

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“ESTUDIO DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA BIOGÉNESIS DE LA CITOCROMO C OXIDASA Y SU PAPEL EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO, EL DESARROLLO VEGETAL Y LA RESPUESTA A ESTRÉS.”.

Lic. Natanael Mansilla

Director: Dr. Daniel González

Co-director: Dra. Elina Welchen

Laboratorio de Biología Molecular

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

2017

1. INDICE.

1. INDICE.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	6
2. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS y NOMENCLATURA.....	8
2.1. Abreviaturas y símbolos.....	8
2.1. Símbolos para aminoácidos.....	10
2.2. Nomenclatura para genes y proteínas.....	11
3. RESUMEN Y OBJETIVOS.....	12
3.1. RESUMEN.....	12
3.2. SUMMARY.....	15
3.3. OBJETIVOS.....	18
3.3.1. LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS SON:.....	18
3.4. LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA TESIS Y PUBLICACIONES.....	19
3.4.1. PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES CON REFERATO ESTRICTO.....	19
4. INTRODUCCIÓN.....	20
4.1. MITOCONDRIAS, FUNCIONES GENERALES.....	20
4.2. LA IMPORTANCIA DE LAS MITOCONDRIAS EN ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS.....	21
4.3. LAS MITOCONDRIAS EN PLANTAS.....	23
4.3.1. COMPLEJOS RESPIRATORIOS DE PLANTAS.....	24
4.3.1.1. Complejo I o NADH deshidrogenasa.....	24
4.3.1.2. Complejo II (CII) o succinato deshidrogenasa (SDH).....	25
4.3.1.3. Complejo III (CIII) o citocromo c reductasa.....	25
4.3.1.4. Complejo IV o citocromo c oxidasa (COX).....	26
4.3.1.5. Supercomplejos mitocondriales.....	26
4.3.2. VIAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES ALTERNATIVAS EN PLANTAS.....	27
4.3.2.1. NAD(P)H deshidrogenasas alternativas.....	28
4.3.2.2. La oxidasa alternativa.....	30
4.3.2.3. Proteínas desacoplantes.....	32
4.3.3. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS EN LA MITOCONDRIA.....	33
4.3.4. VÍAS METABÓLICAS QUE HACEN INGRESAR ELECTRONES A LAS MITOCONDRIAS DE PLANTAS.....	35
4.3.4.1. NAD(P)H de la matriz.....	35
4.3.4.2. FADH ₂ de la matriz.....	36
4.3.4.3. NAD(P)H del IMS.....	37
4.3.4.4. FADH ₂ del IMS.....	37
4.4. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL.....	38
4.5. GENOMA MITOCONDRIAL.....	40
4.6. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS.....	41
4.7. EXPRESIÓN COORDINADA DE LOS GENES NUCLEARES DE PROTEINAS MITOCONDRIALES.....	41
4.8. REGULACIÓN RETRÓGRADA EN ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS.....	43
4.9. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS A LA MITOCONDRIA DE PLANTAS.....	47
4.9.1. COMPLEJOS DE LA MEMBRANA EXTERNA MITOCONDRIAL.....	48

