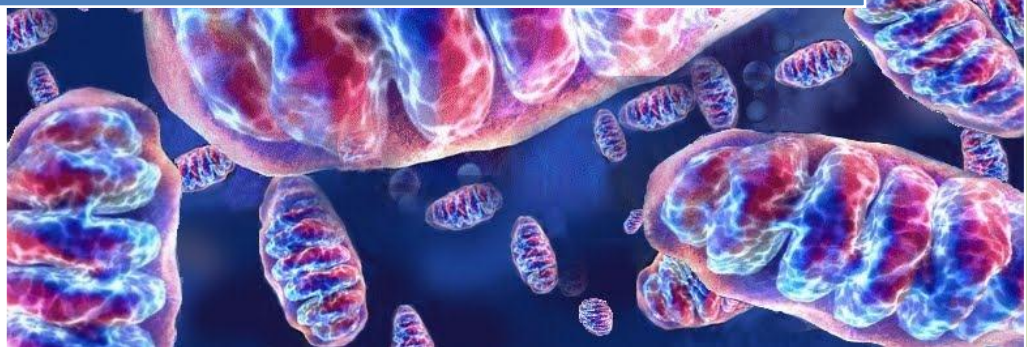




Universidad Nacional de Mar del Plata
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

2016

Estudio del subdominio CA
(Anhidrasas Carbónicas)
perteneciente al complejo I de la
cadena respiratoria mitocondrial
de *Arabidopsis thaliana*



Licenciada Soto Débora

Director: Dr. Eduardo Zabaleta



Instituto de Investigaciones Biológicas

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa.”*

Mahatma Gandhi

El complejo I es el punto de entrada principal de los electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. En varios organismos eucariotas, exceptuando animales y hongos, el complejo I posee un dominio extra (dominio CA) compuesto por trímeros de proteínas con alta similitud a anhidrasas carbónicas de tipo gamma (γ -CAs). En *Arabidopsis thaliana* existen cinco genes nucleares que codifican para estas γ -CAs. Tres de las proteínas codificadas son denominadas CA (Carbonic Anhidrase) 1, CA2 y CA3. Las restantes poseen una estructura primaria menos conservada y se las denomina CAL (Carbonic Anhidrase Like) 1 y CAL2. Estudios realizados utilizando mutantes simples de *Arabidopsis* para cada una de estas subunidades CA no lograron esclarecer el rol fisiológico funcional del dominio CA. Ha sido sugerido que este dominio es importante en el contexto de la fotorrespiración por su participación en el reciclado de CO_2 mitocondrial que permite el mantenimiento de una tasa normal de fijación de carbono en plantas. En este trabajo, se reportan evidencias experimentales que apoyan esta hipótesis utilizando mutantes de *Arabidopsis* carentes de dos subunidades CA que muestran fenotipos alterados. Mutantes dobles crecidas en condiciones ambientales normales presentan un retardo en el crecimiento en comparación con plantas salvajes. Este fenotipo puede ser rescatado cultivando dichas plantas en atmósferas con altas concentraciones de CO_2 . Adicionalmente, bajo condiciones fotorrespiratorias, la asimilación de carbono se ve disminuida y la glicina se acumula en las dobles mutantes, sugiriendo un desequilibrio relacionado con la fotorrespiración. Sumado a esto, los niveles de transcriptos de los genes que codifican para las subunidades CA se encuentran reducidos en plantas salvajes crecidas bajo condiciones no fotorrespiratorias. Estos resultados permiten vincular el rol funcional del dominio CA con la vía fotorrespiratoria. Por otro lado, también se reportan mutantes dobles que presentan un fenotipo de letalidad del embrión, presentando semillas inmaduras incoloras que colapsan al secarse. Esto muestra que la falta de dos subunidades CA puede dar lugar también a un fenotipo letal. En conjunto, los resultados presentados en este trabajo permitieron generar conocimiento acerca del rol fisiológico de las anhidrasas carbónicas de tipo gamma (γ -CAs) que conforman el dominio CA del complejo I mitocondrial de plantas; mostrando que este dominio resulta esencial para la viabilidad de los embriones y contribuye a sostener una fotosíntesis eficiente bajo las condiciones ambientales actuales.

The NADH–ubiquinone oxidoreductase complex (complex I) is the main entrance site of electrons into the respiratory chain. In a variety of eukaryotic organisms, except animals and fungi (Opisthokonta), it contains an extra domain comprising trimers of putative gamma carbonic anhydrases, named the CA domain, which has been proposed to be essential for assembly of complex I. However, its physiological role in plants is not fully understood. It has been postulated that the CA domain may be involved in recycling CO₂ from respiration and photorespiration. In *Arabidopsis thaliana* there are five gamma carbonic anhydrases proteins, called Carbonic Anhydrase (CA) 1, CA2, CA3, Carbonic Anhydrase Like (CAL) 1 and CAL2. None of the T-DNA insertional single mutants shows any visible phenotype under normal conditions. In order to investigate the functional role of the CA domain, we performed crosses of single mutants to obtain different double mutants. Here, we report that *Arabidopsis* mutants defective in two CA subunits show an altered photorespiratory phenotype. Mutants grown in ambient air show growth retardation compared to wild type plants, a feature that is reversed by cultivating plants in a high CO₂ atmosphere. Moreover, under photorespiratory conditions, carbon assimilation is diminished and glycine accumulates, suggesting an imbalance with respect to photorespiration. Additionally, transcript levels of specific CA subunits are reduced in plants grown under non-photorespiratory conditions. On the other hand, we also present *Arabidopsis* mutant plants affected in two CA subunits that show an embryo lethal phenotype. Taken together, these results suggest that the CA domain of plant complex I contributes to sustaining efficient photosynthesis under ambient (photorespiratory) conditions, and is also required for normal embryogenesis.

Índice

Introducción General.....	1
Las Mitocondrias y la Cadena Respiratoria	2
El Complejo I.....	6
Las Anhidrasas Carbónicas de tipo gamma y el Dominio CA	9
Actividad de las subunidades CA y su posible rol funcional.....	15
Capítulo I.....	19
Introducción I	20
Las mutantes simples	21
Resultados I	25
Obtención de mutantes dobles	26
Mutantes afectadas en dos subunidades CA presentan letalidad del embrión	33
Mutantes afectadas en dos subunidades CA presentan fenotipos alterados	35
Capítulo II.....	41
Introducción II	42
La Fotorrespiración	43
Los Mecanismos de Concentración de Carbono (CCMs)	45
El Dominio CA y un Mecanismo de Reciclado de Carbono basal	49
Resultados II	55
El fenotipo de las mutantes dobles <i>ca2cal2</i> y <i>ca2cal1</i> puede ser rescatado mediante el cultivo en atmósferas con altas concentraciones de CO ₂	56
Las dobles mutantes muestran un consumo de O ₂ similar a la mutante simple <i>ca2</i>	58
Los niveles de complejo I en la mutante doble <i>ca2cal2</i> y la mutante simple <i>ca2</i> son similares	59
La doble mutante <i>ca2cal2</i> muestra una asimilación de carbono reducida	63
La suplementación con sacarosa puede rescatar el fenotipo de las mutantes dobles.....	66
Las dobles mutantes <i>ca2cal1</i> y <i>ca2cal2</i> presentan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno	68
El análisis de metabolitos de la doble mutante <i>ca2cal2</i> sugiere un desbalance relacionado con la fotorrespiración	71
Los niveles de transcritos de genes que codifican para enzimas fotorrespiratorias se encuentran alterados en la mutante doble <i>ca2cal2</i>	75
La enzima GDC de la vía fotorrespiratoria presenta una actividad aumentada en la doble mutante <i>ca2cal1</i>	77

Discusión y Conclusiones	79
Discusión	80
El rol funcional del dominio CA y su vinculación con la fotorrespiración	82
Las subunidades CA y la posible composición del dominio CA	88
Conclusiones	95
Materiales y Métodos	98
1. Nomenclatura.....	99
1.1. Genes.....	99
1.2. Abreviaturas	100
2. Material Biológico	102
2.1. Plantas	102
2.1.1. Condiciones de Cultivo.....	103
2.1.2. Cruzas.....	104
2.2. Bacterias.....	105
2.2.1. Condiciones de Cultivo.....	105
2.3. Callos y Suspensiones Celulares	105
3. Extracciones	106
3.1. DNA genómico.....	106
3.2. RNA total	107
3.3. Proteínas	107
3.4. Mitocondrias	108
4. Vectores y Clonado	112
5. Transformaciones.....	113
5.1. Bacterias.....	113
5.2. Plantas	114
6. PCR	115
6.1. Oligonucleótidos	116
6.2. PCR genómica.....	118
6.3. RT-PCR	118
6.4. qRT-PCR.....	119
7. Electroforesis.....	119
7.1. Geles de Agarosa.....	119
7.2. Geles de Poliacrilamida	120
7.2.1. SDS-PAGE	120

7.2.2.	1D BN-PAGE	120
7.2.3.	2D BN/SDS-PAGE	122
7.3.	Tinciones	123
7.3.1.	Coomasie Blue Coloidal	123
7.3.2.	Tinción de Plata.....	123
7.3.3.	Tinción de actividad NADH	124
7.4.	Western blot.....	124
8.	Ciclo de Vida. Radio Máximo de la roseta. Peso fresco y peso seco.....	125
9.	Consumo de Oxígeno	126
10.	Asimilación de carbono y análisis de fluorescencia	126
11.	Características estomáticas.....	127
12.	Cuantificación de nucleótidos de pirimidina.....	127
13.	Determinación de ROS	127
14.	Metabolómica	128
15.	Cuantificación de aminoácidos por HPLC.....	129
16.	Actividad GDC.....	129
17.	Análisis de imágenes y estadística	130
Bibliografía.....		131
Publicaciones		142

Introducción General

Las Mitocondrias y la Cadena Respiratoria

La hipótesis que sostiene que las mitocondrias derivaron a partir de una bacteria ancestral (α -proteobacteria) es ahora ampliamente aceptada (Sagan, 1967; Margulis, 1996) aunque los eventos exactos de su origen son aún objeto de discusión (Degli Esposti, 2014). El evento endosimbiótico ocurrido hace billones de años y la transformación de esta bacteria ancestral en las actuales mitocondrias han permitido la evolución de la vida eucariota en el planeta. La secuenciación y comparación de genomas mitocondriales y bacterianos han aportado un gran número de datos que permiten actualmente avalar esta hipótesis con datos precisos (Gray, 1999). Numerosos genomas mitocondriales de diversas especies han sido secuenciados y estudiados revelando tamaños y contenidos génicos muy variables. En líneas generales, los genomas mitocondriales de plantas suelen ser mucho más grandes que aquéllos encontrados en animales y hongos (Scheffler, 2008). Para el caso particular de *Arabidopsis*, el genoma es de unos 365 Kpb y codifica para 57 genes (Unsel et al., 1997). A través de la evolución, la mayoría de los genes que se encontraban en el endosimbionte original fueron transferidos al núcleo, de manera que varias de las proteínas mitocondriales son codificadas allí. Sin embargo, el número y el tipo de genes que migraron al núcleo no son los mismos entre los diferentes linajes (Andersson et al., 2003).

Las mitocondrias poseen un rol crucial en el mantenimiento de todas las funciones celulares ya que constituyen la primordial fuente de energía de las células eucariotas. Adicionalmente, las mitocondrias participan en muchos otros procesos importantes dentro de las células como la regulación de las reservas de calcio (Duchen, 2000), la utilización de nutrientes (Liesa y Shirihai, 2013), la señalización intracelular (Tait y Green, 2012) y la muerte celular (Pradelli et al., 2010). Así, el mantenimiento de una población saludable de mitocondrias es esencial para la supervivencia de las células (Stotland y Gottlieb, 2015).

Estructuralmente, las mitocondrias poseen dos membranas, una interna y otra externa, que dan lugar a dos espacios diferentes: la matriz mitocondrial y

el espacio intermembrana. La membrana interna forma invaginaciones o pliegues llamados crestas mitocondriales y separa la matriz mitocondrial del espacio intermembrana. La membrana externa separa el espacio intermembrana del citosol de la célula. En la **Figura 1** se muestra un esquema de la estructura de una mitocondria. Esta organización resulta fundamental para el funcionamiento de las mitocondrias como generadoras de energía.

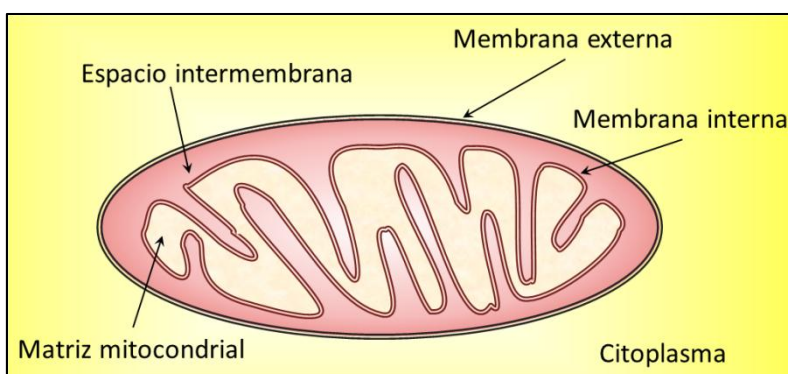


Figura 1. Esquema de la estructura general de una mitocondria.

En las mitocondrias se aloja la maquinaria necesaria para la producción de ATP vía el proceso de fosforilación oxidativa. En la membrana interna mitocondrial se encuentran presentes una serie de complejos proteicos; el complejo NADH deshidrogenasa (complejo I), el complejo succinato deshidrogenasa (complejo II), el complejo citocromo c reductasa (complejo III) y el complejo citocromo c oxidasa (complejo IV). Estos complejos, junto con la ubiquinona (UQ) y el citocromo c (Cyt c), forman la cadena respiratoria mitocondrial. A través de ella, los electrones procedentes de compuestos como el NADH y el FADH_2 son transportados vía una serie de reacciones de óxido-reducción hasta el O_2 como aceptor final. Este transporte de electrones se encuentra acoplado al traslado de protones (H^+) desde la matriz al espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico que es subsecuentemente utilizado por el complejo ATP sintasa (complejo V) para catalizar la fosforilación del ADP y producir energía en forma de ATP. En la **Figura 2** se esquematizan los principales componentes de la cadena respiratoria mitocondrial de plantas. En la vía clásica, los electrones ingresan a la cadena respiratoria mediante la oxidación de compuestos reducidos como el NADH vía el complejo I. Estos electrones son transferidos a continuación a la UQ, que se encuentra libre en la membrana mitocondrial interna y es capaz de difundir para transportar los electrones a otros componentes de la cadena. La

actividad del complejo I se ve inhibida por la adición del insecticida rotenona, el cual evita la transferencia de los electrones desde dicho complejo a la UQ (Friedrich et al., 1994). Por otro lado, el complejo II es capaz de ceder electrones a la UQ a partir de la oxidación del succinato a fumarato. La UQ reducida (o ubiquinol) transfiere luego sus electrones al complejo III, el cual a su vez cede los electrones al Cyt c. El complejo III es inhibido por el antibiótico antimicina A. El Cyt c se encuentra localizado en la membrana mitocondrial interna como una proteína periférica, del lado del espacio intermembrana, y se cree que también es capaz de difundir libremente para llevar sus electrones al último complejo de la cadena respiratoria, el complejo IV. Este complejo toma los electrones del Cyt c y los transfiere al aceptor final, el O_2 , para formar H_2O . El cianuro de potasio (KCN) inhibe la actividad de este último complejo. Los H^+ bombeados durante el pasaje de los electrones por los complejos I, III y IV son utilizados por el complejo V para obtener ATP, ya que el paso de los H^+ a favor de gradiente desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial otorga la energía necesaria para la formación del enlace de alta energía entre ADP y P_i para dar lugar a la molécula de ATP.

En plantas, la cadena transportadora de electrones es más complicada en comparación con aquéllas presentes en animales; ya que cuenta con oxidoreductasas alternativas que participan del transporte de electrones sin contribuir con la formación del gradiente de H^+ (Rasmusson et al., 2008). La oxidasa alternativa (AOX) aparece como una ramificación de la cadena respiratoria principal al nivel de la UQ y es capaz de producir H_2O por reducción del O_2 pero, como ya se mencionó, no produce el bombeo de H^+ al espacio intermembrana (Juszczuk y Rychter, 2003). Esta enzima es insensible al KCN, pero se ve inhibida por el ácido salicilhidroxámico (SHAM). AOX es activa como dímero, y para que sea funcional, debe producirse la reducción de un puente disulfuro que une el homodímero. Entre las funciones propuestas para AOX se encuentran la limitación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las mitocondrias (Møller, 2001) y la participación en mecanismos que permiten a las plantas regular su equilibrio energético en respuesta a ambientes cambiantes (Hansen et al., 2002; Moore et al., 2002). El rol potencial de AOX es más complicado en los tejidos fotosintéticamente

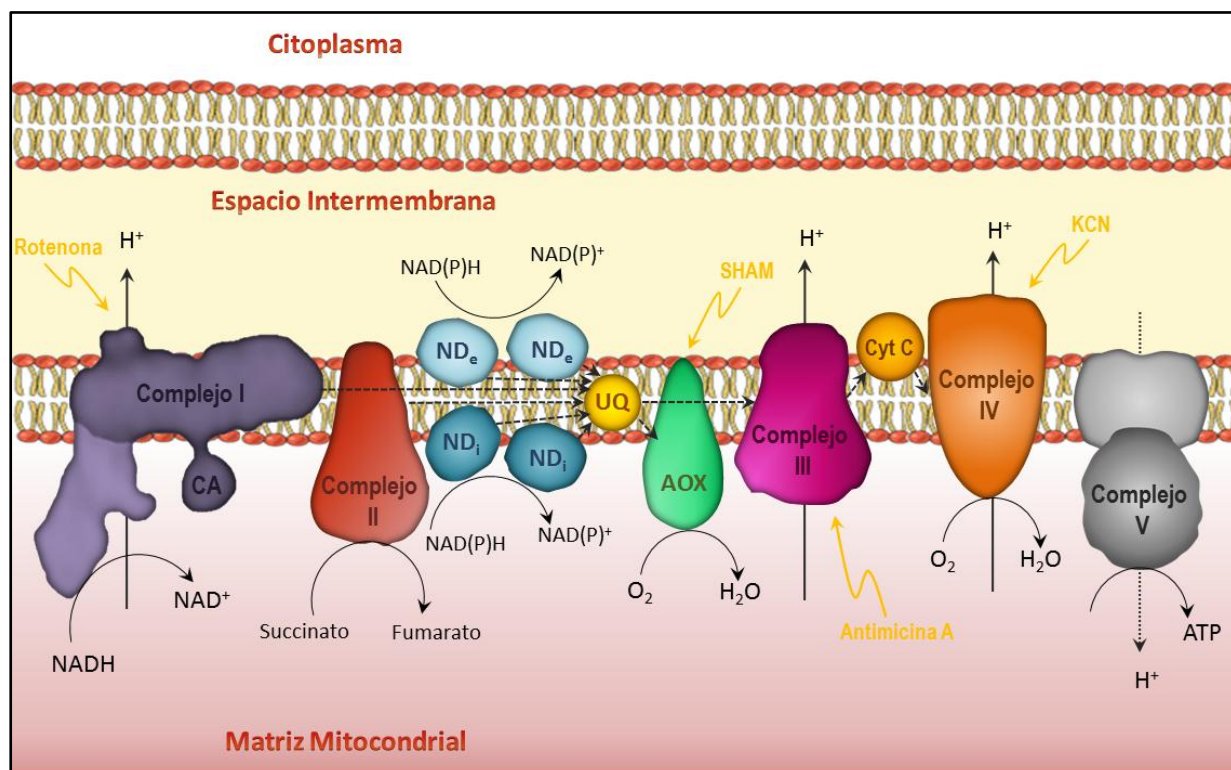


Figura 2. Esquema de los principales componentes de la cadena respiratoria mitocondrial de plantas.

Se muestran los complejos proteicos de la cadena respiratoria mitocondrial clásica (complejos I, II, III y IV) que acoplan el transporte de electrones a la generación de un gradiente electroquímico mediante el bombeo de H^+ al espacio intermembrana. El complejo V emplea ese gradiente en la síntesis de ATP. También se muestran la ubiquinona (UQ) y el citocromo c (Cyt c) involucrados en el transporte de electrones entre complejos proteicos. Adicionalmente se esquematizan las NAD(P)H deshidrogenasas alternativas internas (ND_i) y externas (ND_e), y la oxidasa alternativa (AOX) que constituyen una vía de transporte de electrones alterna que no genera bombeo de H^+ ni ATP. En color amarillo se indican los compuestos capaces de inhibir los complejos proteicos correspondientes.

activos debido a la interacción entre mitocondrias y cloroplastos con respecto al uso del ATP y el poder reductor. Existe la propuesta de que AOX podría participar en la oxidación de compuestos en la vía fotorrespiratoria ayudando a mantener la relación ATP/ADP y oxidando NADH (Igamberdiev et al., 1997). Por otro lado, las mitocondrias de plantas poseen cuatro NAD(P)H deshidrogenasas alternativas. Estas son monoméricas, no bombean H^+ y son insensibles a la rotenona (Kerscher, 2000). Dos de estas enzimas se encuentran en la superficie externa de la membrana mitocondrial interna localizadas hacia el espacio intermembrana, y son conocidas como NAD(P)H deshidrogenasas externas (Roberts et al., 1995). Otras dos se localizan en la

superficie interna de esta membrana sobresaliendo hacia la matriz mitocondrial, y se denominan NAD(P)H deshidrogenasas internas (ND_i) (Melo et al., 1996). Debido a la presencia de NAD(P)H deshidrogenasas externas (ND_e), las mitocondrias de plantas pueden oxidar NADH y NADPH generados fuera de la matriz mitocondrial e ingresar los electrones a la cadena respiratoria prescindiendo del complejo I (Roberts et al., 1995). Las NAD(P)H deshidrogenasas internas pueden competir con el complejo I por los sustratos NADH y UQ. La entrada de los electrones vía una NAD(P)H deshidrogenasa alternativa en comparación con la entrada vía el complejo I da como resultado una relación ATP/O_2 más baja. Sin embargo, la posibilidad de tener una cadena transportadora de electrones funcional mediante la expresión de un solo polipéptido en lugar de todas las subunidades que componen el complejo I puede ser ventajoso en condiciones donde las fuentes de carbono son abundantes y un crecimiento rápido resulta esencial (Kerscher, 2000).

El Complejo I

El Complejo I es el principal sitio de entrada de los electrones a la cadena respiratoria, transfiriendo los electrones desde el NADH a la UQ. Este complejo ya se encontraba presente en las proteobacterias, ancestros de las mitocondrias, y se considera que su aparición ocurrió tempranamente en la evolución (Gray, 2012). El complejo I de bacterias posee una composición simple y ha sido ampliamente estudiado. Análisis mediante microscopía electrónica revelaron que este complejo posee dos brazos que se ubican formando una “L”; el brazo de membrana inserto en la membrana mitocondrial interna, y el brazo periférico que sobresale hacia la matriz mitocondrial (Dudkina et al., 2005) (**Figura 3**). La estructura del complejo I de la eubacteria *Thermus thermophilus* logró ser resuelta mediante cristalografía de rayos X (Baradaran et al., 2013). Fisiológicamente, el complejo I puede ser dividido en tres módulos funcionales; los módulos de oxidación del NADH y de reducción de la UQ (módulos N y Q) ubicados en el brazo periférico, y el módulo de transferencia de protones (módulo P) en el brazo de membrana (Braun et al.,

2014) (**Figura 3**). En procariotas, el complejo I está compuesto por aproximadamente 14 subunidades, mientras que su composición en eucariotas es más compleja y suele constar de más de 40 proteínas diferentes (Carroll et al., 2006). En eucariotas superiores es considerado el más grande y complicado de los complejos pertenecientes a la cadena respiratoria. Posee un origen genético dual, ya que de cinco a nueve de sus subunidades se encuentran codificadas por el genoma mitocondrial, mientras que las otras restantes son codificadas por el genoma nuclear (Meyer et al., 2011).

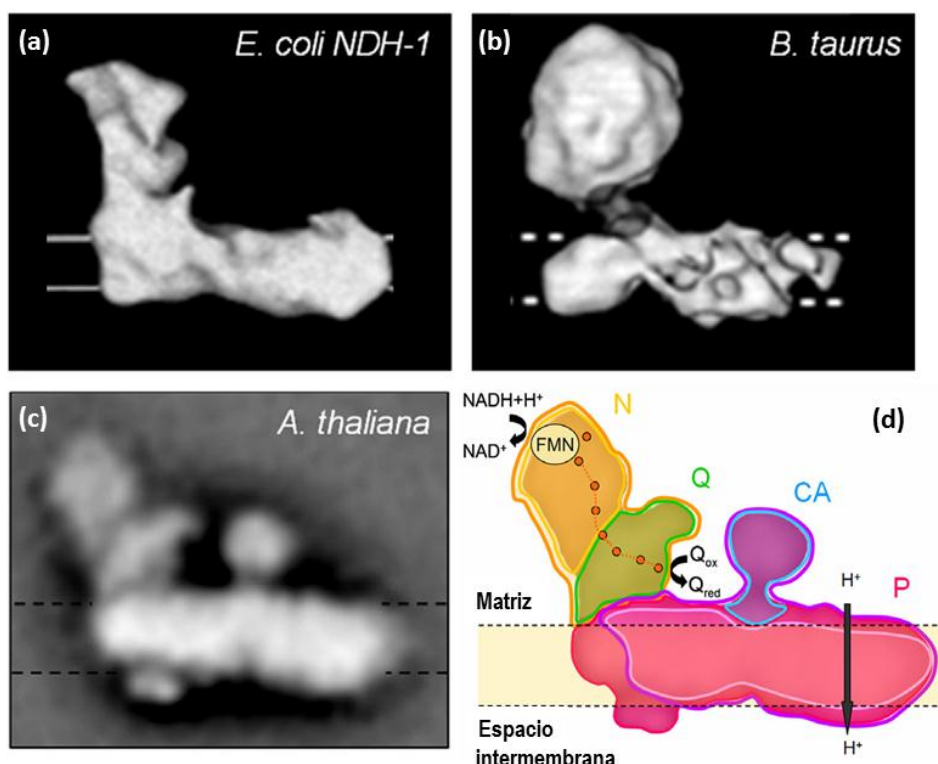


Figura 3. El complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

Estructura del complejo I de (a) *Escherichia coli* (Guénebaut et al., 1998), (b) *Bos taurus* (Grigorieff, 1998) y (c) *Arabidopsis thaliana* (Dudkina et al., 2005) revelados a partir de estudios realizados mediante microscopia electrónica de partícula única. (d) Esquema del complejo I de *A.thaliana* donde se señalan en rosado el brazo de membrana inserto en la membrana mitocondrial interna (línea punteada), y en naranja el brazo periférico que sobresale hacia la matriz mitocondrial. También se muestran sus módulos funcionales. N: módulo de oxidación de NADH. Q: módulo de reducción de UQ. P: módulo de transferencia de protones. Mediante el complejo I los electrones son transferidos desde el NADH a la UQ. CA: Dominio CA de forma esférica anclado a la parte central del brazo de membrana sobresaliendo hacia la matriz mitocondrial.

Las imágenes fueron extraídas y modificadas de (Klodmann y Braun, 2011).

El complejo I sigue una larga e intrincada ruta de ensamblaje hasta transformarse en un complejo proteico funcionalmente activo. Aproximadamente 50 genes deben ser transcritos de manera coordinada en dos diferentes compartimentos celulares, el núcleo y las mitocondrias. Estos transcritos deben ser traducidos en el citosol o en la matriz mitocondrial, los productos citosólicos deben ser transportados a las mitocondrias y los péptidos señal deben ser removidos. Las diferentes subunidades deben plegarse correctamente e incluir los grupos prostéticos necesarios para la actividad enzimática. Finalmente, todas las subunidades deben ensamblarse para formar el complejo activo. Adicionalmente, los transcritos mitocondriales requieren un extensivo proceso de maduración y los productos de la traducción requieren modificaciones post-traduccionales (Braun et al., 2014). El ensamblaje del complejo I ha sido ampliamente estudiado mediante diferentes técnicas, las cuales incluyen la utilización de mutantes y anticuerpos contra subunidades específicas, tratamientos con inhibidores de la traducción mitocondrial, el uso de subunidades marcadas, y el monitoreo del ensamblado mediante marcado radiactivo (Meyer et al., 2011). En conjunto, la información disponible da evidencias de que el ensamblaje del complejo I seguiría una secuencia de eventos conservada evolutivamente (Voge et al., 2007). El brazo periférico es armado independientemente en la matriz mitocondrial mientras que el ensamblaje del brazo de membrana se inicia dentro de la membrana interna. Posteriormente, el brazo periférico pre-armado es insertado en el complejo en formación, y finalmente el brazo de membrana es completado para acabar con todo el proceso. Se han descripto varios factores de ensamblaje involucrados durante esta secuencia, aunque su forma de acción precisa no ha sido dilucidada (Meyer et al., 2011). Estos factores son necesarios para el ensamblaje del complejo I y, adicionalmente, algunos de ellos están involucrados en la formación de proteínas hierro-azufre, sugiriendo que el correcto ensamblaje del complejo I no es posible sin los centros hierro-azufre (Bych et al., 2008). A su vez, se conoce que el complejo I es capaz de asociarse a la forma dimérica del complejo III, formando el supercomplejo I + III₂ (Dudkina et al., 2005). La forma dimérica del complejo III puede también asociarse al complejo IV, conectando indirectamente este último complejo con el complejo I (Krause et al., 2004). Los beneficios inherentes de esta

interacción entre complejos son especulativos. Entre ellos se incluyen la regulación del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria ramificada de plantas, la reducción de la producción de ROS y el incremento en la capacidad de las membranas de las crestas mitocondriales de acomodar proteínas (Dudkina et al., 2005, 2010). En plantas, el complejo I posee varias características especiales. El análisis del complejo I de *Arabidopsis thaliana* reveló al menos 49 tipos de subunidades, de las cuales 40 poseen homólogos en mamíferos (Peters et al., 2013). Las subunidades restantes fueron consideradas como específicas del complejo I de plantas (Parisi et al., 2004). Estudios posteriores revelaron que homólogos a estas subunidades pueden ser encontrados también en algunos linajes protistas, pero se encuentran totalmente ausentes en animales y hongos (Gawryluk y Gray, 2010; Andrews et al., 2013). De hecho, la comparación directa mediante geles de poliacrilamida nativos reveló que la masa molecular total del complejo I de plantas es claramente mayor a la que presenta el complejo I de mamíferos (Jänsch et al., 1995). Algunas de estas subunidades adicionales poseen funciones aún desconocidas y podrían introducir actividades accesorias al complejo. Análisis mediante microscopia electrónica revelaron que el complejo I de plantas posee una estructura única que además incluye un dominio extra (Dudkina et al., 2005). En conjunto, esta información sugiere que en plantas el complejo I podría poseer funciones ligadas a roles específicos de las mitocondrias en estos organismos.

Las Anhidrasas Carbónicas de tipo gamma y el Dominio CA

Como se mencionó anteriormente, el complejo I de plantas incluye subunidades proteicas adicionales. Entre ellas, existen unas proteínas particulares que poseen un peso molecular aproximado de 30 kDa y se asemejan a anhidrasas carbónicas de tipo gamma (γ -CAs) (Perales et al., 2004). Subunidades de este tipo han sido encontradas en todas las plantas analizadas hasta el momento. El complejo I de *Arabidopsis thaliana* contiene cinco de ellas, el complejo I de *Chlamydomonas* contiene tres y el de arroz

por lo menos dos de estas subunidades (Cardol et al., 2004; Heazlewood et al., 2003; Perales et al., 2004; Sunderhaus et al., 2006).

Las anhidrasas carbónicas (EC 4.2.1.1) son metaloenzimas que contienen zinc y catalizan la interconversión del dióxido de carbono (CO_2) a bicarbonato (HCO_3^-). La primera enzima fue descubierta en eritrocitos humanos pero la actividad ha sido reportada en muchos tipos de organismos incluyendo plantas, animales, eubacterias y arqueobacterias (Hewett-Emmett y Tashian, 1996). Las anhidrasas carbónicas juegan papeles importantes en numerosos procesos fisiológicos relacionados con reacciones de carboxilación y decarboxilación, por ejemplo durante la respiración y la fotosíntesis. Son importantes en la homeostasis de CO_2 y el control del pH. También participan en el transporte de carbono inorgánico hacia células fotosintéticas o fuera de aquéllas que están respirando activamente. Estas enzimas probablemente evolucionaron como facilitadoras del transporte transmembrana del CO_2 y adquirieron luego un rol metabólico secundario en la evolución (Henry, 1996). Las anhidrasas carbónicas son codificadas por al menos cinco familias génicas diferentes y evolutivamente no relacionadas. Así, pueden ser clasificadas en distintos tipos; α (alpha), β (beta), γ (gamma), δ (delta) y ϵ (épsilon) (So et al., 2004; Sawaya et al., 2006).

Las subunidades del complejo I adicionales de plantas anteriormente mencionadas poseen una alta similitud de secuencia con la anhidrasa carbónica de tipo gamma (γ -CA) de la arqueobacteria *Methanosarcina thermophila*, denominada Cam (Parisi et al., 2004; Sunderhaus et al., 2006). Esta es la única proteína representativa de la clase γ que ha sido fisiológica y bioquímicamente caracterizada (Alber y Ferry, 1994). Cam es un homotrímero, y si bien se asume que uniría zinc como las demás clases de anhidrasas carbónicas, sería posible que se una a un cofactor diferente como por ejemplo el hierro (Tripp, 2003). El estudio de estructuras cristalizadas de alta resolución con bicarbonato unido al sitio activo de la enzima permitió predecir los residuos directamente involucrados en la catálisis (Iverson et al., 2000), los cuales fueron posteriormente confirmados mediante experimentos de mutagénesis puntual (Tripp y Ferry, 2000; Tripp et al., 2002). El sitio activo se encuentra formado en la interfase de interacción entre monómeros, de manera que los

aminoácidos requeridos para su formación son aportados por diferentes monómeros haciendo que la estructura trimérica sea fundamental para la actividad enzimática (Zimmerman y Ferry, 2006). Dado que los aminoácidos de Cam importantes para la catálisis se conocen en detalle, se ha propuesto un mecanismo para la reacción enzimática que cataliza. La coordinación del ión metálico estaría dada por tres residuos de histidina; His81, His122 aportados por uno de los monómeros y His117 aportado por otro monómero. Dos moléculas de agua participan de esta coordinación y se encuentran además unidas a residuos de glutamina Gln75 y ácido glutámico Glu62. Durante la reacción, un protón es extraído de la molécula de agua unida al Glu62 y el hidróxido unido al metal a su vez extrae un protón de la molécula de agua adyacente unida a Gln75. El hidróxido unido por puente de hidrógeno a Gln75 ahora está listo para el ataque nucleofílico y la incorporación de CO_2 . Este último, es atacado por electrones del hidróxido unido al metal, dando como resultado HCO_3^- unido al ión metálico. Una molécula de agua ingresa y desplaza oxígeno lo que genera HCO_3^- unido a los residuos asparagina Asn202 y Glu62. Finalmente, una segunda molécula de agua libera el HCO_3^- del sitio activo (Zimmerman y Ferry, 2006). *Methanosarcina thermophila* posee una segunda γ -CA denominada CamH. Esta proteína carece de alguno de los aminoácidos que estarían involucrados en la catálisis, sin embargo, presenta actividad anhidrasa carbónica (Ferry, 2010). En la mayoría de las subunidades CA del complejo I de plantas, los aminoácidos funcionalmente importantes se encuentran conservados o reemplazados por aminoácidos alternativos que podrían cumplir el mismo rol (Parisi et al., 2004).

En *Arabidopsis thaliana* existen cinco genes nucleares que codifican para estas subunidades CA. Tres de las proteínas codificadas poseen conservados la mayoría de los aminoácidos importantes en los sitios activos, y son denominadas CA (Carbonic Anhydrase) 1, CA2 y CA3. Las restantes poseen una estructura primaria menos conservada con respecto a Cam y se las denomina CAL (Carbonic Anhydrase Like) 1 y CAL2 (Perales et al., 2004). Algunas características de estas proteínas se encuentran resumidas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Las subunidades CA de *Arabidopsis thaliana*.

CA1	At1g19580	275 aas	29.97 kDa
CA2	At1g47260	278 aas	30.06 kDa
CA3	At5g66510	258 aas	27.83 kDa / 29.04 kDa
CAL1	At5g63510	252 aas	25.08 kDa (madura), pre-secuencia 22 aas
CAL2	At3g48680	256 aas	25.04 kDa (madura), pre-secuencia 26 aas

La localización de las subunidades CA de *Arabidopsis* en el complejo I mitocondrial ha sido confirmada por distintos tipos de evidencias. La utilización de predictores bioinformáticos de localización subcelular permitió ubicar a estas proteínas en las mitocondrias e identificar aminoácidos en la región N-terminal correspondientes a péptidos de tránsito. Esto fue demostrado mediante experimentos de importación, donde proteínas CA traducidas in vitro fueron activamente transportadas a mitocondrias de papa y sus péptidos señal fueron removidos proteolíticamente luego del transporte (Parisi et al., 2004; Perales et al., 2004). Adicionalmente, la localización en mitocondrias de la proteína CA2 pudo ser observada mediante fusiones con la proteína fluorescente verde (GFP) (Perales et al., 2004). Esta ubicación subcelular fue además ampliamente estudiada mediante análisis del proteoma mitocondrial por electroforesis en geles de poliacrilamida de dos dimensiones (2D BN/SDS-PAGE) (**ver Materiales y Métodos, sección 7.2.3**) en combinación con inmunodetección utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce todas las proteínas CA y CAL (Perales et al., 2004). Durante este procedimiento, los complejos mitocondriales son inicialmente separados por electroforesis nativa (BN-PAGE) en la primera dimensión (**Figura 4 (a)**), y luego son subsecuentemente divididos en sus correspondientes subunidades mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en la segunda dimensión (**Figura 4 (b)**). Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana, la cual es incubada con el anticuerpo policlonal. Como puede observarse en la **Figura**

4 (c), se produce el reconocimiento de cinco bandas de peso molecular de entre 27 y 30 KDa, principalmente localizadas en las regiones correspondientes al complejo I y al supercomplejo I+III₂ (Perales et al., 2005). La identidad de cada punto en el gel bidimensional está soportada además por análisis mediante espectrometría de masa, donde las proteínas de cada punto son extraídas del gel, digeridas con tripsina e identificadas (Klodmann et al., 2011; http://www.gelmap.de/arabidopsis_mito).

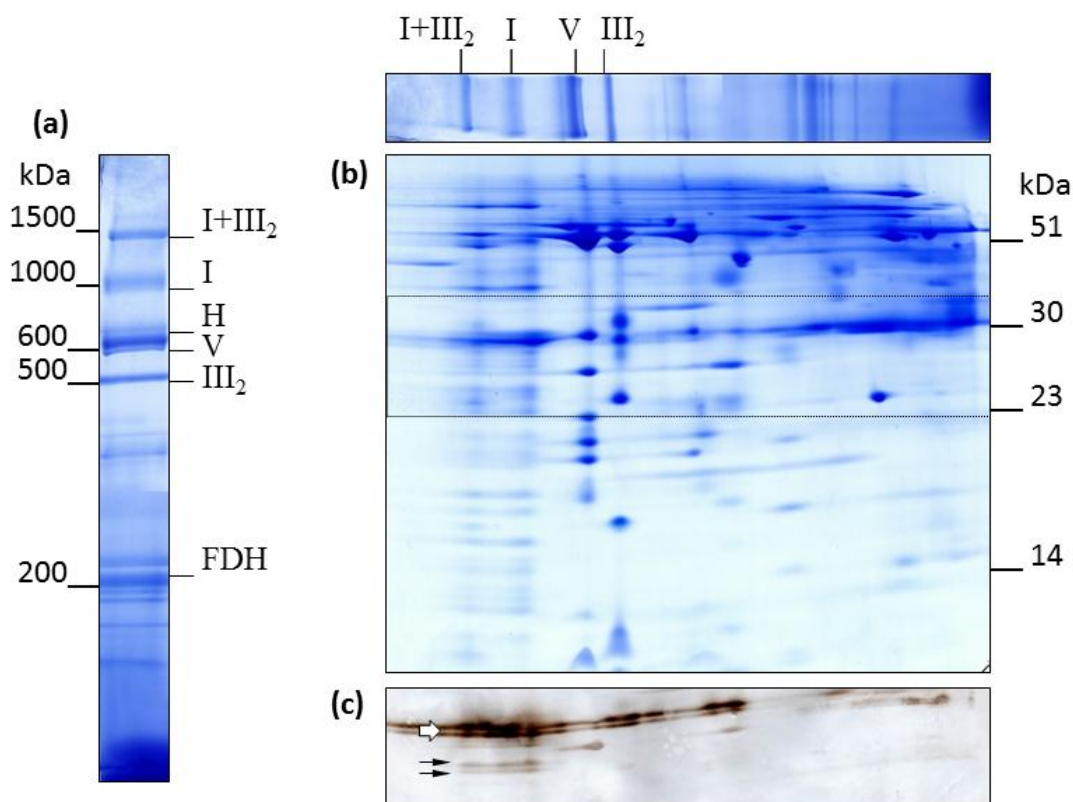


Figura 4. Análisis del proteoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de dos dimensiones (2D BN/SDS-PAGE). Los complejos proteicos de mitocondrias aisladas a partir de cultivos celulares salvajes fueron separados mediante 2D BN/SDS-PAGE **(a)** Primera dimensión, electroforesis nativa (1D BN-PAGE) **(b)** Segunda dimensión, electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). Los geles fueron teñidos por Coomassie Blue. Los pesos moleculares están indicados en kDa y se encuentra señalada la identidad de los complejos proteicos. I+III₂: supercomplejo formado por el complejo I y el complejo III en forma dimérica. I: complejo I. H: complejo HSP60. V: complejo ATP sintasa. III₂: complejo III dimérico. FDH: complejo formato deshidrogenasa. **(c)** Western blot. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y analizadas utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce todas las proteínas CA y CAL. El recuadro de línea punteada indica la zona analizada. La flecha blanca indica la posición de las proteínas CA mientras que las flechas negras señalan las proteínas CAL.

