a nivel proteico. Para tal fin, se obtuvo un anticuerpo antiCOX17-1 de *Arabidopsis* (ver Materiales y Métodos 1.2.38). En la figura 10 se muestra la detección de *AtCOX17-1* mediante Western blot en plantas *oeCOX17* y WT. Se observa la presencia de una banda de un tamaño molecular de 14 kDa en las plantas sobreexpresantes. Si bien el tamaño molecular de *AtCOX17-1*, según la secuencia de

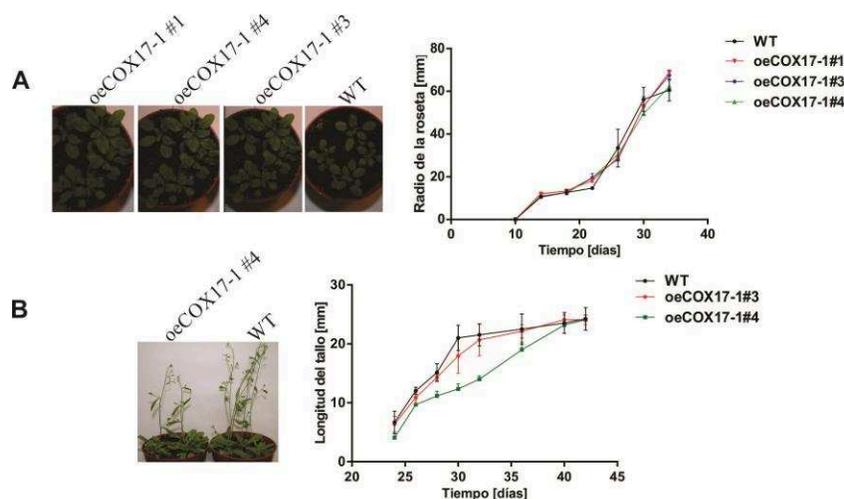
aminoácidos, es de 7,4 KDa, se ha reportado que la migración de proteínas con dominios CX<sub>9</sub>C en presencia de β-mercaptoetanol se corresponde con la de proteínas de mayor tamaño molecular (Heaton et al., 2001), por lo que esta banda correspondería a la proteína monomérica sobreexpresada. Las plantas que sobreexpresan AtCOX17-2 presentaron, además, una banda de 22 KDa que podría corresponder a una forma dimérica resistente al tratamiento con reductor y detergente (Figura 10). En el caso de plantas WT, los niveles de AtCOX17 son prácticamente indetectables, observándose también una banda de 14 KDa cuando se siembran en el gel grandes cantidades de proteína (Figura 10, primera calle del panel derecho). Dado que se observan mayores niveles de AtCOX17 en ambos tipos de líneas transgénicas, se pudo concluir que el anticuerpo empleado no distingue entre AtCOX17-1 y AtCOX17-2. Además, los resultados indican que los niveles de proteína no se correlacionan en todos los casos con los niveles de transcritos observados en la figura 9. En el caso de las líneas oeCOX17-2#6 y oeCOX17-2#10, por ejemplo, los niveles de transcritos difieren en al menos 15 veces (Figura 9B), pero no parecen observarse diferencias de esa magnitud en los niveles de proteína (Figura 10, derecha). Una situación similar se observa entre las líneas oeCOX17-1#3 y oeCOX17-1#1.

**Figura 10. Expresión de AtCOX17 en plantas oeCOX17-1 y oeCOX17-2.** Detección de AtCOX17 mediante



Western blot en extractos totales obtenidos a partir de plantas oeCOX17-1, oeCOX17-2 y WT crecidas en medio MS 0,5x durante 10 días. Se emplearon anticuerpos contra COX2 y GAPC-1 como controles. Los tamaños de las bandas detectadas, obtenidos a partir de la migración de estándares de peso molecular, se muestran en cada caso.

La sobreexpresión de AtCOX17-1 no produjo una modificación en el fenotipo de las plantas (Figura 11). Si bien se observó una tendencia al incremento en el tamaño de la roseta de las plantas que sobreexpresan AtCOX17-1 (#1, #4 y #3), la cuantificación del radio de la roseta no produjo diferencias significativas (Figura 11A). Además, para la línea AtCOX17-1#4, cuyo nivel de expresión es medio entre las líneas #1 y #3, se observó un retraso en el pasaje al estadio reproductivo respecto de la planta WT (Figura 11B). Dado que no se encontraron más líneas con un fenotipo similar, esta línea no se empleó en los ensayos descritos en esta tesis.



**Figura 11. Características fenotípicas de las plantas oeCOX17-1.** A. Fenotipo de plantas oeCOX17-1 crecidas en sustrato sólido durante 20 días en fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad (izquierda). El radio de la roseta se cuantificó desde el día 10 hasta el día 34 de crecimiento (derecha). B. Longitud del tallo desde el día 24 hasta el día 42 de crecimiento (derecha). A la izquierda se muestra una imagen de las plantas oeCOX17-1#4, que presentaron un retraso en el desarrollo de la inflorescencia

En el caso de plantas oeCOX17-2, se observó una disminución significativa en el tamaño de la roseta y alteraciones en la forma de las hojas en líneas con niveles muy altos de transcritos, como la línea oeCOX17-2#6 (Figura 12A). El número de hojas (Figura 12B) y la altura del tallo (Figura 12C) también se vieron disminuidos. Notoriamente, este incremento en los niveles de transcritos no se correlacionó con los niveles de proteína (Figura 10, derecha). Dado que otras líneas sobreexpresantes, como las líneas #10 y #14, presentaron características fenotípicas similares a las de plantas WT, se continuó con el estudio de estas últimas.

La sobreexpresión de AtCOX17-1 o de AtCOX17-2 no produce un fenotipo diferencial respecto del observado en plantas WT crecidas en condiciones estándares. Si bien se observan excepciones en algunas líneas, creemos que dichas diferencias podrían radicar en el número y/o posición de las inserciones del transgén y no estarían relacionadas con la función de AtCOX17.