4.9.2. IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS AL IMS.....	49
4.9.3. COMPLEJOS DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL.....	49
4.10. BIOGÉNESIS DEL COMPLEJO IV	51
4.10.1. SUBUNIDADES ESTRUCTURALES DE CODIFICACIÓN MITOCONDRIAL.	51
4.10.2. SUBUNIDADES ESTRUCTURALES DE CODIFICACIÓN NUCLEAR.	52
4.10.3. ENSAMBLADO DE COX.....	54
4.10.4. SÍNTESIS E INSERCIÓN DEL HEMO A EN COX	54
4.10.5. METALOCHAPERONAS E INSERCIÓN DEL COBRE EN COX.	55
4.11. METALOCHAPERONAS EN PLANTAS.	59
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
5.1. Cepas utilizadas.	63
5.2. Vectores utilizados.	63
5.3. Material vegetal y condiciones de crecimiento	64
5.4. Clonado de genes y generación de líneas transgénicas de Arabidopsis	65
5.5. Amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).	66
5.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	67
5.7. Purificación de fragmentos de ADN.	67
5.8. Digestión con endonucleasas de restricción.	67
5.9. Ligación de moléculas de ADN.....	67
5.10. Transformación de bacterias de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.	68
5.11. Transformación de bacterias de <i>A. tumefaciens</i> con ADN plasmídico.	68
5.12. Mini-preparación de ADN plasmídico.	68
5.13. Transformación de plantas.....	69
5.14. Mini-preparación de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.....	70
5.15. Complementación de una levadura mutante Δ cox10 con AtCOX10	70
5.16. Microscopía de escaneo laser confocal (CLSM).....	70
5.17. Aislamiento y análisis de ARN.	71
5.18. Determinaciones de respiración.....	71
5.19. Electroforesis de geles de poliacrilamida azul nativos (BN-PAGE) de extractos enriquecidos en mitocondrias.	72
5.20. Análisis de western blot.....	72
5.21. Tratamientos con NaCl.....	72
5.22. Determinación del contenido de clorofila e inspección visual de la senescencia.	73
5.23. Medición de parámetros fotosintéticos.....	73
5.24. Inspección microscópica de embriones en desarrollo.	74
5.25. Análisis histoquímico de actividad COX y de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPC) en embriones.....	74
5.26. Análisis transcriptómico de plantas As-HCC1 y hcc2	74
5.27. Análisis de alineamiento de secuencias y árbol filogenético	75
5.28. Análisis estadístico	75
6. ESTUDIOS FUNCIONALES DE ATCOX10 DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	76
6.1. RESULTADOS	76
6.1.1. Identificación y caracterización de un homólogo de COX10 en Arabidopsis	76
6.1.2. AtCOX10 es capaz de complementar levaduras mutantes nulas en cox10..	78
6.1.3. Localización de AtCOX10 in vivo en mitocondrias de plantas.	79

6.1.4. AtCOX10 es expresado en embriones, endosperma y regiones meristemáticas.	80
6.1.5. AtCOX10 es esencial en las etapas tempranas del desarrollo de la planta... ..	81
6.1.6. Una disminución parcial en la expresión de AtCOX10 afecta la actividad de COX.....	84
6.1.7. Una disminución en la expresión de AtCOX10 afecta el inicio y la progresión de la senescencia	86
6.2. DISCUSIÓN	91
6.2.1. AtCOX10 es capaz de reemplazar a su homólogo de levaduras.	92
6.2.2. AtCOX10 se expresa en tejidos con elevada demanda energética.....	93
6.2.3. La carencia de AtCOX10 genera letalidad embrionaria.....	93
6.2.4. La deficiencia de AtCOX10 afecta el inicio y la progresión de la senescencia.	95
7. LAS PROTEINAS HCC TIENEN EFECTOS OPUESTOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS SALINO EN <i>A. THALIANA</i>	97
7.1. RESULTADOS	97
7.1.1. Análisis filogenético de las proteínas HCC.....	97
7.1.2 Silenciamiento de HCC1	101
7.1.2.1. Caracterización fenotípica de plantas As-HCC1	102
7.1.3. Análisis transcriptómico global de plantas con niveles alterados de las proteínas HCC.	104
7.1.4. Caracterización de la tolerancia a estrés por NaCl de plantas As-HCC1 y hcc2.....	111
7.1.4.1. Caracterización de parámetros asociados a la actividad de la citocromo c oxidasa durante el estrés por NaCl.	115
7.1.5. Caracterización de la respuesta transcripcional al NaCl.	118
7.1.6. Evaluación de la interacción in planta entre HCC1 y HCC2 mediante Complementación Biomolecular de la Fluorescencia.	122
7.1.6.1. Interacción de las proteínas completas	122
7.1.6.2 Interacción de las porciones N-terminal de las proteínas HCC.....	124
7.2. CONCLUSIONES.....	126
7.2.2. Plantas con niveles alterados de las proteínas HCC presentan cambios transcripcionales asociados a la respuesta a estrés.	126
7.2.3. La alteración de los niveles de las proteínas HCC afecta la tolerancia al estrés por NaCl.	126
7.2.4. La percepción del estrés por NaCl se ve modificada en plantas As-HCC1 y hcc2.....	127
7.2.5. Las proteínas tipo Sco de Arabidopsis son capaces de interaccionar en mitocondrias de plantas.	127
8. ANEXOS.....	130
8.1 ANEXO I.....	130
8.1.1. Tabla de términos GO enriquecidos en plantas As-HCC1.....	130
8.1.2. Tabla de términos GO enriquecidos en plantas hcc2.	132
8.1.3. Tabla de términos GO enriquecidos en genes co-regulados en plantas As-HCC1 y amiCOX17.	134
8.1.4. Tabla de términos GO enriquecidos en genes regulados en forma opuesta en plantas hcc2 y amiCOX17.....	135
8.1.5. Tabla de clusters asociados a ROS enriquecidos en el grupo de 382 genes regulados positivamente en las plantas As-HCC1.....	136