Ninguno de estos estudios proteómicos ha identificado las proteínas CA en otros complejos, por lo que la señal que se observa en zonas del gel diferentes a las que corresponden al complejo I se atribuye principalmente a un efecto de la corrida electroforética, probablemente debido a rupturas parciales del complejo I. Adicionalmente, la localización de las subunidades CA dentro del complejo I fue estudiada mediante geles 2D BN/PAGE en combinación con espectrometría de masa. Durante este proceso, el complejo I se divide en dos subcomplejos de 600 y 400 kDa, los cuales representan el brazo de membrana y el brazo periférico, respectivamente. Las subunidades CA fueron encontradas sólo en el subcomplejo de 600 kDa (Sunderhaus et al., 2006). La ubicación de CA2 dentro del brazo de membrana fue investigada mediante experimentos donde mitocondrias carentes de su membrana externa (mitoplastos) fueron sometidas a tratamientos con proteasas con el objetivo de analizar la susceptibilidad de la proteína CA2 a la digestión. La comparación de fracciones tratadas y no tratadas reveló que CA2 se encuentra protegida de la acción proteolítica, indicando que es una proteína integral de membrana localizada hacia el lado de la matriz mitocondrial del brazo de membrana del complejo I. Solo un pequeño producto de degradación resultó detectable indicando que una parte de CA2 de aproximadamente 2 kDa podría encontrarse sobresaliendo hacia el espacio intermembrana (Sunderhaus et al., 2006).

La utilización de microscopia electrónica de partícula única para el análisis del complejo I de *Arabidopsis* permitió la identificación de un dominio adicional. Este dominio posee una forma esférica y se encuentra anclado a la parte central del brazo de membrana sobresaliendo hacia la matriz mitocondrial (Dudkina et al., 2005) (**Figura 3**). También fue descrito en papa, maíz y el alga *Polytomella* sp. (Bultema et al., 2009; Peters et al., 2008; Sunderhaus et al., 2006) revelando que la presencia de subunidades CA en el complejo I se correlaciona con la ocurrencia de este dominio adicional. Su masa molecular estimada es de aproximadamente 85 kDa, dato que se correspondería con el peso de tres proteínas CA. Dada la alta similitud con Cam, las subunidades CA de *Arabidopsis* podrían también encontrarse formando una estructura trimérica. Así, se denomina dominio CA a este dominio adicional y se considera como un heterotrímero de proteínas CA y CAL (Sunderhaus et al., 2006). Estudios

donde el complejo I es desensamblado controladamente en subcomplejos mediante tratamientos con bajas concentraciones de SDS y su composición analizada mediante espectrometría de masa, revelaron la presencia de las proteínas CA1, CA2, CAL1 y CAL2 en el subcomplejo de 85 kDa. La estequiometría de las proteínas CA y CAL analizada mediante 2D BN/SDS-PAGE resultó no ser la misma, las cantidades de CA1+CA2 claramente exceden las cantidades de CAL1+CAL2. Esta evidencia llevó a pensar que el dominio CA debería incluir dos proteínas CA y una proteína CAL, probablemente variando entre complejos I individuales (Klodmann et al., 2010).

Todos los eucariotas fotosintéticos estudiados hasta el momento poseen al menos una proteína CA y una proteína CAL. La interacción de estas subunidades entre sí y su ubicación exacta dentro del dominio CA son aspectos que aún permanecen poco claros. La interacción directa entre las proteínas CA y las CAL fue mostrada mediante ensayos de doble híbrido en levadura, donde CA2 fue capaz de interactuar con CAL1 y CAL2 (Perales et al., 2004). En cambio, la interacción directa de las proteínas CAL entre sí no pudo ser observada mediante este sistema experimental. La interacción de la proteína CA3 con cualquier otro miembro de la familia CA/CAL no pudo ser demostrada por ensayos de doble híbrido, y su presencia no pudo ser detectada mediante el análisis de los subcomplejos del complejo I por 2D BN/SDS-PAGE y espectrometría de masa (Klodmann et al., 2010). La proteína CA2 recombinante expresada en *E.coli* resultó capaz de formar homotrímeros in vitro. Estos homotrímeros fueron sometidos a pruebas de actividad y resultaron capaces de unir carbono inorgánico eficientemente, sin embargo, la catálisis de la interconversión de CO_2 a HCO_3^- no pudo ser detectada (Martin et al., 2009).

Actividad de las subunidades CA y su posible rol funcional

Hasta el momento, no existen evidencias fisiológicas directas de actividad anhidrasa carbónica asociada al complejo I de plantas. Numerosos esfuerzos por determinar esta actividad han sido realizados utilizando

diferentes fracciones incluyendo complejo I purificado de *Arabidopsis* (Perales et al., 2005), sin lograr detectar la conversión reversible de CO_2 a HCO_3^- . Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la mayoría de los aminoácidos importantes para la catálisis se encuentran conservados entre Cam y las subunidades CA de plantas (Parisi et al., 2004). El estudio de la proteína relacionada CcmM de la cianobacteria *Synechocystis*, mostró que ésta también posee la mayoría de los residuos catalíticos conservados con respecto a Cam, a excepción de Asp 76 y Asn 202, los cuales se postulan como esenciales para la transferencia de protones durante la hidratación del CO_2 (Tripp et al., 2001). Esta proteína es un componente del carboxisoma de cianobacterias, una estructura involucrada en el mecanismo de concentración de carbono (CCM), el cual permite el almacenamiento de carbono inorgánico en forma de HCO_3^- para su posterior transformación en CO_2 en las proximidades de la enzima fijadora RubisCO (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) con el fin de maximizar su actividad (Long et al., 2007). De manera similar a los homotrímeros de la proteína CA2 recombinante, CcmM es capaz de unir carbono inorgánico. Sin embargo, su actividad anhidrasa carbónica no pudo ser detectada (Cot et al., 2007; Martin et al., 2009). Así, la evidencia experimental sugiere que proteínas con alta similitud a γ -CAs podrían presentar una actividad diferente pero relacionada a la actividad anhidrasa carbónica. Una de las funciones propuestas para CcmM es la de transportar HCO_3^- desde el citoplasma al centro del carboxisoma, donde posteriormente una anhidrasa carbónica de tipo beta (β -CA) conservada, la proteína CcaA, convierte eficientemente el HCO_3^- en CO_2 para que la RubisCO pueda fijarlo mediante el ciclo de Calvin (Cot et al., 2007).

Especialmente a bajas concentraciones de CO_2 , la enzima RubisCO es capaz de utilizar el oxígeno (O_2) e iniciar la vía fotorrespiratoria. Esta enzima cataliza dos tipos de reacciones que comparten el mismo sitio activo: la carboxilación, necesaria para el crecimiento de los organismos; y la oxigenación, que da lugar a la síntesis de 2-fosfo-glicolato y luego glicolato en el cloroplasto. La presencia de este metabolito implica toxicidad y puede ser detoxificado mediante la vía fotorrespiratoria (Eisenhut et al., 2008; Maurino y Peterhansel, 2010). En esta vía, el catabolismo del glicolato ocurre en los

peroxisomas produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y glicina. Esta última es transportada a las mitocondrias donde es descarboxilada produciendo serina, amonio (NH_4^+) y CO_2 . La serina formada es llevada nuevamente a los peroxisomas para su posterior metabolización y el CO_2 es liberado (Maurino y Peterhansel, 2010). Sin embargo, estudios sobre la asimilación de carbono indican que no todo el CO_2 producido se pierde, sugiriendo que existiría algún mecanismo por el cual parte del carbono es reciclado (Bauwe et al., 2010). Luego de su producción en las mitocondrias, el CO_2 podría ser rápidamente convertido a HCO_3^- por una β -CA mitocondrial, posiblemente At β CA6 (Fabre et al., 2007). De esta manera, el CO_2 sería reciclado incrementando la eficiencia de la fijación de carbono fotosintética. Según esta hipótesis, se postuló la presencia de un transportador de carbono inorgánico en la membrana interna mitocondrial que, como CcmM, se encargara del transporte de un lado al otro (Raven, 2001). A partir de esto, fue propuesta una conexión entre la fotorrespiración y las subunidades CA, las cuales podrían tener un rol junto con β -CAs mitocondriales en el reciclado del CO_2 . Ya que es parte del complejo I ubicado en la membrana interna mitocondrial, sería capaz de unir carbono inorgánico a niveles comparables con CcmM y no presenta actividad anhidrasa carbónica detectable; se postuló al dominio CA como este posible transportador de carbono inorgánico propuesto (Braun y Zabaleta, 2007; Zabaleta et al. 2012) **(ver Capítulo II: Las subunidades CA y la Fotorrespiración)**.

Adicionalmente, una participación esencial del dominio CA durante el ensamblaje del complejo I ha sido postulada (Perales et al., 2005) y experimentalmente demostrada en varios estudios independientes (Klodmann et al., 2010; Meyer et al., 2011; Li et al., 2013). Por otro lado, también se mostró que las proteínas CA pueden estar involucradas en la fotomorfogénesis de las plantas (Wang et al., 2012) y el desarrollo reproductivo masculino (Villareal et al., 2009).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, hasta el momento las subunidades CA no han logrado ser funcionalmente caracterizadas y el rol fisiológico del dominio CA permanece poco claro. Estudios realizados utilizando mutantes simples de *Arabidopsis thaliana* para cada una de las subunidades CA no lograron esclarecer el rol funcional de estas proteínas **(ver Capítulo I:**

Las mutantes afectadas en las subunidades CA). Probablemente esto pueda deberse a redundancias funcionales entre ellas, sin embargo, la razón biológica de la ocurrencia de cinco subunidades CA estructuralmente relacionadas en *Arabidopsis* no está establecida y podría estar reflejando la existencia de diferentes roles individuales.

Nuevas investigaciones son necesarias para lograr un mejor entendimiento de la composición y función del dominio CA.

De esta manera, el **objetivo general** de este trabajo es generar conocimiento acerca del rol fisiológico de las anhidrasas carbónicas de tipo gamma (γ -CAs) que conforman el dominio CA del complejo I mitocondrial de plantas.

Según lo expuesto anteriormente, la **hipótesis** principal a contrastar es que el dominio CA del complejo I mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* es importante en el contexto de la fotorrespiración, ya que participaría en el reciclado de CO_2 mitocondrial permitiendo el mantenimiento de una tasa normal de fijación de carbono. Por ende, una planta carente de al menos dos de las subunidades CA podría presentar problemas para hacer frente a condiciones fotorrespiratorias.

Capítulo I



Las mutantes afectadas en las
subunidades CA

Introducción I

Las mutantes simples

Como se mencionó anteriormente, hasta el momento las subunidades CA no han logrado ser funcionalmente caracterizadas y el rol fisiológico del dominio CA permanece poco claro. Una de las formas posibles de abordar esta problemática es mediante la utilización y análisis de líneas mutantes homocigotas. Las plantas mutantes simples por inserción de T-DNA para cada una de las subunidades CA (**ver Materiales y Métodos sección 2.1 y Figura 6**) no presentan fenotipos alternados creciendo bajo condiciones normales (Perales et al., 2005), lo cual sugeriría cierto grado de redundancia entre los miembros de la familia CA, ya que la subunidad faltante podría estar siendo reemplazada por alguna de las otras proteínas CA (Braun y Zabaleta, 2007). Sin embargo, en la mutante simple *ca2*, la separación de los complejos proteicos de mitocondrias aisladas a partir de cultivos celulares heterotróficos mediante 1D BN-PAGE y 2D BN/SDS-PAGE revelaron una reducción drástica en los niveles de complejo I (Perales et al., 2005) (**Figura 5 (a) y (b)**). Se estima que esta reducción es de aproximadamente el 80 % con respecto a las mitocondrias salvajes, y es también acompañada por una reducción en los niveles del supercomplejo I + III₂. El complejo I remanente (aproximadamente 20 %) presenta una masa molecular similar a la encontrada para el complejo I de mitocondrias salvajes, lo que sugiere que posiblemente alguna de las otras subunidades CA podría reemplazar a la proteína CA2 en estos complejos I restantes. Consecuentemente, en geles de actividad NADH deshidrogenasa se observa una reducción en la actividad del complejo I en la mutante *ca2* dado el menor contenido de dicho complejo, sin embargo, esto sugiere que las partículas de complejo I remanentes son igualmente activas (**Figura 5(c)**). La abundancia de todos los demás complejos se mantiene inalterada (Perales et al., 2005). A partir de estas evidencias, se postuló a la proteína CA2 como un componente esencial para el ensamblaje del complejo I. Estudios posteriores sobre este proceso y sus intermediarios demostraron que la subunidad CA2 posee un rol fundamental en el paso iniciador de la formación del brazo de membrana del complejo I (Meyer et al., 2011). La proteína CA2 fue detectada en todos los subcomplejos que se forman durante el proceso de ensamblaje del

brazo de membrana, sugiriendo que esta proteína se incorpora en etapas tempranas. A su vez, no pudo detectarse la presencia de estos subcomplejos en la mutante nula *ca2*, indicando que ninguna de las demás subunidades analizadas logran ensamblarse en subcomplejos estables cuando CA2 está ausente. En conjunto, estos resultados sugieren que el brazo de membrana del complejo I de *Arabidopsis thaliana* logra ensamblarse correctamente en un subcomplejo de aproximadamente 600 kDa en presencia de la proteína CA2 (Meyer et al., 2011), al que luego se adiciona el brazo de matriz para formar el complejo I final.

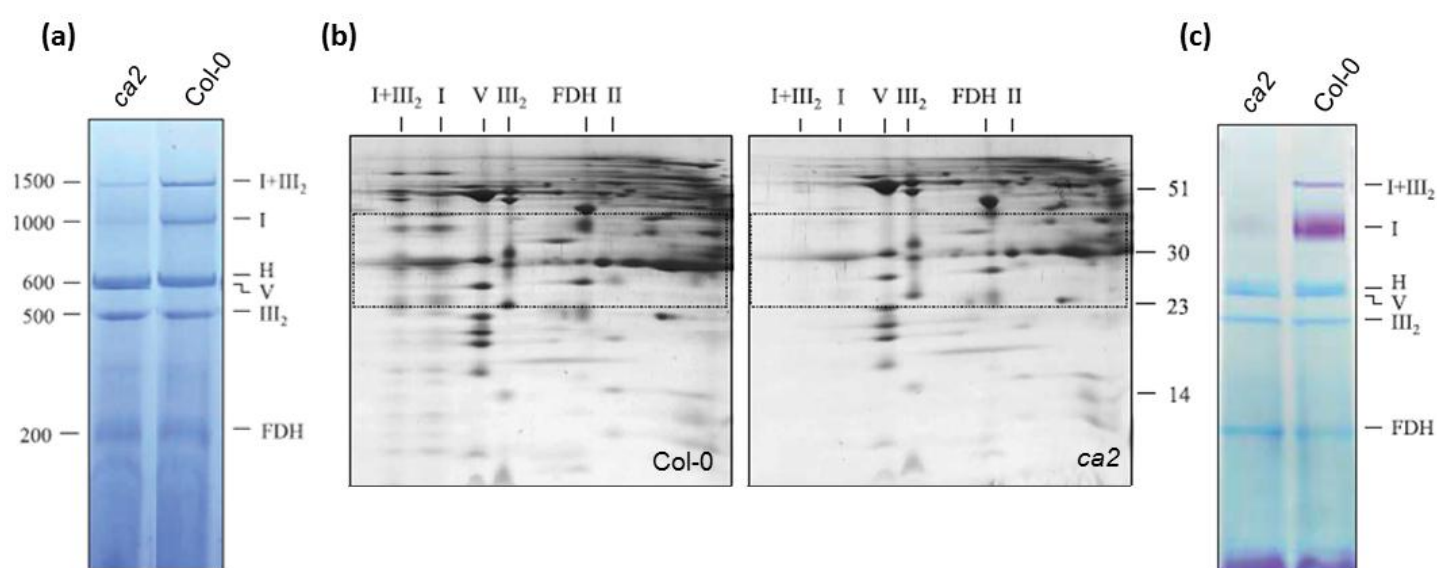


Figura 5. La mutante *ca2* presenta una drástica reducción en los niveles de complejo I.

Los complejos proteicos de mitocondrias aisladas a partir de cultivos celulares mutantes *ca2* y salvajes fueron separados mediante 1D BN-PAGE (a) (c) y 2D BN/SDS-PAGE (b). Los geles fueron teñidos por Coomassie Blue (a) (b) o mediante tinción de actividad NADH deshidrogenasa (c). El peso molecular está indicado en kDa y se encuentra señalada la identidad de los complejos proteicos. I+III₂: supercomplejo formado por el complejo I y el complejo III en forma dimérica. I: complejo I. H: complejo HSP60. V: complejo ATP sintasa. III₂: complejo III dimérico. FDH: complejo formato deshidrogenasa.

Figura extraída y modificada de Perales et al. (2005).

Los cultivos celulares generados a partir de plantas mutantes *ca2* no poseen diferencias en textura, color ni tamaño de partículas con respecto a los cultivos salvajes; sin embargo la tasa de crecimiento es ligeramente menor y las células mutantes presentan una reducción en el consumo de oxígeno de aproximadamente un 50% con respecto a las células salvajes (Perales et al.,

2005). Esta reducción también puede ser observada en el consumo de oxígeno de hojas de plantas mutantes *ca2* (Villarreal et al., 2009). Sin embargo, y a pesar de las características anteriormente descritas que presenta la mutante *ca2*, la comparación del fenotipo y los estadios de desarrollo entre esta mutante y las plantas salvajes no arroja ninguna diferencia significativa. Bajo condiciones normales de cultivo, las plantas mutantes resultan indistinguibles de las plantas salvajes considerando la morfología de sus raíces, hojas, tallos y flores. La evaluación estadística de la duración de los diferentes estadios de desarrollo tampoco revela diferencias significativas. Ambos tipos de plantas presentan fertilidad comparable y producen similares cantidades de semillas (Perales et al., 2005).

Por otro lado, la expresión ectópica de CA2 en *Arabidopsis thaliana* causa esterilidad masculina en plantas transgénicas sobre-expresantes. Durante el desarrollo normal de las anteras, el engrosamiento secundario de la pared de las células del endotecio causa la apertura de las anteras cuando éstas se deshidratan. Análisis histológicos de plantas sobre-expresantes 35S::CA2 revelaron que un engrosamiento anormal del endotecio evita la dehiscencia de las anteras. Mediciones del consumo de O₂ en estas plantas revelaron una respiración disminuida con respecto a plantas salvajes. Estos experimentos sugieren que el proceso de respiración está afectado a nivel del complejo I con un aumento del pasaje de electrones principalmente a través de las NAD(P)H deshidrogenasas alternativas. Adicionalmente, las plantas sobre-expresantes mostraron una menor acumulación de ROS mitocondrial en general. Particularmente, no fue posible evidenciar el pico de ROS que ocurre normalmente previo a la dehiscencia de las anteras. Así, se piensa que la sobre-expresión ectópica de la proteína CA2 en tejidos del endotecio, donde normalmente su expresión es reducida, afecta la producción de ROS en las mitocondrias. Esta reducción en el contenido de ROS influye sobre la polimerización de lignina dependiente de H₂O₂ que da lugar al engrosamiento del endotecio, proceso indispensable para la dehiscencia de las anteras. La falta de dehiscencia es la causa de la esterilidad masculina observada en plantas 35S::CA2 (Villarreal et al., 2009).

Dado que ninguna de las mutantes simples de *Arabidopsis thaliana* para las subunidades CA presenta un fenotipo alterado bajo condiciones normales de cultivo, los **objetivos particulares** del **Capítulo I** de este trabajo son:

- Realizar cruzamientos de las mutantes simples disponibles con el fin de obtener mutantes dobles.
- Observar y analizar las nuevas mutantes obtenidas generando información que permita avanzar en el conocimiento del rol funcional de las proteínas CA.

Resultados I

Obtención de mutantes dobles

Como se describió anteriormente, las mutantes simples de los genes CA no presentan fenotipos alterados creciendo bajo condiciones ambientales normales, razón por la cual se planteó la generación de mutantes dobles afectadas en diferentes combinaciones de subunidades CA con el fin de obtener información acerca del rol fisiológico de estas proteínas mitocondriales. Para esto, se realizaron las diferentes cruzas entre las distintas mutantes simples disponibles (**ver Materiales y Métodos, sección 2.1 y Figura 6**). Las plantas mutantes simples parentales fueron crecidas en tierra bajo condiciones ambientales normales y un fotoperíodo de 16hs luz / 8hs oscuridad según se describe en **Materiales y Métodos, sección 2.1.1**. La identidad de dichas plantas fue confirmada mediante el análisis de la presencia de la correspondiente inserción de T-DNA. Para ello se realizaron reacciones de PCR utilizando como templado DNA genómico y oligonucleótidos derivados de la secuencia del borde del T-DNA y una región interna de cada uno de los genes CA a evaluar (**ver Materiales y Métodos, sección 6.1 y Figura 6**). Llegada la fase reproductiva, las flores jóvenes de cada mutante simple fueron emasculadas para evitar la autopolinización y posteriormente fueron polinizadas manualmente utilizando el polen de una mutante diferente. En todos los casos se realizaron las cruzas recíprocas (**ver Materiales y Métodos, sección 2.1.2**), sin observarse diferencias. Las semillas resultantes de cada una de las cruzas fueron sembradas y dieron lugar a la primera generación filial. Ésta se evaluó mediante reacciones de PCR genómica resultando todos los individuos heterocigotas dobles, como era esperado dada la herencia mendeliana de la inserción. A modo de ejemplo se muestra en la **Figura 7** el resultado para la obtención de la doble mutante *ca3ca11*. La autofecundación de estas plantas doble heterocigotas generó semillas que posteriormente dieron lugar a la segunda filial. En esta generación se espera una segregación de la mutación, es decir, la ocurrencia de individuos salvajes, mutantes heterocigotas y mutantes homocigotas. Dado que los genes CA se encuentran en diferentes regiones del genoma de *Arabidopsis*, las inserciones en dichos genes se comportan como caracteres hereditarios independientes, por lo que

se espera la aparición de un individuo mutante homocigota doble en una proporción 1:16. El genotipo de al menos el doble de plantas (32) pertenecientes a la segunda filial de cada una de las cruza fue analizado mediante reacciones de PCR genómica para evaluar la presencia de las inserciones de T-DNA y la ausencia de la versión salvaje de los genes CA correspondientes.

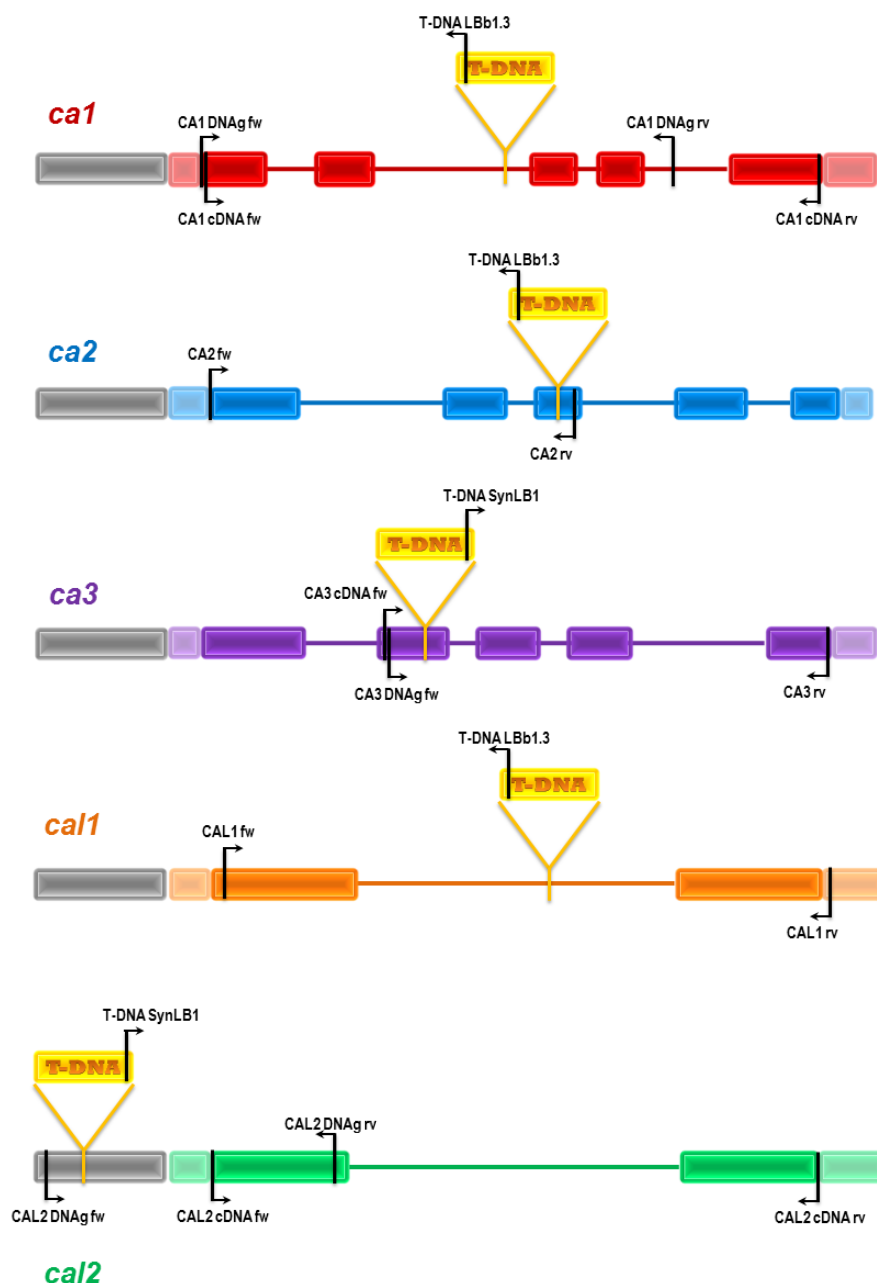


Figura 6. Las mutantes simples de los genes CA.

Representación esquemática de los genes CA de las mutantes simples *ca1* (polimorfismo SALK_109391) (rojo), *ca2* (polimorfismo SALK_010194) (azul), *ca3* (polimorfismo Garlic_631_C01.b.1a.Lb3Fa) (violeta), *cal1* (polimorfismo SALK_072274) (naranja) y *cal2* (polimorfismo SAIL_235_F03) (verde). Para cada uno de ellos se muestra la ubicación de la inserción de T-DNA y los lugares de hibridación de los diferentes oligonucleótidos utilizados durante las reacciones de PCR genómica y RT-PCR. Para más detalle a cerca de los oligonucleótidos ver **Materiales y Métodos, sección 6.1**. Cajas de color fuerte: exones; Líneas: intrones; Caja gris: región promotora; Cajas de color suave: regiones no traducidas.

En la **Figura 8 (a)** se muestra a modo de ejemplo los resultados de las reacciones de PCR genómica obtenidos para la doble mutante *ca2ca11*. Los productos de amplificación de aproximadamente 770 pb y 1500 pb correspondientes a los genes no interrumpidos *CA2* y *CAL1*, respectivamente, pueden ser observados en la planta salvaje; mientras que bandas de aproximadamente 900 pb y 1100 pb correspondientes a los genes *CA2* y *CAL1* que contienen la inserción de T-DNA, respectivamente, se observan en la doble mutante *ca2ca11*. Ambos tipos de bandas se presentan en la planta mutante doble heterocigota, mientras que la completa ausencia de los productos de amplificación correspondientes a las versiones salvajes de los genes *CA2* y *CAL1* permite identificar a la doble mutante homocigota *ca2ca11*. Adicionalmente, y dado que la expresión de los genes interrumpidos por la inserción de T-DNA se encuentra bloqueada, RNA total de las mutantes homocigotas dobles fue extraído y utilizado como templado en reacciones de RT-PCR con el fin de asegurar la falta de los transcritos de los genes interrumpidos (**ver Materiales y Métodos, sección 6.3**). La verificación de la ausencia de RNA mensajero proveniente de los genes *CA2* y *CAL1* se muestra en la **Figura 8 (b)**, donde productos de amplificación de aproximadamente 400 pb y 740 pb son fácilmente observables en la planta salvaje pero se encuentran totalmente ausentes en la doble mutante homocigota *ca2ca11*. Los procedimientos de obtención, búsqueda y evaluación de identidad se realizaron de igual manera para todas las mutantes dobles obtenidas en este trabajo.

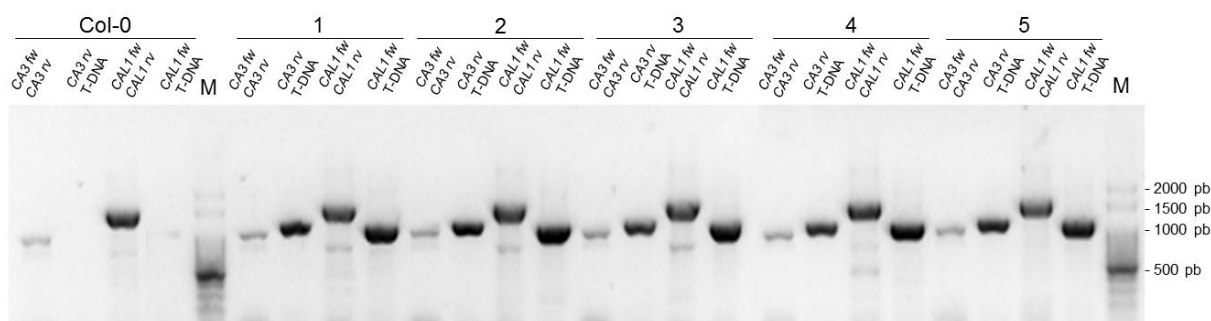
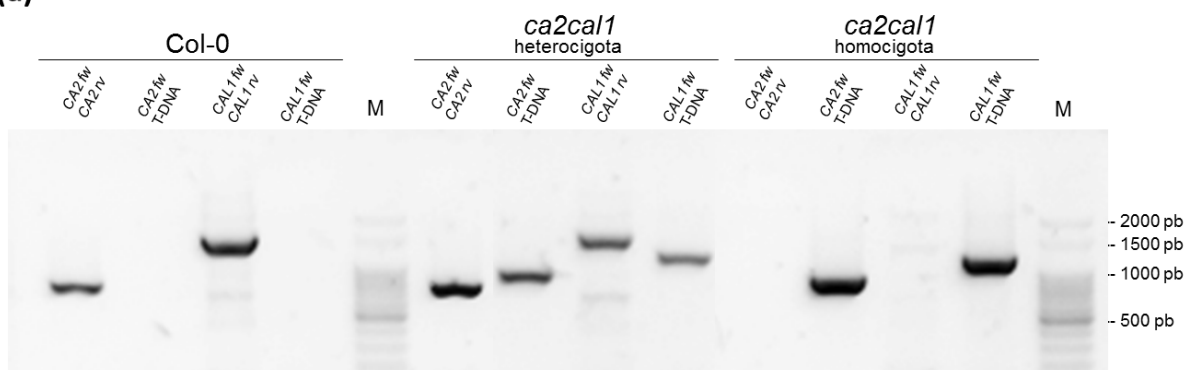


Figura 7. Primera generación filial de la cruce de las mutantes simples *ca3* y *cal1*.

Las semillas resultantes de la cruce fueron sembradas y dieron lugar a individuos heterocigotas dobles (1 a 5) según la herencia mendeliana de la inserción. Las plantas fueron evaluadas mediante reacciones de PCR genómica utilizando oligonucleótidos derivados de la secuencia del borde del T-DNA (T-DNA) y de los genes *CA3* (*CA3 fw*, *CA3 rv*) y *CAL1* (*CAL1 fw*, *CAL1 rv*). El análisis de la primera generación filial fue realizado de igual manera para todas las cruces. Los productos de las reacciones de PCR fueron resueltos en geles de agarosa 1% teñidos con *SYBR safe*. M: marcador de peso molecular.

Una vez obtenidas y verificadas, las dobles mutantes homocigotas fueron sembradas tanto en tierra como en placa de Petri bajo condiciones ambientales normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad según se describe en **Materiales y Métodos, sección 2.1.1**. Las plantas fueron observadas periódicamente durante un ciclo de vida completo.

(a)



(b)

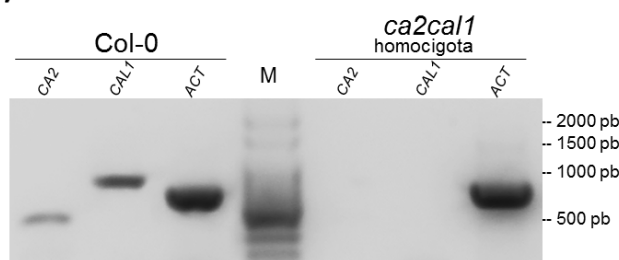


Figura 8. Genotipo y niveles de transcritos de la mutante doble *ca2cal1*.

(a) La presencia de las correspondientes inserciones de T-DNA fue comprobada mediante reacciones de PCR utilizando como templado DNA genómico y oligonucleótidos derivados de la secuencia del borde del T-DNA (T-DNA) y de los genes *CA2* (*CA2 fw*, *CA2 rv*) y *CAL1* (*CAL1 fw*, *CAL1 rv*). (b) Los niveles de transcritos correspondientes a los genes *CA2* y *CAL1* fueron evaluados en plantas salvajes y la doble mutante *ca2cal1* mediante RT-PCR. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen *CA* y una programación de 40 ciclos. Se utilizó actina (*ACT*) como gen constitutivo.

Los productos de las reacciones de PCR fueron resueltos en geles de agarosa 1% teñidos con *SYBR safe*. M: marcador de peso molecular.

Paralelamente a la estrategia de cruzamientos de mutantes simples por inserción de T-DNA, se utilizó un sistema de silenciamiento de genes mediante microRNAs artificiales (*amiRs*). Los microRNAs naturales son RNAs pequeños (19-24 nucleótidos) de simple cadena con función regulatoria negativa sobre la expresión génica. Son procesados a partir de precursores de RNA más largos y su interacción con el RNA mensajero (mRNA) blanco produce su clivaje y la

degradación de los subproductos. Los precursores incluyen la región con la secuencia del microRNA y una región que es complementaria a la anterior, lo que permite su apareamiento. Esto le confiere la capacidad de formar una horquilla y generar un RNA doble cadena. Durante el procesamiento, se produce el corte enzimático de las bases de la horquilla, formando lo que se denomina un pre-microRNA, que finalmente es convertido en el microRNA simple cadena maduro por acción de varias enzimas diferentes (Bartel, 2004) **(Figura 9 (a))**. Los amiRs son diseñados imitando las características de los microRNAs naturales de acuerdo con el gen blanco que se quiere silenciar. Esta técnica permitió generar mutantes múltiples de una manera alternativa y rápida. Adicionalmente este sistema permite obtener mutantes múltiples con un silenciamiento parcial, si fuera el caso que las mutantes múltiples nulas por inserción de T-DNA resultaran letales. Dado que los amiRs pueden generarse de modo que impacten sobre varios transcritos con homología (WMD tool, <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>), se procedió a realizar una construcción que generara un amiR específico contra los genes CA y otra que generara un amiR específico contra los genes CAL. Para esto, se partió de un precursor de microRNA conocido de *A.thaliana* (miR319a) y se realizó una mutagénesis dirigida por PCR utilizando cuatro oligonucleótidos específicos (I a IV) según los genes a silenciar y dos oligonucleótidos del vector (A y B) donde el precursor miR319a se encuentra clonado **(ver Materiales y Métodos secciones 4 y 6.1)**. La estrategia para la generación de los amiRs se encuentra esquematizada en la **Figura 9 (b)**. De este modo, se logró obtener un amiR que se procesa igual que el miR319a pero que ahora es capaz de silenciar los genes específicos de interés de acuerdo a la secuencia que se le introdujo. Esta técnica resultó exitosa para la creación de un amiR contra los genes *CAL1* y *CAL2* (denominado AmiRCALs) y un amiR contra los genes *CA1* y *CA3* (denominado AmiRCAs). En ambas construcciones los amiRs se expresaron bajo el promotor constitutivo 35S (CaMV) presente en el vector binario pCHF3. Se procedió luego a transformar plantas de *A.thaliana* mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

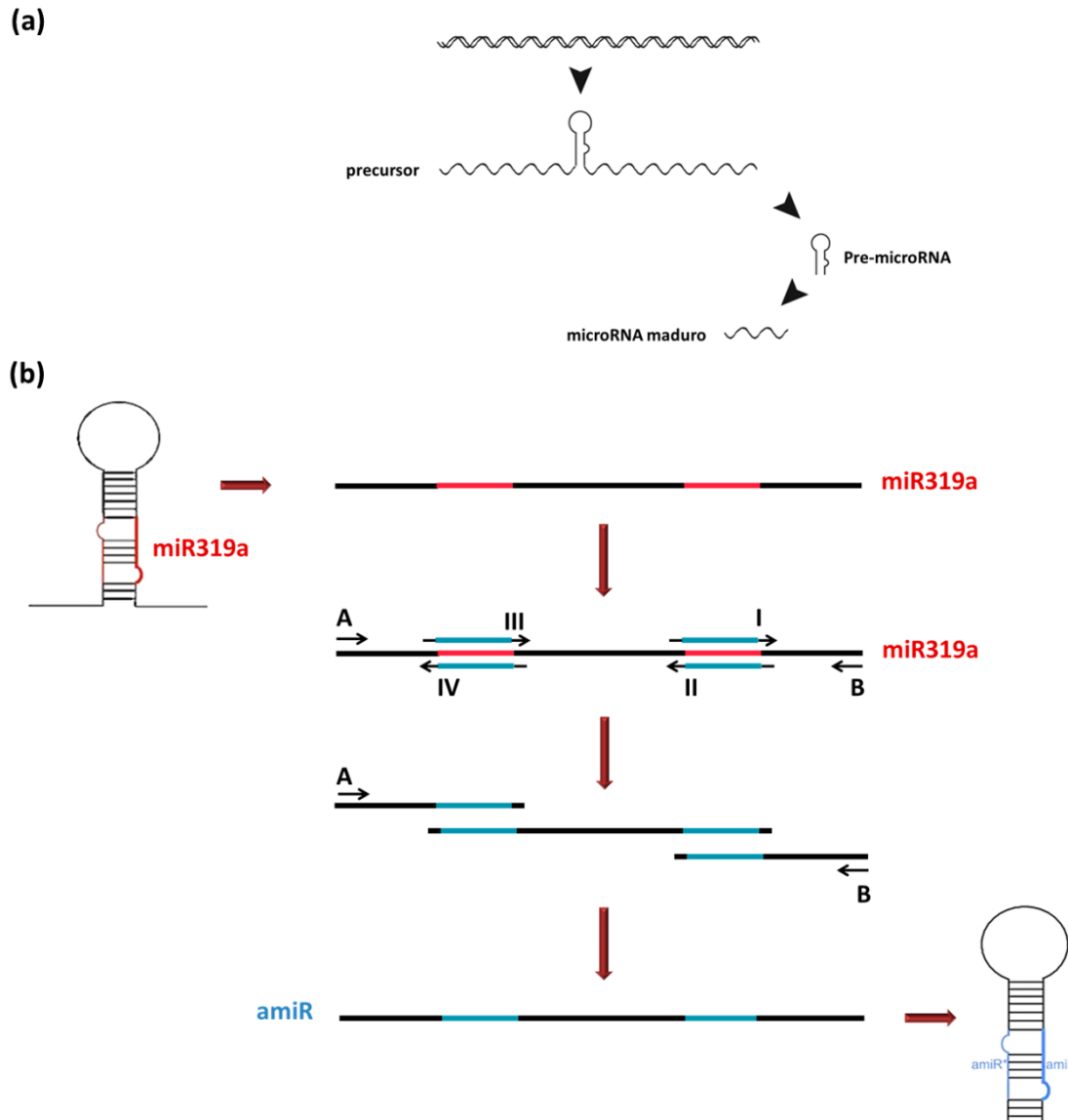


Figura 9. Silenciamiento de genes mediante el uso de microRNAs artificiales (amiRs). Los microRNAs naturales son RNAs pequeños de simple cadena con función regulatoria negativa sobre la expresión génica. Los amiRs son diseñados imitando las características de los microRNAs naturales de acuerdo con el gen blanco que se quiere silenciar. **(a)** Esquema simplificado del procesamiento de un microRNA. Son procesados a partir de precursores de RNA más largos que incluyen la región con la secuencia del microRNA y una región complementaria que permite la formación de una horquilla. Esto genera un RNA doble cadena que, luego del corte enzimático de las bases de la horquilla, da lugar a un pre-microRNA, que finalmente es convertido en el microRNA simple cadena maduro. **(b)** Esquema de la estrategia utilizada para generar amiRs específicos contra los genes CA. Se partió del precursor miR319a y se realizó una mutagénesis dirigida por PCR utilizando cuatro oligonucleótidos específicos (I a IV) según los genes a silenciar y dos oligonucleótidos del vector (A y B) donde el precursor miR319a se encuentra clonado. Se obtuvieron amiRs que se procesan igual que el miR319a pero que ahora son capaces de silenciar los genes de interés de acuerdo a la secuencia que se introdujo.

Las transformantes fueron seleccionadas con el antibiótico correspondiente y analizadas mediante RT-PCR semicuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen, obteniéndose así individuos que expresan los amiRs y silencian los transcritos correspondientes. Los resultados obtenidos muestran que, si bien se encontraron niveles variables de silenciamiento entre diferentes plantas transgénicas, es posible generar mediante esta técnica plantas silenciadas (**Figura 10 (a)**).

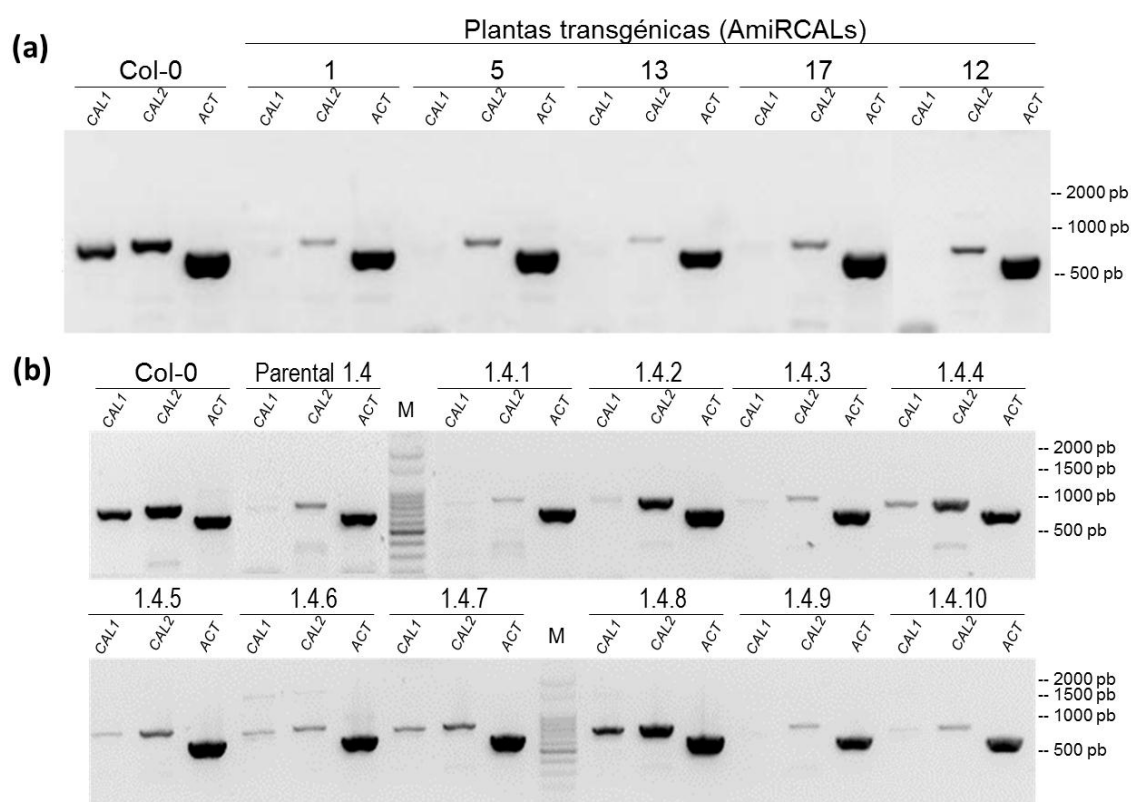


Figura 10. Plantas transgénicas silenciadas mediante microRNAs artificiales (amiRs).

Los niveles de transcritos de los genes correspondientes fueron evaluados en plantas salvajes y transgénicas mediante RT-PCR. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen y una programación de 35 ciclos. Se utilizó actina (ACT) como gen constitutivo.

(a) Plantas transgénicas que expresan un amiR contra los genes *CAL1* y *CAL2* (AmiRCALs). Se observan niveles variables de silenciamiento entre plantas obtenidas a partir de diferentes eventos de transformación independientes **(b)** Primera (1.4) y segunda (1.4.1-10) generaciones derivadas de la planta transgénica número 1. Se observan niveles muy variables de silenciamiento entre plantas derivadas de una misma planta madre. En todos los casos las plantas fueron previamente seleccionadas con el antibiótico correspondiente.

Los productos de las reacciones de PCR fueron resueltos en geles de agarosa 1% teñidos con SYBR safe. M: marcador de peso molecular.

Sin embargo, el análisis de la progenie obtenida de cada una de las plantas transgénicas silenciadas reveló niveles muy variables de silenciamiento entre plantas derivadas de una misma planta madre (**Figura 10 (b)**). Esto posiblemente podría deberse a la naturaleza de las construcciones realizadas con el promotor constitutivo 35S, el cual en algunos casos puede a su vez ser silenciado en plantas salvajes del ecotipo Col-0 (Mlotshwa et al., 2010). Los niveles variables de silenciamiento dificultaron el análisis de las plantas silenciadas mediante técnicas que requieren cantidades de tejido superiores a las que puede ofrecer un único individuo, por lo tanto limitó el uso de las líneas silenciadas para los diferentes ensayos, de manera que finalmente no fueron utilizadas en los posteriores estudios.

Mutantes afectadas en dos subunidades CA presentan letalidad del embrión

Durante los procedimientos realizados para la obtención de las diferentes mutantes dobles anteriormente descritos, la aparición de individuos mutantes homocigotas dobles en la progenie no resultó en todos los casos en la proporción esperada según la herencia mendeliana de la inserción. Luego de varios intentos infructuosos para obtener las mutantes dobles *ca1ca2* y *ca1ca3* homocigotas, individuos que poseen uno de los genes mutantes en homocigosis y el otro en heterocigosis (*ca1ca1ca2CA2*; *CA1ca1ca2ca2*; *ca1ca1ca3CA3* y *CA1ca1ca3ca3*) fueron identificados y sujetos a evaluación. Dada la posibilidad de que la falta de más de una proteína CA resulte en un fenotipo letal, se decidió evaluar las semillas en desarrollo de estos individuos, con el objetivo de determinar si existen problemas o abortos por encima del porcentaje normalmente encontrado. En *Arabidopsis*, la apariencia externa de las semillas inmaduras pasa de ser inicialmente blanca a tomar una coloración verdosa, y posteriormente tornarse amarronada antes de la ruptura de la silicua y la liberación al ambiente. Las semillas contenidas en una misma silicua suelen desarrollarse aproximadamente en forma simultánea. Un bajo porcentaje de semillas sufren problemas o abortos normalmente en las plantas salvajes (2-3%). Analizando las silicuas en desarrollo de las mutantes

ca1ca1ca2CA2; *CA1ca1ca2ca2*; *ca1ca1ca3CA3* y *CA1ca1ca3ca3* se pudo observar la ocurrencia de semillas inmaduras anormales incoloras con una frecuencia superior a la que podría ser encontrada en una planta salvaje. Estas semillas inmaduras incoloras son fácilmente diferenciables de las semillas en desarrollo verdes salvajes, y se tornan oscuras y arrugadas en las silicuas maduras (Figura 11). Dado que al tiempo en que las semillas salvajes germinan y dan lugar a plántulas verdes, estas semillas anormales no son capaces de germinar, y que la ocurrencia de dichas semillas se da en una proporción 3:1 coincidente con la segregación mendeliana, se podría inferir que las semillas anormales contendrían embriones mutantes dobles homocigotas. Este hecho explica la imposibilidad de encontrar los individuos mutantes dobles homocigotas buscados en la población de plantas adultas analizadas.

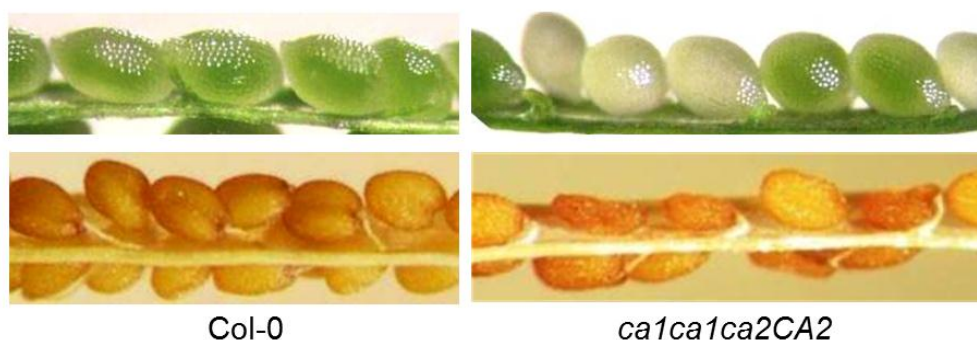


Figura 11. Mutantes afectadas en dos subunidades CA presentan letalidad del embrión. A diferencia de las plantas salvajes, las mutantes *ca1ca1ca2CA2* presentan semillas inmaduras incoloras en sus silicuas en desarrollo (paneles superiores), y semillas oscuras y arrugadas en las silicuas maduras (paneles inferiores) en una proporción de alrededor del 25%.

El resto de las mutantes dobles homocigotas tratadas en este trabajo (*ca2cal1*, *ca2cal2*, *ca2ca3*, *ca1cal1*, *ca3cal1*) lograron ser obtenidas mediante el proceso anteriormente descrito en la proporción esperada según la herencia mendeliana de la inserción.

El estudio en profundidad de las mutantes afectadas en dos subunidades del dominio CA que presentan letalidad del embrión es objeto de otros proyectos llevados a cabo por colegas del laboratorio.

Mutantes afectadas en dos subunidades CA presentan fenotipos alterados

Las dobles mutantes homocigotas obtenidas a partir de las cruzas realizadas fueron sembradas tanto en tierra como en placa de Petri bajo condiciones ambientales normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs (**ver Materiales y Métodos, sección 2.1.1**). Con el fin de realizar una evaluación fenotípica, las plantas fueron observadas periódicamente durante tres semanas en placas de Petri y durante un ciclo de vida completo en maceta. En las condiciones utilizadas, las mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca2* presentaron igual fenotipo. En ambas mutantes no se observó una diferencia significativa en la germinación en comparación con plantas salvajes, sin embargo, luego de transcurridas las primeras dos semanas comenzó a evidenciarse un retardo en el crecimiento de las dobles mutantes. A las cuatro semanas de edad, las plantas mutantes dobles presentaron un tamaño significativamente menor con respecto a las plantas salvajes y a las mutantes simples (**Figura 12 (a)**). Esto puede observarse claramente en la medición del radio máximo de la roseta (**Figura 12 (b)**). Los datos de peso fresco y peso seco reflejan lo observado ya que las dobles mutantes presentaron una masa fresca y seca significativamente menor con respecto a las plantas salvajes (**Figura 12 (c) y (d)**). La duración de cada una de las fases del ciclo de vida de las mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2* no se vio significativamente afectada a excepción del inicio de la floración, la cual se vio levemente retrasada ($3,2 \pm 0.5$ días después de la floración de plantas salvajes. $P \leq 0.05$) (**Figura 13**).

El fenotipo anteriormente descrito fue observado con mayor intensidad en la doble mutante *ca2ca3* evaluada en las mismas condiciones. Esta mutante presentó un retardo en el crecimiento aún más evidente que el observado en las mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2*. A las cuatro semanas de edad, las mutantes *ca2ca3* mostraron un tamaño reducido con respecto a las plantas salvajes, a las mutantes simples y a las mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca2*, lo que se vio también reflejado en los datos de radio máximo de la roseta, peso fresco y peso seco (**Figura 12**). Si bien no se observó un retraso en la germinación de esta mutante, las plántulas resultaron ser más pequeñas con respecto a las

plántulas salvajes y a las demás dobles mutantes desde el inicio de su desarrollo; a diferencia de las mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2* cuyo tamaño reducido con respecto a las plantas salvajes se hizo evidente sólo luego de transcurridas las primeras dos semanas de crecimiento.

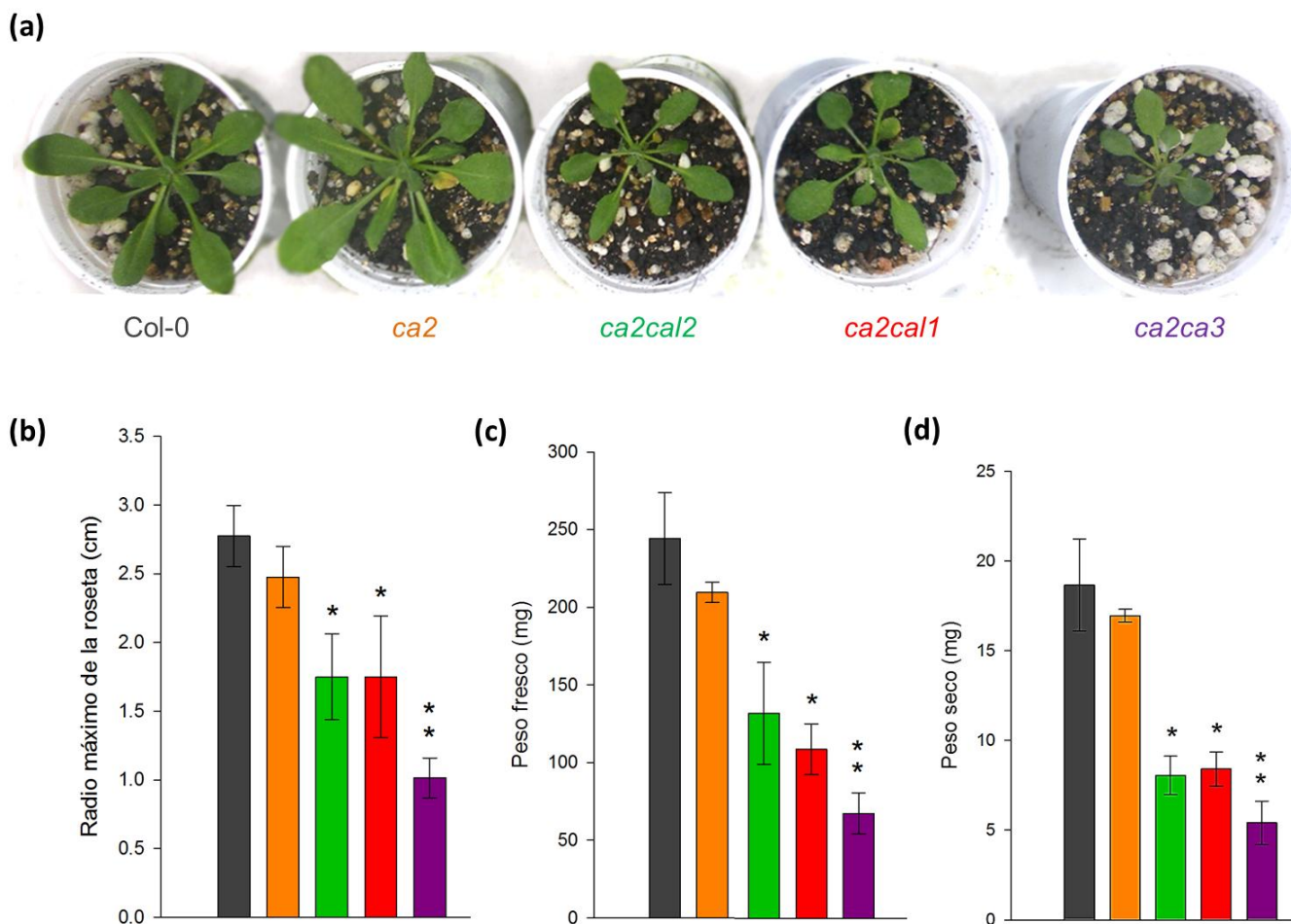


Figura 12. Mutantes afectadas en dos subunidades del dominio CA presentan retardo en el crecimiento.

Plantas salvajes y mutantes fueron crecidas bajo condiciones ambientales normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad según se describe en **Materiales y Métodos, sección 2.1.1**. Transcurridas cuatro semanas fueron realizadas las mediciones y tomadas las fotografías. **(a)** Fenotipo de plantas mutantes. **(b)** Radio máximo de la roseta (medición de la hoja más larga de la roseta). **(c)** Peso fresco de rosetas enteras. **(d)** El peso seco fue obtenido secando rosetas enteras a 100°C por 24 horas.

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las plantas salvajes.

Los asteriscos dobles indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes y a otras mutantes dobles ($P \leq 0.05$).

La mutante *ca2ca3* presentó también un retraso significativo en el inicio de la floración aún mayor que las mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2*, comenzando su etapa reproductiva $8,9 \pm 0.5$ días después que plantas salvajes ($P \leq 0.05$). (**Figura 13**). Las diferencias observadas en el inicio de la floración de las mutantes dobles con respecto a las plantas salvajes, en todos los casos fueron disipadas en el transcurso de la etapa reproductiva y la madurez. Aproximadamente a los 65 días de vida las plantas de todos los genotipos presentaron varas florales largas con silicuas en desarrollo y hojas al comienzo de la senescencia.

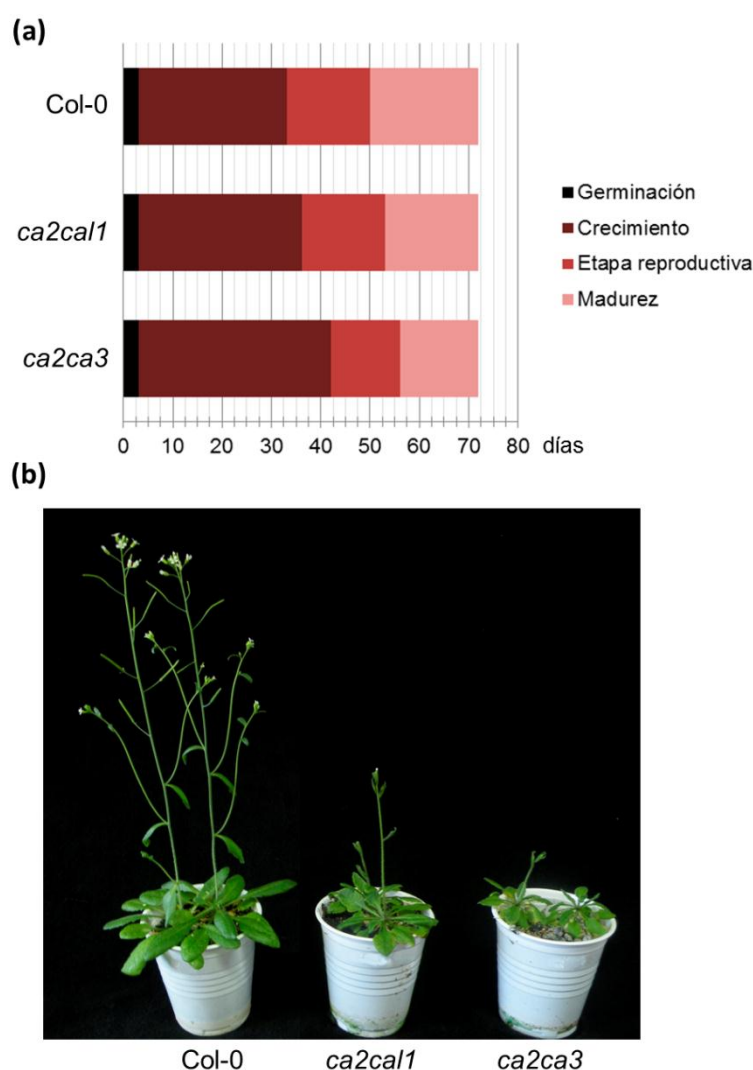


Figura 13. Mutantes afectadas en dos subunidades CA presentan retraso en el inicio de la floración.

Plantas salvajes y mutantes fueron crecidas bajo condiciones ambientales normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. **(a)** Fases del ciclo de vida de plantas salvajes y las mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca3*. **(b)** Plantas de los genotipos indicados fueron fotografiadas pasados 43 días desde la siembra.

La mutante doble *ca3ca1* logró ser exitosamente obtenida a partir del cruzamiento de las mutantes simples *ca3* y *ca1*. La observación preliminar de esta mutante bajo condiciones ambientales normales mostró un retraso en el inicio de la floración. Sin embargo, sus características fenotípicas obtenidas a partir de una evaluación completa no han sido aún determinadas.

Por otro lado, la mutante doble *ca1ca1* fue también obtenida satisfactoriamente a partir de los procedimientos de cruce realizados. Utilizando siempre las mismas condiciones de cultivo anteriormente descriptas, esta mutante doble presentó un fenotipo comparable a las plantas de tipo salvaje.

Dado que las simples mutantes no poseen fenotipo alterado, se espera que la complementación de las dobles mutantes con al menos uno de los genes salvajes sea capaz de restaurar el fenotipo salvaje. Para comprobar esto, las plantas mutantes dobles fueron transformadas con una construcción realizada con la secuencia genómica a partir del inicio de la transcripción del gen *CA2* bajo el promotor 35S (**ver Materiales y Métodos, sección 4**). En la **Figura 14** se muestra la complementación de la mutante *ca2ca2* con el gen *CA2* salvaje. Las plantas mutantes dobles y mutantes dobles complementadas junto con plantas salvajes se crecieron bajo condiciones ambientales normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. Se extrajo RNA total de cada individuo, el cual fue utilizado para la síntesis de cDNA. Los niveles de transcripto del gen *CA2* se evaluaron mediante reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Según lo esperado, se pudo observar que las plantas complementadas recobraron los niveles de transcripto de *CA2* normales así como también las características fenotípicas de las plantas salvajes.

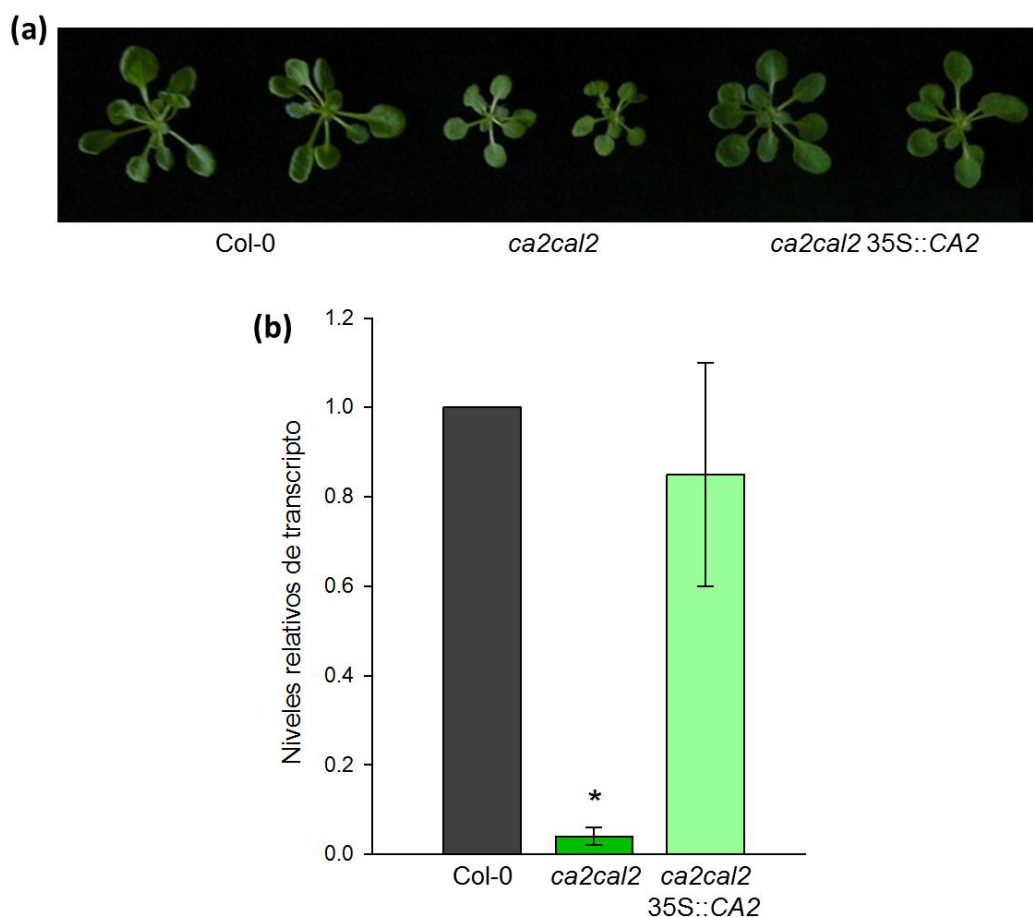


Figura 14. El gen salvaje CA2 complementa la mutante doble *ca2cal2*.

Plantas mutantes *ca2cal2* se transformaron con la secuencia genómica a partir del inicio de la transcripción del gen CA2 bajo el promotor 35S. **(a)** Plantas salvajes, mutantes *ca2cal2* y mutantes *ca2cal2* complementadas se crecieron bajo condiciones ambientales normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad durante tres semanas. **(b)** Niveles relativos de transcripto del gen CA2 evaluados mediante qPCR. *UBQ5* y *ACT2* fueron utilizados como genes constitutivos. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las plantas salvajes ($P \leq 0.001$).

Durante este trabajo, se logró la generación de diferentes mutantes dobles a partir de cruzas entre las mutantes simples disponibles. Entre ellas, se observaron mutantes dobles que presentaron un retardo en el crecimiento mostrando a las cuatro semanas de edad un tamaño significativamente menor con respecto a plantas salvajes y mutantes simples. Adicionalmente, estas mutantes dobles presentaron un retraso en el inicio de la etapa reproductiva. Por otro lado, a partir de la evaluación de semillas en desarrollo también se identificaron mutantes dobles que presentaron letalidad del embrión. Esto

implica que la obtención de individuos mutantes dobles homocigotas en la población de plantas adultas no sea posible.

En la tabla a continuación se muestra un resumen de las distintas mutantes de subunidades del dominio CA obtenidas durante este trabajo y sus principales características.

Mutante	Fenotipo
<i>ca1ca2</i>	Letalidad del embrión
<i>ca1ca3</i>	Letalidad del embrión
<i>ca1cal1</i>	Salvaje (observación preliminar)
<i>ca2cal1</i>	Retardo en el crecimiento, retraso en el inicio de la floración
<i>ca2cal2</i>	Retardo en el crecimiento, retraso en el inicio de la floración
<i>ca2ca3</i>	Retardo en el crecimiento, retraso en el inicio de la floración, mayor al presentado por <i>ca2cal1</i> y <i>ca2cal2</i>
<i>ca3cal1</i>	Retraso en el inicio de la floración (observación preliminar)

Capítulo II

Las subunidades CA y la Fotorrespiración

Introducción II

La Fotorrespiración

La carboxilación de una molécula de cinco carbonos, la ribulosa-1,5-bifosfato, mediante la acción de la enzima RubisCO (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) es la vía más importante de asimilación de carbono inorgánico (Ci) y por ende, la principal fuente de carbono orgánico para la mayoría de los seres vivos. En las plantas con metabolismo de tres carbonos (C3), la RubisCO cataliza directamente la incorporación del CO₂ atmosférico formando dos moléculas de tres carbonos, el 3-fosfoglicerato, el cual es posteriormente utilizado para sintetizar las diferentes moléculas orgánicas (Andersson, 2007). Sin embargo, esta enzima posee dos actividades diferentes que comparten el mismo sitio activo; la carboxilación y la oxigenación. La ocurrencia de cada una de estas dos reacciones depende de las concentraciones de CO₂ y O₂ en las proximidades de la enzima (Sage et al., 2011). Especialmente en condiciones ambientales de alta irradiancia, temperatura y/o aridez la concentración interna de CO₂ en las plantas es usualmente baja, debido a que el ingreso del CO₂ atmosférico suele estar restringido por el cierre de los estomas. Bajo estas condiciones, la reacción de oxigenación puede verse favorecida disminuyendo la eficiencia de la fijación de carbono. Como consecuencia de la oxigenación de la ribulosa-1,5-bifosfato, se forman en los cloroplastos una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de 2-fosfoglicolato, en lugar de las dos moléculas de 3-fosfoglicerato formadas durante la carboxilación. El 2-fosfoglicolato representa un inhibidor de la fotosíntesis y debe ser transformado rápidamente en otros compuestos (Eisenhut et al., 2008). Esta detoxificación ocurre principalmente mediante la vía fotorrespiratoria (**Figura 15**). En esta vía, el 2-fosfoglicolato es primero desfosforilado en los cloroplastos, y el glicolato resultante es posteriormente transportado a los peroxisomas donde es oxidado a glioxilato por la acción de la enzima Glicolato Oxidasa (GOX). Esta última reacción está ligada a la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual es detoxificado por catalasas dentro del peroxisoma (Esser et al., 2014). El glioxilato es luego aminado convirtiéndose en glicina mediante la acción de la enzima Glutamato Glioxilato Aminotransferasa (GGAT).

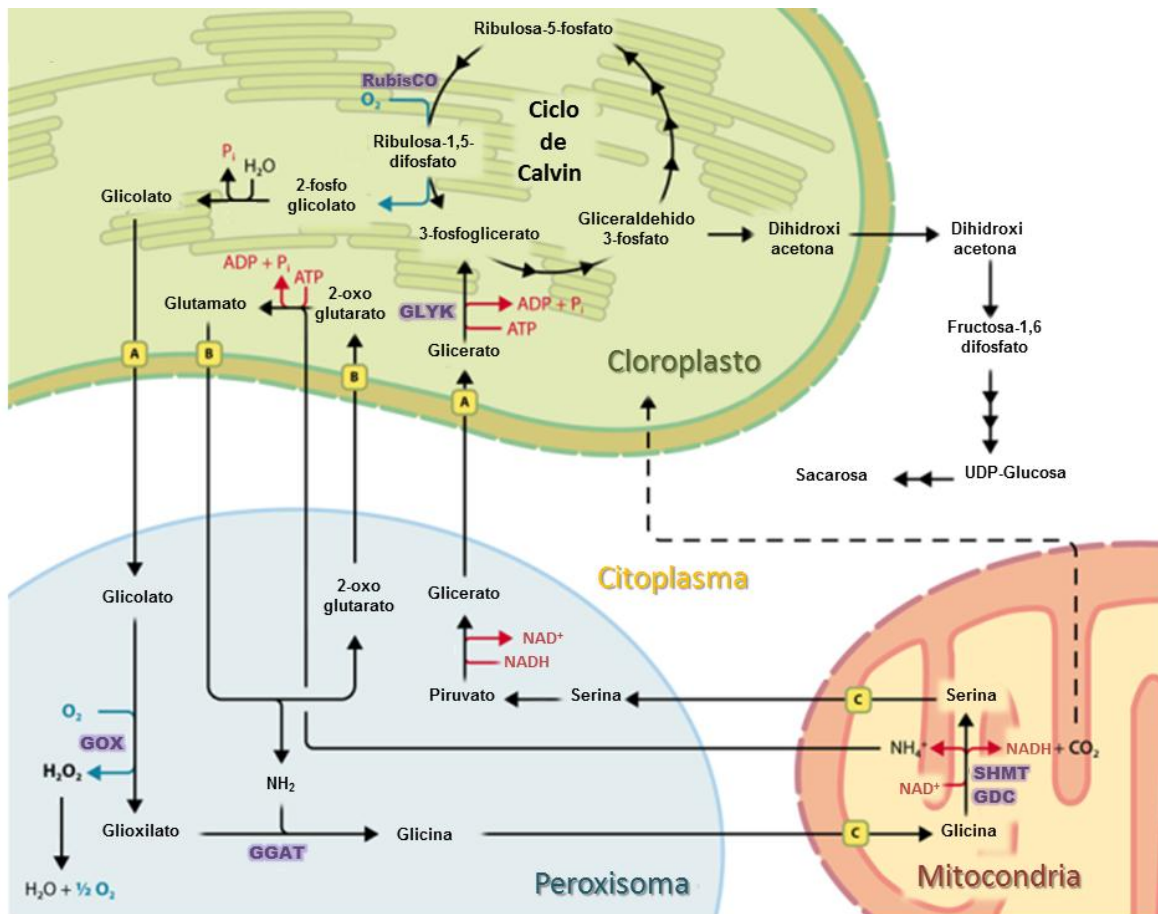


Figura 15. Vía fotorespiratoria.

A partir de la oxigenación de la ribulosa-1,5-bisfosfato, se forman en los cloroplastos 3-fosfoglicerato y 2-fosfoglicolato. Este último es desfosforilado y el glicolato resultante es posteriormente transportado a los peroxisomas donde es oxidado a glioxilato por la acción de la enzima Glicolato Oxidasa (GOX). El glioxilato es luego aminado convirtiéndose en glicina mediante la acción de la enzima Glutamato Glioxilato Aminotransferasa (GGAT). La glicina es subsiguientemente transportada a las mitocondrias, donde es descarboxilada y convertida en serina mediante la acción de las enzimas Glicina Descarboxilasa (GDC) y Serina Hidroximetiltransferasa (SHMT), respectivamente. Estas últimas reacciones producen la liberación de NADH, NH_4^+ y CO_2 . La serina formada en las mitocondrias es transportada nuevamente a los peroxisomas donde es desaminada para formar piruvato, el cual es posteriormente reducido a glicerato. Finalmente, el glicerato es fosforilado por la Glicerato Quinasa (GLYK) en los cloroplastos formando 3-fosfoglicerato que puede ser reincorporado al ciclo de Calvin.

Los cuadrados amarillos indican transportadores de membrana.

La figura fue extraída y modificada de Buchanan et al. (2000).

La glicina es subsiguientemente transportada a las mitocondrias, donde es descarboxilada y convertida en serina mediante la acción de las enzimas Glicina Descarboxilasa (GDC) y Serina Hidroximetiltransferasa (SHMT),

respectivamente (Maurino y Peterhansel, 2010). Estas últimas reacciones están ligadas a la reducción de NAD^+ y a la liberación de NH_4^+ y CO_2 . La serina formada en las mitocondrias es transportada nuevamente a los peroxisomas donde es desaminada para formar hidroxipiruvato, el cual es posteriormente reducido a glicerato. Finalmente, el glicerato es fosforilado por la Glicerato Quinasa (GLYK) en los cloroplastos formando 3-fosfoglicerato que puede ser reincorporado al ciclo de Calvin. Según esto, tres de cuatro átomos de carbono contenidos en dos moléculas de 2-fosfoglicolato son recuperados al metabolismo primario del carbono. Dado que este proceso completo ocurre sólo en presencia de luz y además consume O_2 produciendo la liberación de CO_2 , es conocido como fotorrespiración. Esta ruta metabólica coexiste con la respiración clásica, muchas veces llamada en plantas “respiración oscura”.

La concentración de CO_2 en las proximidades de la enzima RubisCO es un factor de gran importancia para la fijación de carbono que sustenta el crecimiento vegetal y en definitiva la vida en el planeta. Durante la evolución, especialmente en períodos de bajas concentraciones de CO_2 atmosféricas, surgieron independientemente diferentes estrategias bioquímicas y/o anatómicas para sobrellevar condiciones en las cuales la fijación de carbono no se veía favorecida. Estas estrategias son conocidas como Mecanismos de Concentración de Carbono (CCMs) (Zabaleta et al., 2012).

Los Mecanismos de Concentración de Carbono (CCMs)

Los CCMs pueden estar basados en procesos bioquímicos, en el transporte activo de carbono inorgánico a través de membranas o en el aumento localizado de las concentraciones de CO_2 mediante la acidificación de un compartimento celular particular (Giordano et al., 2005). En todos los casos, el rol del CCM es incrementar la concentración de CO_2 en las inmediaciones de la enzima RubisCO para favorecer la fijación de carbono (Moroney y Ynalvez, 2007). Los primeros CCMs descritos en detalle fueron el metabolismo de cuatro carbonos (C_4) y el metabolismo ácido de crasuláceas (CAM) en plantas superiores. Ambas estrategias están basadas en un paso de pre-fijación del

carbono, dado por la hidratación del CO_2 proveniente de la atmósfera externa por una β -CA y la unión del HCO_3^- al fosfoenolpiruvato (PEP) mediante la enzima Fosfoenolpiruvato Carboxilasa (PEPC), la cual no es sensible al oxígeno. Esta pre-fijación del carbono y la fijación final del CO_2 por la RubisCO se encuentran separadas espacialmente, en el metabolismo C4, y temporalmente, en el metabolismo CAM.

En las plantas C4, la carboxilación del PEP tiene lugar en las células del mesófilo de las hojas, donde también se lleva a cabo la etapa lumínica de la fotosíntesis. Esta carboxilación produce un compuesto de cuatro carbonos, el oxalacetato. Este compuesto es posteriormente transformado en malato, el cual puede ser transportado desde las células del mesófilo hacia las células de la vaina, un tipo celular presente en las hojas de las plantas con anatomía Kranz. Dentro de estas células, el malato es convertido a piruvato y el carbono pre-fijado es liberado como CO_2 que puede ser utilizado por la RubisCO. Gracias a este proceso, la concentración de CO_2 en las células de la vaina es aproximadamente diez veces mayor a la normalmente encontrada en la atmósfera. En consecuencia, el proceso de fotorrespiración se ve muy disminuido (Sage et al., 2011).

En aquellas plantas con metabolismo CAM, que suelen crecer en ambientes secos y de altas temperaturas, la carboxilación del PEP ocurre durante la noche, cuando los estomas se encuentran abiertos y permiten el intercambio gaseoso. El oxalacetato producido es transformado a malato, el cual puede ser almacenado en la vacuola. Durante el día, cuando los estomas están cerrados para evitar la pérdida de agua, el malato es descarboxilado liberando el CO_2 que luego es fijado por la RubisCO en el ciclo de Calvin (Klavsén et al., 2011).

Existen plantas que poseen un metabolismo intermedio que presentan características de los metabolismos C3 y C4. Algunas de estas plantas son capaces de restringir la descarboxilación de la glicina proveniente de la fotorrespiración a las células de la vaina, concentrando el CO_2 en las proximidades de la RubisCO e incrementando así la eficiencia fotosintética (Vogan et al., 2007). Si bien en las plantas C4 la fotorrespiración se encuentra

muy reducida en comparación con las plantas C3, existen evidencias de que la vía fotorrespiratoria constituye un proceso metabólico esencial. Las mutantes de maíz, una planta C4, afectadas en la enzima GOX no sobreviven en atmósfera normal pero pueden ser completamente rescatadas si son cultivadas en altas concentraciones de CO₂. Estas mutantes acumulan rápidamente glicolato cuando son transferidas a atmósfera normal, y presentan un gran decaimiento en la eficiencia de la asimilación de carbono neta. Esto indicaría que una vía fotorrespiratoria funcional es necesaria para el desarrollo de las plántulas de maíz, probablemente para la detoxificación del glicolato (Zelitch et al., 2008).

En el alga eucariota *Chlamydomonas* spp. existe un CCM similar. Este mecanismo permite la captación del CO₂ ambiental y la concentración de HCO₃⁻ en el cloroplasto con la participación de anhidrasas carbónicas en el espacio periplásmico y el citoplasma, y de transportadores de carbono inorgánico en las membranas cloroplásticas. La enzima RubisCO se encuentra localizada en los pirenoides, unos micro compartimentos en los cloroplastos donde ocurre la fijación de carbono (Moroney y Ynalvez, 2007). Una α -CA se encuentra ubicada en el lumen de los tilacoides, especialmente en aquellos túbulos que penetran en los pirenoides. Esta enzima tiene un rol esencial en la deshidratación del HCO₃⁻ acumulado y la liberación de CO₂ en el pirenoide (Mitra, 2004). La expresión de varios de los componentes de este CCM es regulada por los cambios en las concentraciones de CO₂ ambiental, aumentando significativamente las cantidades de mensajero bajo condiciones de CO₂ limitantes donde el CCM es funcional. Adicionalmente, β -CAs mitocondriales de *Chlamydomonas* exhiben un patrón de expresión que se correlaciona con la expresión de los componentes del CCM (Moroney y Ynalvez, 2007). Un posible rol postulado para estas CAs mitocondriales es la conversión del CO₂ generado en la respiración y la fotorrespiración a HCO₃⁻. Esto permitiría recapturar el carbono y transportarlo mediante reacciones anapleróticas nuevamente hacia el cloroplasto. Allí el carbono sería fijado y se limitaría la pérdida de CO₂ desde la mitocondria (Raven, 2001). Este rol propuesto requiere la presencia de un transportador de HCO₃⁻ en la membrana interna de las mitocondrias, el cual aún no ha podido ser identificado. La

presencia de este transportador permitiría un flujo controlado de carbono hacia el citosol.

En cianobacterias, la enzima RubisCO presenta una menor afinidad por el CO_2 que la enzima presente en plantas C3, característica que es compensada por un CCM eficiente que aumenta las concentraciones de CO_2 en las cercanías de la enzima. En estos organismos, la RubisCO se encuentra localizada en un compartimento proteico específico llamado carboxisoma (Price, 2011). Este compartimento permite el almacenamiento de carbono inorgánico en forma de HCO_3^- para su posterior transformación en CO_2 con el fin de maximizar la actividad de la RubisCO (Long et al., 2007). La deshidratación del HCO_3^- está catalizada por una β -CA específica del carboxisoma, la proteína CcaA, la cual convierte eficientemente el HCO_3^- en CO_2 para que pueda ser fijado mediante el ciclo de Calvin (Cot et al., 2007). Los carboxisomas están compuestos por varias proteínas de cubierta con diferentes funciones. Una de estas proteínas es la subunidad CcmM, la cual posee un extremo N-terminal con alta similitud a γ -CAs y un extremo C-terminal que incluye repeticiones similares a la subunidad pequeña de la RubisCO (Ludwig et al., 2000). CcmM es un componente importante del complejo multiproteico para la deshidratación del HCO_3^- , junto con CcaA entre otras. Además, permite la interacción de este complejo con otras proteínas de la cubierta del carboxisoma. Sin embargo, CcmM es inactiva como anhidrasa carbónica. Una de las funciones propuestas para esta proteína es la de transportar HCO_3^- desde el citoplasma al centro del carboxisoma, donde posteriormente es convertido a CO_2 por CcaA (Cot et al., 2007). Mutantes con problemas en alguno de los componentes del CCM, como por ejemplo en las proteínas de la cubierta del carboxisoma o en transportadores de HCO_3^- , muestran una afinidad fotosintética muy baja por el carbono inorgánico externo. Así, estas mutantes poseen un fenotipo que requiere de altas concentraciones de CO_2 , mostrando la importancia del CCM para la supervivencia de las cianobacterias bajo las condiciones atmosféricas actuales (Badger, 2003). En cianobacterias como *Thermosynechococcus elongatus* que carecen de la proteína CcaA, estudios realizados con la proteína CcmM completa revelaron que ésta posee actividad anhidrasa carbónica, permitiendo el funcionamiento

del carboxisoma en ausencia de CcaA. La pérdida de la organización trimérica de la CcmM de esta cianobacteria en condiciones reductoras la vuelve inactiva, mientras que los agentes oxidantes son capaces de activarla (Peña et al., 2010). En otras mutantes, a pesar de la presencia de un CCM eficiente, la carencia del metabolismo del 2-fosfoglicolato produce también un fenotipo que requiere de altas concentraciones de CO₂. Esto sugiere que la fotosíntesis necesita tanto de un CCM funcional como de un sistema detoxificador de glicolato completamente activo (Eisenhut et al., 2008). Así, ambos serían cruciales para la viabilidad de los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica y crecen bajo atmósferas con concentraciones de CO₂ normales.

El Dominio CA y un Mecanismo de Reciclado de Carbono basal

Las subunidades que componen el dominio CA presente en el complejo I mitocondrial de plantas y otros organismos podrían haber evolucionado a partir de γ -CAs ancestrales de α -proteobacterias durante la adaptación del primer endosimbionte y su transformación en mitocondria. Si bien se creyó originalmente que las subunidades CA eran componentes específicos del complejo I de organismos fotosintéticos (Heazlewood et al., 2003; Parisi et al., 2004); investigaciones posteriores mostraron la existencia de proteínas homólogas en *Dictyostelium spp.* y *Acanthamoeba spp.* entre otros linajes eucariotas (Gawryluk y Gray, 2010). La presencia de homólogos de γ -CAs en eucariotas ancestrales aplastídicos hace pensar que el antiguo rol de estas proteínas no estaba relacionado a la fotosíntesis. Sin embargo, la mayoría de las proteínas homólogas a γ -CAs de eucariotas no pertenecientes al grupo de las plantas, no poseen conservados los residuos importantes para la coordinación de un metal y la unión de carbono inorgánico, como sí lo hacen la mayoría de las γ -CAs de plantas. Consecuentemente, podrían existir funciones diferentes para las subunidades CA de plantas y las proteínas homólogas presentes en otros linajes de eucariotas (Gawryluk y Gray, 2010). Las γ -CAs mitocondriales han sido descritas en dicotiledóneas con metabolismo C3 (*Arabidopsis thaliana*), monocotiledóneas con metabolismo C3 (arroz),

monocotiledóneas con metabolismo C4 (maíz), así como también en algas verdes con metabolismo C3 y CCM (*Chlamydomonas*). Sorprendentemente, ningún homólogo a γ -CAs ha sido encontrado en *Ostreococcus tauri*, el alga verde eucariota de metabolismo tipo C4 más pequeña conocida (Derelle et al., 2006). Sin embargo, la clasificación de este organismo en el reino *Plantae* está actualmente en discusión (Hindle et al., 2014).