8.1.6. Tabla de clusters asociados a ROS enriquecidos en el grupo de 683 genes regulados negativamente en las plantas As-HCC1.....	136
8.1.7. Tabla de clusters asociados a ROS enriquecidos en el grupo de 441 genes regulados positivamente en las plantas hcc2.	136
8.1.8. Tabla de clsters asociados a ROS enriquecidos en el grupo de 321 genes regulados negativamente en las plantas hcc2	137
8.1.9. Tabla de genes regulados negativamente en plantas As-HCC1 presentes en los clústeres V, VII y VIII	137
8.1.10. Tabla de genes regulados positivamente en plantas hcc2 presentes en los clústeres IV, V, VI, VII y VIII	137
8.2.1. Lista de oligonucleótidos usados.....	138
8.2.2. Lista de oligonucleótidos usados en RT-qPCR.....	140
9. BIBLIOGRAFÍA	141

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Nacional de Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por darme la posibilidad de realizar mis estudios de postgrado.

Al CONICET por financiar este postgrado de forma integral y brindarme la posibilidad de realizar este postgrado.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por brindarme un espacio de trabajo y por acercarme a la comunidad científica. A sus directivos, a Emilio, Seba, Pablo, y Manu por darnos una mano cada vez que necesitamos solucionar algún problema.

Al Dr. Daniel González por brindarme la posibilidad de formar parte de su grupo de trabajo. Así como también por compartir su experiencia y conocimientos durante el desarrollo de la tesis.

Quiero agradecer a Elina por guiarme en el trabajo de mesada y en el análisis de resultados. Quiero expresar mi infinita gratitud hacia ella, por compartir su inmenso conocimiento en el laboratorio, por ayudarme en cada nueva etapa, en cada reto, por alentarme e incentivar me en todo momento. A Diana, Andres e Ivana, por brindarme sus conocimientos cada vez que los necesite así como por aportar una visión crítica al momento de discutir resultados.

A mis compañeros de laboratorio, gracias a los cuales mis días allí fueron inolvidables. A los que se fueron, Luli, Pancho, Nori y Leo por ayudarme en cada momento con su conocimiento, por discutir tanto dificultades como resultados en búsqueda de la mejor explicación. Por su humor diario, por las risas cómplices y por sus invaluable consejos. A los que están, a la Peña, a los Intensos. A Ale, Ariel, Clari, Facu, Flor, Juan, Pablo, Regi, Santi, Sofi Ra, Sofi Ru, Luci, Viky y Virgi. Por compartir almuerzos, mates, infinitas peñas, cumpleaños, despedidas y muchas cervezas hablando o discutiendo por prácticamente todo. Por la motivación diaria, por escucharme tanto en los momentos malos como para los chismes, por sus consejos y por su aguante. Gracias a ellos, todos los días son un poco más divertidos.

A mi hermano de la vida, Martín, por brindarse en cada momento, con una palabra, un gesto, un abrazo. Por su apoyo incondicional, sin importar las circunstancias.

A mi familia, el mayor de mis agradecimientos. Por educarme, y ayudar a convertirme en quien soy. Por brindarme la posibilidad de realizar una carrera universitaria. Por apoyarme en cada circunstancia, por su motivación continua para alcanzar mis sueños. A Gordi, mi mama, por ser un ejemplo de fortaleza, invulnerabilidad, de lucha constante, y de calidez. A Pancho, mi papa, por toda su templanza, y experiencia. A Aylén y Lilen, mis hermanas, por su apoyo y contención. A todos ellos gracias por su inmenso amor, con el cual inundo mis días de felicidad.