El descubrimiento de γ -CAs mitocondriales en casi todos los organismos eucariotas fotosintéticos analizados hasta el momento pero no en animales ni en hongos da lugar a hipotetizar sobre el posible rol fisiológico del dominio CA. Como se mencionó anteriormente, la propuesta realizada por Raven (2001) requiere de un transportador de HCO_3^- presente en la membrana interna mitocondrial de *Chlamydomonas* spp. involucrado en la recuperación del carbono liberado a partir de las reacciones de descarboxilación mitocondriales. De manera similar, fue propuesto que el dominio CA formaría parte de un sistema de exportación de HCO_3^- que permitiría transferir eficientemente carbono inorgánico desde las mitocondrias a los cloroplastos. Este dominio estaría involucrado en la formación y/o en el transporte de HCO_3^- a través de la membrana mitocondrial interna. (Braun y Zabaleta, 2007; Zabaleta et al. 2012).

Especialmente en condiciones de alta irradiancia o temperatura, la concentración de CO_2 en los cloroplastos suele ser baja, debido a las reacciones de carboxilación catalizadas por la RubisCO y a que el ingreso del CO_2 atmosférico puede estar restringido por el cierre de los estomas durante el día. Al mismo tiempo, las mitocondrias producen un exceso de CO_2 a partir de las reacciones de descarboxilación del ciclo de Krebs y a partir de la transformación de glicina a serina en la vía fotorrespiratoria. Mientras que en animales y hongos el CO_2 es mayormente un producto de desecho, en plantas constituye el sustrato principal para la fijación de carbono fotosintética y muchas veces puede ser un factor limitante del crecimiento vegetal. Parte del CO_2 mitocondrial puede ser reciclado para su fijación por la RubisCO mediante su difusión hacia los cloroplastos. Adicionalmente, se propone la existencia de este sistema de transporte de carbono que implicaría la exportación de HCO_3^- asociada al complejo I mitocondrial. El HCO_3^- podría ser luego transferido del citosol a los cloroplastos a través de otro transportador o mediante reacciones

metabólicas del estilo del metabolismo C4. En los cloroplastos, β -CAs se encargan eficientemente de la conversión del HCO_3^- en CO_2 en las inmediaciones de la enzima RubisCO para favorecer la fijación. Este sistema constituiría un Mecanismo de Reciclado de Carbono basal (bCRM), el cual se encuentra esquematizado en la **Figura 16**. Según esto, se propuso que el dominio CA del complejo I podría funcionar de manera similar a la proteína CcmM del carboxisoma de cianobacterias (Zabaleta et al. 2012).

Existen numerosas evidencias experimentales que soportan la propuesta de que existiría un bCRM en todos los organismos eucariotas fotosintéticos (Zabaleta et al. 2012). A pesar de que la mayoría de los aminoácidos relevantes para la actividad CA en las γ -CAs mitocondriales del complejo I se encuentran presentes y correctamente posicionados en el supuesto sitio activo de forma similar a la proteína Cam (**ver Introducción General**), la actividad enzimática de las subunidades CA mitocondriales de ninguna planta o alga verde eucariota ha podido ser detectada (Parisi et al., 2004). Sin embargo, la proteína de cianobacterias CcmM así como los homotrímeros de la proteína CA2 de *Arabidopsis* mostraron ser capaces de unir carbono inorgánico a tasas comparables (Cot et al., 2007; Martin et al., 2009). Los aminoácidos importantes para la unión de carbono inorgánico también se encuentran conservados (Parisi et al., 2004). Esto apoya la propuesta de que el dominio CA estaría involucrado en el transporte de HCO_3^- a través de la membrana mitocondrial interna. Este compuesto se uniría a los residuos conservados junto con un ión metálico. Estudios del complejo I de *Arabidopsis thaliana* realizados utilizando microscopía electrónica de partícula única revelaron la presencia de una pequeña cavidad ubicada en el brazo de membrana en posición opuesta al lugar de anclaje del dominio CA. Posiblemente esto indique la existencia de una estructura semejante a un poro (Dudkina et al., 2005). Adicionalmente, experimentos realizados con proteasas revelaron que la proteína CA2 atraviesa el brazo de membrana y su extremo C-terminal sobresale hacia el espacio intermembrana (Sunderhaus et al., 2006). Este extremo C-terminal podría conformar un canal anfipático que permitiría el pasaje del HCO_3^- asociado a la transferencia de protones, de manera similar a lo propuesto para ciertas proteínas de cianobacterias (Maeda et al., 2002).

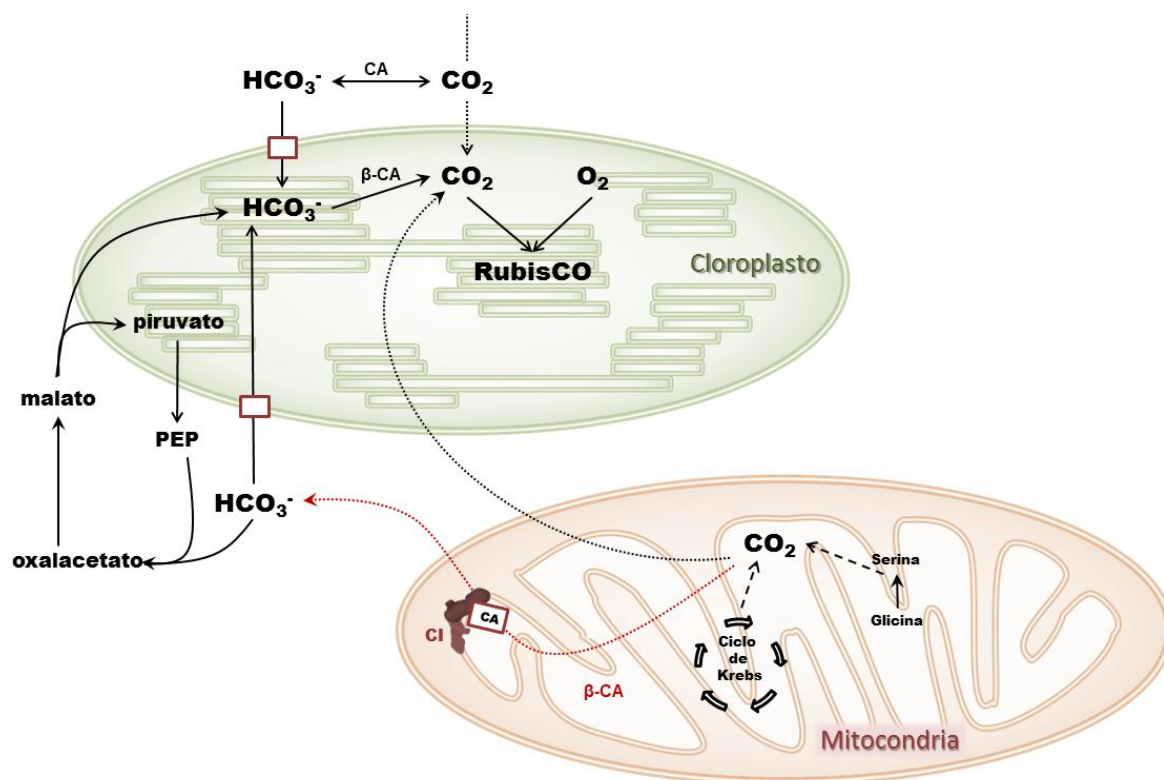


Figura 16. Mecanismo de Reciclado de Carbono basal (bCRM).

Se muestra un esquema del bCRM propuesto. En condiciones de alta irradiancia o temperatura, la concentración de CO_2 en los cloroplastos suele ser baja, debido a las reacciones de carboxilación catalizadas por la RubisCO y a que el ingreso del CO_2 atmosférico puede estar restringido por el cierre de los estomas durante el día. Al mismo tiempo, las mitocondrias producen un exceso de CO_2 a partir de las reacciones de descarboxilación del ciclo de Krebs y a partir de la transformación de glicina a serina en la vía fotorrespiratoria. Parte del CO_2 mitocondrial puede ser reciclado para su fijación por la RubisCO mediante su difusión hacia los cloroplastos (línea punteada negra). Adicionalmente, se propone la exportación de HCO_3^- asociada al dominio CA del complejo I (CI) mitocondrial (línea punteada roja). Una $\beta\text{-CA}$ ubicada en la matriz mitocondrial podría participar en la formación de HCO_3^- . El HCO_3^- podría ser luego transferido del citosol a los cloroplastos a través de otros transportadores (rectángulos) o mediante reacciones metabólicas del estilo del metabolismo C4. En los cloroplastos, $\beta\text{-CA}$ s se encargan eficientemente de la conversión del HCO_3^- en CO_2 en las inmediaciones de la enzima RubisCO para favorecer la fijación. Figura modificada a partir de Zabaleta et al. (2012).

Datos obtenidos a partir de análisis de Microarray en *Arabidopsis thaliana* indicaron que el gen que codifica para la proteína CA2 se encuentra regulado negativamente cuando las plantas son cultivadas bajo atmósferas con altas concentraciones de CO_2 (Perales et al., 2005). Este dato apoya la idea de que las proteínas CA tendrían un rol asociado a la fotorrespiración (Braun y Zabaleta, 2007; Zabaleta et al. 2012). Adicionalmente, la acetazolamida (EZA),

un inhibidor fuerte de γ -CAs, causa una disminución en la liberación de O_2 fotosintético en protoplastos pero no en cloroplastos aislados. Este fenómeno logró ser observado sólo a bajas concentraciones de CO_2 , con efectos casi nulos a altas concentraciones de CO_2 (Riazunnisa et al., 2006). Estos resultados sugieren que CAs en las células pero externas a los cloroplastos estarían involucradas en el reciclado del CO_2 bajo condiciones fotorrespiratorias.

La forma en que el HCO_3^- alcanza los cloroplastos aún permanece desconocida, ya que todavía no se ha identificado en plantas superiores un transportador equivalente al encontrado en cianobacterias. Una posibilidad es que el HCO_3^- exportado por las mitocondrias reaccione con el PEP mediante la acción de una PEPC citoplasmática. El oxalacetato resultante puede ser transformado en malato y luego transportado al interior de los cloroplastos como ocurre en el metabolismo C4 (**Figura 16**). Todas las enzimas necesarias se encuentran presentes en *Arabidopsis*; una PEPC citosólica (Sánchez et al., 2005), una malato deshidrogenasa citosólica (E.C.1.1.1.83), un transportador antiporter malato/oxalacetato, una translocasa de ácido dicarboxílico de la familia DiT (Schneidereit et al., 2006) y una enzima málica dependiente de NADP cloroplástica (Gerrard Wheeler et al., 2008). Las mutantes de *Arabidopsis* y tabaco afectadas en translocasas de ácido dicarboxílico de la familia DiT, ambas presentan fenotipos fotorrespiratorios (Renné et al., 2003). Esto apoya la idea de que los transportadores de malato y oxalacetato son importantes durante la fotorrespiración, posiblemente por su participación en el reciclado del CO_2 mitocondrial. Mutantes de *Nicotiana sylvestris* que poseen una drástica reducción en el contenido de complejo I ven afectada su fotosíntesis bajo condiciones atmosféricas normales (fotorrespiratorias). Estas mutantes presentan una disminución de alrededor de un 20-30% en su tasa fotosintética bajo los niveles de CO_2 atmosféricos actuales. Esta inhibición de la fotosíntesis se reduce al cultivar las plantas en atmósferas con altas concentraciones de CO_2 o bajas concentraciones de O_2 (Dutilleul et al., 2003). Según estos resultados, se interpretó que se requiere de un complejo I funcional para establecer un correcto balance redox subcelular (Noctor et al., 2003; Bauwe et al., 2010). Sin embargo, la importancia del complejo I para

sostener tasas fotosintéticas normales puede ser explicada también por su posible rol en el reciclado del CO₂ mitocondrial (Zabaleta et al., 2012).

En resumen, la existencia de un bCRM para una reutilización eficiente del CO₂ mitocondrial especialmente importante en condiciones fotorrespiratorias es apoyado por varias evidencias experimentales. Según esto, y a partir del retardo en el crecimiento observado en algunas de las dobles mutantes presentadas en el Capítulo I de este trabajo, los **objetivos particulares** del **Capítulo II** planteados son:

- Analizar bajo atmósferas controladas el fenotipo de aquellas dobles mutantes que presentaron un retardo en el crecimiento.
- Realizar el estudio de parámetros fisiológicos, bioquímicos y genéticos que contribuyan a esclarecer el vínculo del fenotipo observado en estas dobles mutantes al proceso fotorrespiratorio.

Resultados II

El fenotipo de las mutantes dobles *ca2cal2* y *ca2cal1* puede ser rescatado mediante el cultivo en atmósferas con altas concentraciones de CO₂

Según la hipótesis planteada en este trabajo, el dominio CA del complejo I mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* estaría involucrado en el reciclado de CO₂ durante la fotorrespiración permitiendo así el mantenimiento de una tasa normal de fijación de carbono. Bajo esta hipótesis y a partir del retraso en el crecimiento observado en las plantas mutantes *ca2cal1*, *ca2cal2* y *ca2ca3* cultivadas en atmósferas normales, se decidió evaluar los fenotipos de estas dobles mutantes bajo condiciones no fotorrespiratorias. Para esto, plantas mutantes y salvajes fueron crecidas (**ver Materiales y Métodos, sección 2.1.1.**) durante cuatro semanas con un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad bajo una atmósfera controlada con alta concentración de CO₂ (2000 ppm CO₂), la cual reduce notoriamente la fotorrespiración (Maier et al., 2012). La diferencia de tamaño observada en las mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2* con respecto a las plantas salvajes crecidas bajo atmósferas normales logró ser completamente rescatada cuando las plantas fueron cultivadas bajo condiciones no fotorrespiratorias. En la **Figura 17 (a)** se muestra el tamaño alcanzado por plantas salvajes, mutantes simples y mutantes dobles luego de cuatro semanas de crecimiento. No se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las plantas mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2* con respecto a las plantas salvajes, indicando que el fenotipo de estas dobles mutantes puede ser rescatado mediante su cultivo en atmósferas con altas concentraciones de CO₂. Sin embargo, las mutantes dobles *ca2ca3* mostraron un tamaño menor con respecto a las plantas salvajes y a las mutantes simples y dobles *ca2cal1* y *ca2cal2*, a pesar de haber tenido un mayor crecimiento al ser cultivadas en condiciones no fotorrespiratorias con respecto al crecimiento observado bajo atmósferas normales. Esto indica que existiría un rescate parcial del fenotipo observado en la mutante *ca2ca3* cuando es cultivada en atmósferas con altas concentraciones de CO₂. Estos resultados se muestran también en la medición del radio máximo de la roseta (**Figura 17 (b)**).

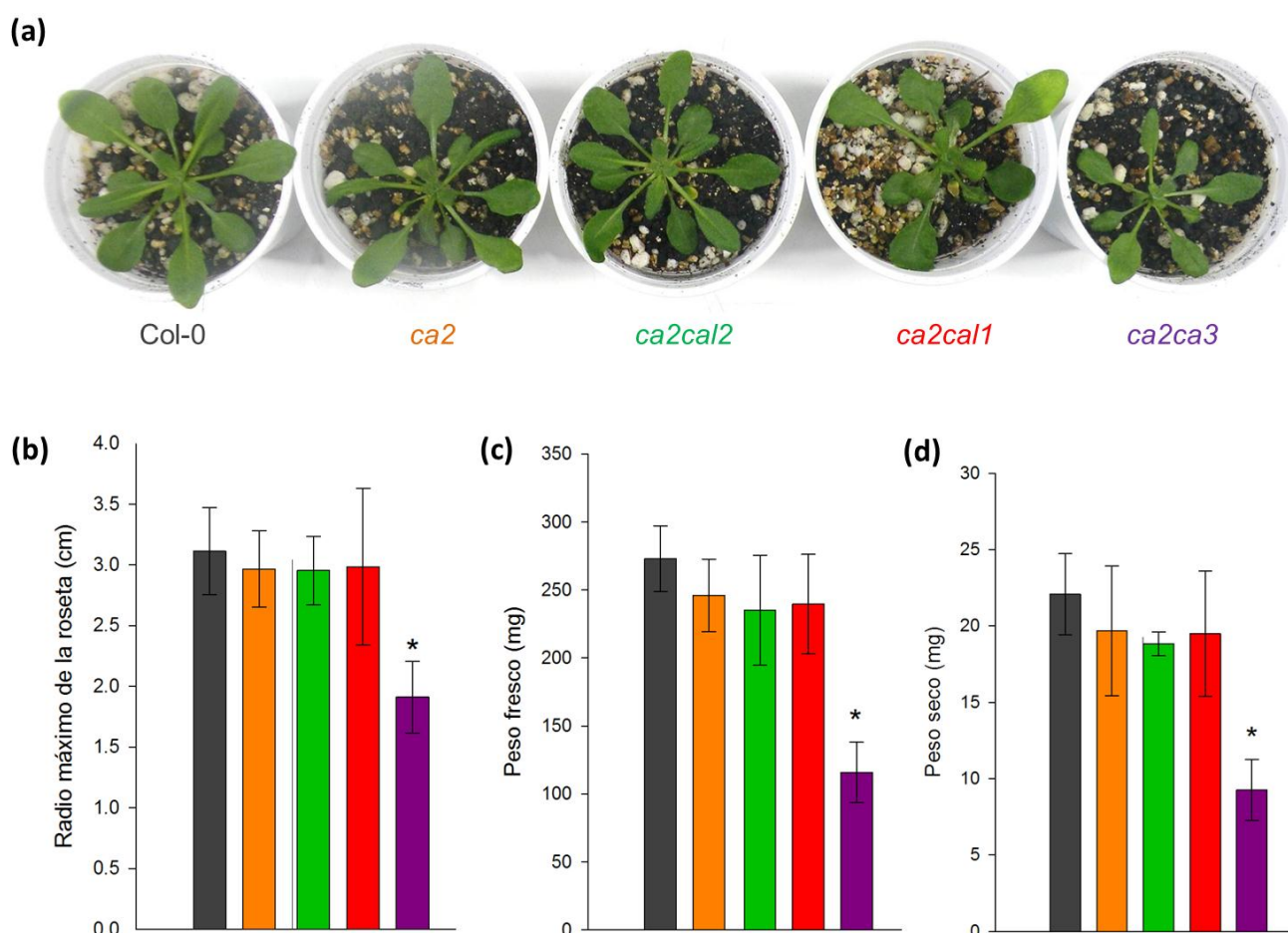


Figura 17. El fenotipo de mutantes afectadas en dos subunidades del dominio CA puede ser rescatado mediante el cultivo en atmósferas con altas concentraciones de CO₂. Plantas salvajes y mutantes fueron crecidas bajo atmósferas con altas concentraciones de CO₂ (2000 ppm CO₂) y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad según se describe en **Materiales y Métodos, sección 2.1.1**. Transcurridas cuatro semanas fueron realizadas las mediciones y tomadas las fotografías. **(a)** Fenotipo de plantas mutantes. **(b)** Radio máximo de la roseta (medición de la hoja más larga de la roseta). **(c)** Peso fresco de rosetas enteras. **(d)** El peso seco fue obtenido secando rosetas enteras a 100°C por 24 horas. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las plantas salvajes ($P \leq 0.05$).

Los datos de peso fresco y peso seco (**Figura 17 (c) y (d)**) reflejan lo observado ya que sólo las dobles mutantes *ca2ca3* presentaron una masa fresca y seca significativamente menor con respecto a las plantas salvajes. El fenotipo observado que implica que las dobles mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2* presenten un retardo en el crecimiento en atmósferas ambientales y un comportamiento igual a las plantas salvajes en atmósferas con alta

concentración de CO₂, fue previamente descrito y clasificado como un fenotipo fotorrespiratorio de clase III por Timm y Bauwe (2012). Este resultado aporta indicios de que el dominio CA tendría un rol relacionado con la fotorrespiración.

Las dobles mutantes muestran un consumo de O₂ similar a la mutante simple *ca2*

Como fue mencionado previamente, se conoce que la mutante simple *ca2* posee una reducción de alrededor del 80% en el contenido de complejo I (Perales et al., 2005; Meyer et al., 2011; Li et al., 2013) y que su consumo de oxígeno representa aproximadamente el 50% del consumo observado en plantas salvajes, tanto en hojas como en suspensiones celulares (Perales et al., 2005; Villareal et al., 2009). Estos niveles bajos de consumo de oxígeno son similares a aquéllos obtenidos cuando plantas salvajes son previamente tratadas con el insecticida rotenona, inhibiendo el complejo I. Esto lleva a la conclusión de que en la mutante *ca2*, la principal ruta de entrada de electrones a la cadena respiratoria debe darse a través del complejo II y/o a través de las NAD(P)H deshidrogenasas alternativas (Perales et al., 2005, Villarreal et al., 2009). Sin embargo, estas características presentadas por la mutante *ca2* no se traducen en ningún fenotipo observable en la planta completa.

Para determinar si problemas en la respiración mitocondrial podrían estar causando el fenotipo observado en las dobles mutantes *ca2ca1*, *ca2ca2* y *ca2ca3*, hojas de dichas plantas crecidas en atmósferas normales fueron utilizadas para medir el consumo de oxígeno según el procedimiento descrito en **Materiales y Métodos, sección 9**. Como se puede observar en la **Figura 18**, todas las mutantes dobles analizadas presentaron una reducción en el consumo de oxígeno de aproximadamente un 50% con respecto a plantas salvajes, igual a lo observado en la mutante simple *ca2*. Así, la reducción en el contenido de la proteína CAL2 o la ausencia de las proteínas CAL1 o CA3 junto con la falta de la proteína CA2, no suman un efecto sobre la respiración adicional al efecto observado sólo con la ausencia de CA2. Dado que sólo las

dobles mutantes poseen fenotipo alterado, este resultado indicaría que el retardo en el crecimiento observado en las dobles mutantes no puede ser atribuido a una respiración defectuosa.

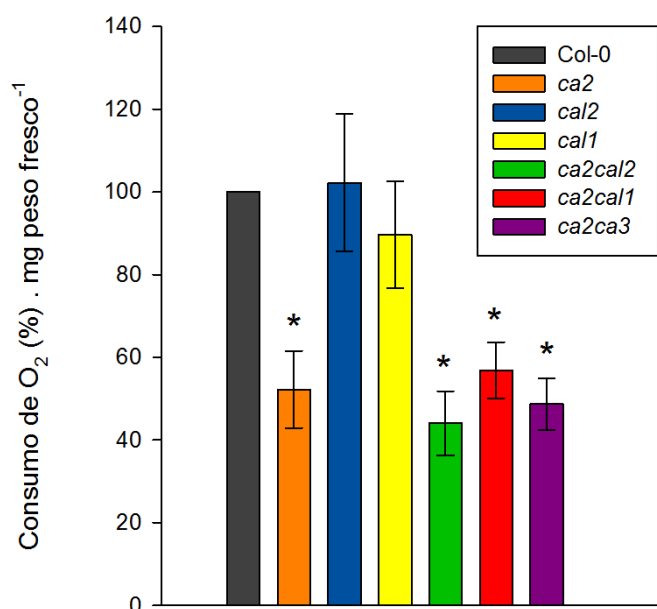


Figura 18. Las dobles mutantes muestran un consumo de oxígeno similar a la mutante simple *ca2*. Plantas salvajes y mutantes fueron crecidas bajo condiciones ambientales normales durante cuatro semanas. Se utilizaron 200 mg de hojas para realizar cada medición del consumo de O₂ según se describe en **Materiales y Métodos, sección 9**. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las plantas salvajes ($P \leq 0.001$).

Los niveles de complejo I en la mutante doble *ca2ca1/2* y la mutante simple *ca2* son similares

Tanto las mutantes dobles *ca2ca1/2*, *ca2ca2* y *ca2ca3* como la mutante simple *ca2*, son mutantes nulas para el gen *CA2* (ver **Materiales y Métodos, sección 2.1**), lo que implica una reducción en el ensamblaje del Complejo I con respecto a plantas salvajes. Se estima que esta reducción sería aproximadamente de un 80 % y es también acompañada por una disminución en los niveles del supercomplejo I + III₂. (Perales et al., 2005, Meyer et al., 2011). Con el objetivo de determinar si en las mutantes dobles la falta de otra subunidad CA sumada a la ausencia de la proteína CA2 produce algún efecto adicional sobre el contenido de complejo I, se analizaron los niveles y la actividad del complejo I. Para esto, se establecieron callos y cultivos celulares salvajes y mutantes (ver **Materiales y Métodos, sección 2.3.**), que fueron luego utilizados para realizar los aislamientos de mitocondrias según se

describe en **Materiales y Métodos, sección 3.4**. Los complejos proteicos mitocondriales fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos de una dimensión (1D BN-PAGE) (**ver Introducción General, Figura 4; Materiales y Métodos, sección 7.2.2**). Los niveles de complejo I observados en la doble mutante *ca2ca12* resultaron ser no significativamente diferentes con respecto a aquéllos encontrados en la mutante simple *ca2* (**Figura 19**). Esto corrobora la reducción de aproximadamente un 80% en el contenido de Complejo I con respecto a las mitocondrias salvajes, atribuible a la ausencia de la proteína CA2.

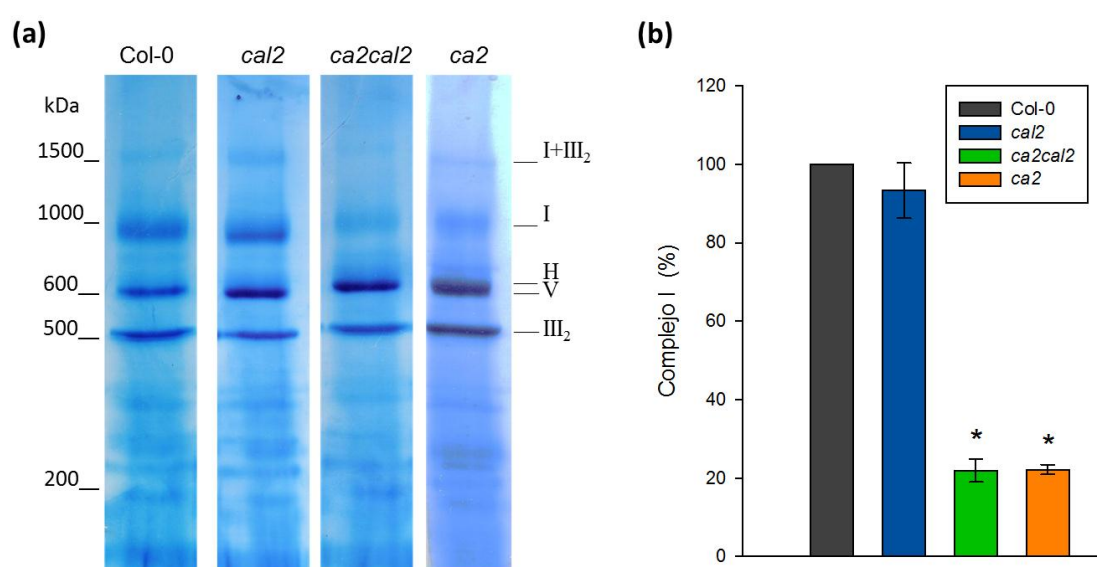


Figura 19. La mutante doble *ca2ca12* y la mutante simple *ca2* contienen niveles de complejo I similares.

Se aislaron mitocondrias a partir de cultivos celulares salvajes y mutantes y los complejos proteicos mitocondriales fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida nativos de una dimensión (1D BN-PAGE). **(a)** Geles teñidos por Coomassie-Blue coloidal. Se indica la identidad de los diferentes complejos proteicos. I+III₂: supercomplejo formado por el complejo I y el complejo III en forma dimérica. I: complejo I. H: complejo HSP60. V: complejo ATP sintasa. III₂: complejo III dimérico. **(b)** Cuantificación de los niveles de complejo I a partir de geles 1D BN-PAGE teñidos por Coomassie-Blue utilizando el programa Image J.

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a Col-0 ($P \leq 0.001$).

Por otra parte, se utilizó una tinción que evidencia la actividad NADH deshidrogenasa para evaluar si el complejo I remanente en las dobles mutantes se encuentra activo (**ver Materiales y Métodos, sección 7.3.3**). En

la **Figura 20** se puede observar que el complejo I de la mutante doble *ca2ca12* presenta actividad así como el complejo I de la mutante simple *ca2*. Ambas mutantes presentaron niveles de actividad del complejo I inferiores a los niveles presentados por el complejo I de mitocondrias salvajes dado el menor contenido de dicho complejo en las mutantes. Esto indicaría que el complejo I remanente sería igualmente activo en la mutante doble *ca2ca12* y en la mutante simple *ca2*. Así, la falta de otra subunidad CA sumada a la ausencia de la proteína CA2 en las dobles mutantes no generaría un efecto sobre el contenido de complejo I o su actividad adicional al efecto ya observado en la mutante simple *ca2*. Según esto, el fenotipo observado sólo en las mutantes dobles no podría ser atribuido a un menor contenido de complejo I o a partículas de complejo I con menor actividad.

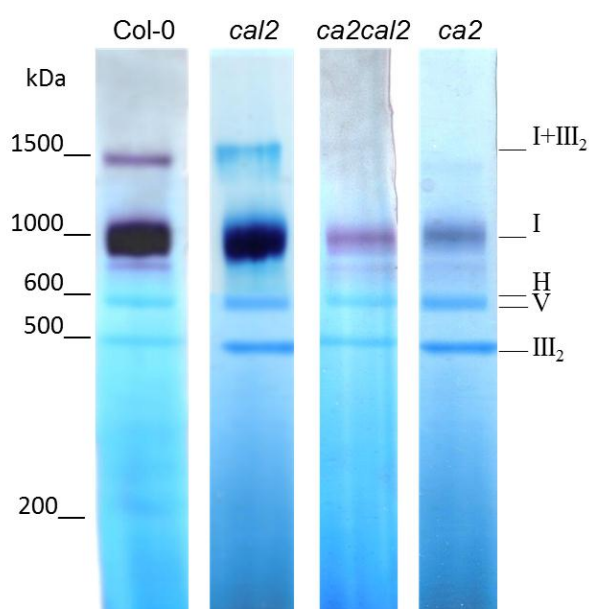


Figura 20. La actividad del complejo I de la mutante doble *ca2ca12* y la mutante simple *ca2* es similar.

Se aislaron mitocondrias a partir de cultivos celulares salvajes y mutantes. Los complejos proteicos mitocondriales fueron separados mediante geles 1D BN-PAGE. Se utilizó una tinción que evidencia la actividad NADH deshidrogenasa. Se indica la identidad de los diferentes complejos proteicos. I+III₂: supercomplejo formado por el complejo I y el complejo III en forma dimérica. I: complejo I. H: complejo HSP60. V: complejo ATP sintasa. III₂: complejo III dimérico.

Para seguir profundizando en esto, se decidió evaluar si el proceso de reciclado de dinucleótidos de pirimidinas se encuentra afectado por la falta de subunidades CA, analizando la relación NADH/NAD⁺ en plantas mutantes y salvajes. Para esto se utilizaron extractos de hojas completas y mitocondrias aisladas. Como puede verse en la **Figura 21**, la relación NADH/NAD⁺ resultó ser menor en las plantas salvajes que en cualquiera de las mutantes evaluadas. Este resultado es consistente con el hecho de que todas las mutantes que poseen niveles reducidos de complejo I oxidan menos NADH. No

se encontraron diferencias significativas entre las mutantes dobles y la mutante *ca2*, lo que indicaría que cantidades similares de complejo I estarían contribuyendo de igual manera al reciclado de NADH.

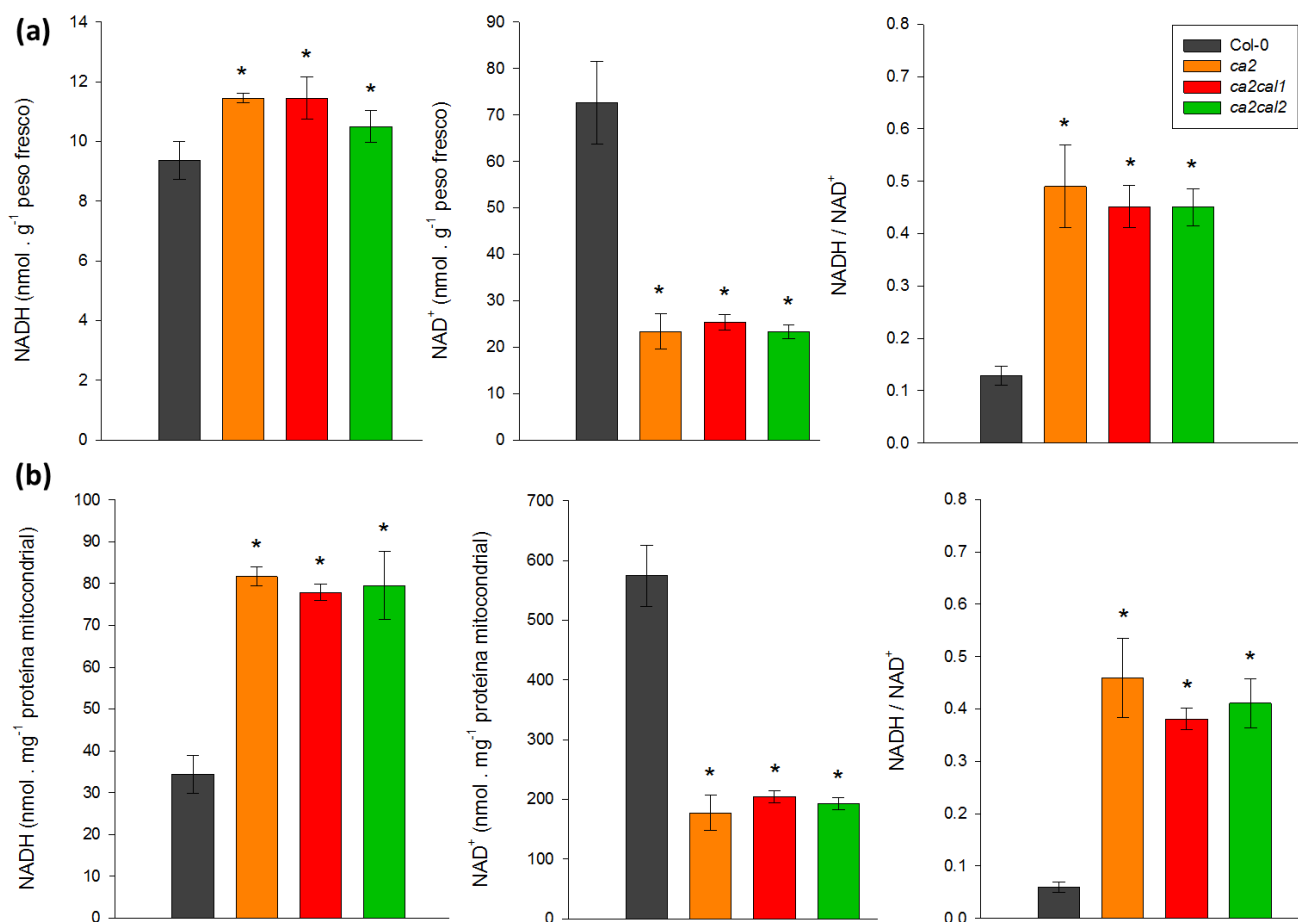


Figura 21. Efectos de la falta de subunidades CA sobre la relación NADH/NAD⁺.

Se evaluó el contenido de NADH y NAD⁺ en hojas y mitocondrias de plantas salvajes y mutantes.

(a) Hojas enteras (500 mg) o **(b)** mitocondrias aisladas fueron sometidas a extracciones alcalina (NADH) o ácida (NAD⁺) y se determinó el contenido de dinucleótidos de pirimidinas.

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a Col-0 (P ≤ 0.001).

Todos estos resultados, tomados en conjunto con los resultados acerca del consumo de oxígeno, demuestran que ni problemas en la respiración ni un contenido diferencial de NADH podrían ser las causas del retardo en el crecimiento presentado por las dobles mutantes en condiciones fotorrespiratorias.

La doble mutante *ca2cal2* muestra una asimilación de carbono reducida

Según la hipótesis planteada en este trabajo de que el dominio CA estaría involucrado en el reciclado de CO_2 durante la fotorrespiración y luego de los resultados expuestos anteriormente, el siguiente objetivo fue evaluar si la falta de dos subunidades CA en las mutantes dobles tiene efecto sobre la fotosíntesis. Así, se decidió analizar la tasa de asimilación de carbono en plantas mutantes en comparación con plantas salvajes. Para esto se realizaron experimentos de intercambio de gases bajo atmósferas normales según se describe en **Materiales y Métodos, sección 10**. La tasa de asimilación de carbono normal (con una densidad de flujo de fotones de $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ y 380 ppm CO_2) esperada en plantas salvajes es de aproximadamente $12 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y fue considerada como 100%. En la **Figura 22 (a)** se puede observar que las mutantes simples *ca2* y *cal2* no presentaron diferencias significativas en la tasa de asimilación de carbono con respecto a las plantas salvajes. Este resultado indicaría que ni la reducción en el contenido de la proteína CAL2 ni la falta de la proteína CA2 afecta la fotosíntesis neta. Sin embargo, bajo atmósfera ambiental, la mutante doble *ca2cal2* mostró una reducción en la tasa de asimilación de carbono de aproximadamente un 40% con respecto a la observada en las plantas salvajes y en las mutantes simples.

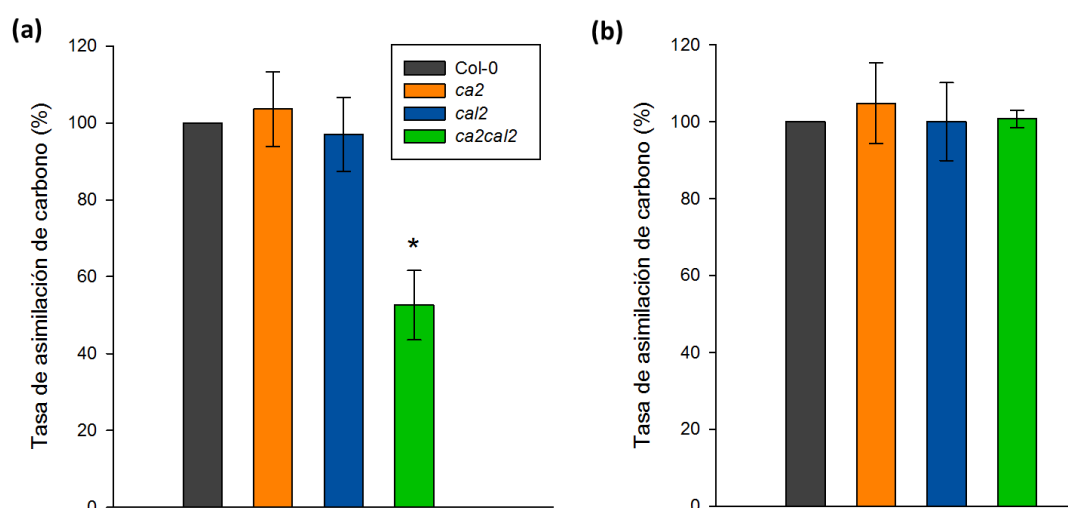


Figura 22. La mutante doble *ca2cal2* muestra una asimilación de carbono reducida.

Plantas salvajes y mutantes fueron crecidas durante cuatro semanas **(a)** bajo atmósferas ambientales o **(b)** bajo atmósfera con alta concentración de CO_2 . Hojas de cada individuo fueron utilizadas para determinar el intercambio gaseoso según se describe en **Materiales y Métodos, sección 10**.

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes ($P \leq 0.001$).

Dado que esta diferencia observada en la asimilación de carbono podría deberse a variaciones en las características de los estomas de las plantas mutantes dobles, se evaluaron el índice estomático y la conductancia estomática de plantas mutantes y salvajes (**ver Materiales y Métodos, sección 11**). Como puede observarse en la **Figura 23**, no se registraron diferencias significativas entre plantas mutantes y salvajes para ninguno de los parámetros evaluados. A partir de esto, se puede concluir que en condiciones ambientales, las mutantes *ca2ca/2* poseen una tasa de asimilación de carbono menor que una planta salvaje. Adicionalmente, la doble mutante *ca2ca/2* mostró una leve disminución en el rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ PSII) (**Figura 24 (a)**), y consecuentemente una tendencia a una extinción no fotoquímica (NPQ) aumentada (**Figura 24 (b)**). Resultados similares se obtuvieron para la mutante *ca2ca/1*. Estos resultados en conjunto sugieren que el retardo en el crecimiento observado en las dobles mutantes en atmósferas ambientales podría deberse principalmente a una fijación de carbono disminuida.

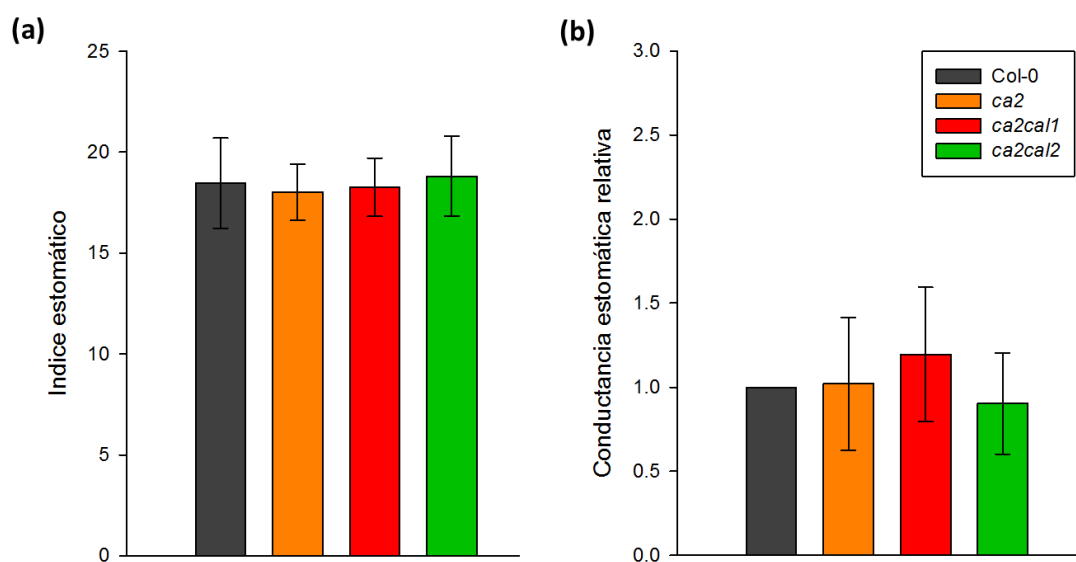


Figura 23. Características estomáticas.

Plantas salvajes y mutantes fueron crecidas durante cuatro semanas bajo atmósferas ambientales. **(a)** Índice estomático calculado según se describe en **Materiales y Métodos, sección 11**, a partir de fotografías representativas de cada individuo analizado. **(b)** Conductancia estomática relativa a plantas salvajes. No se observaron diferencias significativas.

Dado que se observó un rescate del fenotipo presentado por las dobles mutantes cuando las plantas fueron cultivadas bajo atmósferas con alta concentración de CO₂, se decidió realizar los experimentos de intercambio gaseoso bajo estas condiciones. Como se muestra en la **Figura 22 (b)**, no se observaron diferencias significativas en la tasa de asimilación de carbono en ninguna de las mutantes evaluadas con respecto a las plantas salvajes. De esta manera, las mutantes *ca2cal2* presentaron en condiciones no fotorrespiratorias la misma tasa de asimilación de carbono que las plantas salvajes y las mutantes simples.

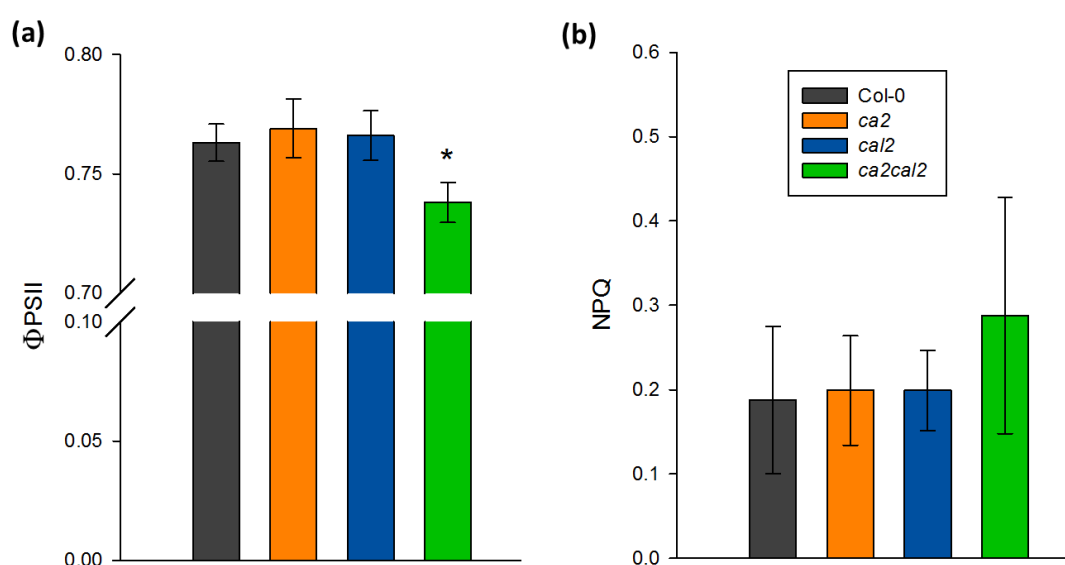


Figura 24. La doble mutante *ca2cal2* mostró una leve disminución en el rendimiento cuántico del fotosistema II.

Los parámetros relacionados con la fluorescencia de la clorofila fueron determinados según se describe en **Materiales y Métodos, sección 10**, en plantas salvajes y mutantes crecidas durante cinco semanas bajo atmósferas ambientales. **(a)** Rendimiento cuántico del fotosistema II (ΦPSII) **(b)** Extinción no fotoquímica (NPQ).

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes ($P \leq 0.001$).

Estos resultados apoyan la idea de que, bajo condiciones fotorrespiratorias, las mutantes dobles presentan un retardo en el crecimiento con respecto a plantas salvajes y a mutantes simples debido principalmente a una tasa de asimilación de carbono disminuida. Sin embargo, bajo condiciones no fotorrespiratorias las plantas de todos los genotipos analizados presentan un crecimiento similar lo cual sugiere que la asimilación de carbono no se encuentra afectada.

La suplementación con sacarosa puede rescatar el fenotipo de las mutantes dobles

Dado que el retardo en el crecimiento observado en las dobles mutantes en atmósferas ambientales podría deberse principalmente a una asimilación neta de carbono disminuida, se decidió evaluar si el cultivo de dichas plantas en un medio suplementado con sacarosa afecta el fenotipo observado. Para esto, plantas mutantes y salvajes fueron crecidas durante 20 días en placas de Petri con medio MS suplementado con 3% de sacarosa bajo condiciones atmosféricas normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad (**ver Materiales y Métodos, sección 2.1.1**). Como se puede observar en la **Figura 25**, las mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca2* no mostraron diferencias significativas en el crecimiento con respecto a plantas salvajes en el medio suplementado con sacarosa. Así, el fenotipo de estas mutantes pudo ser rescatado en estas condiciones de cultivo. Sin embargo, de manera similar a lo observado durante el cultivo en atmósferas con alta concentración de CO₂, la mutante doble *ca2ca3* presentó un rescate fenotípico parcial. Si bien durante el cultivo en medio suplementado con sacarosa, los individuos mutantes *ca2ca3* alcanzaron un tamaño superior al adquirido durante el crecimiento en un medio no suplementado, esta mutante mostró un retardo en el crecimiento con respecto a las plantas salvajes y a las demás plantas mutantes. Estos rescates parciales del fenotipo de la mutante *ca2ca3* sugieren que en esta doble mutante en particular deben existir problemas adicionales a los presentados por las mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2*. El rescate observado en estas últimas mutantes concuerda con la idea de que su retardo en el crecimiento radicaría en una fijación neta de carbono por fotosíntesis menor con respecto a las plantas salvajes. Se conoce (Hdider y Desjardins, 1994) que la adición de sacarosa al medio de cultivo es capaz de inhibir la fotosíntesis. Esto explicaría que las mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca2* muestren un fenotipo salvaje al ser crecidas en un medio suplementado con sacarosa, ya que de esta manera se dispararían las diferencias entre plantas salvajes y mutantes.

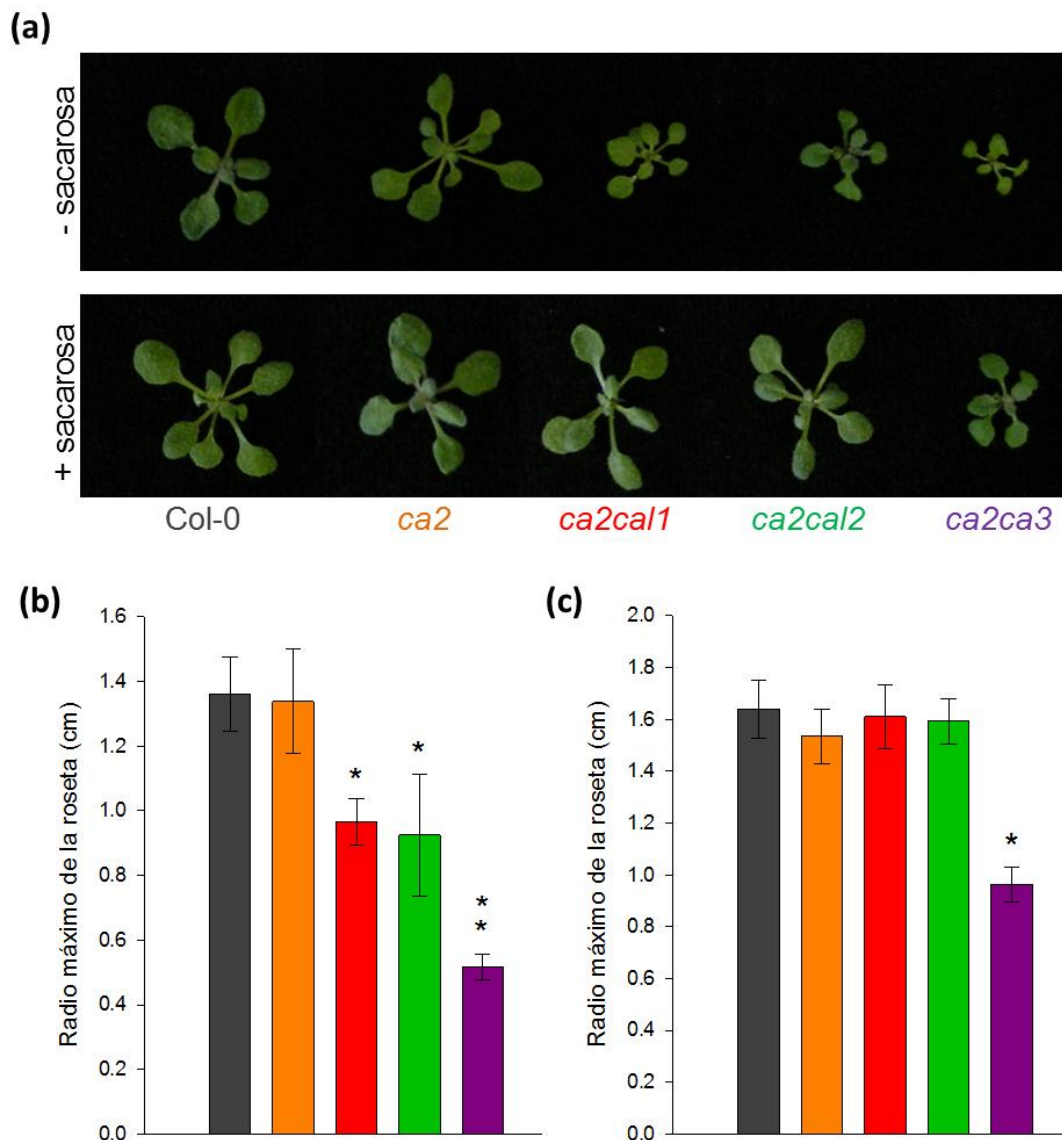


Figura 25. La suplementación con sacarosa puede rescatar el fenotipo de las mutantes dobles.

Plantas mutantes y salvajes fueron crecidas durante 20 días en medio MS suplementado con 3% de sacarosa o sin suplementar bajo condiciones atmosféricas normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. **(a)** Fenotipo de plantas mutantes. **(b)** Radio máximo de la roseta de plantas crecidas en medio sin sacarosa. **(c)** Radio máximo de la roseta de plantas crecidas en medio con sacarosa.

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes ($P \leq 0.001$).

Los asteriscos dobles indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes y otras mutantes ($P \leq 0.05$).

Las dobles mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2* presentan niveles elevados de especies reactivas de oxígeno

Con el objetivo de analizar el estado oxidativo de las dobles mutantes, se evaluaron los niveles de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y del anión superóxido (O_2^-) en hojas de plantas mutantes y salvajes. Los individuos fueron crecidos durante cuatro semanas bajo atmósfera ambiental con un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. Se utilizaron hojas enteras para la determinación de H_2O_2 utilizando diaminobenzidina (DAB), y de O_2^- utilizando nitroazul de tetrazolio (NBT) (ver **Materiales y Métodos, sección 13**). Como se muestra en la **Figura 26**, las mutantes simples *ca2* y *cal2* no mostraron un mayor contenido de ROS con respecto a las plantas salvajes, sin embargo, las dobles mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2* presentaron niveles superiores tanto de H_2O_2 como de O_2^- con respecto a las plantas salvajes y a las mutantes simples.

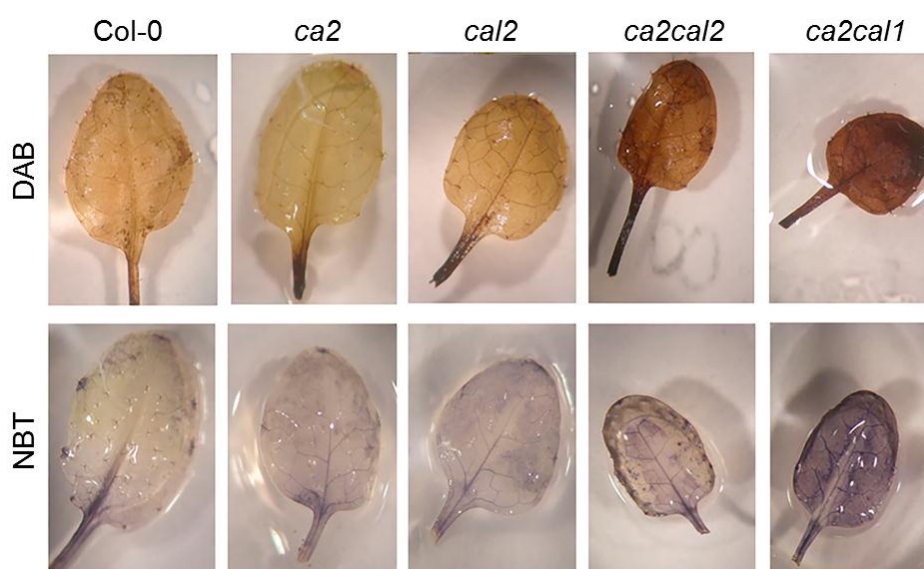


Figura 26. Las hojas de las mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2* muestran niveles incrementados de ROS.

Plantas mutantes y salvajes fueron crecidas durante cuatro semanas bajo condiciones atmosféricas normales y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. Se utilizaron hojas enteras para la determinación de H_2O_2 utilizando diaminobenzidina (DAB), y de O_2^- utilizando nitroazul de tetrazolio (NBT).

La transcripción de los genes CA depende de los niveles de CO₂ del aire

Datos obtenidos a partir de análisis de Microarray en *Arabidopsis thaliana* indicaron que el gen que codifica para la proteína CA2 se encuentra regulado negativamente cuando las plantas son cultivadas bajo atmósferas con altas concentraciones de CO₂ (Perales et al., 2005). Con el objetivo de analizar la regulación de la transcripción de los genes que codifican para las subunidades CA en relación a la concentración atmosférica de CO₂, los niveles de transcriptos se evaluaron mediante reacciones de qPCR. Para esto, plantas salvajes se crecieron en atmosfera ambiental (400 ppm +/- 50 CO₂) o bajo atmósferas con alto contenido de CO₂ (700 ppm y 2000 ppm +/-200 CO₂) durante cuatro semanas. Se tomaron muestras de tejido para realizar extracciones de RNA total y síntesis de cDNA según se describe en **Materiales y Métodos, secciones 3.2. y 6.3**). Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen (**ver Materiales y Métodos, sección 6.1**) y los genes *ACT2* y *UBQ5* se utilizaron como genes constitutivos. Las condiciones de atmósfera ambiental fueron tomadas como control y se expresaron los resultados de forma relativa. Como puede observarse en la **Figura 27**, las plantas cultivadas en atmósferas con alto CO₂ mostraron una clara reducción en los niveles de transcriptos de los genes *CA2* y *CAL1*. Así mismo, aunque en menor medida los niveles de transcriptos de los genes *CA1* y *CAL2* también resultaron ser significativamente más bajos en condiciones no fotorrespiratorias. Los resultados obtenidos para el gen *CA2* confirman lo expuesto por Perales et al. (2005) sobre la regulación negativa de este gen a 700 ppm CO₂, y muestran niveles de transcripto de *CA2* aún menores a 2000 ppm CO₂. Los datos obtenidos en la evaluación de la transcripción del gen *CA3* mostraron una amplia variabilidad y no presentaron diferencias significativas con respecto al control.

Los resultados obtenidos durante este estudio indican que la expresión de los genes CA se encontraría regulada negativamente en condiciones no fotorrespiratorias, sugiriendo que los trímeros que contienen la proteína CA2 serían necesarios cuando las plantas crecen bajo una atmósfera ambiental normal pero podrían ser dispensables en condiciones no fotorrespiratorias.

Este fenómeno ya fue reportado para otros genes relacionados a la fotorrespiración en varios organismos (Joët et al., 2001).

Por otro lado, se evaluaron de la misma forma los niveles de transcritos de los genes *PSST*, *NADHb*, *TYKY* y *TYKY2* que codifican para otras subunidades del complejo I. En contraste con lo observado para los genes *CA*, los niveles de transcritos de estos genes se vieron aumentados en plantas crecidas en atmósferas con alto CO_2 (**Figura 28**).

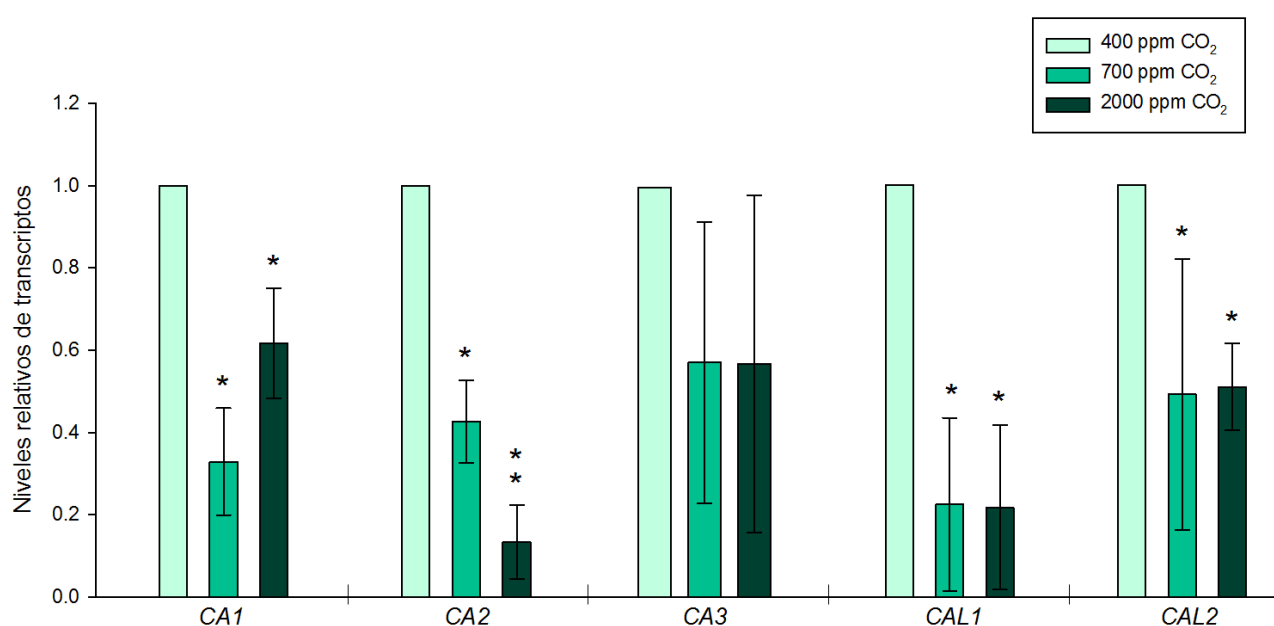


Figura 27. La transcripción de los genes *CA* depende de los niveles de CO_2 del aire.

Plantas salvajes se crecieron en atmósfera ambiental (400 ppm \pm 50 CO_2) o bajo atmósferas con alto contenido de CO_2 (700 ppm y 2000 ppm \pm 200 CO_2) durante cuatro semanas. Se extrajo RNA y los niveles de transcritos fueron evaluados mediante qPCR. *ACT2* y *UBQ5* se utilizaron como genes constitutivos. Se expresaron los resultados de forma relativa al control (atmósfera ambiental).

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($P \leq 0.001$).

Los asteriscos dobles indican diferencias significativas con respecto al control y a 700 ppm CO_2 .

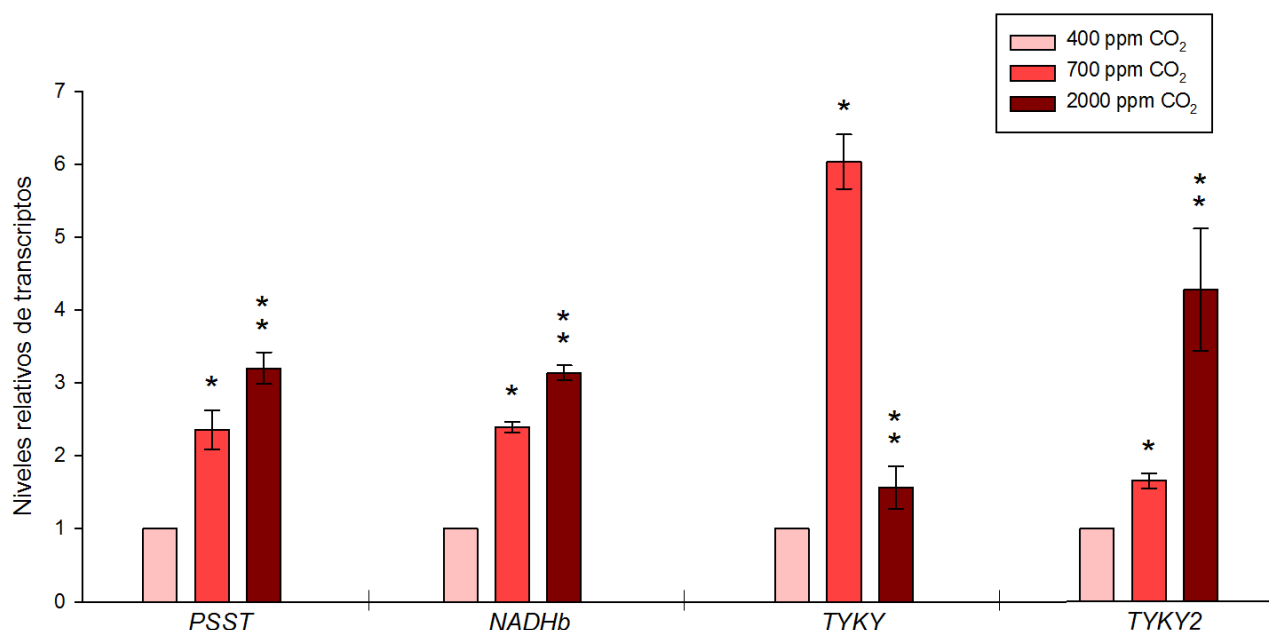


Figura 28. Los niveles de transcritos de subunidades del complejo I son mayores en atmósferas con alto CO₂.

Plantas salvajes se crecieron en atmósfera ambiental (400 ppm \pm 50 CO₂) o bajo atmósferas con alto contenido de CO₂ (700 ppm y 2000 ppm \pm 200 CO₂) durante cuatro semanas. Los niveles de transcritos fueron evaluados mediante qPCR. *ACT2* y *UBQ5* se utilizaron como genes constitutivos. Se expresaron los resultados de forma relativa al control (atmósfera ambiental).

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($P \leq 0.001$).

Los asteriscos dobles indican diferencias significativas con respecto al control y a 700 ppm CO₂.

El análisis de metabolitos de la doble mutante *ca2cal2* sugiere un desbalance relacionado con la fotorrespiración

Con el objetivo de lograr un entendimiento más profundo sobre el posible rol fisiológico del dominio CA y su relación con la fotorrespiración, se realizó un perfil de numerosos metabolitos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (**ver Materiales y Métodos, sección 14**) en plantas salvajes y mutantes crecidas en condiciones fotorrespiratorias. La mutante doble *ca2cal2*, plantas salvajes y las mutantes simples *ca2* y *cal2*, fueron crecidas durante cuatro semanas a 400 ppm CO₂ con un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. En estas condiciones, la mutante doble *ca2cal2* mostró un comportamiento general similar a la mutante simple *ca2* (**Figura 29**), con algunos cambios. Entre los metabolitos analizados, el aminoácido glicina, relacionado con la vía fotorrespiratoria, resultó ser el que mostró mayores

diferencias en la mutante doble *ca2ca12*. Esta doble mutante mostró un contenido de glicina de 2,8 veces mayor con respecto a las plantas salvajes, mientras que las mutantes simples *ca2* y *ca12* presentaron contenidos de glicina 2 y 1,3 veces mayores que las plantas salvajes, respectivamente. Los niveles de glicerato, también relacionado con la fotorrespiración, se encuentran aumentados en las mutantes *ca2ca12* y *ca12*. Los niveles de glicolato se muestran levemente reducidos en la doble mutante (**Figura 29 y Tabla 2**).

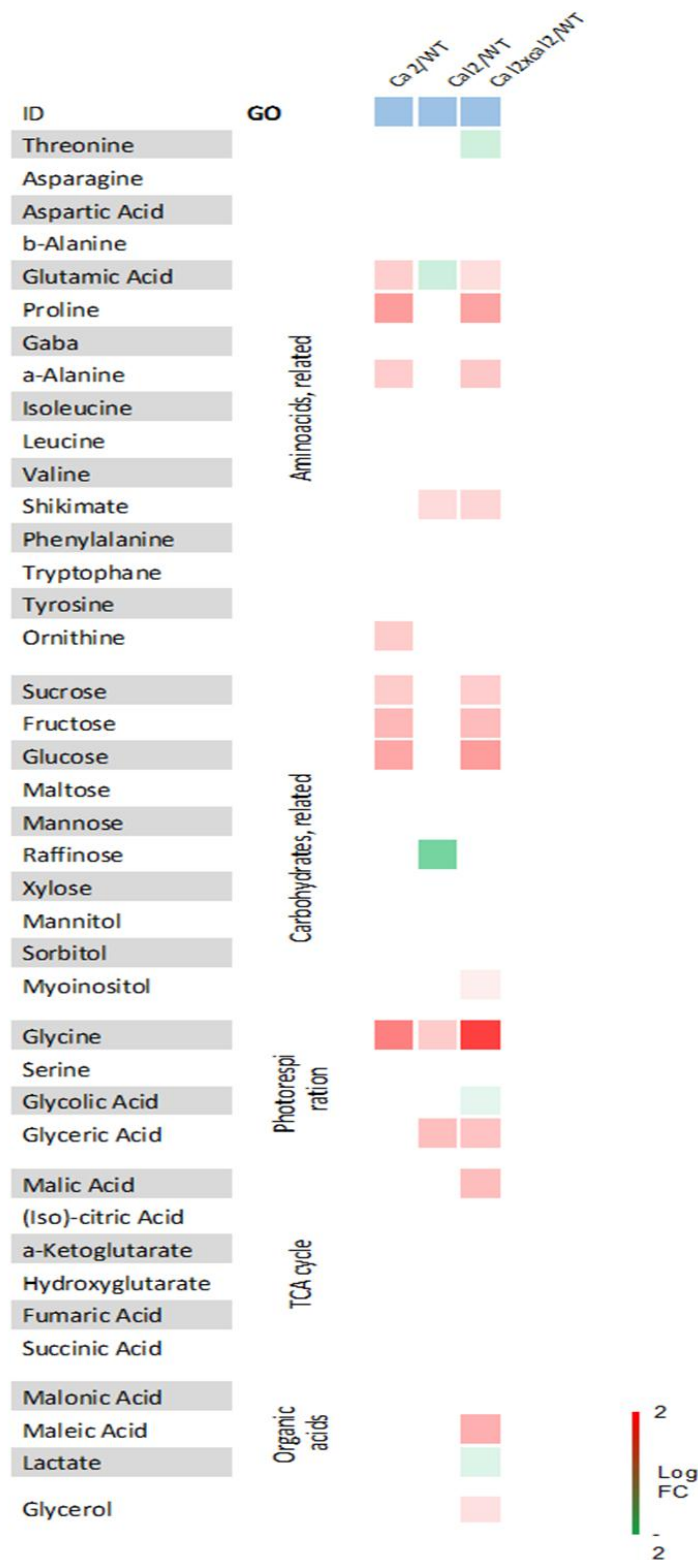


Figura 29. Representación gráfica del perfil metabólico.

Se muestran coloreados los cambios en los niveles de metabolitos en las plantas mutantes con respecto a plantas salvajes. La intensidad del color representa la magnitud del cambio. El color rojo indica aumento y el color verde disminución. Los niveles del aminoácido glicina constituyen el cambio más notorio.

Tabla 2. Niveles de metabolitos relacionados con la vía fotorrespiratoria.

Las mediciones se realizaron sobre rosetas enteras de plantas salvajes y mutantes mediante GC-MS. Las plantas fueron crecidas durante cuatro semanas a 400 ppm CO₂ y cosechadas pasadas 6 hs de iluminación. Los valores mostrados son promedios +/- desvío estándar y están normalizados por área. Los valores resaltados son significativamente diferentes a plantas salvajes (P≤0.05).

	Col-0	<i>ca2</i>	<i>cal2</i>	<i>ca2cal2</i>
Glicerato	0.25+/-0.02	0.26+/-0.03	0.35+/-0.01	0.34+/-0.02
Glicina	2.14+/-0.04	4.29+/-0.32	2.84+/-0.15	6.05+/-0.21
Glicolato	0.39+/-0.02	0.38+/-0.01	0.44+/-0.04	0.34+/-0.01
Serina	0.31+/-0.02	0.35+/-0.04	0.26+/-0.03	0.31+/-0.01

Dado que los niveles elevados de glicina en la doble mutante *ca2cal2* resultaron ser la diferencia principal en el perfil de metabolitos en comparación con plantas salvajes, se decidió corroborar este resultado y evaluar en qué medida esta acumulación de glicina está relacionada con procesos fotorrespiratorios. Para esto, se realizaron extracciones de aminoácidos totales de hojas de plantas salvajes y mutantes, y se midieron las concentraciones de glicina mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (**ver Materiales y Métodos, sección 15**). Plantas salvajes, mutantes simples *ca2* y *cal2*, y mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2* fueron crecidas durante cuatro semanas bajo atmósferas ambientales con un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. Para poder determinar variaciones en el contenido de glicina relacionadas con la actividad fotorrespiratoria, las mediciones se realizaron con plantas cosechadas al final del día (luego de 12 horas de iluminación) y al final de la noche (luego de 12 horas de oscuridad). Como puede observarse en la **Figura 30**, los niveles de glicina para las plantas salvajes alcanzaron 2,05 µmoles/g de peso fresco al final de la noche (considerado como 100%), aumentando hasta 2,5 µmoles/g de peso fresco al final del día. Estos resultados son similares a aquéllos reportados por Hoffmann et al. (2013). Las mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2* exhibieron niveles de glicina de 4 a 6 veces superiores con respecto a las plantas salvajes (500-700%, 10-14 µmoles/g de peso fresco) al final del día. Aunque en menor medida, los niveles de glicina en las dobles mutantes

también resultaron ser significativamente más altos con respecto a las plantas salvajes al final de la noche. La mutante simple *cal2* no presentó diferencias con respecto a las plantas salvajes, sin embargo, la mutante simple *ca2* mostró niveles de glicina significativamente mayores que las plantas salvajes, pero menores que los observados en las mutantes dobles. Adicionalmente, se analizó también el contenido de glicina al final del día y al final de la noche en las plantas *ca2cal2* complementadas con el gen *CA2* salvaje (*ca2cal2* 35S::CA2), las cuales recuperan el fenotipo salvaje (**ver Resultados I, Figura 14**). En estas plantas, los niveles de glicina no presentaron diferencias significativas con respecto a los niveles observados en plantas salvajes en ninguno de los momentos del día (**Figura 30**). La acumulación de glicina en las mutantes dobles con respecto a las plantas salvajes fue observada tanto al final de la noche como al final del día, sin embargo, la diferencia resultó mucho más pronunciada luego de 12 horas de luz. Este resultado sugiere que la acumulación de glicina observada estaría asociada a procesos dependientes de luz, apoyando su vinculación con la vía fotorrespiratoria.

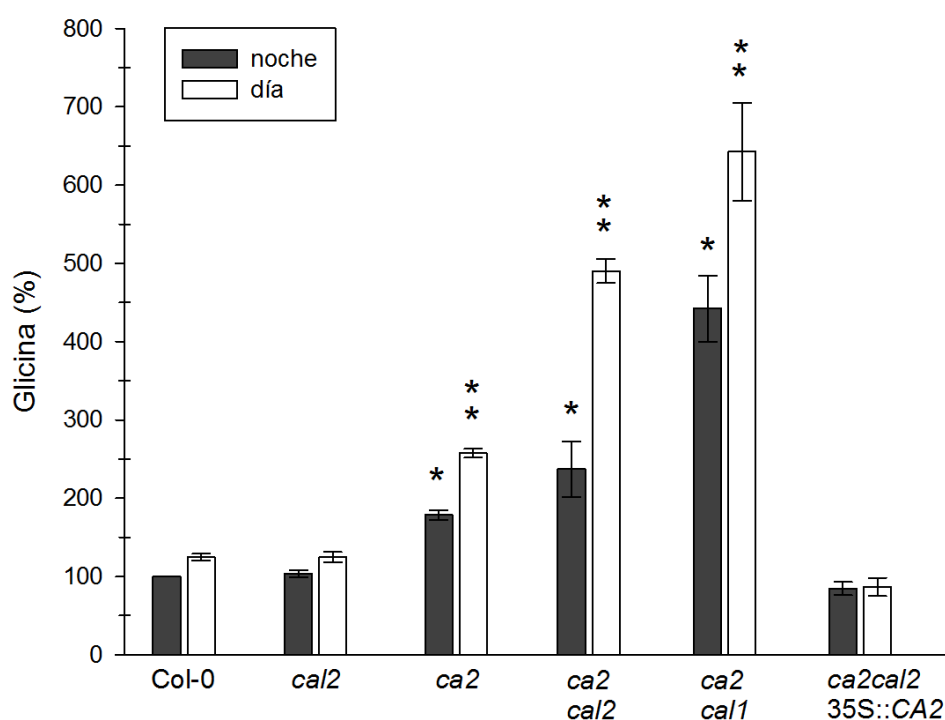


Figura 30. Las dobles mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2* muestran niveles elevados de glicina.

Se midieron las concentraciones de glicina mediante HPLC de plantas salvajes y mutantes crecidas en atmósfera ambiental. Las barras claras representan el final del día (luego de 12 horas de iluminación) y las barras oscuras el final de la noche (luego de 12 horas de oscuridad).

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes.

Los asteriscos dobles indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes y a plantas del mismo genotipo al final de la noche ($P \leq 0.001$).

Los niveles de transcriptos de genes que codifican para enzimas fotorrespiratorias se encuentran alterados en la mutante doble *ca2cal2*

Los niveles elevados de glicina observados en las mutantes dobles pueden deberse a un desequilibrio en la vía fotorrespiratoria (**ver Introducción II, Figura 15**). En esta vía, la oxigenación de la ribulosa-1,5-bifosfato produce una molécula de 3-fosfoglicerato y una de 2-fosfoglicolato. Este último es primero desfosforilado en los cloroplastos, y el glicolato resultante es posteriormente transportado a los peroxisomas donde es oxidado a glioxilato por la acción de la enzima Glicolato Oxidasa (GOX). El glioxilato es luego aminado convirtiéndose en glicina mediante la acción de la enzima Glutamato Glioxilato Aminotransferasa (GGAT). La glicina es subsiguientemente transportada a las mitocondrias, donde es descarboxilada y convertida en serina mediante la acción de las enzimas Glicina Descarboxilasa (GDC) y Serina Hidroximetiltransferasa (SHMT), respectivamente. Estas últimas reacciones están ligadas a la reducción de NAD^+ y a la liberación de NH_4^+ y CO_2 . Un desbalance en la cantidad o actividad de estas enzimas involucradas en la vía fotorrespiratoria podría causar la acumulación de glicina observada en las plantas mutantes. Con el objetivo de evaluar la expresión de los genes que codifican para estas enzimas fotorrespiratorias, se analizaron en plantas salvajes y mutantes los niveles de transcriptos de los genes *GOX1*, *GOX2*, *GGAT*, *GDC P1* (subunidad catalítica P1), *SHMT* y *GLYK* (Glicerato Quinasa). Para esto, plantas salvajes y mutantes se crecieron durante cuatro semanas bajo atmósfera ambiental y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. Se extrajo RNA total, se sintetizó cDNA y se realizaron reacciones de qPCR con oligonucleótidos específicos. Los resultados revelaron que los niveles de transcriptos de los genes *GOX1*, *GOX2*, *GGAT* y *GLYK* se encuentran aumentados con respecto a plantas salvajes tanto en la mutante simple *ca2* como en la mutante doble *ca2cal2*. Los niveles de transcriptos de los genes *GDC* y *SHMT* en cambio resultaron menores en las plantas mutantes con respecto a las plantas salvajes. No se observaron diferencias significativas entre las mutantes simple y doble (**Figura 31**).

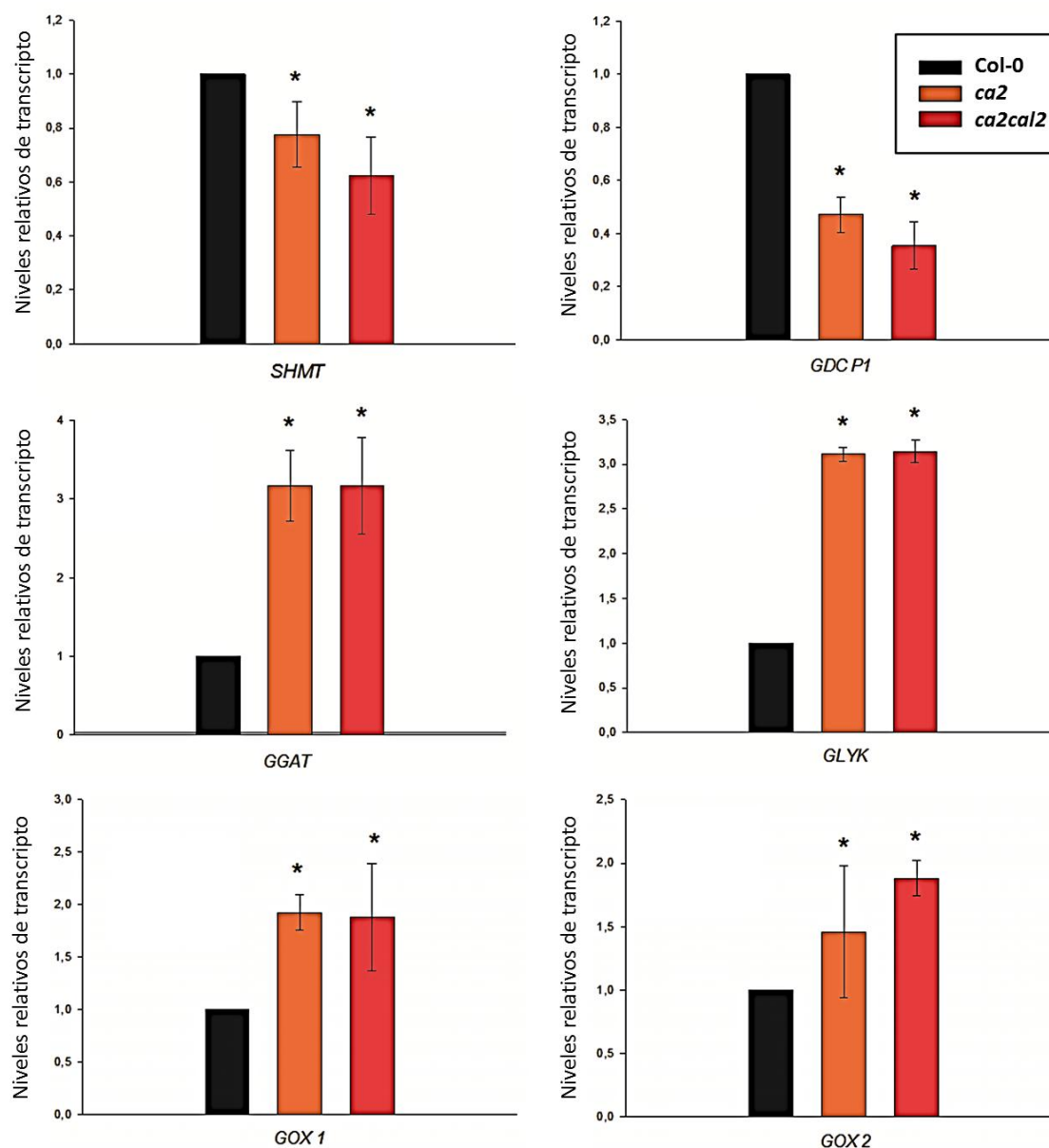


Figura 31. Niveles de transcriptos de genes que codifican para enzimas fotorrespiratorias. Plantas salvajes y mutantes se crecieron en atmósfera ambiental durante cuatro semanas. Se extrajo RNA total y se sintetizó cDNA. Los niveles de transcriptos se evaluaron mediante qPCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos. *ACT2* y *UBQ5* se utilizaron como genes constitutivos.

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes ($P \leq 0.05$).

La enzima GDC de la vía fotorrespiratoria presenta una actividad aumentada en la doble mutante *ca2cal1*

Dada la acumulación de glicina y los niveles de transcritos de genes fotorrespiratorios modificados observados, se decidió profundizar en el análisis midiendo la actividad de la enzima GDC involucrada en la conversión de glicina a serina en la vía fotorrespiratoria. Para esto, plantas mutantes y salvajes se crecieron durante cuatro semanas bajo atmósfera ambiental, y fueron utilizadas para realizar extractos crudos de mitocondrias (**ver Materiales y Métodos, sección 3.4**). La actividad enzimática se evaluó en estos extractos utilizando [^{14}C]-glicina y cuantificando el [^{14}C]- CO_2 liberado por la reacción mediante un contador de centelleo según se describe en **Materiales y Métodos, sección 16**. Como puede observarse en la **Figura 32**, la mutante simple *ca2* no presentó diferencias significativas con respecto a plantas salvajes, sin embargo, la mutante doble *ca2cal1* mostró una actividad GDC aproximadamente tres veces mayor a la observada en plantas salvajes. Este resultado muestra un aumento en la reacción de descarboxilación de la glicina en estas plantas, y posiblemente sea indicio de una inducción general de la vía fotorrespiratoria.