2. ABREVIATURAS, SÍMBOLOS y NOMENCLATURA.

2.1. Abreviaturas y símbolos.

- ABA: ácido abscísico
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNc: ácido desoxirribonucleico copia
- ADNmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- ADN-T: ADN de transferencia
- AEBSF: 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
- ami: microARN artificial (*artificial microRNA*)
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNasa: ribonucleasa A
- ARNi: ARN de interferencia
- ARNm: ácido ribonucleico mensajero
- ARNr: ácido ribonucleico ribosomal
- ARNt: ácido ribonucleico de transferencia
- ATP: adenosina trifosfato
- BiFC: Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia.
- BN-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida azul nativo
- BSA: albúmina sérica bovina C: Complejo (hace referencia a complejos mitocondriales, CI, CII, CIII y CIV)
- CaMV: virus del mosaico de la coliflor cm: centímetros
- COX: citocromo c oxidasa
- Da: daltons
- DAB: 3,3'-diaminobencidina
- dATP: desoxiadenosina trifosfato
- dNTP: desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- DO: densidad óptica
- DTNB: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
- DTT: ditioneitol
- EDTA: ácido etilen diamino tetraacético
- ROS: especies reactivas del oxígeno

- FAD dinucleótido de flavina-adenina
- g: gravedad
- FDR: Tasa de descubrimientos falsos positivos.
- Fv/Fm: Eficiencia cuántica máxima del fotosistema II
- GO: Término de ontología génica
- GUS: β -glucuronidasa
- h: hora
- HEPES: ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N´-(2-etanosulfónico)
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- kDa: kilodaltons
- MQ: Agua miliQ
- NBT: nitroblutetrazolium
- Kpb: kilopares de bases
- KCN: Cianuro de potasio
- KO: *Knock out*
- LB: Luria-Bertani
- M: Molar
- mA: miliamper/s
- min: minuto
- ml: mililitro
- mM: milimolar
- mm: milímetros
- mmol: milimoles
- MOPS: ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
- MS: medio de cultivo Murashige-Skoog
- NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida-adenina
- NADH: dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido
- NBT: Nitroblue tetrazolium
- NDs: NAD(P)H deshidrogenasas
- nm: nanómetros
- oe: sobreexpresante
- p/v: peso en volumen

- pb: pares de bases
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PM: peso molecular
- PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo
- Q: Ubiquinona
- RT: Retrotranscripción
- RT-qPCR: RT seguida de PCR cuantitativa en tiempo real.
- SA: ácido salicílico
- SOD: superóxido dismutasa
- rpm: revoluciones por minuto
- s: segundo
- SHAM: Ácido salicilhidroxámico
- SDS: dodecil sulfato de sodio
- TCA: ácido tricarbóxico
- TEMED: N,N,N',N',-tetrametilendiamina
- TM: Dominio transmembrana
- Tris: tris(hidroximetil)-aminometano
- U: unidad/es
- μ : micrometro
- UNL: Universidad Nacional del Litoral
- UV: ultravioleta
- V: volts
- Wt: Ecotipo salvaje
- Δxyz : mutante nula de levaduras en el gen XYZ

2.1. Símbolos para aminoácidos

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteina	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico	P	Pro	Prolina

E	Glu	Ácido glutámico	Q	Gln	Glutamina
F	Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptófano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

2.2. Nomenclatura para genes y proteínas

- *HCC1/AtCOX10*: Gen HCC1/COX10 salvaje de *Arabidopsis thaliana*.
- *hcc1/atcox10*: Gen mutante (*knock-out* o *knock-down*) en *HCC1/AtCOX10* de *Arabidopsis thaliana*.
- HCC1/AtCOX10: Proteína HCC1/COX10 de *Arabidopsis thaliana*. Las primeras dos letras indican la especie a la cual pertenece el gen o la proteína.