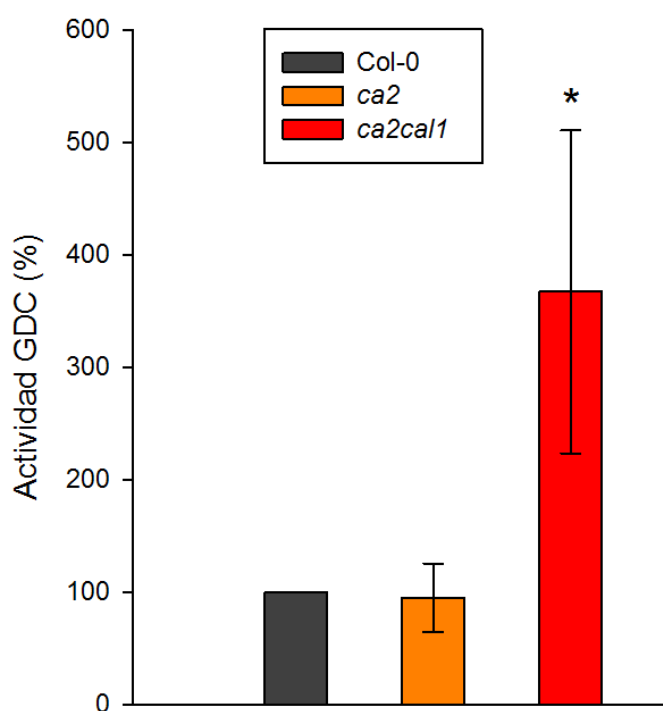


Figura 32. La doble mutante *ca2cal1* muestra una actividad GDC incrementada.

Extractos crudos de mitocondrias de plantas salvajes y mutantes crecidas en atmósfera ambiental se utilizaron para las determinaciones de actividad. Se agregó [^{14}C]-glicina en los tubos de reacción y se cuantificó el [^{14}C]- CO_2 liberado mediante un contador de centelleo.

Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a plantas salvajes ($P \leq 0.05$).

Durante este trabajo, se evaluó el fenotipo de mutantes afectadas en dos subunidades CA que mostraron un retardo en el crecimiento en atmósferas ambientales. Dicho fenotipo pudo ser completamente rescatado en las mutantes dobles *ca2ca1/1* y *ca2ca2/2* mediante el cultivo bajo atmósferas con alta concentración de CO₂. Adicionalmente, se mostró una disminución en la asimilación de carbono neta sólo bajo condiciones fotorrespiratorias, lo cual apoya la idea de que el fenotipo observado podría deberse principalmente a una baja incorporación de carbono. Mediciones de consumo de oxígeno y de niveles de complejo I indicaron que problemas en la respiración o un contenido diferencial de NADH no podrían ser las causas del retardo en el crecimiento observado. La suplementación del medio de cultivo con sacarosa permitió también el rescate del fenotipo, apoyando su vinculación con el proceso fotorrespiratorio, ya que las diferencias entre mutantes dobles y plantas salvajes se disipan en condiciones donde la fotosíntesis no constituye la principal fuente de carbono. Las mutantes dobles presentaron también una acumulación de glicina asociada a procesos dependientes de la luz, lo que da indicios de un desequilibrio fotorrespiratorio. La actividad enzimática aumentada de una de las enzimas involucradas en el proceso de fotorrespiración indicaría una inducción general de la vía. Sumado a esto, la expresión de los genes CA se encontraría regulada negativamente en condiciones no fotorrespiratorias, sugiriendo que el dominio CA sería necesario cuando las plantas crecen bajo una atmósfera ambiental normal pero no en condiciones no fotorrespiratorias. Así, los datos presentados en este trabajo sugieren que la falta de dos subunidades CA en las dobles mutantes altera el proceso de fotorrespiración y genera un desbalance metabólico.

Discusión y Conclusiones



Discusión

Durante este trabajo, se logró generar diferentes mutantes dobles a partir de cruza entre las mutantes simples disponibles. Entre ellas, se observaron mutantes dobles que presentaron un retardo en el crecimiento mostrando un tamaño significativamente menor con respecto a plantas salvajes y mutantes simples (**Figura 12**) crecidas en condiciones ambientales normales, las cuales representan condiciones fotorrespiratorias para una planta de metabolismo C3. Este fenotipo pudo ser rescatado creciendo las plantas mutantes bajo atmósferas con alta concentración de CO₂ (2000 ppm), es decir, condiciones no fotorrespiratorias (**Figura 17**). Estas características fueron previamente descritas y clasificadas como un fenotipo fotorrespiratorio de clase III por Timm y Bauwe (2012). Dentro de esta categoría se encuentran aquellas mutantes que son viables en condiciones atmosféricas y presentan un retardo en el crecimiento totalmente rescatable por altas concentraciones de CO₂. Adicionalmente, se mostró una asimilación de carbono disminuida bajo condiciones fotorrespiratorias (**Figura 22**) y una acumulación de glicina dependiente de la luz (**Figura 30**), resultados que sugieren un desequilibrio fotorrespiratorio. Sumado a esto, se vio que la expresión de los genes CA se encuentra regulada negativamente en atmósferas con alto contenido de CO₂ (**Figura 27**). Estas evidencias tomadas en conjunto sugieren que el dominio CA es necesario cuando las plantas crecen bajo una atmósfera ambiental normal pero no resulta indispensable en condiciones no fotorrespiratorias. Así, los datos generados en este trabajo indican que la falta de dos subunidades CA en las dobles mutantes altera el metabolismo de la fotorrespiración, provocando un fenotipo fotorrespiratorio de clase III. Los resultados presentados permiten vincular el rol funcional del dominio CA con la vía fotorrespiratoria.

Por otro lado, a partir de la evaluación de semillas en desarrollo también se identificaron mutantes dobles que mostraron letalidad del embrión. Estas mutantes presentaron semillas inmaduras incoloras en sus silicuas en desarrollo que se tornan oscuras y arrugadas en las silicuas maduras (**Figura 11**). La ocurrencia de dichas semillas en una proporción 3:1 coincidente con la segregación mendeliana junto con la imposibilidad de encontrar los individuos mutantes dobles homocigotas en la población de plantas adultas, permitieron inferir que las semillas anormales contendrían embriones mutantes dobles

homocigotas. Estos resultados muestran que la falta de dos subunidades CA puede dar lugar también a un fenotipo letal.

El rol funcional del dominio CA y su vinculación con la fotorrespiración

Los resultados obtenidos durante este trabajo generaron evidencias experimentales que permiten vincular el fenotipo observado en las dobles mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2* con la vía fotorrespiratoria, y además, descartar otras posibles causas. El retardo en el crecimiento mostrado por estas mutantes podría ser explicado por una reducción en los niveles de complejo I por debajo de los niveles observados en la mutante simple *ca2*. Esta última mutante posee una reducción en el contenido de complejo I de aproximadamente un 80% comparado con plantas salvajes (**Figura 19**) (Perales et al., 2005; Meyer et al., 2011; Li et al., 2013), pero aun así no muestra ningún fenotipo visiblemente alterado. Los experimentos de proteómica mitocondrial y consumo de oxígeno realizados mostraron que la respiración, los niveles de complejo I, la actividad NADH deshidrogenasa y la relación NADH/NAD⁺ son similares en la mutante simple *ca2* y en las mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2* (**Figuras 18 a 21**). Estos resultados indican que el fenotipo observado sólo en las dobles mutantes no puede ser atribuido a problemas en la respiración o el reciclado de NADH. Adicionalmente, estos resultados también sugieren que el dominio CA podría ensamblarse con la misma estabilidad en las mutantes dobles y en la mutante simple *ca2*, de manera que las proteínas CAL1 y CAL2 individualmente no serían esenciales para este proceso.

Las plantas que poseen silenciado el gen *CAL2* mediante RNA de interferencia y una mutación nula en el gen *CAL1* (*cal1cal2RNAi*) descritas por Wang et al. (2012), muestran también un tamaño reducido con respecto a plantas salvajes. Sin embargo, estas plantas poseen un retraso en la germinación y una diferencia de tamaño desde etapas tempranas, mientras que las dobles mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2* no muestran ningún retraso en la germinación y su tamaño reducido comienza a hacerse evidente transcurridas las primeras dos semanas, cuando la fotosíntesis está totalmente establecida. Sumado a esto, el cultivo a altas concentraciones de CO₂ produjo sólo una

reversión parcial del fenotipo presentado por las plantas *ca1ca2RNAi* (Fromm et al., 2015). De manera similar, los rescates parciales del fenotipo de la mutante *ca2ca3* observados en este trabajo sugieren que en esta doble mutante en particular deben existir problemas adicionales a los presentados por las mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2*. Adicionalmente, la doble mutante nula *ca1ca2-2* presentó un fenotipo de letalidad del embrión (Wang et al., 2012) similar al observado en las mutantes *ca1ca2* y *ca1ca3* en este trabajo (**Figura 11**).

Bajo atmósfera ambiental, la mutante doble *ca2ca2* mostró una reducción en la tasa de asimilación de carbono con respecto a las plantas salvajes y a las mutantes simples (**Figura 22**). Cuando los experimentos de intercambio gaseoso se realizaron en condiciones no fotorrespiratorias, esta diferencia no fue observada, sugiriendo que el retardo en el crecimiento presentado por las mutantes dobles en atmósfera ambiental es causado principalmente por una incorporación de carbono neta disminuida. Estos resultados pueden ser explicados bajo la hipótesis planteada en este trabajo por la cual el dominio CA es importante en el contexto de la fotorrespiración por su participación en el reciclado de CO₂ mitocondrial. Así, en condiciones donde una fracción del carbono potencialmente asimilable es liberado en la vía fotorrespiratoria, parte de este carbono sería reciclado y devuelto a los cloroplastos para su reasimilación en plantas salvajes, pero este mecanismo se vería afectado en las mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca2* provocando una asimilación de carbono neta menor. La mutante CMSII de *Nicotiana sylvestris* carece de complejo I funcional y tiene afectada su fotosíntesis bajo condiciones atmosféricas normales. Estas mutantes presentan una disminución de alrededor de un 20-30% en su tasa fotosintética bajo los niveles de CO₂ atmosféricos actuales. Esta inhibición de la fotosíntesis se reduce al cultivar las plantas en atmósferas con altas concentraciones de CO₂ o bajas concentraciones de O₂ (Duttilleul et al., 2003). La importancia del complejo I para sostener tasas fotosintéticas normales puede ser explicada por el rol del dominio CA en el reciclado del CO₂ mitocondrial. Adicionalmente, la doble mutante *ca2ca2* mostró una disminución en el rendimiento cuántico del fotosistema II (ΦPSII) (**Figura 24**). La reasimilación del CO₂ mitocondrial

liberado durante la respiración y la fotorrespiración contribuye al uso continuo de NADPH que evita la sobrerreducción de los transportadores de electrones en el cloroplasto (Haupt-Herting et al., 2001). Un menor reciclado de CO₂ mitocondrial en las mutantes dobles podría contribuir a una mayor permanencia de los transportadores de electrones cloroplásticos en estado reducido, disminuyendo así el rendimiento cuántico del fotosistema II.

Se sabe que la adición de sacarosa al medio de cultivo es capaz de inhibir la fotosíntesis (Hdider y Desjardins, 1994). Así, el hecho de que el fenotipo de plantas mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca2* pudo ser rescatado cuando fueron crecidas en un medio suplementado con sacarosa (**Figura 25**), concuerda con la idea de que su retardo en el crecimiento radicaría en una fijación neta de carbono fotosintética menor con respecto a las plantas salvajes. En condiciones donde la fotosíntesis no constituye la principal fuente de carbono, las mutantes dobles y las plantas salvajes se comportan de igual manera, ya que se disiparía la principal característica que las diferencia. La mutante *aoat1-1* de *Arabidopsis*, posee alterada la vía fotorrespiratoria al carecer de una Alanina 2-oxoglutarato Aminotransferasa (AOAT) que funciona como Glutamato Glioxilato Aminotransferasa (GGAT). Esta mutante muestra retardo en su crecimiento bajo condiciones de alta irradiancia o creciendo en un medio sin adición de sacarosa. De manera similar, las diferencias entre la mutante *aoat1-1* y las plantas salvajes se rescatan con el cultivo en alta concentración de CO₂ o el agregado al medio de sacarosa 3% (Igarashi et al., 2003). En contraste, el rescate parcial del fenotipo de la mutante *ca2ca3* en medio suplementado con sacarosa sugiere nuevamente que esta doble mutante podría tener una combinación de más de una afección.

Bajo condiciones no fotorrespiratorias, la actividad oxigenasa de la enzima RubisCO se encuentra suprimida (Maier et al., 2012; Florian et al., 2013), y en consecuencia, la vía fotorrespiratoria no es indispensable. En varios tipos de organismos diferentes, la transcripción de los genes que codifican proteínas involucradas en la vía fotorrespiratoria se reduce bajo estas condiciones (Price, 2011; Timm et al., 2012). En concordancia con esto, durante este trabajo se mostró que los niveles de transcritos de los genes *CA1*, *CA2*, *CAL1* y *CAL2* de *Arabidopsis* resultaron menores en plantas

salvajes cultivadas en atmósferas con altas concentraciones de CO₂ (**Figura 27**). Este resultado contribuye a establecer una conexión entre las proteínas codificadas por estos genes y la fotorrespiración, sugiriendo que son necesarias cuando las plantas crecen bajo una atmósfera ambiental pero no cuando crecen en condiciones no fotorrespiratorias. En cambio, los niveles de transcriptos de genes que codifican para otras subunidades del complejo I aumentan en plantas crecidas en altas concentraciones de CO₂ (**Figura 28**). Datos provenientes de estudios transcriptómicos y fisiológicos en *Arabidopsis* mostraron evidencias de un incremento de la capacidad respiratoria bajo atmósferas con altas concentraciones de CO₂, sin embargo, no se encontraron diferencias en las actividades enzimáticas; lo que implica que los altos niveles de transcriptos de genes que codifican para enzimas respiratorias encontrados no se traducen en un aumento de la actividad de las proteínas correspondientes (Watanabe et al., 2014). Dado que la proteína CA2 es esencial para el ensamblaje del complejo I (Meyer et al., 2011; Braun et al., 2014), los bajos niveles de transcripto de CA2 en atmósferas con altas concentraciones de CO₂ podrían afectar el ensamblaje del complejo I, a menos que otra proteína reemplace su función en estas condiciones. El hecho de que los niveles de transcriptos de genes que codifican para otras subunidades del complejo I se incrementen sugiere una alteración en la vía de ensamblaje del complejo I a altas concentraciones de CO₂. También podrían existir mecanismos compensatorios de los niveles de proteínas bajo diferentes atmósferas.

Por otro lado, las dobles mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2* mostraron acumulación de ROS (**Figura 26**). Según la hipótesis planteada en este trabajo, la reducida asimilación de carbono observada podría deberse a una afección en el dominio CA que da como resultado una menor capacidad de la dobles mutantes de restituir el CO₂ mitocondrial a los cloroplastos para su reasimilación. Si la concentración de CO₂ en las inmediaciones de la RubisCO son bajas, se ve favorecida la actividad oxigenasa de esta enzima, lo cual conlleva a una inducción de la vía fotorrespiratoria. La reacción catalizada por la enzima GOX en los peroxisomas produce H₂O₂, y la inducción de las reacciones fotorrespiratorias podría hacer que esta producción sobrepase la

capacidad de las plantas mutantes dobles de detoxificar ROS. Adicionalmente, la producción de O_2^- y H_2O_2 por el complejo I depende de la relación NADH/NAD⁺ y es inhibida por altos niveles de NAD⁺ (Hirst et al., 2008). Cuando la cantidad de complejo I es reducida, la relación NADH/NAD⁺ aumenta (**Figura 21**), ya que la actividad NADH deshidrogenasa total se reduce aún en presencia de las NADH deshidrogenasas alternativas. De esta manera, todas las mutantes de subunidades CA que poseen una reducción en los niveles de complejo I muestran acumulación de la producción de ROS mitocondrial. Si bien esto no explica las diferencias en los contenidos de ROS observados en las plantas mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca1* con respecto a la mutante simple *ca2*, contribuiría junto con otras fuentes a aumentar los niveles de ROS en las mutantes dobles.

En la vía fotorrespiratoria, la enzima GGAT produce glicina en los peroxisomas, que luego se transporta hacia las mitocondrias. Las enzimas GDC y SHMT catalizan la conversión de dos moléculas de glicina en una molécula de serina, produciendo NH₄⁺ y NADH (Maurino y Peterhänsel, 2010; Florian et al., 2013). Las dobles mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2* acumulan glicina en condiciones fotorrespiratorias (**Figura 30**), y este es el cambio más significativo en el perfil metabólico (**Figura 29; Tabla 2**). Adicionalmente, esta acumulación de glicina resultó estar asociada a procesos dependientes de luz, lo que apoya la idea de la existencia de un desbalance fotorrespiratorio. Los niveles de glicina observados en las mutantes dobles *ca2ca1* y *ca2ca2* al final de la noche comparados con aquéllos alcanzados al final del día, indicarían que estas mutantes son capaces de degradar la glicina. Si bien la mutante simple *ca2* mostró un aumento moderado de los niveles de glicina con respecto a plantas salvajes, el desbalance presentado por esta mutante no sería suficiente para traducirse en un fenotipo alterado. Los niveles de glicina observados en las plantas complementadas similares a los mostrados por plantas salvajes, sugieren que la falta de una segunda subunidad CA sumada a la ausencia de la proteína CA2 agudiza el desequilibrio fotorrespiratorio.

En la mutante doble *ca2ca1*, se observó un incremento de la actividad de la enzima GDC en comparación con plantas salvajes y la mutante simple *ca2* (**Figura 32**). Esto fue interpretado como un indicio de una mayor síntesis

de glicina a través de las reacciones catalizadas por las enzimas GOX y GGAT, dentro de una inducción general de la vía fotorrespiratoria. En este sentido, se observaron aumentos en los niveles de transcriptos de los genes que codifican para estas enzimas (**Figura 31**). Por lo tanto, se sugiere que la mayor actividad GDC observada en la mutante *ca2cal1* podría no ser suficiente para contrarrestar las cantidades de glicina producida en esta vía fotorrespiratoria activada, dando cuenta de la acumulación de este aminoácido (**Figura 30**).

Las evidencias experimentales generadas durante este trabajo permiten explicar los fenómenos observados en las mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2*, y proponer lo que ocurre en las plantas salvajes. Así, en atmósferas ambientales normales, durante el día coexisten la vía fotosintética y la vía fotorrespiratoria. La ocurrencia de cada una de estas vías depende de las concentraciones de CO₂ y O₂ en las proximidades de la enzima RubisCO. Parte del carbono liberado durante la fotorrespiración es reciclado para su reasimilación en los cloroplastos. En esta tesis se propone que el dominio CA del complejo I mitocondrial se encuentra involucrado en el transporte de carbono a través de la membrana interna mitocondrial en este proceso de reciclado, contribuyendo así a mantener tasas de asimilación de carbono normales. En las plantas mutantes, por el contrario, los altos niveles de glicina junto con la actividad GDC aumentada, sugieren una inducción general de la vía fotorrespiratoria. Esto implica una mayor liberación de CO₂ en las reacciones de descarboxilación de la glicina. Ante la afección del dominio CA, este CO₂ liberado no puede ser reciclado a los cloroplastos, lo cual tiene como resultado una asimilación neta de carbono disminuida. Esta baja incorporación de carbono explica el retardo en el crecimiento presentado por las mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2* en condiciones fotorrespiratorias. A su vez, bajas concentraciones de CO₂ en las inmediaciones de la RubisCO favorecen la actividad oxigenasa de esta enzima, lo que provoca la inducción de la vía fotorrespiratoria. En condiciones donde las diferencias entre plantas salvajes y mutantes se disipan, como atmósferas con alta concentración de CO₂ donde la fotorrespiración se ve inhibida, o ante el suplemento con sacarosa externa que hace que la fijación fotosintética no sea la principal fuente de carbono, las plantas mutantes exhiben un fenotipo salvaje.

Así, la hipótesis planteada en este trabajo, la cual propone al dominio CA del complejo I mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* como un componente importante en el contexto de la fotorrespiración por su participación en el reciclado de CO₂ mitocondrial que permite el mantenimiento de una tasa de fijación de carbono normal, es apoyada por las evidencias experimentales presentadas. Adicionalmente, se proveen datos que apoyan la idea de la existencia de un bCRM propuesta previamente (Raven, 2001; Braun y Zabaleta, 2007; Zabaleta et al., 2012).

La detección de proteínas homólogas a γ CAs en eucariotas no fotosintéticos demuestra que las subunidades CA no son específicas de plantas y algas verdes, y sugiere que estas proteínas serían una característica ancestral del complejo I mitocondrial y no una nueva adquisición específica de plantas (Gawryluk y Gray, 2010). En estos organismos eucariotas no fotosintéticos se ha propuesto sólo una función estructural en el ensamblado del complejo. Sin embargo, se propone en este trabajo de tesis que las subunidades CA en base a su estrecha relación estructural y de secuencia, particularmente en el sitio activo con gamma anhidrasas carbónicas ancestrales, podrían haber adquirido un rol funcional en el contexto de la fotorrespiración sólo en organismos fotosintéticos eucariotas, lo que condujo a su conservación. En animales y hongos, donde el ensamblaje de complejo I ocurre por un proceso alternativo, estas subunidades resultaron dispensables y pudieron haberse perdido dado que no se han encontrado aún en ningún genoma de ningún organismo de esta clase (Opisthokonta).

Las subunidades CA y la posible composición del dominio CA

Durante este trabajo, se lograron identificar mutantes dobles afectadas en el dominio CA que mostraron letalidad del embrión. La imposibilidad de encontrar los individuos mutantes dobles homocigotas *ca1ca2* y *ca1ca3* en la población de plantas adultas llevó a realizar la evaluación de semillas en desarrollo. La ocurrencia de semillas inmaduras incoloras en las silicuas en desarrollo, las cuales se tornan oscuras y arrugadas en las silicuas maduras (**Figura 11**) en una proporción 3:1 coincidente con la segregación mendeliana,

permitió inferir que dichas semillas anormales contendrían embriones mutantes dobles homocigotas. Estudios paralelos a este trabajo confirmaron esta presunción y mostraron que estos embriones poseen un potencial de membrana mitocondrial reducido y una acumulación de ROS que afecta su desarrollo. Si bien, estas semillas anormales son capaces de germinar, lo hacen 12 días después que las semillas salvajes, y en poco tiempo las plántulas se tornan blancas y mueren (Córdoba et al., 2015, en prensa). Estos resultados muestran que la falta de dos subunidades CA puede dar lugar a un fenotipo letal. Este fenotipo fue también observado por Wang et al. (2012) en la doble mutante *cal1cal2-2* nula de *Arabidopsis*. De igual manera, no se encontraron individuos adultos dobles mutantes homocigotas en la progenie de la cruce entre las mutantes simples *cal1* y *cal2-2*. Las silicuas de plantas *cal1cal1cal2CAL2* y *CAL1cal1cal2cal2* contienen entre un 20% y un 25% de semillas inmaduras incoloras. En nuestro laboratorio se obtuvo una doble mutante *cal1cal2* (Villarreal, Fernando, tesis doctoral 2010), pero a diferencia de lo publicado por Wang et al. (2012), estas mutantes no presentan un fenotipo letal debido a que el alelo *cal2-1* con que contamos no es nulo, lo cual explica la diferencia observada. El alelo *cal2-2* no está disponible en el banco de semillas mutantes ABRC.

A partir de todas las diferentes mutantes descriptas en este trabajo y sus fenotipos, en conjunto con conocimientos previos reportados, se puede hacer un análisis sobre la posible composición del dominio CA, la cual no se conoce aún con claridad. Este dominio es considerado un heterotrímero de proteínas CA y CAL (Perales et al., 2004; Sunderhaus et al., 2006; Braun et al., 2014). Estudios donde el complejo I es desensamblado controladamente en subcomplejos y su composición analizada mediante espectrometría de masa, revelaron la presencia de las proteínas CA1, CA2, CAL1 y CAL2 en el dominio CA. La estequiometría de las proteínas CA y CAL analizada mediante 2D BN/SDS-PAGE resultó no ser la misma, las cantidades de CA1+CA2 claramente exceden las cantidades de CAL1+CAL2. Esta evidencia llevó a pensar que el dominio CA debería incluir dos proteínas CA y una proteína CAL, probablemente variando entre complejos I individuales (Klodmann et al., 2010). Adicionalmente, todos los eucariotas fotosintéticos estudiados hasta el

momento poseen al menos una proteína CA y una proteína CAL. La interacción directa entre las proteínas CA y las CAL fue mostrada mediante ensayos de doble híbrido en levadura, donde CA2 fue capaz de interaccionar con CAL1 y CAL2 (Perales et al., 2004). En cambio, la interacción directa de las proteínas CAL entre sí no pudo ser observada mediante este sistema experimental. La interacción de la proteína CA3 con cualquier otro miembro de la familia CA/CAL no pudo ser demostrada por ensayos de doble híbrido. Las cinco proteínas CA son detectadas mediante espectrometría de masa en complejos I aislados completos y al separar el brazo de membrana. Sin embargo, cuando se separa el dominio CA del resto del complejo I, se logran encontrar en él todas las subunidades CA excepto la proteína CA3 (Klodmann et al., 2010). Así, el dominio CA se encontraría compuesto por tres subunidades, al menos una proteína CA y una proteína CAL, de variada identidad. Se cree que la composición del dominio CA podría variar entre partículas de complejo I individuales, con posibles funciones fisiológicas específicas. Si bien, la relevancia funcional de esta heterogeneidad se desconoce, la composición del dominio CA podría cambiar entre diferentes tejidos y/o ante diferentes condiciones ambientales.

De esta manera, se puede proponer un modelo de la composición del dominio CA. En las plantas salvajes, los trímeros podrían contener a la subunidad CA2 en la mayoría de los complejos I (80%) y a la subunidad CA1 en los restantes complejos I (20%); dado que se reportó que las proteínas CA1 y CA2 no estarían interaccionando entre sí (Córdoba et al., 2015, en prensa). Esto se correlaciona con el hecho de que la mutante simple *ca2* posee una reducción de aproximadamente un 80% en los niveles de complejo I (Perales et al., 2005). Dado que la subunidad CA2 posee un rol fundamental en el ensamblaje del complejo I (Meyer et al., 2011), aproximadamente el 80% del complejo I no podría ensamblarse. Así, en esta mutante simple, el dominio CA normalmente más abundante no lograría formarse, quedando sólo el complejo I remanente con la proteína CA1 (20%). En la mutante simple *ca1*, la subunidad CA2 sería capaz de formar todos los trímeros, lo que explicaría que no se observen diferencias en el contenido de complejo I con respecto a las plantas salvajes, o una posible diferencia de un 20% no es apreciable por las técnicas

utilizadas. En la mutante doble *ca1ca2* reportada en este trabajo y en la mutante doble *cal1cal2* (Wang et al., 2012), ninguno de los dos tipos de dominio CA podrían formarse, el ensamblaje del complejo I no podría llevarse a cabo, dando como resultado una embriogénesis afectada y un fenotipo letal. Esto concuerda con el hecho de que en plantas mutantes dobles homocigotas *ca1ca2* que lograron ser rescatadas no es posible detectar complejo I formado (Hans-Peter Braun, comunicación personal). En las mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2*, cuando la subunidad CA2 está ausente junto con la subunidad CAL1 o el contenido de la proteína CAL2 se encuentra reducido, 20% del complejo I aún puede ser ensamblado. Esto se ajusta a las cantidades del dominio CA menos abundante, que estaría compuesto por la subunidad CA1 y la subunidad CAL remanente. Además, a partir de esto se puede inferir que el dominio CA podría ensamblarse con la misma estabilidad en las mutantes dobles y en la mutante simple *ca2*, de manera que las proteínas CAL1 y CAL2 individualmente no contribuirían en este proceso. Este modelo también concuerda con el hecho de que el dominio CA se encontraría compuesto por al menos una proteína CA y una proteína CAL. La ausencia de las subunidades CA1 y CAL1 en conjunto, así como la ausencia de las subunidades CA3 y CAL1, no condujeron a letalidad en ninguno de los casos. Como se mencionó anteriormente, la proteína CA3 no se encontró en el dominio CA aislado, pero sí en el complejo I completo (Klodmann et al., 2010). La localización de esta proteína permanece aún poco clara. Adicionalmente, los resultados obtenidos acerca de la mutante doble *ca2ca3* con respecto a su fenotipo, no pueden explicarse por completo en base a la hipótesis planteada en este trabajo, sugiriendo que esta doble mutante en particular tiene problemas adicionales a los presentados por las demás mutantes dobles analizadas y una combinación de más de una afección. Recientemente se observó en forma preliminar que esta doble mutante contiene un nivel muy bajo de complejo I (Fassolari y Córdoba, comunicación personal), lo cual explica algunos de los defectos observados que además son comparables a los obtenidos por otro laboratorio con las mutantes *cal1cal2RNAi*, la cual posee un 5% de complejo I (Fromm et al, 2015). Las mutantes dobles carentes de la subunidad CA3 y la interacción de esta proteína con las demás subunidades CA y otros componentes del complejo I es objeto de otro proyecto paralelo desarrollado en el laboratorio.

Dado que la presencia del dominio CA es importante para el ensamblaje del complejo I (Li et al, 2013; Meyer et al., 2011; Perales et al., 2005), resulta difícil independizar las consecuencias de la falta o disminución del contenido de dominio CA de los efectos de la reducción en los niveles de complejo I. Se han reportado diversas evidencias experimentales mostrando la influencia del complejo I sobre la capacidad fotosintética y la viabilidad de plantas mutantes. La mutante *ndufs4* de *Arabidopsis* posee afectada la subunidad de 18 kDa del complejo I y contiene sólo algunas trazas de él. Esta mutante presenta una germinación sensible a la sacarosa, un retraso en el crecimiento bajo condiciones de cultivo normales, una eficiencia del fotosistema II y una transferencia de electrones cloroplástica reducidas (Meyer et al., 2009). La mutante *ndufv1* carece por completo de actividad del complejo I y es letal bajo condiciones normales de crecimiento. Esta mutante requiere de la suplementación del medio de cultivo con sacarosa para sobrevivir (Kühn et al., 2015). Tanto en la mutante *ndufs4* como en la mutante *ndufv1* se produce una acumulación de subcomplejos intermediarios, ya que el ensamblaje del complejo I no puede completarse. En cambio, en las mutantes que carecen de la subunidad CA2 no hay acumulación de subcomplejos dado que esta proteína se incorpora en etapas tempranas del proceso de ensamblaje (Meyer et al., 2011). La mutante *ca2ca2* reportada en este trabajo posee aproximadamente un 20% de complejo I, sin embargo el fenotipo fotorrespiratorio mostrado por esta mutante no puede ser atribuido a esto, ya que la reducción en los niveles de complejo I no resulta mayor a la presentada por la mutante simple *ca2*. Los niveles de complejo I posiblemente muy reducidos en la mutante *ca2ca3* y la mutante *ca1ca2RNAi* (Fromm et al, 2015) podrían explicar algunos de los defectos observados en estas mutantes. En plantas mutantes dobles homocigotas *ca1ca2* rescatadas no fue posible detectar complejo I (Hans-Peter Braun, comunicación personal), lo que podría explicar el fenotipo letal en condiciones normales de cultivo de la mutante *ca1ca2* reportada en este trabajo y posiblemente en la mutante *ca1ca2* reportada por Wang et al. (2012). Como se mencionó anteriormente, modificaciones en la actividad fotosintética habían sido reportadas en la mutante *CMSII* de *Nicotiana sylvestris* que carece de complejo I funcional (Noctor et al., 2003). La reducción en actividad fotosintética es revertida cuando las plantas mutantes son crecidas en altas

concentraciones de CO₂ que previenen la fotorrespiración, y puede ser explicada por un suministro de CO₂ limitante (Priault et al., 2006). Las observaciones en diferentes mutantes afectadas en el complejo I, presentadas en este trabajo o reportadas por otros autores, muchas veces deben ser interpretadas con cautela ya que resulta difícil descartar efectos indirectos sobre el metabolismo primario del carbono.

Finalmente, en la **Tabla 3** se resumen las distintas mutantes de subunidades del dominio CA y sus principales características. El hecho de que las mutantes simples del dominio CA no muestren fenotipos alterados fue atribuido a redundancias funcionales entre las distintas subunidades CA, sin embargo, la razón biológica de la ocurrencia de cinco de estas subunidades estructuralmente relacionadas en *Arabidopsis thaliana* no está establecida y podría estar reflejando la existencia de diferentes roles individuales. Las diferentes problemáticas observadas en las distintas mutantes dobles reportadas en este trabajo, concuerdan con esta idea, ya que la falta de diferentes combinaciones de subunidades CA lleva a distintos efectos de variada intensidad, desde mutantes con fenotipos leves hasta mutantes letales. Así, no todas las subunidades CA podrían ser eficientemente reemplazadas por cualquiera de las restantes proteínas CA.

Durante este trabajo se logró cumplir con el objetivo general planteado, generando conocimiento acerca del rol funcional de las anhidrasas carbónicas de tipo gamma (γ-CAs) que conforman el dominio CA del complejo I mitocondrial de plantas. Sin embargo, aún quedan varios aspectos por esclarecer para lograr un completo entendimiento de la composición y función de este dominio.

Tabla 3. Diferentes mutantes de subunidades del dominio CA y sus principales características.

Mutante	Fenotipo alterado respecto a plantas salvajes
<i>ca1</i>	No
<i>ca2</i>	≈80% reducción del Complejo I, ≈50% Reducción en el consumo de O ₂ , fenotipo salvaje. (Perales et al., 2005)
<i>ca3</i>	No
<i>cal1</i>	No
<i>cal2</i>	No
<i>ca1ca2</i>	Letalidad del embrión
<i>ca1ca3</i>	Letalidad del embrión
<i>ca1cal1</i>	No (observación preliminar)
<i>ca2ca3</i>	Fenotipo fotorrespiratorio combinado con problemas adicionales
<i>ca2cal1</i>	Fenotipo fotorrespiratorio de clase III
<i>ca2cal2</i>	Fenotipo fotorrespiratorio de clase III
<i>ca3cal1</i>	Retraso en el inicio de la floración (observación preliminar)
<i>cal1cal2</i>	Letalidad del embrión (Wang et al., 2012)

Conclusiones

Las principales conclusiones a las cuales se arribó a partir de la evidencia experimental generada durante este trabajo son:

- La afección de dos subunidades del dominio CA del complejo I mitocondrial puede dar lugar a un fenotipo letal.
- Existen mutantes de *Arabidopsis thaliana* afectadas en dos subunidades del dominio CA del complejo I mitocondrial que muestran un retardo en el crecimiento en condiciones ambientales normales.
- Este fenotipo puede ser rescatado mediante el cultivo bajo atmósferas con altas concentraciones de CO₂ en las mutantes *ca2cal1* y *ca2cal2*.
- Problemas en la respiración, en la actividad NADH deshidrogenasa, niveles de complejo I ó contenidos de NADH diferenciales, no son las causas del retardo en el crecimiento presentado por las dobles mutantes.
- Estas dobles mutantes poseen una tasa de asimilación de carbono reducida neta sólo bajo condiciones fotorrespiratorias.
- El fenotipo observado también puede ser rescatado mediante el cultivo en medio suplementado con sacarosa.
- Las mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2* poseen niveles elevados de ROS.
- Los niveles de transcriptos de los genes que codifican para las subunidades CA disminuyen en plantas salvajes crecidas en condiciones no fotorrespiratorias.
- Las mutantes dobles *ca2cal1* y *ca2cal2* presentan una acumulación de glicina asociada a procesos dependientes de la luz.
- Los niveles de transcriptos de genes que codifican para enzimas fotorrespiratorias se encuentran alterados.
- La enzima GDC responsable de la descarboxilación de la glicina presenta una actividad aumentada, dando indicios de una inducción general de la vía fotorrespiratoria.

- Las características observadas en la mutante doble *ca2ca3* sugieren que esta doble mutante en particular tiene problemas adicionales a los presentados por las mutantes *ca2ca1* y *ca2ca2* combinando más de una afección.
- Los resultados presentados permiten vincular el rol funcional del dominio CA con la vía fotorrespiratoria.

Materiales y Métodos

1. Nomenclatura

Durante todo este trabajo los nombres de genes, proteínas y mutantes de plantas de *Arabidopsis thaliana* son utilizados de acuerdo a las siguientes normas:

Proteínas: en mayúscula (ejemplo, CA2)

Genes: en mayúscula itálica (ejemplo, *CA2*)

Individuos mutantes: en minúscula itálica (ejemplo, *ca2*)

En aquellos casos en que sea necesario distinguir entre diferentes alelos de un mismo gen, los alelos mutantes serán designados en minúscula itálica y los alelos salvajes en mayúscula itálica (ejemplo, *ca1ca1ca2CA2*, individuo que posee el alelo mutante del gen *CA1* en homocigosis y el alelo mutante del gen *CA2* en heterocigosis)

1.1. Genes

<i>ACT2</i>	At3g18780	Actina 2
<i>CA1</i>	At1g19580	Gamma-anhidrasa carbónica 1
<i>CA2</i>	At1g47260	Gamma-anhidrasa carbónica 2
<i>CA3</i>	At5g66510	Gamma-anhidrasa carbónica 3
<i>CAL1</i>	At5g63510	Gamma-anhidrasa carbónica "like" 1
<i>CAL2</i>	At3g48680	Gamma-anhidrasa carbónica "like" 2
<i>GDC P1</i>	At4g33010	Complejo glicina descarboxilasa (subunidad P1)
<i>GGAT</i>	At1g23310	Glioxilato glutamato aminotransferasa
<i>GOX1</i>	At3g14420	Glicolato oxidasa 1
<i>GOX2</i>	At3g14415	Glicolato oxidasa 2
<i>GLYK</i>	At1g80380	Glicerato kinasa
<i>NADHb</i>	At5g08530	NADH binding
<i>PSST</i>	At5g11770	NADH-ubiquinona oxidorreductasa subunidad de 20 KDa
<i>SHMT</i>	At4g37930	Serin hidroximetiltransferasa

TYKY	At1g79010	NADH-ubiquinona oxidoreductasa subunidad de 23 KDa
TYKY2	At1g16700	Subunidad NADH-ubiquinona oxidoreductasa
UBQ 5	At3g62250	Ubiquitina 5

1.2. Abreviaturas

ADP	Adenosin difosfato
AOX	Oxidasa alternativa
ATP	Adenosin trifosfato
BN	Blue Native – Nativo azul
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CA	Anhidrasa carbónica
Cam	Gamma-Anhidrasa carbónica de <i>Methanosarcina thermophila</i>
CAM	Metabolismo ácido de crasuláceas
CCM	Mecanismo de concentración de carbono
CcmM	Proteína de la cianobacteria <i>Synechocystis</i> con alta similitud a CAM
cDNA	DNA copia
Col-0	Ecotipo Columbia (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
Cyt C	Citocromo c
C3	Metabolismo de tres carbonos
C4	Metabolismo de cuatro carbonos
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos fosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
FAD	Flavín adenín dinucleótido oxidado

GC-MS	cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
GGAT	Enzima Glutamato Glioxilato Aminotransferasa
GDC	Complejo enzimático Glicina descarboxilasa
GOX	Enzima Glicolato Oxidasa
H ⁺	Protones
HCO ₃ ⁺	Bicarbonato
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSP60	Proteína de choque térmico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
KCN	Cianuro de potasio
mRNA	RNA mensajero
NADH	Nicotinamín adenina dinucleótido reducido
NAD ⁺	Nicotinamín adenina dinucleótido oxidado
NBT	Nitroazul de tetrazolio
ND _e	NAD(P)H deshidrogenasa externa
ND _i	NAD(P)H deshidrogenasa interna
NH ₄ ⁺	Amonio
O ₂	Oxígeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCRg	PCR genómica
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Enzima Fosfoenolpiruvato carboxilasa
P _i	Fosforo inorgánico
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR	Transcripción reversa seguida de PCR
RubisCO	Enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
SDS	Docecil sulfato de sodio
SHMT	Enzima Serina Hidroximetiltransferasa
UQ	Ubiquinona
γ -CA	Anhidrasa carbónica de tipo gamma
Φ PSII	Rendimiento cuántico del fotosistema II
NPQ	Extinción no fotoquímica
35S	Promotor constitutivo del virus de mosaico del coliflor 35S CaMV

2. Material Biológico

2.1. Plantas

En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio la especie *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia (Col-0).

Se emplearon líneas de mutantes por inserción de T-DNA obtenidas del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)

Mutante	Polimorfismo	Ubicación de la inserción	Resistencia
ca1	SALK_109391	Intrón	Kanamicina
ca2	SALK_010194	Exón	Kanamicina
ca3	Garlic_631_C01.b.1 ^a .Lb3Fa	Exón	BASTA
cal1	SALK_072274	Intrón	Kanamicina
cal2	SAIL_235_F03	Promotor	BASTA

Las líneas SALK poseen resistencia al antibiótico kanamicina (gen *nptII*), y las líneas SAIL son resistentes al herbicida BASTA (gen *bar*).

Dada la ubicación de la inserción de T-DNA en la mutante *cal2* sobre la región del promotor, esta mutante es considerada “knock down”, lo que significa que la expresión del gen interrumpido se encuentra disminuida y

existe la posibilidad de la presencia de cantidades mínimas de la proteína. El resto de las mutantes utilizadas, en cambio, son mutantes “knock out” o nulas, en las cuales la expresión de los genes interrumpidos se encuentra completamente bloqueada y no hay presencia de las proteínas.

2.1.1. Condiciones de Cultivo

El cultivo en placa de Petri de plántulas de *Arabidopsis* se realizó utilizando medio MS (Murashige-Skoog) 4,4 g/l pH 5.7-5.8 y agar 1%. El medio fue suplementado en caso de corresponder con el antibiótico Kanamicina 30 µg/ml, el herbicida BASTA 10 µg/ml y/o sacarosa 3%. Previamente a su siembra, las semillas fueron esterilizadas por cinco minutos en etanol 70%, seguido de un tratamiento de cinco minutos con una solución de hipoclorito de sodio 5%, siempre en agitación. Luego se lavaron cinco veces con agua destilada estéril, incrementando el tiempo de cada lavado de 10 segundos a cinco minutos final. Finalmente, las semillas se sembraron sobre el MS agar resuspendidas en una solución de agarosa 0.15%, a fin de facilitar su distribución sobre las placas. Cada placa fue sellada con cinta hipoalérgica y mantenida durante dos días a 4°C en oscuridad. Posteriormente fueron transferidas a un cuarto o cámara de cultivo con una temperatura de 25°C y el fotoperíodo correspondiente. Las placas fueron posicionadas de forma horizontal o vertical según fuera necesario.

Para el cultivo en maceta, semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en un sustrato compuesto de resaca de río/perlita/vermiculita en proporciones 4:1:1. Las semillas fueron colocadas individualmente sobre el sustrato humedecido con agua corriente. Las bandejas con 24 macetas cada una fueron cubiertas con film se mantuvieron a 4°C en oscuridad durante dos días. Posteriormente, las bandejas se trasladaron a un cuarto o cámaras de cultivo donde las plantas fueron crecidas a 25°C con el fotoperíodo correspondiente. El riego se realizó periódicamente con agua corriente.

Los fotoperíodos utilizados según el experimento a realizar fueron de 16 hs luz / 8 hs oscuridad, de 12 hs luz /12 hs oscuridad, y 8 hs luz / 16 hs oscuridad.

Para el cultivo bajo atmósferas controladas, se utilizó una cámara de cultivo hermética donde fue posible modificar las condiciones atmosféricas (% de CO₂ u O₂), el fotoperíodo, y monitorear la temperatura y la intensidad lumínica. Dicha cámara fue construida en colaboración con el Ing. Gustavo Uicich y el Ing. Esteban Tocci (Facultad de Ingeniería, UNMdP, Argentina) para el cultivo de plantas durante este trabajo.

2.1.2. Cruzas

En plantas mutantes simples adultas en etapa reproductiva, las flores jóvenes aún no abiertas fueron emasculadas para evitar la autopolinización. Se denomina emasculación a la eliminación de los estambres de las flores, sin causar daño al gineceo. De esta manera, posteriormente fue posible hacer una polinización dirigida, es decir, las plantas fueron polinizadas manualmente utilizando el polen de una mutante diferente. Para evitar confusiones, se quitaron las flores de una misma vara floral que no fueron utilizadas para hacer cruzamientos. Pasadas 24 a 48 hs luego de la emasculación, los estigmas de las flores suelen encontrarse receptivos para ser polinizados. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo lupa. En todos los casos se realizaron las cruzas recíprocas, de manera que cada mutante simple fue utilizada como macho en una de las cruzas y como hembra en otra crusa. Cada flor exitosamente polinizada fue marcada y rotulada con su genotipo y el genotipo del polen utilizado. Las plantas continuaron su ciclo de vida hasta la senescencia. Una vez desarrolladas las silicuas, se cosecharon las semillas y se dejaron secar antes de su siembra. Según la herencia mendeliana de la inserción, todos los individuos de la primera generación filial deben ser heterocigotas dobles. La autofecundación de estas plantas generó semillas que posteriormente dieron lugar a la segunda filial. En esta generación se espera una segregación de la mutación, es decir, la ocurrencia de individuos salvajes, mutantes heterocigotas y mutantes homocigotas.

2.2. Bacterias

Para propósitos de clonado y obtención de plásmidos, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue, resistente al antibiótico tetraciclina.

Para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana*, se empleó la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101 pMP90, con resistencia a los antibióticos rifampicina y gentamicina.

2.2.1. Condiciones de Cultivo

Las bacterias se crecieron en placas de Petri con medio LB agar adicionando el antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 hs (*E.coli*) o a 30°C durante 48 hs (*Agrobacterium*).

Para cultivos líquidos se utilizó medio LB con la adición de los antibióticos correspondientes. Los cultivos se incubaron a 37°C (*E.coli*) o 30°C (*Agrobacterium*) en agitación constante.

2.3. Callos y Suspensiones Celulares

Para el establecimiento de callos, se crecieron plántulas durante 10 días en placa de Petri según se describe en la **sección 2.1.1**. Al décimo día de crecimiento, pequeños pedazos de tejido de las plántulas fueron cortados en esterilidad y transferidos a placas de Petri con medio MS 4,4 g/l pH 5.7-5.8 y agar 1%, suplementado con sacarosa 3%, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) 0,5 mg/l y kinetina (N6- furfuriladenina) 0,05 mg/l. Las placas se sellaron con cinta hipoalergénica y se incubaron a 25°C en oscuridad durante un mes. Al cabo de este tiempo, los callos indiferenciados formados se trasladaron a placas con medio fresco, o se transfirieron a medio líquido para el establecimiento de suspensiones celulares. Para el mantenimiento de los callos, estos deben ser trasladados a placas con medio fresco una vez por mes.

Las suspensiones celulares fueron establecidas a partir de callos transferidos a 50 ml de medio de cultivo líquido (MS 4,4 g/l pH 5.7-5.8, sacarosa 3%, 2,4-D 0,5 mg/l, kinetina 0,05 mg/l) en erlenmeyers de 250 ml. Los erlenmeyers se colocaron en oscuridad en un agitador a 125 rpm y

25°C para el crecimiento de las células. Para el mantenimiento del cultivo celular el medio líquido debe ser cambiado cada 7 días. Para obtener mayor cantidad de masa celular, parte de las células de un cultivo crecido fueron trasladadas a nuevos erlenmeyers con medio fresco.

Tanto para el establecimiento de callos como de suspensiones celulares, es de suma importancia mantener estrictas condiciones de esterilidad. Las manipulaciones de callos y células se realizaron siempre en flujo laminar horizontal previamente esterilizado con luz UV.

Algunos de los experimentos con suspensiones celulares, purificación de mitocondrias, geles 2D BN/SDS-PAGE y Western blot (**ver secciones 3.4, 7.2.3, 7.4**) se realizaron durante una estadía en el Institut für Pflanzengenetik, Abteilung Pflanzenproteomik, Leibniz Universität, Hannover, Niedersachsen, Alemania; bajo el proyecto “Caracterización fisiológica y estructural de proteínas mitocondriales específicas de plantas L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (L-GalLDH) y gamma anhidrasas carbónicas (CA)” (Código: DA/09/10), en el marco del Programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCYT) y el Deutsche Akademischer Austausch Dienst (DAAD) de Alemania.

3. Extracciones

3.1. DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico se tomaron hojas pequeñas de plantas de *Arabidopsis* de aproximadamente 100-250 mg y se pulverizaron en nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 1.5 ml utilizando un pilón de plástico. Una vez obtenido un polvo fino, se agregó a cada tubo 400 µl de buffer de ruptura pre-calentado a 65°C. El buffer de ruptura debe ser preparado fresco en el momento mezclando 4 partes de buffer de homogeneización (0.1M NaCl, 0.2M sacarosa, 0.01M EDTA, 0.03M Tris-HCl pH 8) y 1 parte de buffer de lisis (0.2 EDTA, 2.5% (p/v) SDS, 0.5M Tris-HCl pH 9.2). Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 65°C. Se

agregaron posteriormente 133 μ l de acetato de potasio pH 4.7 y se incubó en hielo durante 30 minutos. Pasado este tiempo se agregaron 200 μ l de cloroformo y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 minutos a 14000rpm y la fase acuosa (superior) conteniendo el DNA se transfirió a otro tubo eppendorf limpio. Se agregaron 700 μ l de etanol absoluto y se centrifugó nuevamente a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante se lavó dos veces con etanol 70%. Por último se removió el etanol, se dejó secar el precipitado y posteriormente se resuspendió el DNA en 40 μ l de agua destilada estéril. Se deben esperar al menos 30 minutos para congelar el DNA o utilizarlo como templado en reacciones de PCR.

3.2. RNA total

Para extraer RNA total de tejido vegetal se utilizó la técnica de extracción por el reactivo TRIzol (Invitrogen). Se emplearon aproximadamente 100 mg de tejido como material de partida. Se pulverizaron en nitrógeno líquido en tubos eppendorf de 1.5 ml utilizando un pilón de plástico y se agregó inmediatamente 1 ml de TRIzol total. Luego de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente se agregaron 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente. Los tubos se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa (superior) fue transferida a un tubo limpio. Se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10000rpm durante 10 minutos a 4°C. El precipitado resultante se lavó con etanol 75% (en agua DEPC), y se dejó secar antes de resuspender en 35 μ l de agua DEPC.

La cantidad de ARN extraído se midió utilizando el fluorómetro Qubit (Invitrogen) ó alternativamente midiendo la absorbancia 280 nm en un espectrofotómetro. La calidad del ARN se determinó corriendo 2 μ g de ARN total en geles de agarosa al 1,5% teñidos con SYBR Safe (Invitrogen).

3.3. Proteínas

Se tomaron muestras de tejido de las plantas a analizar (entre 50 y 200 mg) y se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml. Las muestras se

congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se trituraron con un pilón de plástico. A continuación se agregó 0,5 ml de solución de extracción (HEPES 50 mM pH 7.5, KCl 100 mM, Glicerol 10%, Triton X-100 0.1%, DTT 2mM, EDTA 5 mM, PVPP 5%, cóctel de inhibidores de proteasas Pierce 1X) por cada 200 mg de tejido. Se mezcló con vortex por 10 segundos y se centrifugó a 13200 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf limpio y se centrifugó por 4 minutos a 9000 rpm a 4° C. Este paso de limpieza del sobrenadante fue repetido una vez más.

La concentración de proteínas totales se determinó mediante el método de Bradford utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar para la confección de la curva de calibración.

3.4. Mitocondrias

Los aislamientos de mitocondrias a partir de cultivos celulares fueron realizados mediante ultracentrifugación en gradientes discontinuos de Percoll.

El día anterior al aislamiento, se prepararon los gradientes de Percoll. Para esto se utilizaron soluciones de Percoll 18%, 23% y 40%, realizadas con buffer de gradiente (Sacarosa 1.5 M, MOPS 50 mM, pH 7.2). En tubos de ultracentrífuga de 30 ml, se cargaron 9.5 ml de la solución de Percoll 18%, empleando una jeringa y una aguja de una longitud mayor al tubo. Luego se cargaron 9.5 ml de la solución de Percoll 23%, llevando el extremo de la aguja al fondo del tubo y dejando entrar la solución muy lentamente, a fin de evitar la mezcla de las soluciones. De manera similar se cargaron 9.5 ml de la solución de Percoll 40%. Como resultado final, el tubo de gradiente poseía tres capas de 9.5 ml de soluciones de Percoll cada una (la superior de 18%, la media de 23%, y la inferior de 40%), y consecuentemente, dos interfases. La interfase 23% / 40% es donde las mitocondrias quedarán concentradas, en tanto que los peroxisomas migran al final del tubo y los plástidos permanecen en la de 18%. Los gradientes se conservaron refrigerados hasta el día siguiente.

Durante el aislamiento de mitocondrias, todos los procedimientos se realizaron trabajando en frío, en hielo dentro de una cámara a 4°C. El

material de vidrio y plástico utilizado se lavó previamente con etanol, fue enjuagado dos veces con agua bidestilada y mantenido a 4°C hasta su utilización. Para los aislamientos de mitocondrias se empleó la mayor cantidad de material posible. Para lograr esto, la semana previa al aislamiento se maximizó el número de erlenmeyers destinados al crecimiento de los cultivos celulares (**ver sección 2.3**). Para lograr un buen aislamiento de mitocondrias se recomienda partir al menos de 80-100 g de células. Los cultivos celulares fueron filtrados usando un colador de tela y pesados. Se les agregó buffer de ruptura (Sacarosa 450 mM, MOPS 15 mM, EGTA 1.5 mM, PVP 40 6 g/l, BSA 2 g/l, PMSF 0.2 mM, pH 7,4; BSA y PMSF se agregaron justo antes de usar) en proporción 2 ml por gramo de tejido. Las células se procesaron en licuadora, realizando un pulso de 15 segundos a velocidad máxima, seguido de 2 pulsos de 15 segundos a velocidad media. Entre cada pulso, se realizó un período de descanso de 1 min, a fin de reducir el incremento de la temperatura. Luego del procesamiento, se agregó β -Mercaptoetanol a una concentración final de 14.3 mM. Los cultivos procesados se centrifugaron en una centrífuga Sorvall (RC5, rotor GSA-3) por 5 minutos a 2700 xg. Este paso se repitió dos veces más. A continuación, el sobrenadante fue centrifugado nuevamente por 5 minutos a 8300 xg. Estos pasos permitieron eliminar los restos celulares. Posteriormente se sedimentaron las organelas (mitocondrias, plástidos y peroxisomas) centrifugando 10 minutos a 17000 xg. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se resuspendió suavemente en 3 ml de buffer de lavado (Sacarosa 300 mM, MOPS 10 mM, EGTA 1 mM, 0.2 mM PMSF, pH 7.2) utilizando un pincel. Las organelas en suspensión se transfirieron a un homogenizador (Potter) y se disgregaron con dos golpes suaves con el pilón. Este paso se realiza para romper agregados de mitocondrias que después pueden no migrar correctamente en el gradiente de Percoll. Se cargó 1 ml de la suspensión en cada una de los gradientes de Percoll, y a continuación se ultracentrifugó a 70000 xg por 90 min a 4° C. Las mitocondrias se recuperaron de la interfase 23% / 40% utilizando una pipeta Pasteur y se transfirieron a tubos de 30 ml. Se agregó buffer de resuspensión (Manitol 400 mM, EGTA 1 mM, Tricina 10 mM, PMSF 0.2 mM, pH 7.2) hasta

completar el volumen del tubo, y se centrifugó a 14500 xg por 10 minutos a 4°C para lavar y recuperar las mitocondrias. A fin de eliminar los restos de Percoll, este paso de resuspensión y centrifugación se repitió las veces necesarias hasta conseguir un precipitado firme. El volumen de buffer de resuspensión utilizado se fue disminuyendo en cada paso sucesivo. Finalmente, la última centrifugación fue realizada en un tubo eppendorf de 1,5 ml pesado previamente. Se determinó el peso del precipitado y se agregó buffer de resuspensión para lograr una concentración final de 0.1 g de mitocondrias/ml, correspondiente a 10 mg de proteína mitocondrial/ml. Se considera que el 10% del peso de las mitocondrias corresponde a proteínas. El resuspendido se dividió en alícuotas de 100 µl (1 mg de proteína mitocondrial) en tubos eppendorf. Se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80° C hasta su utilización.

Los aislamientos de mitocondrias a partir de tejido verde fueron realizados mediante ultracentrifugación en gradientes continuos de Percoll. En este caso, los gradientes se forman a partir de 23 ml de una solución de Percoll 50% realizada en buffer Percoll (sacarosa 0.3 M, TES 10 mM, EDTA 1 mM, KH_2PO_4 10 mM, glicina 1 mM, pH 7.5), durante la ultracentrifugación a 24000 rpm durante 40 minutos a 4°C.

La parte aérea de plantas de *Arabidopsis* de no más de cuatro semanas de edad fueron cosechadas antes del amanecer. Idealmente, al menos 100 g de tejido debe ser utilizado por aislamiento. Todos los procedimientos se realizaron trabajando en frío, en hielo dentro de una cámara a 4°C. Las plantas se colocaron en el vaso de una licuadora y 3/4 del volumen ocupado por ellas se llenaron con buffer de ruptura (sacarosa 0.3 M, TES 60 mM, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 25 mM, KH_2PO_4 10 mM, EDTA 2 mM, glicina 1 mM, PVP40 1%, BSA 1%, ascorbato de sodio 50 mM, cisteína 20 mM, pH 8). Se rompió el tejido con 3 pulsos de 4-5 segundos alternando con pausas de 1 minuto. El homogenato resultante se filtró con varias capas de Miracloth (CALBIOCHEM) y el líquido filtrado se reservó en un vaso de precipitados. El material sólido retenido en el Miracloth se transfirió a un mortero y se procesó durante 10 minutos continuados. Este nuevo homogenato se filtró con varias capas de Miracloth limpio y el líquido filtrado se adicionó al

líquido reservado anteriormente. El material sólido se desechó. El líquido filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C para sedimentar las organelas. El precipitado se resuspendió cuidadosamente con un pincel en 4 ml de buffer de lavado (sacarosa 0.3 M, TES 10 mM, KH_2PO_4 10 mM, pH 7.5). Las organelas en suspensión se disgregaron con un homogenizador (Potter). Se sembró 1ml de extracto en cada uno de los gradientes previamente preparados y refrigerados. Se centrifugaron a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. Las mitocondrias quedan ubicadas en una zona blanquecina en la parte inferior del gradiente, mientras que los cloroplastos forman una banda verde claramente distinguible en la parte superior. Las mitocondrias se recolectaron utilizando una pipeta Pasteur y se transfirieron a tubos de 30 ml. Se agregó buffer de lavado hasta completar el volumen del tubo, y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C para lavar los restos de Percoll y recuperar las mitocondrias. Este paso de resuspensión y centrifugación se repitió las veces necesarias hasta conseguir un precipitado firme. Se determinó el peso del precipitado y se resuspendió en buffer de lavado para lograr una concentración final de 0.1 g de mitocondrias/ml, correspondiente a 10 mg de proteína mitocondrial/ml. El resuspendido se alicuotó en tubos eppendorf (100 μl , 1 mg de proteína mitocondrial). Se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80° C hasta su utilización.

En ciertas ocasiones el aislamiento completo de mitocondrias no resultó necesario y se optó por realizar extractos crudos enriquecidos en mitocondrias. Para esto, se realizó la primera parte de los protocolos anteriormente descritos y se trabajó con los extractos obtenidos sin someterlos a separación en gradientes de Percoll.

Opcionalmente, también se prepararon extractos de membranas totales; procedimiento que ofrece la ventaja de utilizar poca cantidad de tejido como material de partida. Durante esta preparación, 150-200 mg de hojas de *Arabidopsis* fueron congelados en nitrógeno líquido y procesados en tubos eppendorf con un pilón de plástico. Se agregaron 2 ml de buffer de

extracción (MOPS 75mM pH7.5, sacarosa 0.6 M, EDTA 4 mM, cisteína 8 mM, BSA 0.2%, PVP40 0.2%, PMSF 40 µg/ml). El homogenato resultante se filtró a través de Miracloth mediante una jeringa de 5 ml. El líquido filtrado se centrifugó a 1300 xg por 4 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y fue centrifugado a 22000 xg por 10 min a 4°C. El precipitado se lavó con 2 ml de buffer de lavado (MOPS 10 mM pH 7.2, sacarosa 300 mM) centrifugando 5 minutos a 22000 xg a 4°C. Cada precipitado conteniendo las membranas totales se resuspendió en 200 µl de buffer de lavado y se almacenó a -80°C.

4. Vectores y Clonado

Para generar la construcción que permitió complementar mutantes dobles con la versión salvaje del gen CA2, DNA genómico se extrajo según se detalla en la **sección 3.1**. La secuencia genómica del gen CA2 a partir del inicio de la transcripción fue amplificada mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos (**ver sección 6.**). El producto de PCR fue posteriormente clonado en el vector pENTR/TOPO (Invitrogen; <http://www.lifetechnologies.com/ar/es/home/brands/invitrogen.html>), y se verificó la secuencia. El plásmido resultante (pENTR-gCA2) fue sometido a la reacción de recombinación LR (Gateway) utilizando el vector de destino V032pH7FWG2 (Grefen et al., 2010).

Para el diseño de microRNAs artificiales (amiRs) para silenciar los genes CA se utilizó la herramienta en línea WMD (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>). Dado que los amiRs pueden generarse de modo que impacten sobre varios transcritos con homología, se crearon un amiR contra los genes CAL1 y CAL2 (denominado AmiRCALs) y un amiR contra los genes CA1 y CA3 (denominado AmiRCAs). Para ambas construcciones, se partió de un precursor de microRNA conocido de *A.thaliana* (miR319a) y se realizó una mutagénesis dirigida por PCR utilizando cuatro oligonucleótidos específicos (I a IV) según los genes a silenciar y dos oligonucleótidos (A y B) del vector NB47 donde el precursor

miR319a se encuentra clonado (**ver sección 6.1**). Utilizando como templado el vector NB47 se realizaron tres reacciones de PCR diferentes con las combinaciones de oligonucleótidos A-IV, III-II y I-B con las condiciones detalladas en la sección 6. Esta estrategia se encuentra esquematizada en la **Figura 9 (Resultados I)** de este trabajo. Los productos de PCR obtenidos se utilizaron como templado de una cuarta reacción de PCR con la combinación de oligonucleótidos A-B. Este producto de PCR fue clonado en el vector TOPO-Blunt (Invitrogen) para su amplificación y secuenciación. El producto final es un amiR que se procesa igual que el miR319a pero que ahora es capaz de silenciar los genes CA. Una vez verificada la secuencia, se subclonó en el vector binario pCHF3 (con origen de replicación para *E.coli* y *A. tumefaciens*). Este vector posee el promotor constitutivo del virus de mosaico del coliflor 35S CaM, el terminador del gen *RBCS* de poroto y el gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Estos elementos están contenidos entre las secuencias del extremo del T-DNA de *Agrobacterium*, denominadas LB (left border, extremo izquierdo), y RB (right border, extremo derecho). El vector pCHF3 confiere resistencia al antibiótico espectinomicina en bacterias.

5. Transformaciones

5.1. Bacterias

Para obtener bacterias electrocompetentes de *E.coli* y de *A.tumefaciens*, colonias frescas crecidas en placa se repicaron en 3 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Estos cultivos se crecieron durante una noche (*E.coli* a 37°C, *A.tumefaciens* a 30°C) en agitación. Al día siguiente, los 3 ml de cultivo fueron transferidos a erlenmeyers con 300 ml de medio LB fresco que se incubaron con agitación constante hasta alcanzar una OD de 0.6-1. Los cultivos se centrifugaron por 5 minutos a 4000 rpm para sedimentar las bacterias. A continuación, se realizaron dos ciclos de resuspensión en agua destilada estéril y fría seguido de una centrifugación de 5 minutos a 4000 rpm. Las bacterias se resuspendieron en una solución de glicerol 10% en agua

destilada estéril y fría. Tras una centrifugación de 5 minutos a 4000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregaron 3 ml de solución glicerol 10% en agua destilada estéril y fría, donde las bacterias fueron finalmente resuspendidas, y guardadas en alícuotas de 50 μ l a -80°C hasta su utilización.

Para la transformación de bacterias por electroporación, se mezclaron como máximo 40 ng de DNA (ya sea proveniente de una ligación o de una mini-preparación de DNA plasmídico) con 50 μ l de bacterias electrocompetentes. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad) fría, y a continuación se aplicaron 2.5 kV empleando el electroporador *E.coli* pulser (Bio-Rad). Inmediatamente se agregó 1 ml de medio LB a la cubeta, se mezcló por inversión y se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Las células se incubaron por una hora en agitación (*E.coli*, a 37°C ; *A.tumefaciens* a 30°C) para su recuperación del impacto eléctrico. Este período también permite que las bacterias expresen los genes de resistencia del plásmido con el que se transformaron. Por último, las bacterias se sembraron en medio LB sólido con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C por 24 hs (*E.coli*) o a 30°C por 48 hs (*A.tumefaciens*).

5.2. Plantas

La metodología empleada para la transformación de plantas de *Arabidopsis* es denominada “floral dip”, o inmersión floral. Las inflorescencias de plantas adultas se cortaron tres veces consecutivas espaciadas por 4 días, con el objeto de forzar la producción de un mayor número de inflorescencias secundarias. De 4 a 6 días después del último corte, las plantas se encuentran en su estado óptimo para ser transformadas, ya que poseen un gran número de flores inmaduras y pocas silicuas fertilizadas. A fin de lograr que el sustrato esté seco al momento de transformar, las plantas dejaron de ser regadas 4 días antes de la inmersión floral. Dos días antes de la transformación se procedió a obtener el cultivo de *A.tumefaciens* necesario para transformar las plantas. Para esto, se

transfirió una de las colonias aisladas en medio LB sólido transformada con el plásmido binario de interés a 3 ml de medio LB líquido adicionado con los antibióticos correspondientes. Este cultivo se creció durante una noche a 30°C en agitación y se transfirió luego a un erlenmeyer con 300 ml de medio LB fresco con los antibióticos correspondientes. Este nuevo cultivo creció durante otra noche a 30°C en agitación constante. Al otro día, las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos y resuspendidas en 250 ml de medio de inmersión (sacarosa 50 g/l, Silwet L-77 50 µl/l). Las bacterias en medio de inmersión se colocaron en un vaso de precipitado suficientemente grande como para poder sumergir las macetas. Se emplearon 250 ml de medio de inmersión cada 4 macetas con plantas listas para transformar. Se sumergieron todas las inflorescencias de cada planta durante 10 segundos. Las macetas se colocaron horizontalmente en una bandeja sellada con film transparente. Esto da como resultado la generación de una cámara húmeda que incrementa la eficiencia de transformación. Las plantas se mantuvieron de esta manera durante un día y posteriormente las macetas fueron devueltas a su posición y condiciones de cultivo normales. Por último, terminado el ciclo de vida de las plantas, se cosecharon las semillas. Para la selección de semillas transformantes, se sembraron aproximadamente entre 500 a 800 semillas en medio MS sólido suplido con el agente de selección correspondiente. Las plántulas capaces de desarrollar hojas verdaderas fueron transferidas a placas nuevas de medio MS con el agente de selección para descartar falsos positivos. Luego de una semana, las plantas sobrevivientes se transfirieron a tierra y se sometieron a análisis para determinar la presencia del transgén de interés, mediante PCR genómica y/o RT-PCR.

6. PCR

Las reacciones en cadena de la DNA polimerasa se realizaron con las condiciones estandarizadas. Durante este trabajo se utilizó principalmente la enzima Go Taq (Promega). La mezcla de reacción incluyó: 2 µl buffer Go taq 5X, 1 µl dNTPs 2mM, 0.3 µl oligonucleótido fw 10 pmoles/µl, 0.3 µl

oligonucleótido rv 10 pmoles/ μ l, 0.2 μ l Go Taq, 1-2 μ l templado, agua destilada estéril para completar un volumen final de reacción de 10 μ l. El programa utilizado fue: 94°C, 2 minutos de desnaturalización inicial; 94°C, 50 segundos de desnaturalización; 50-55°C, 30 segundos de hibridación; 72°C, 1 minutos de elongación; 72°C, 10 minutos de elongación final.

En los casos en los que los productos de PCR iban a ser utilizados para la confección de alguna construcción, se utilizó la DNA polimerasa Pfu (Promega), ya que posee capacidad de control de calidad, lo cual contribuye en gran medida a reducir la probabilidad de que se incorpore un nucleótido erróneo durante la reacción.

6.1. Oligonucleótidos

A continuación, se muestra una lista de los oligonucleótidos empleados en el presente trabajo y su finalidad.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
CA1 DNAg fw	ATC TCG AGA TGG GAA CCC TAG GCA	PCRg
CA1 DNAg rv	CAC ACC ACC TCC AAT ACT TTC AGC C	PCRg
CA1 cDNA fw	ATT CTA GAA TGG GAA CCC TAG GCA	RT-PCR
CA1 cDNA rv	TTT CCC GGG GTT CAC ATT AGA AGG ACG	RT-PCR
CA2 fw	CAC TCG AGA TGG GAA CCC TAG GA	PCRg y RT-PCR
CA2 rv	TCA GAG TAG GTA GAA CCT TGC CA	PCRg y RT-PCR
CA3 DNAg fw	GCC TCG AGA TGA ATG TTT TTG AC	PCRg
CA3 rv	ATC TCG AGT CAA GCT GCT TTT GGT	PCRg y RT-PCR
CA3 cDNA fw	ATA CAT ATG AGG CAC CGC ACA CTC	RT-PCR
CAL1 fw	CGT CGA CGG ATC TTG TGA A	PCRg y RT-PCR
CAL1 rv	GAG CCG GAC TTG TTT TGA TGT T	PCRg y RT-PCR
CAL2 DNAg fw	ATG TTG CGA GCC AGT TGT TAG	PCRg
CAL2 DNAg rv	AGC ATG AAC AAC ACA CCG TTC	PCRg
CAL2 cDNA fw	TTC TCG AGA TGG CGA CTT CGT TA	RT-PCR
CAL2 cDNA rv	TTC TCG AGC TAG ATG GCG ATT CC	RT-PCR
T-DNA LBb1.3	ATT TTG CCG ATT TCG GAA C	PCRg
T-DNA SynLB1	GCC TTT TCA GAA ATG GAT AAA TAG CCT TGC TTC C	PCR genómica
Act fw	AAT CTC CGG CGA CTT GAC AG	RT-PCR
Act rv	AAA CCC TCG TAG ATT GGC ACA G	RT-PCR

CA1 qPCR fw	TTC CG AGA ACA ACT GTC AAG GC	qPCR
CA1 qPCR rv	ACG ATC CTC TTC CAA TGT GAA CG	qPCR
CA2 qPCR fw	CAG GAT TGA TTC TCT GGA AGG	qPCR
CA2 qPCR rv	TCT GCA AAT TGT TCC TCG AA	qPCR
CA3 qPCR fw	TTG ATT TCC TGC TTC TCC AA	qPCR
CA3 qPCR rv	ATG AAT GCC TTT AAG CCG AA	qPCR
CAL1 qPCR fw	GGC AAT CCA GCA AGA TTC A	qPCR
CAL1 qPCR rv	TTG ATG GCT ACA GCG AGT TT	qPCR
CAL2 qPCR fw	CGC CGC GGA AGC AGT A	qPCR
CAL2 qPCR rv	GTC ACC TGC GAT TTC GGT TT	qPCR
PSST fw	GAC CTT TGG TCT CGC TTG CT	qPCR
PSST rv	GCG AGG ACT AGG CCT GAA GA	qPCR
TYKY fw	GAA GAT GGA AGC CGC AGA AC	qPCR
TYKY rv	TTC AAC GAT TGC ATC AAC GG	qPCR
TYKY2 fw	GAA GAT GGA AGC CGC AGA AC	qPCR
TYKY2 rv	GTC CTT CCA CGA TTG CAT CA	qPCR
NADHb fw	GAT TCT TGG CTT GCA AAG GG	qPCR
NADHb rv	TGG AGT GGT GGA AGT GGA TG	qPCR
GOX1 fw	AGA ACA GCA GCA ACA CAG AAC	qPCR
GOX1 rv	CAC TAG GCT TGG TTT GTG ATC TGA TA	qPCR
GOX2 fw	ATA TCT CGA AAA ACT TGT TTC TCC CTA TAT	qPCR
GOX2 rv	ATC TAT TGT ACA AGC AAT AAG AAT AAA CGG	qPCR
GGAT fw	TGC CCT CAG CCC TAA TGT CT	qPCR
GGAT rv	CCA TCT GTC ATG AGC CTT GC	qPCR
GDC P1 fw	TGT CTC TGC ACA CGG TAC AA	qPCR
GDC P1 rv	TTG TCT TTG TTG GCT TCT GC	qPCR
SHMT1 fw	CTG GTG CAA GTG CTT ATG CT	qPCR
SHMT1 rv	AAA CCA CTG ATG TGT GCC AT	qPCR
GLYK fw	TCC TCA AGG ATG TGG CAA GA	qPCR
GLYK rv	CTC AAT TCA GCC TGG CCT TC	qPCR
UBQ5 fw	AAG GTT CAG CGT TTG AGG AAG G	qPCR
UBQ5 rv	TCT TTC TGG TAA ACG TAG GTG AGT C	qPCR
ACT2 qPCR fw	GCC ATC CAA GCT GTT CTC TC	qPCR
ACT2 qPCR rv	GAA ACC CTC GTA GAT TGG CA	qPCR
gCA2 fw	CAC CGG ACT ATT TCC GGA TTT AGG C	Clonado
gCA2 rv	GAA GAT TAA TCC AAC TTG	Clonado

A CHF3 fw	CAT TTC ATT TGG AGA GAA CAC G	amiRs
B CHF3 rv	CGA AAC CGA TGA TAC GAA CG	amiRs
I amiRCALs	GATTTAGTATTGAGTGTTGACCCTCTCTCTTTGTATTCC	amiRs
II amiRCALs	GAGGGTCAACACTCAATACTAAATCAAAGAGAATCAATGA	amiRs
III amiRCALs	GAGGATCAACACTCATTACTAATTCACAGGTCGTGATATG	amiRs
IV amiRCALs	GAATTAGTAATGAGTGTTGATCCTCTACATATATATTCCT	amiRs
I amiRCAs	GATGTCCTGAATATTAGTGCCAGTCTCTCTTTGTATTCC	amiRs
II amiRCAs	GACTGGCACTAATATTCAGGACATCAAAGAGAATCAATGA	amiRs
III amiRCAs	GACTAGCACTAATATACAGGACTTCACAGGTCGTGATATG	amiRs
IV amiRCAs	GAAGTCCTGTATATTAGTGCTAGTCTACATATATATTCCT	amiRs

6.2. PCR genómica

Las reacciones de PCR genómica (PCRg) fueron realizadas con la enzima Go Taq, utilizando la mezcla de reacción y el programa anteriormente descritos. Se utilizaron 1 µl de DNA genómico diluido 1/10 como templado para cada reacción y un programa de 40 ciclos. La PCR genómica tuvo como objetivo evaluar la identidad de plantas mutantes mediante el análisis de la presencia de la correspondiente inserción de T-DNA. Para esto se utilizaron oligonucleótidos derivados de la secuencia del borde del T-DNA y una región interna de cada uno de los genes a evaluar.

6.3. RT-PCR

La transcripción reversa (RT) se realizó a partir de ARN total, extraído como se detalló en la **sección 3.2**. Se mezclaron 1-2 µg de ARN total con 0,6 µg de oligonucleótidos al azar (Random primers, Biodynamics), y se incubó durante 10 min a 70° C. Una vez transcurrido este tiempo, los tubos se transfirieron inmediatamente a hielo y se incubaron durante 10 min. Luego se agregó una mezcla de reacción conteniendo los siguientes reactivos: transcriptasa reversa ImProm II (10 U, Promega), buffer ImProm II (1X), dNTPs (0.5 mM de cada uno), MgCl₂ (1.5 mM), inhibidor de proteasas RNasin (20 Unidades). Se incubó a 25° C por 5 minutos para permitir el apareamiento de los oligonucleótidos al azar, y luego se realizó una incubación de una hora a 42° C para permitir la transcripción reversa.

Finalmente se realizó una incubación de inactivación a 70°C durante 15 minutos. El cDNA obtenido se utilizó como templado para reacciones de PCR diluido 1/10.

Las reacciones de PCR luego de la transcripción reversa (RT-PCR) se realizaron utilizando la mezcla de reacción y el programa anteriormente descritos. Se utilizaron 2 µl de cDNA 1/10 como templado por cada tubo de reacción y oligonucleótidos específicos para evaluar la expresión de los genes correspondientes. Un programa de 35 ciclos se utilizó para el análisis de la expresión de los genes *CAL1* y *CAL2*; mientras que para el análisis de los genes *CA1*, *CA2* y *CA3* fue necesario un programa de 40 ciclos.

6.4. qRT-PCR

Las extracciones de RNA total fueron realizadas según se describe en la **sección 3.2**. Adicionalmente, las muestras fueron tratadas con la enzima DNasa RQ1(Promega) según las instrucciones del proveedor. La síntesis de cDNA se llevó a cabo como se detalla en la **sección 6.3**. Las muestras fueron usadas en las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando la mezcla de reacción SYBR Green PCR y el sistema Step-One (Applied Biosystems; <http://www.lifetechnologies.com/ar/es/home/brands/applied-biosystems.html>). Los oligonucleótidos utilizados para cada reacción están detallados en la **sección 6**. Se utilizaron como genes constitutivos los genes *UBQ5* y *ACT2*.

7. Electroforesis

7.1. Geles de Agarosa

Para la separación de muestras de ácidos nucleicos, se utilizaron geles de agarosa 1% preparados en buffer TBE (Tris 0.1 M, ácido bórico 0.1 M, EDTA 0.02 M pH 8). La agarosa se fundió calentando en microondas, y una vez disuelta totalmente, se dejó enfriar unos minutos para agregar SYBR safe (Invitrogen) en una dilución 1:10000. Se mezcló por agitación y se vertió en una cama de acrílico conteniendo un peine para generar las calles

necesarias para sembrar las muestras. Se dejó solidificar el gel y se colocó en una cuba electroforética (Bio-Rad), se utilizó buffer de corrida TBE. Las muestras provenientes de reacciones de PCR realizadas con la enzima Go Taq se sembraron sin la necesidad del agregado de buffer de siembra, ya que la mezcla de reacción ya contiene componentes que facilitan la siembra y permiten visualizar el frente de corrida. Las muestras de otros orígenes fueron previamente mezcladas con buffer de siembra (glicerol 40%, xilene cianol 0.025% y azul de bromofenol 0.025%). La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 100v. El gel se visualizó en transiluminador de luz azul y se fotografió con el equipo G-Box (Syngene) o alternativamente utilizando la cámara fotográfica Coolpix P80 (Nikon).

7.2. Geles de Poliacrilamida

7.2.1. SDS-PAGE

Para armar y correr geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) se empleó la unidad de mini-geles verticales SE 260 (GE Healthcare), en todos los casos geles de 10 cm x 10.5 cm x 0.75 mm. Las soluciones empleadas para preparar los geles fueron las descritas previamente (Laemmli, 1970). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 120v.

7.2.2. 1D BN-PAGE

La particularidad de los geles BN (blue native, nativo azul) es que permiten separar complejos multiproteicos o proteínas en su estado nativo. En estos geles se reemplaza el uso del detergente SDS por el colorante azul Coomassie G-250, el cual cumple la función de otorgar carga negativa a las proteínas sin las propiedades desnaturalizantes del SDS. De esta manera las proteínas y complejos multiproteicos son separados en base a su tamaño y forma en condiciones nativas. Los geles 1D BN-PAGE y 2D BN/SDS-PAGE se armaron y corrieron en un equipo PROTEAN II xi cell (Bio-Rad), con vidrios de 18 cm x 20 cm y separadores de 1 mm o 1.5 mm. Los geles BN-PAGE fueron armados creando un gradiente de acrilamida

de 4.5% a 16%. De esta manera se pueden separar y visualizar complejos multiproteicos de 1500 kDa hasta proteínas monoméricas de bajos pesos moleculares (50 kDa). El gradiente se generó empleado un mezclador de soluciones con dos cámaras, donde se colocaron 21 ml de la solución de acrilamida 4.5% de en una cámara y 18.5 ml de la solución de acrilamida 16% en la otra. La solución de acrilamida 4.5% contenía: acrilamida (Sigma) 4.5%, ácido aminocaproico 0.25 M, Bis-Tris 25 mM, TEMED 0.45 μ l/ml, APS 0.045%. La solución de acrilamida 16% estaba compuesta de: acrilamida 16%, ácido aminocaproico 0.25 M, Bis-Tris 25 mM, glicerol 20%, TEMED 0.33 μ l/ml, APS 0.033%. Con la ayuda de una bomba peristáltica se cargaron, mediante un sistema de mangueras y aguja, aproximadamente 3 ml de la solución de 4.5% por la parte inferior de los vidrios armados empleando separadores de 1.5 mm de espesor. Luego, se permitió que la solución de la cámara de acrilamida 16% ingresara paulatinamente en la otra cámara y se mezclara con la solución de acrilamida 4.5%. La totalidad de las soluciones fueron cargadas entre los vidrios de esta manera. Así, la parte superior del gel corresponde a la concentración de 4.5% de acrilamida, aumentando gradualmente hacia la parte inferior. Para evitar la polimerización de las soluciones antes de que el gradiente este completamente formado, toda esta etapa se realizó dentro de una cámara fría a 4°C. Una vez terminada la carga, el gel se incubó a 37°C durante 45 minutos para permitir la polimerización. Polimerizado el gradiente, se cargó el gel de apilamiento (acrilamida 4%, ácido aminocaproico 0,25 M, Bis-Tris 25 mM, TEMED 0,45 μ l/ml, APS 0,045%) en la parte superior. Se insertó el peine correspondiente y se dejó polimerizar. A continuación se armó la cuba para realizar la corrida. En la cámara del ánodo se usó un buffer Bis-Tris 50 mM pH 7, en tanto que el buffer cátodo que se empleó estaba compuesto de Tricina 50 mM, Bis-Tris 15 mM, Coomassie G-250 0.02%, pH 7. Luego de agregar 1.2 L de buffer ánodo y 350 ml de buffer cátodo, se sembraron las muestras previamente preparadas. Los geles BN-PAGE fueron utilizados durante este trabajo para separar en forma nativa los complejos multiproteicos que componen la cadena respiratoria mitocondrial. Las mitocondrias aisladas según se describe en la **sección 3.4.** fueron solubilizadas con el detergente no iónico

digitonina. Este detergente permite una buena separación de complejos y supercomplejos mitocondriales (Eubel et al., 2003). Alícuotas de 100 μ l de mitocondrias purificadas (1 mg de proteínas totales) se centrifugaron a 13500 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó, y las mitocondrias sedimentadas fueron resuspendidas en 100 μ l de buffer de solubilización (HEPES 30 mM, acetato de potasio 150 mM, glicerol 10%, digitonina 5%, pH 7.4). Se incubó durante 20 minutos en hielo. Luego se volvió a centrifugar 10 minutos a 13500 rpm a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Este sobrenadante contiene las proteínas mitocondriales totales, tanto las solubles como las proteínas de membrana solubilizadas. A continuación las muestras se mezclaron con 5 μ l de buffer de carga azul (ácido aminocaproico 750 mM, coomassie G-250 5%). Luego las proteínas se sembraron en el gel. La corrida se realizó dentro la cámara fría, en una primera etapa de precorrida a 100v por 45 minutos, seguida de 16 hs a 15 mA por mm de espesor de gel, limitando el voltaje a 500v. Una vez corrida la primera dimensión el gel puede ser teñido según se detalla en la **sección 7.3**, o bien las calles pueden ser cortadas y utilizadas para la corrida de una segunda dimensión.