3. RESUMEN Y OBJETIVOS

3.1. RESUMEN

En los organismos eucariotas, las mitocondrias son las organelas encargadas de transformar el poder reductor generado por los distintos procesos metabólicos celulares en ATP. Este proceso es llevado a cabo en la membrana interna mitocondrial mediante la cadena de transporte de electrones. La misma está compuesta por 4 complejos multiproteicos que transportan los electrones desde los cofactores reducidos hacia el oxígeno, translocando protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana durante este proceso. Finalmente, este gradiente electroquímico es utilizado por el complejo V para la síntesis de ATP. La estructura de todos estos complejos ha sido extensamente estudiada en levaduras y en mamíferos. Gracias a esto se conoce que el ensamblado de los mismos es un proceso sumamente coordinado, que requiere de la correcta expresión del genoma nuclear y el mitocondrial para la producción de las distintas subunidades. Sumado a esto, es necesario que las proteínas de codificación nuclear sean correctamente importadas y ensambladas en la mitocondria. Además, la mayoría de estos complejos posee grupos prostéticos, los que suman un nivel extra de complejidad, dado que requieren de proteínas que se encarguen de su síntesis e inserción. Finalmente, las plantas, por ser organismos sésiles, poseen vías de ingreso de electrones extras así como también una oxidasa alternativa, las cuales no acoplan su funcionamiento a la translocación de protones. El complejo IV o Citocromo *c* Oxidasa, (COX), es la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones. Este complejo está compuesto por 3 subunidades de codificación mitocondrial (COX1, COX2 y COX3) y 7-10 subunidades de codificación nuclear. COX cuenta con 2 centros de cobre y 2 grupos hemo *a*. Se conoce, por estudios en levaduras, que para el ensamblado de COX son necesarias numerosas proteínas que participan en la inserción de las subunidades y en la síntesis e inserción de los cofactores. Búsquedas bioinformáticas en *Arabidopsis thaliana* han identificado supuestas proteínas homólogas a factores de ensamblado de COX, entre ellas OXA1, COX10, COX11, SURF1, COX15, COX17, COX19, COX23 y SCO1. COX10, COX15 y SURF1 participarían en la formación e inserción del grupo hemo *a*. COX17, COX19 y COX23 participarían en el transporte de cobre hacia SCO1 y COX11. Estas últimas serían las encargadas de la inserción y formación de los centros de cobre en COX.

En la presente tesis, nos propusimos estudiar la función de la proteína involucrada en la biosíntesis del grupo hemo *a* AtCOX10, así como profundizar en el entendimiento del rol biológico que tienen las proteínas de tipo Sco, HCC1 y HCC2, en Arabidopsis.

En levaduras, Cox10p es una farnesil transferasa que cataliza la conversión del hemo *b* en hemo *o*. Es el factor limitante en la biosíntesis del hemo *a* y es esencial para la inserción de éste en COX. En este trabajo, se caracterizó AtCOX10, la probable homóloga de Arabidopsis. AtCOX10 se localizó en la mitocondria y fue capaz de restaurar el crecimiento de la mutante nula de levaduras Δ cox10 en fuentes de carbono no fermentables, sugiriendo su participación en la síntesis del hemo *o*. No se pudieron obtener plantas mutantes con inserción de ADN-T en ambos alelos de AtCOX10. Las plantas heterocigotas mostraron semillas con embriones arrestados en estadios de desarrollo tempranos, los que carecieron de actividad COX. Estas plantas también exhibieron menores niveles de actividad COX y de respiración sensible a cianuro, pero los niveles de respiración total fueron normales a expensas de un incremento en la respiración alternativa. AtCOX10 parece estar implicada en el inicio y la progresión de la senescencia, ya que las mutantes heterocigotas mostraron una disminución más rápida del contenido de clorofila y del rendimiento de los fotosistemas en comparación con las plantas salvajes. Esto se observó durante la senescencia natural y la inducida por oscuridad. Sumado a esto, la complementación de las mutantes por la expresión del ADNc de AtCOX10 bajo el control de su propio promotor permitió obtener plantas con inserciones de ADN-T en ambos alelos de AtCOX10. Las plantas complementadas mostraron características fenotípicas comparables con las de plantas salvajes. Estos resultados resaltan la relevancia de la síntesis del hemo *o* en plantas y sugieren que este proceso es un factor limitante que influencia los niveles de actividad COX, la respiración mitocondrial y la senescencia.

HCC1 es una homóloga de plantas de las proteínas Sco, las que están involucradas en el tráfico e inserción de cobre en COX. Otra proteína similar, HCC2, está presente solamente en plantas y no tiene el dominio de unión a cobre. A pesar de ello, HCC2 presenta un elevado grado de identidad y se conserva en todas las plantas con flores. Para estudiar el rol de HCC1 y HCC2, analizamos el perfil de transcripción global de plantas mutantes en HCC2 (*hcc2*) y plantas que expresan un ARN antisentido