7.2.3. 2D BN/SDS-PAGE

Una vez que se han separado los complejos multiproteicos mediante BN-PAGE, cada uno de estos complejos puede ser a su vez disgregado en sus correspondientes subunidades en una segunda dimensión desnaturizante. Completada la primera dimensión (1D BN-PAGE), se cortaron aquellas calles del gel que resultaron de interés y se incubaron por 30 minutos en una solución que contiene SDS 1% y β -Mercaptoetanol 1% a temperatura ambiente. Luego, la calle se lavó por 1 minuto en agua destilada y se colocó entre dos vidrios en la parte superior utilizando separadores de 1 mm para armar el segundo gel de poliacrilamida. Por los espacios que quedaron entre la calle y los separadores en la parte superior, se cargaron las soluciones de acrilamida. Primero se agregaron 25 ml de solución de gel de resolución (acrilamida 16%, Tris 1 M, SDS 0.1%, glicerol 12%, TEMED 0.33 μ l/ml, APS 0.033%). Inmediatamente se agregaron cuidadosamente, 5 ml de solución de gel de separación

(acrilamida 10%, Tris 1 M, SDS 0.1%, TEMED 0.33 μ l/ml, APS 0.033%). Se dejó polimerizar 1 hora a 37°C. Luego se agregó la solución del gel de apilamiento (acrilamida 10%, ácido aminocaproico 0.25 M, Bis-Tris 25 mM, glicerol 10%, SDS 0.1%, TEMED 0.8 μ l/ml, APS 0.08%), evitando que queden burbujas en la parte inferior de la calle recortada proveniente de la primera dimensión. En la cuba de corrida, la cámara de ánodo se llenó con 1.5 L de buffer ánodo (Tris 0.2 M, pH 8.9), en tanto que en el cátodo se colocaron 350 ml de buffer cátodo (Tris 0.1 M, tricina 0.1 M, SDS 0.1%, pH 8.25). La corrida electroforética se realizó a temperatura ambiente durante 18-20 hs a 30 mA por gel y voltaje limitado a 500v.

Los geles 2D BN/SDS-PAGE fueron teñidos por alguna de las técnicas descriptas en la **sección 7.3**, o transferidos a membranas para realizar hibridaciones con anticuerpos según se encuentra detallado en la **sección 7.4**.

7.3. Tinciones

7.3.1. Coomassie Blue Coloidal

El día anterior a realizar el procedimiento, se preparó la solución de tinción mezclando 98% v/v de solución A (H_3PO_4 (85%) 2% p/v, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10% p/v) con 2% v/v de solución B (Coomassie G-250 5% p/v). La solución de tinción así preparada se mantuvo en agitación durante toda la noche. Al día siguiente el gel a teñir se colocó durante dos horas en solución de fijación (metanol 40%, ácido acético 10%). Se descartó la solución de fijación y a continuación se incubó el gel con la solución de tinción, a la cual se le agregó, justo antes de usar, metanol (concentración final 20% v/v). El gel se incubó al menos durante 24 hs en agitación. Posteriormente, se descartó la solución de tinción y se lavó con agua destilada hasta que las bandas de proteína fueran fácilmente visibles. Para obtener la imagen de los geles, se utilizó un escáner.

7.3.2. Tinción de Plata

Todos los recipientes a utilizar fueron previamente lavados con detergente, luego etanol, seguido de tres enjuagues con agua destilada. Durante todo el proceso se emplearon guantes, los cuales fueron lavados antes de tocar

los geles de la misma forma que todo el resto del material. El gel fue fijado durante dos horas en solución fijadora (metanol 50%, ácido acético 10%) en agitación. A continuación se incubó durante dos horas en solución de incubación (etanol 30%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.2%, acetato de sodio 0.8 M, glutaraldehído 25%). Se realizaron tres lavados en agua destilada de 20 minutos cada uno. La tinción se llevó a cabo por incubación durante 30 minutos en solución de plata (AgNO_3 0.1%, formaldehído 0.01%). Se lavó durante no más de 1 minuto en agua destilada, y se incubó en solución de revelado (Na_2CO_3 2.5%, formaldehído 0.01%, pH 10.9 ajustado con NaHCO_3) hasta lograr la coloración deseada. La reacción se detuvo en EDTA 0.05 M. Los geles fueron digitalizados con un escáner.

7.3.3. Tinción de actividad NADH

En los geles BN pueden realizarse tinciones de actividad enzimática. Esta tinción evidencia la actividad del complejo I. Inmediatamente después de la corrida electroforética, los geles nativos fueron lavados en agua destilada durante 10 minutos. Es este tipo de tinción los geles no son fijados. La solución de tinción debe ser preparada al momento de ser utilizada (Tris-HCl 0.1M pH 7.4, NADH 0.14 mM, NBT 1mg/ml). Los geles se incubaron en solución de tinción en agitación hasta que las bandas o puntos de actividad se hicieron visibles. El tiempo de tinción necesario varía según la cantidad de proteína y el tipo de gel. Para los geles 1D BN-PAGE el tiempo utilizado fue de aproximadamente 15 minutos. La duración exacta de cada tinción fue contabilizada y repetida estrictamente en geles que debían ser comparados entre sí. La reacción se detuvo fijando el gel (metanol 40%, ácido acético 10%). Los geles fueron escaneados.

7.4. Western blot

La transferencia de proteínas se realizó a membranas de nitrocelulosa. Se cortaron la membrana y porciones de papel de transferencia al tamaño del gel, y se pusieron a incubar junto con el gel a transferir en buffer de transferencia (Tris 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%) durante 1 minuto. Se utilizó un equipo de transferencia líquida, cuya cámara se llenó con aproximadamente 3L de buffer de transferencia. El gel, la membrana y los

papeles fueron acomodados quitando todas las burbujas atrapadas. La transferencia se realizó durante toda una noche a 120 mA a temperatura ambiente. Una vez completada la transferencia, la membrana fue incubada en solución TTBS (Tri-HCl 2M, pH7.4, Tween 20 10%, NaCl 5M) por 30 minutos. El anticuerpo primario correspondiente fue disuelto en TTBS y la membrana fue incubada en esa solución toda la noche en agitación. Durante este trabajo se utilizó el anticuerpo policlonal disponible en el laboratorio anti-ALLCA, que reconoce todas las proteínas CA. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces de 10 minutos cada una con solución TTBS. El anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano fue preparado también en solución TTBS y esta solución se utilizó para incubar la membrana por 2 hs en agitación. La membrana se lavó nuevamente tres veces de 10 minutos cada una con solución TTBS. Para revelar se utilizó el kit ABC Vectastain (Vector Labs) y una solución de revelado compuesta por Tris-HCl 100 mM pH 7.4, DAB 0.05%, NiCl_2 0.05% p/v, H_2O_2 0.015%. El revelado se detuvo con agua destilada. La membrana se dejó secar antes de ser escaneada.

8. Ciclo de Vida. Radio Máximo de la roseta. Peso fresco y peso seco

Para realizar el seguimiento y evaluar el fenotipo de plantas de *Arabidopsis*, se realizaron observaciones periódicamente durante 20 días en placas de Petri y durante un ciclo de vida completo en maceta según se detalla en Boyes et al. (2001). El radio máximo de la roseta de plantas de *Arabidopsis* fue determinado midiendo el largo de la hoja más larga. Las partes aéreas de plantas de *Arabidopsis* se pesaron en balanza digital inmediatamente después de ser cosechadas para determinar su peso fresco. Los valores de peso seco se obtuvieron secando en una estufa a 100°C las partes aéreas de plantas de *Arabidopsis* durante 24 hs.

9. Consumo de Oxígeno

La determinación del consumo de oxígeno se realizó utilizando el equipo Oxygraph (Hansatech) equipado con una cámara DW1/AD para medidas en fase líquida (cultivos celulares) y con la cámara LD2/3 para medidas en fase gaseosa (hojas de *Arabidopsis*). El equipo cuenta con un electrodo S1 tipo Clark y una unidad de control con la cual es posible acoplar el electrodo a una computadora para realizar las medidas. Se utilizó el programa Oxygraph Plus (Hansatech) para calibrar el electrodo y registrar los datos según las instrucciones del proveedor.

Las plantas destinadas a la medición de consumo de oxígeno se incubaron durante 3 hs en oscuridad y se tomaron aproximadamente 200 mg de hojas. Se registró el peso exacto de las hojas y se colocaron en la cámara LD2/3. Se tomó el nivel de O₂ durante 10 min, y con estos datos se calculó la velocidad de consumo de O₂ (en nmol de O₂ consumido x min⁻¹), y se relativizó al peso fresco (nmol de O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹).

10. Asimilación de carbono y análisis de fluorescencia

Los parámetros fotosintéticos se midieron utilizando un sistema portable de análisis de intercambio gaseoso CIRAS2 (PPSystems, www.ppsystems.com). Hojas completamente desarrolladas de plantas de *Arabidopsis* se aclimataron previamente en la cámara de medición por 20 minutos. Las mediciones se realizaron a 25°C con una densidad de flujo de fotones de 250 $\mu\text{E m}^{-2}\text{seg}^{-1}$, 21% O₂ y 380 ppm CO₂. En cada medición se tomó el área que ocupaba cada hoja en la cámara de medición y los datos se relativizaron por unidad de área y tiempo. La tasa de asimilación de carbono se calculó mediante el programa ciras2 software.

Para los análisis de fluorescencia, plantas de *Arabidopsis* se crecieron a una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ durante 5 semanas. Los parámetros relacionados con la fluorescencia de la clorofila se midieron en hojas bien iluminadas utilizando un analizador de fluorescencia de clorofila modulado FMS2 (Hansatech). El rendimiento cuántico máximo del transporte de electrones del fotosistema II (fluorescencia variable F_v/

fluorescencia máxima F_m) se determinó luego de 30 minutos en oscuridad. Los cálculos se realizaron según describen Bartoli et al. (2005). La extinción no fotoquímica (NPQ) se calculó como $(F_m - F_m')/F_m'$.

11. Características estomáticas

Plantas de *Arabidopsis* se crecieron por 4 semanas bajo atmósfera ambiental y un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad. Se retiraron tiras epidérmicas de varias hojas de una misma planta para su análisis al microscopio óptico. El índice estomático se determinó a partir de fotografías representativas de cada individuo analizado. La fórmula utilizada para el cálculo del índice estomático fue: $(\text{número de estomas} / (\text{número de células epidérmicas} + \text{número de estomas})) * 100$.

La conductancia estomática fue determinada utilizando un analizador infra rojo de gases (IRGA) QUBIT, CO650 Plant CO₂ Analysis y el programa Logger Pro 3.6.1.

12. Cuantificación de nucleótidos de pirimidina

Se utilizaron extractos de hojas completas y mitocondrias aisladas para la determinación del contenido de dinucleótidos de pirimidinas. Se realizaron extracciones alcalinas, para determinar NADH, o ácidas, para determinar NAD⁺. Los procedimientos se encuentran detallados por Queval y Noctor (2007).

13. Determinación de ROS

Para analizar de forma cualitativa los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejidos, se empleó la tinción con DAB, que permite la visualización del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y la tinción con NBT, que permite determinar la presencia del anión superóxido (O₂⁻). Se tomó el tejido a estudiar y se colocó en placas de cultivo celular de 6 o 12 pocillos. Se agregaron 500 µl de solución DAB (DAB 0.5 mg/ml en acetato de sodio

50 mM pH 5.4, Tween-20 0.5 µl/ml) o de solución NBT (NBT 0.1% p/v 0.5 en buffer acetato de sodio con NaN_3 10mM). Se realizaron tres infiltraciones en una cámara de vacío de 5 minutos cada una. Posteriormente, la placa se tapó y se incubó durante una noche a 25°C. El tejido fue decolorado incubando con etanol 70% el tiempo necesario. Las imágenes se tomaron con una cámara fotográfica Coolpix P80 (Nikon).

14. Metabolómica

Plantas de *Arabidopsis* se crecieron por 4 semanas con un fotoperíodo de 12 hs luz / 12 hs oscuridad bajo atmósfera ambiental (380-400 ppm CO_2). Las rosetas enteras fueron cosechadas a la mitad del día (luego de 6 hs de iluminación) y congeladas a -80°C hasta su utilización. Las extracciones se realizaron en una solución de metanol/cloroformo/agua (5/2/2). Se utilizó ribitol para estandarización interna. El análisis de los metabolitos se realizó mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando tecnología de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF GC-MS) para generar datos exactos (Agilent 7890A GC system, Agilent Technologies; www.agilent.com). Los metabolitos se ionizaron y fueron detectados usando un espectrómetro de masas de alta resolución TOF Waters modelo GCT Premier (Waters GCT Premier TOF-MS). Los datos fueron analizados mediante los programas MassLynx y QuanLynx (Waters GmbH, Eschborn, Germany; www.waters.com). Los metabolitos se identificaron y cuantificaron utilizando una base de datos interna. Se determinaron los niveles relativos de metabolitos por g de peso fresco. Los niveles de metabolitos que presentaron cambios significativos en las plantas mutantes con respecto a las plantas salvajes se representaron gráficamente. Estos procedimientos se realizaron en colaboración con el Institute of Developmental and Molecular Biology of Plants, Cluster of Excellence on Plant Sciences, Heinrich Heine Universitat, Dusseldorf, Alemania.

15. Cuantificación de aminoácidos por HPLC

La extracción de aminoácidos totales se realizó a partir de 100-200 mg de hojas de plantas de *Arabidopsis* cortadas y congeladas al final del día (luego de 12 hs de iluminación) o al final de la noche (luego de 12 hs de oscuridad). El tejido fue procesado en nitrógeno líquido utilizando un pilón de plástico. Se adicionaron 60 µl de buffer de extracción (HEPES 20 mM pH 7, EDTA 5mM, NaF 10 mM) y 500 µl de una solución cloroformo/metanol (1.5/3.5, v/v). Las muestras fueron totalmente homogeneizadas hasta que no quedaron fragmentos de tejido visibles y se las incubó en hielo durante 30 minutos. De este homogenato, se extrajeron los aminoácidos solubles dos veces con 300-600 µl de agua destilada, centrifugando a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Las fases acuosas resultantes se combinaron y se filtraron con filtros de celulosa regenerada de poro 0.22. Una vez filtradas, las muestras evaporaron a sequedad en centrífuga de vacío (Savant AES 1010 Automatic Environmental Speed Vac). Las muestras secas se congelaron hasta su utilización. La determinación de aminoácidos se realizó mediante la derivatización de O-ftaldialdehído (OPA) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Se utilizó un estándar del aminoácido glicina para poder realizar su identificación y cuantificación.

16. Actividad GDC

Para la determinación de la actividad de la enzima GDC se utilizaron extractos crudos enriquecidos en mitocondrias según el procedimiento detallado en la **sección 3.4**. Para cada tubo de reacción se adicionó glicina a una concentración final de 10 mM, la cual contiene [¹⁴C]-glicina (Perkin-Elmer; www.perkinelmer.com) con una radioactividad de 0.1 MBq ml⁻¹, en una mezcla de reacción compuesta por MOPS 30 mM pH7.2, manitol 0.3 M, KCl 10 mM, MgCl₂ 5mM, BSA 0.1% p/v, KH₂PO₄ 10 mM, ADP 1mM. Las reacciones enzimáticas se comenzaron añadiendo el extracto mitocondrial (100 µg de proteínas mitocondriales) y se llevaron a cabo durante 30

minutos a 25°C. Cada reacción fue llevada a cabo en un frasco ampolla con septum de 10 ml que permitió el agregado de sustancias sin la necesidad de ser destapado. Esto evitó que el [^{14}C]-CO₂ liberado por la reacción de descarboxilación de la glicina se escapara, y que pudiera ser capturado en pequeños tubos que contienen 100 µl de KOH 5M ubicados dentro de los frascos ampolla. Las reacciones enzimáticas se detuvieron con el agregado de 100 µl de HCl 2M a través del septum mediante una jeringa. Los frascos ampolla se mantuvieron cerrados hasta el día siguiente a temperatura ambiente con el fin de permitir la absorción de la totalidad del [^{14}C]-CO₂ en los tubos con KOH. La radioactividad atrapada fue cuantificada utilizando un contador de centelleo Beckman LS 7000 (Beckman Coulter; <https://www.beckmancoulter.com>). Este procedimiento resultó de la modificación del método detallado por Igamberdiev et al. (2001).

17. Análisis de imágenes y estadística

Para el análisis de fotografías e imágenes escaneadas se utilizó el programa Image J.

Para el análisis estadístico de datos y la confección de gráficos se utilizó el programa Sigma plot. Para identificar diferencias significativas se emplearon los ensayos de ANOVA y t-test.

Bibliografía

- Alber, B., Ferry, J. (1994). A carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), pp.6909-6913.
- Andersson, G., Karlberg, O., Canback, B., Kurland, C. (2003). On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358(1429), pp.165-179.
- Andersson, I. (2007). Catalysis and regulation in Rubisco. *Journal of Experimental Botany*, 59(7), pp.1555-1568.
- Andrews, B., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I., Walker, J. (2013). Assembly factors for the membrane arm of human complex I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(47), pp.18934-18939.
- Badger, M. (2003). CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, 54(383), pp.609-622.
- Baradaran, R., Berrisford, J., Minhas, G., Sazanov, L. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 494(7438), pp.443-448.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), pp. 281-297.
- Bartoli, C.G., Gomez, F., Gergoff, G., Guiamét, J.J., Puntarulo, S. (2005). Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany*, 56(415), pp.1269-1276.
- Bauwe, H., Hagemann, M., Fernie, A. (2010). Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science*, 15(6), pp.330-336.
- Boyes, D., Zayed, A., Ascenzi, R., McCaskill, A., Hoffman, N., Davis, K., Gorlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7), p.1499.
- Braun, H., Binder, S., Brennicke, A., Eubel, H., Fernie, A., Finkemeier, I., Klodmann, J., König, A., Kühn, K., Meyer, E., Obata, T., Schwarzländer, M., Takenaka, M., Zehrmann, A. (2014). The life of plant mitochondrial complex I. *Mitochondrion*, 19, pp.295-313.
- Braun, H., Zabaleta, E. (2007). Carbonic anhydrase subunits of the mitochondrial NADH dehydrogenase complex (complex I) in plants. *Physiol Plant*, 129(1), pp.114-122.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists.
- Bultema, J., Braun, H., Boekema, E., Kouřil, R. (2009). Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(1), pp.60-67.

- Bych, K., Kerscher, S., Netz, D., Pierik, A., Zwicker, K., Huynen, M., Lill, R., Brandt, U., Balk, J. (2008). The iron–sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *The EMBO Journal*, 27(12), pp.1736-1746.
- Cardol, P., Vanrobaeys, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Matagne, R., Remacle, C. (2004). Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1658(3), pp.212-224.
- Carroll, J., Fearnley, I., Skehel, J., Shannon, R., Hirst, J., Walker, J. (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), pp.32724-32727.
- Córdoba, J.P., Marchetti, F., Soto, D., Martin, M.V., Pagnussat G.C., Zabaleta, E. (2015). The CA domain of the respiratory complex I is required for normal embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Of Experimental Botany*. En prensa.
- Cot, S., So, A., Espie, G. (2007). A multiprotein bicarbonate dehydration complex essential to carboxysome function in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 190(3), pp.936-945.
- Degli Esposti, M. (2014). Bioenergetic Evolution in Proteobacteria and Mitochondria. *Genome Biology and Evolution*, 6(12), pp.3238-3251.
- Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynie, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Piegue, B., Ball, S., Ral, J., Bouget, F., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y., Moreau, H. (2006). Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(31), pp.11647-11652.
- Duchen, M. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of Physiology*, 529(1), pp.57-68.
- Dudkina, N., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E., Braun, H. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), pp.3225-3229.
- Dudkina, N., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H., Boekema, E. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7), pp.664-670.
- Dutilleul, C., Driscoll, S., Cornic, G., De Paepe, R., Foyer, C.H., 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), pp.264-275.
- Eisenhut, M., Ruth, W., Haimovich, M., Bauwe, H., Kaplan, A., Hagemann, M. (2008). The photorespiratory glycolate metabolism is essential for cyanobacteria and might have been conveyed endosymbiontically to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), pp.17199-17204.

- Esser, C., Kuhn, A., Groth, G., Lercher, M., Maurino, V. (2014). Plant and animal glycolate oxidases have a common eukaryotic ancestor and convergently duplicated to evolve long-chain 2-hydroxy acid oxidases. *Molecular Biology and Evolution*, 31(5), pp.1089-1101.
- Eubel, H., Jänsch, L., 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), pp.274-286.
- Fabre, N., Reiter, I., Becuwe-Linka, N., Genty, B., Rumeau, D. (2007). Characterization and expression analysis of genes encoding α and β carbonic anhydrases in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 30(5), pp.617-629.
- Ferry, J. (2010). The γ class of carbonic anhydrases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(2), pp.374-381.
- Florian, A., Araújo, W., Fernie, A. (2013). New insights into photorespiration obtained from metabolomics. *Plant Biology*, 15(4), pp.656-666.
- Friedrich, T., Ohnishi, T., Forche, E., Kunze, B., Jansen, R., Trowitzsch, W., Höfle, G., Reichenbach, H., Weiss, H. (1994). Two binding sites for naturally occurring inhibitors in mitochondrial and bacterial NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Biochem. Soc. Trans.*, 22(1), pp.226-230.
- Fromm, S., Göing, J., Lorenz, C., Peterhänsel, C., Braun, H. (2015). Depletion of the “gamma-type carbonic anhydrase-like” subunits of complex I affects central mitochondrial metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(1), pp.60-71.
- Gawryluk, R., Gray, M. (2010). Evidence for an early evolutionary emergence of γ -type carbonic anhydrases as components of mitochondrial respiratory complex I. *BMC Evol Biol*, 10(1), p.176.
- Gerrard Wheeler, M., Arias, C., Tronconi, M., Maurino, V., Andreo, C., Drincovich, M. (2008). *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: high degree of identity but clearly distinct properties. *Plant Mol Biol*, 67(3), pp.231-242.
- Giordano, M., Beardall, J., Raven, J. (2005). CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), pp.99-131.
- Gray, M. (1999). Mitochondrial Evolution. *Science*, 283(5407), pp.1476-1481.
- Gray, M. (2012). Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), pp.a011403-a011403.
- Grefen, C., Chen, Z., Honsbein, A., Donald, N., Hills, A., Blatt, M. (2010). A novel motif essential for snare interaction with the K⁺ channel KC1 and channel gating in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(9), pp.3076-3092.
- Grigorieff, N. (1998). Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *Journal of Molecular Biology*, 277(5), pp.1033-1046.

- Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., Friedrich, T. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Molecular Biology*, 276(1), pp.105-112.
- Hansen, L., Church, J., Matheson, S., McCarlie, V., Thygersen, T., Criddle, R., Smith, B. (2002). Kinetics of plant growth and metabolism. *Thermochimica Acta*, 388(1-2), pp.415-425.
- Haupt-Herting, S., Klug, K., Fock, H.P. (2001). A new approach to measure gross CO₂ fluxes in leaves. Gross CO₂ assimilation, photorespiration, and mitochondrial respiration in the light in tomato under drought stress. *Plant physiology*, 126(1), pp.388-396.
- Hdider, C., Desjardins, Y. (1994) Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of in vitro cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36(1), pp. 27–33.
- Heazlewood, J., Howell, K., Millar, A. (2003). Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1604(3), pp.159-169.
- Henry, R. (1996). Multiple Roles of Carbonic Anhydrase in Cellular Transport and Metabolism. *Annual Review of Physiology*, 58(1), pp.523-538.
- Hewett-Emmett, D., Tashian, R. (1996). Functional Diversity, Conservation, and Convergence in the Evolution of the α -, β -, and γ -Carbonic Anhydrase Gene Families. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5(1), pp.50-77.
- Hindle, M., Martin, S., Noordally, Z., van Ooijen, G., Barrios-Llerena, M., Simpson, T., Le Bihan, T., Millar, A. (2014). The reduced kinome of *Ostreococcus tauri*: core eukaryotic signalling components in a tractable model species. *BMC Genomics*, 15(1), p.640.
- Hirst, J., King, M., Pryde, K. (2008). The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc. Trans.*, 36(5), pp.976-980.
- Hoffmann, C., Plocharski, B., Haferkamp, I., Lerach, M., Ewald, R., Bauwe, H., Riemer, J., Herrmann, J., Neuhaus, H. (2013). From endoplasmic reticulum to mitochondria: absence of the *Arabidopsis* ATP antiporter endoplasmic reticulum adenylate transporter 1 perturbs photorespiration. *The Plant Cell*, 25(7), pp.2647-2660.
- Igamberdiev, A., Bykova, N., Gardeström, P. (1997). Involvement of cyanide-resistant and rotenone-insensitive pathways of mitochondrial electron transport during oxidation of glycine in higher plants. *FEBS Letters*, 412(2), pp.265-269.
- Igamberdiev, A., Bykova, N., Lea, P., Gardeström, P. (2001). The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. *Physiol Plant*, 111(4), pp.427-438.
- Iverson, T., Alber, B., Kisker, C., Ferry, J., Rees, D. (2000). A Closer Look at the Active Site of γ -Class Carbonic Anhydrases: High-Resolution Crystallographic Studies of the Carbonic Anhydrase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry*, 39(31), pp.9222-9231.

Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz, U., Braun, H. (1995). Cytochrome c Reductase from Potato Does not Comprise Three Core Proteins but Contains an Additional Low-Molecular-Mass Subunit. *Eur J Biochem*, 228(3), pp.878-885.

Joet, T., Cournac L., Horvath E.M., Medgyesy P., Peltier G. (2001). Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. *Plant Physiology*, 125(4), pp.1919-1929.

Juszczuk, I.M., Rychter, A.M. (2003). Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol*, 50, pp.1257-1271.

Klavsén, S., Madsen, T., Maberly, S. (2011). Crassulacean acid metabolism in the context of other carbon-concentrating mechanisms in freshwater plants: a review. *Photosynth Res*, 109(1-3), pp.269-279.

Klodmann, J., Braun, H. (2011). Proteomic approach to characterize mitochondrial complex I from plants. *Phytochemistry*, 72(10), pp.1071-1080.

Krause, F., Reifschneider, N., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S., Dencher, N. (2004). "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp.48369-48375.

Kühn, K., Obata, T., Feher, K., Bock, R., Fernie, A., Meyer, E. (2015). Complete mitochondrial complex I deficiency induces an up-regulation of respiratory fluxes that is abolished by traces of functional complex I. *Plant Physiology*, 168(4), pp.1537-1549.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680-685.

Lazarou, M., Thorburn, D., Ryan, M., McKenzie, M. (2009). Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(1), pp.78-88.

Li, L., Nelson, C., Carrie, C., Gawryluk, R., Solheim, C., Gray, M., Whelan, J., Millar, A. (2013). Subcomplexes of ancestral respiratory complex I subunits rapidly turn over in vivo as productive assembly intermediates in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), pp.5707-5717.

Liesa, M., Shirihi, O. (2013). Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metabolism*, 17(4), pp.491-506.

Long, B., Badger, M., Whitney, S., Price, G. (2007). Analysis of carboxysomes from *Synechococcus* PCC7942 reveals multiple rubisco complexes with carboxysomal proteins CcmM and CcaA. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), pp.29323-29335.

Ludwig, M., Sultemeyer, D., Price, G. (2000). Isolation of ccmKLMN genes from the marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7002 (Cyanophyceae), and evidence that CcmM is essential for carboxysome assembly. *Journal of Phycology*, 36(6), pp.1109-1119.

- Kerscher, S.J. (2000). Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*, 1459, pp.274-283.
- Klodmann, J., Senkler, M., Rode, C., Braun, H. (2011). Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. *Plant Physiology*, 157(2), pp.587-598.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., Jänsch, L., Braun, H. (2010). Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22(3), pp.797-810.
- Maeda, S., Badger, M., Price, G. (2002). Novel gene products associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 complexes are involved in photosynthetic CO₂ hydration in the cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942. *Molecular Microbiology*, 43(2), pp.425-435.
- Maier, A., Fahnenstich, H., von Caemmerer, S., Engqvist, M., Weber, A., Flügge, U., Maurino, V. (2012). Transgenic introduction of a glycolate oxidative cycle into *A.thaliana* chloroplasts leads to growth improvement. *Frontiers in Plant Science*, 3, 38.
- Margulis, L. (1996). Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), pp.1071-1076.
- Martin, V., Villarreal, F., Miras, I., Navaza, A., Haouz, A., González-Lebrero, R., Kaufman, S., Zabaleta, E. (2009). Recombinant plant gamma carbonic anhydrase homotrimers bind inorganic carbon. *FEBS Letters*, 583(21), pp.3425-3430.
- Maurino, V., Peterhansel, C. (2010). Photorespiration: current status and approaches for metabolic engineering. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(3), pp.248-255.
- Melo, A., Roberts, T., Møller, I. (1996). Evidence for the presence of two rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner membrane of potato tuber mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1276(2), pp.133-139.
- Meyer, E., Solheim, C., Tanz, S., Bonnard, G., Millar, A. (2011). insights into the composition and assembly of the membrane arm of plant complex I through analysis of subcomplexes in *Arabidopsis* mutant lines. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), pp.26081-26092.
- Meyer, E., Tomaz, T., Carroll, A., Estavillo, G., Delannoy, E., Tanz, S., Small, I., Pogson, B., Millar, A. (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), pp.603-619.
- Mitra, M. (2004). Identification of a New Chloroplast Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 135(1), pp.173-182.
- Mlotshwa, S., Pruss, G., Gao, Z., Mgutshini, N., Li, J., Chen, X., Bowman, L., Vance, V. (2010). Transcriptional silencing induced by *Arabidopsis* T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. *The Plant Journal*, 64(4), pp.699-704.

- Møller, I. (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(1), pp.561-591.
- Moore, A., Albury, M., Crichton, P., Affourtit, C. (2002). Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger?. *Trends in Plant Science*, 7(11), pp.478-481.
- Moroney, J., Ynalvez, R. (2007). Proposed Carbon Dioxide Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6(8), pp.1251-1259.
- Noctor, G., Dutilleul, C., De Paepe, R., Foyer, C.H. (2003). 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), pp.49-57.
- Parisi, G., Perales, M., Fornasari, M., Colaneri, A., Schain, N., Casati, D., Zimmermann, S., Brennicke, A., Araya, A., Ferry, J., Echave, J., Zabaleta, E. (2004). Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria. *Plant Mol Biol*, 55(2), pp.193-207.
- Peña, K., Castel, S., de Araujo, C., Espie, G., Kimber, M. (2010). Structural basis of the oxidative activation of the carboxysomal γ -carbonic anhydrase, CcmM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6), pp.2455-2460.
- Perales, M., Eubel, H., Heinemeyer, J., Colaneri, A., Zabaleta, E., Braun, H. (2005). Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I+III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis*. *Journal of Molecular Biology*, 350(2), pp.263-277.
- Perales, M., Parisi, G., Fornasari, M., Colaneri, A., Villarreal, F., Gonzalez-Schain, N., Echave, J., Gomez-Casati, D., Braun, H., Araya, A., Zabaleta, E. (2004). Gamma carbonic anhydrase like complex interact with plant mitochondrial complex I. *Plant Mol Biol*, 56(6), pp.947-957.
- Perez, E., Lapaille, M., Degand, H., Cilibrasi, L., Villavicencio-Queijeiro, A., Morsomme, P., González-Halphen, D., Field, M., Rémacle, C., Baurain, D., Cardol, P. (2014). The mitochondrial respiratory chain of the secondary green alga *Euglena gracilis* shares many additional subunits with parasitic *Trypanosomatidae*. *Mitochondrion*, 19, pp.338-349.
- Peters, K., Belt, K., Braun, H. (2013). 3D Gel Map of Arabidopsis Complex I. *Front. Plant Sci.*, 4.
- Peters, K., Dudkina, N., Jansch, L., Braun, H., Boekema, E. (2008). A structural investigation of complex I and I+III₂ supercomplex from Zea mays at 11–13 Å resolution: Assignment of the carbonic anhydrase domain and evidence for structural heterogeneity within complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(1), pp.84-93.
- Pradelli, L., Bénateau, M., Ricci, J. (2010). Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10), pp.1589-1597.
- Priault, P., Tcherkez, G., Cornic, G., De Paepe, R., Naik, R., Ghashghaie, J., Streb, P. (2006). The lack of mitochondrial complex I in a CMSII mutant of *Nicotiana sylvestris* increases

photorespiration through an increased internal resistance to CO₂ diffusion. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), pp.3195-3207.

Price, G. (2011). Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. *Photosynth Res*, 109(1-3), pp.47-57.

Queval, G., Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Analytical Biochemistry*, 363(1), pp.58-69.

Rasmusson, A., Geisler, D., Møller, I. (2008). The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion*, 8(1), pp.47-60.

Raven, J. (2001). A role for mitochondrial carbonic anhydrase in limiting CO₂ leakage from low CO₂-grown cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant, Cell and Environment*, 24(2), pp.261-265.

Renné, P., Dreßen, U., Hebbeker, U., Hille, D., Flügge, U., Westhoff, P., Weber, A. (2003). The *Arabidopsis* mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. *The Plant Journal*, 35(3), pp.316-331.

Riazunnisa, K., Padmavathi, L., Bauwe, H., Raghavendra, A. (2006). Markedly low requirement of added CO₂ for photosynthesis by mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*): possible roles of photorespiratory CO₂ and carbonic anhydrase. *Physiol Plant*, 128(4), pp.763-772.

Roberts, T., Fredlund, K., Møller, I. (1995). Direct evidence for the presence of two external NAD(P)H dehydrogenases coupled to the electron transport chain in plant mitochondria. *FEBS Letters*, 373(3), pp.307-309.

Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), pp.225-236.

Sage, R., Christin, P., Edwards, E. (2011). The C₄ plant lineages of planet Earth. *Journal of Experimental Botany*, 62(9), pp.3155-3169.

Sánchez, R., Flores, A., Cejudo, F. (2005). *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. *Planta*, 223(5), pp.901-909.

Sawaya, M., Cannon, G., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E., Yeates, T., Kerfeld, C. (2006). The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), pp.7546-7555.

Scheffler, I. (2008). *Mitochondria*. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss.

Schneidereit, J., Häusler, R., Fiene, G., Kaiser, W., Weber, A. (2006). Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism. *The Plant Journal*, 45(2), pp.206-224.

- So, A., Espie, G., Williams, E., Shively, J., Heinhorst, S., Cannon, G. (2004). A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (ϵ class) is a component of the carboxysome shell. *Journal of Bacteriology*, 186(3), pp.623-630.
- Stotland, A., Gottlieb, R. (2015). Mitochondrial quality control: Easy come, easy go. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*.
- Sunderhaus, S., Dudkina, N., Jansch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E., Braun, H. (2006). Carbonic Anhydrase Subunits Form a Matrix-exposed Domain Attached to the Membrane Arm of Mitochondrial Complex I in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), pp.6482-6488.
- Tait, S., Green, D. (2012). Mitochondria and cell signalling. *Journal of Cell Science*, 125(4), pp.807-815.
- Timm, S., Bauwe, H. (2012). The variety of photorespiratory phenotypes - employing the current status for future research directions on photorespiration. *Plant Biology*, 15(4), pp.737-747.
- Timm, S., Mielewicz, M., Florian, A., Frankenbach, S., Dreissen, A., Hocken, N., Fernie, A.R., Walter, A., Bauwe, H. (2012). High-to-low CO₂ acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of Arabidopsis. *PLoS ONE*, 7(8): e42809.
- Tripp, B. (2003). A Role for Iron in an Ancient Carbonic Anhydrase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), pp.6683-6687.
- Tripp, B., Ferry, J. (2000). A Structure–Function Study of a Proton Transport Pathway in the γ -Class Carbonic Anhydrase from *Methanosarcina thermophila* †. *Biochemistry*, 39(31), pp.9232-9240.
- Tripp, B., Smith, K., Ferry, J. (2001). Carbonic Anhydrase: New Insights for an Ancient Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), pp.48615-48618.
- Tripp, B., Tu, C., Ferry, J. (2002). Role of Arginine 59 in the γ -Class Carbonic Anhydrases. *Biochemistry*, 41(2), pp.669-678.
- Unsold, M., Marienfeld, J., Brandt, P., Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet*, 15(1), pp.57-61.
- Villarreal, F., Martín, V., Colaneri, A., González-Schain, N., Perales, M., Martín, M., Lombardo, C., Braun, H., Bartoli, C., Zabaleta, E. (2009). Ectopic expression of mitochondrial gamma carbonic anhydrase 2 causes male sterility by anther indehiscence. *Plant Mol Biol*, 70(4), pp.471-485.
- Vogan, P., Frohlich, M., Sage, R. (2007). The functional significance of C3-C4 intermediate traits in *Heliotropium* L. (*Boraginaceae*): gas exchange perspectives. *Plant, Cell & Environment*, 30(10), pp.1337-1345.

Vogel, R., Smeitink, J., Nijtmans, L. (2007). Human mitochondrial complex I assembly: A dynamic and versatile process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(10), pp.1215-1227.

Wang, Q., Fristedt, R., Yu, X., Chen, Z., Liu, H., Lee, Y., Guo, H., Merchant, S., Lin, C. (2012). The γ -carbonic anhydrase subcomplex of mitochondrial complex I is essential for development and important for photomorphogenesis of *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 160(3), pp.1373-1383.

Watanabe, C., Sato, S., Yanagisawa, S., Uesono, Y., Terashima, I., Noguchi, K. (2014). Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in *Arabidopsis thaliana*: possible relationships with respiratory rates. *Plant and Cell Physiology*, 55(2), pp.341-357.

Zabaleta, E., Martin, M., Braun, H. (2012). A basal carbon concentrating mechanism in plants?. *Plant Science*, 187, pp.97-104.

Zelitch, I., Schultes, N., Peterson, R., Brown, P., Brutnell, T. (2008). High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. *Plant Physiology*, 149(1), pp.195-204.

Zimmerman, S., Ferry, J. (2006). Proposal for a hydrogen bond network in the active site of the prototypic γ -class carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 45(16), pp.5149-5157.

Publicaciones

La presente tesis se llevó a cabo a través de una Beca Nivel Inicial de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (abril 2010 – abril 2013), una Beca Perfeccionamiento de la Universidad Nacional de Mar del Plata (abril 2013 – abril 2015), y una Beca Formación Superior de la Universidad Nacional de Mar del Plata (abril 2015 – abril 2016). Las tareas fueron realizadas en el laboratorio de Biología de Mitocondrias del Instituto de Investigaciones Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata.

Las actividades de investigación presentadas en este trabajo dieron lugar a las publicaciones en revistas científicas con referato y presentaciones a congresos que se detallan a continuación.

Revistas científicas con referato

- **Soto, D.**, Córdoba, J., Villarreal, F., Bartoli, C., Schmitz, J., Maurino, V., Braun, H., Pagnussat, G. and Zabaleta, E. (2015). Functional characterization of mutants affected in the carbonic anhydrase domain of the respiratory complex I in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 83(5), pp.831-844.
- Córdoba, J.P., Marchetti, F., **Soto, D.**, Martin, M.V., Pagnussat G.C., Zabaleta, E. (2015). The CA domain of the respiratory complex I is required for normal embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany. En prensa.

Presentaciones a congresos

- **Soto, Débora**; Córdoba, Juan Pablo, Pagnussat, Gabriela y Zabaleta, Eduardo. XLVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. Del 30 de octubre al 2 de noviembre de 2011. Presentación de Poster. “Silencing of mitochondrial γ -CAs using small interference RNA and artificial microRNAs.” Laboratorio Biología de Mitocondrias. Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- **Soto, Débora**; Córdoba, Juan Pablo, Pagnussat, Gabriela; Martin, Victoria y Zabaleta, Eduardo. XXIX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 17 al 20 de septiembre de 2012. Presentación de Poster. “Estudio del rol fisiológico del dominio CA del complejo I mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*.” Laboratorio Biología de Mitocondrias. Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.

- **Soto, Débora**; Córdoba, Juan Pablo; Martin, Victoria; Braun, Hans-Peter; Pagnussat, Gabriela y Zabaleta, Eduardo. 8th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB). Rosario, Santa Fe, Argentina. Del 12 al 16 de mayo de 2013. Presentación de Poster. "The Carbonic Anhydrase Domain of *Arabidopsis* Respiratory Complex I is involved in Carbon Metabolism." Instituto de Investigaciones Biológicas IIB-CONICET-UNMdP, Argentina. Institute for Plant Genetics, Leibniz Universität Hannover, Alemania.
- Córdoba, Juan Pablo; **Soto, Débora**; Martin, Victoria; Pagnussat, Gabriela y Zabaleta, Eduardo. 8th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB). Rosario, Santa Fe, Argentina. Del 12 al 16 de mayo de 2013. Presentación de Poster. "The Carbonic Anhydrase Domain of *Arabidopsis* Respiratory Complex I is essential to sustain embryogenesis." Instituto de Investigaciones Biológicas IIB-CONICET-UNMdP.
- **Soto, Débora**; Córdoba, Juan Pablo; Martin, Victoria; Pagnussat, Gabriela y Zabaleta, Eduardo. XV Congreso Latinoamericano, XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 21 al 24 de septiembre de 2014. Presentación de Poster. "New Insights into the physiological role of the Carbonic Anhydrase domain of *Arabidopsis* respiratory Complex I." Laboratorio Biología de mitocondrias. Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Córdoba, Juan Pablo; **Soto, Débora**; Martin, Victoria; Pagnussat, Gabriela y Zabaleta, Eduardo. XV Congreso Latinoamericano, XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 21 al 24 de septiembre de 2014. Presentación de Poster. "The Carbonic Anhydrase domain of mitochondrial respiratory Complex I is essential to sustain embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*." Laboratorio Biología de mitocondrias. Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- **Soto, Débora**; Córdoba, Juan Pablo; Bartoli, Carlos; Schmitz, Jessica; Maurino, Veronica; Braun, Hans-Peter; Pagnussat, Gabriela y Zabaleta, Eduardo. L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario, Santa Fe, Argentina. Del 11 al 14 de noviembre de 2014. Presentación de Poster. "The Carbonic Anhydrase domain of respiratory Complex I is linked to photorespiration in *Arabidopsis*." Laboratorio Biología de Mitocondrias. Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.

- **Soto, Débora**; Córdoba, Juan Pablo; Bartoli, Carlos; Schmitz, Jessica; Maurino, Veronica; Braun, Hans-Peter; Pagnussat, Gabriela y Zabaleta Eduardo. 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB). Wrocław, Poland. Del 17 al 22 de mayo de 2015. Presentación de Poster. "New insights into the physiological role of the CA domain of *Arabidopsis* respiratory Complex I." Instituto de Investigaciones Biológicas IIB-CONICET-UNMdP.
- **Soto, Débora**; Córdoba, Juan Pablo; Marchetti, Fernanda; Bartoli, Carlos; Pagnussat, Gabriela y Zabaleta, Eduardo. Laboratorio Biología de Mitocondrias. LI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 3 al 6 de noviembre de 2015. Presentación de Poster. "The CA domain of respiratory complex I is involved in photorespiration and is required for embryogenesis." Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Fassolari, Marisol; **Soto, Débora**; Córdoba, Juan Pablo; Pagnussat, Gabriela; Zabaleta, Eduardo. LI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Del 3 al 6 de noviembre de 2015. Presentación de Poster. "Functional analyses of gamma carbonic anhydrases in *Arabidopsis* mitochondrial complex I." Laboratorio Biología de Mitocondrias. Instituto de Investigaciones Biológicas. Universidad Nacional de Mar del Plata.