de *HCC1* (As-HCC1). Un número significativo de genes presentó perfiles transcripcionales opuestos en las líneas analizadas. Las plantas *hcc2* mostraron niveles aumentados de transcritos de respuesta a estrés, mientras que se observó una disminución de éstos en plantas As-HCC1. Sumado a esto, se observó una correlación entre los genes inducidos en las mutantes *hcc2* y los asociados con la regulación por especies reactivas de oxígeno (ROS). En cambio, las plantas As-HCC1 presentaron una regulación opuesta de estos genes. En concordancia con esto, las plantas *hcc2* fueron más tolerantes al estrés por NaCl mientras que las As-HCC1 fueron más sensibles. Además, al medir respiración durante el estrés, se observó que las plantas AS-HCC1 presentaban una caída más temprana de la respiración dependiente de COX, con un concomitante aumento de la respiración alternativa, mientras que las plantas *hcc2* mostraron una caída menor que las plantas salvajes. Esto indica que existe una correlación entre la respiración por la vía COX y la tolerancia al estrés. Por otro lado, en plantas *hcc2* los genes de respuesta a estrés mostraron una inducción más temprana y/o mayor luego de un tratamiento breve con NaCl. En cambio, en las plantas As-HCC1 la respuesta se vio inhibida. Ensayos de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) indicaron que ambas proteínas HCC son capaces de interactuar *in vivo*. Los resultados sugieren que las proteínas Sco de plantas tendrían roles opuestos en la modulación de la respuesta a estrés. Dado que HCC2 no posee los residuos involucrados en la unión a cobre, postulamos que podría actuar modulando la actividad de HCC1 a través de interacciones proteína-proteína.

3.2. SUMMARY

In eukaryotic organisms, mitochondria are the organelles in charge of transforming the reducing power produced by the cellular metabolism into ATP. This process is carried out in the mitochondrial inner membrane through the electron transport chain, which is composed of 4 multiprotein complexes that transport the electrons from reduced cofactors to oxygen and translocate protons from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. Finally, the electrochemical gradient is used by complex V to synthesize ATP. The structure of all complexes has been widely studied in yeast and mammals. According to this, it is known that the assembly of these complexes is a highly coordinated process that requires the correct expression of the nuclear and mitochondrial genomes for the production of the different subunits. Added to this, the correct import and assembly of the nuclear encoded proteins to mitochondria is required. In addition, most of these complexes have prosthetic groups, which add an extra level of complexity, since they require proteins that are responsible for their synthesis and insertion. Finally, plants have additional entry pathways for electrons and an alternative oxidase whose activity is not coupled to the translocation of protons. Complex IV or Cytochrome *c* Oxidase (COX) is the terminal enzyme of the electron transport chain. This complex is composed of 3 mitochondrial encoded subunits (COX1, COX2 and COX3) and 7-10 nuclear encoded subunits. COX has 2 copper centers and 2 heme groups. It is known, through studies in yeast, that several proteins involved in the insertion of subunits and the synthesis and insertion of cofactors are necessary for COX assembly. Bioinformatic searches in *Arabidopsis thaliana* identified putative homologues of COX assembly factors, including OXA1, COX10, COX11, SURF1, COX15, COX17, COX19, COX23 and SCO1. COX10, COX15 and SURF1 would participate in the formation and insertion of the heme *a* group. COX17, COX19 and COX23 would be involved in transporting the copper to SCO1 and COX11. These latter would be in charge of the formation and insertion of COX copper centers.

In this thesis, we aimed to study the function of the protein involved in heme *a* group biosynthesis, AtCOX10, as well as to deepen the understanding of the biological role of the Sco-like proteins HCC1 and HCC2 in *Arabidopsis*.

In yeast, the farnesyltransferase Cox10p, that catalyses the conversion of heme *b* to heme *o*, is the limiting factor in heme *a* biosynthesis and is essential for heme *a* insertion in the Cox1p subunit. In order to elucidate the connection between heme *a* synthesis and COX biogenesis and function in plants, we characterized AtCOX10, a putative Cox10p homologue from *Arabidopsis thaliana*. AtCOX10 is localized in mitochondria and is able to restore growth of a yeast Δcox10 null mutant on non-fermentable carbon sources, suggesting that it also participates in heme *o* synthesis. AtCOX10 is an essential protein, since plants with T-DNA insertions in the coding region of both copies of the *AtCOX10* gene could not be recovered and heterozygous mutant plants showed seeds with embryos arrested at early developmental stages that lacked COX activity. Heterozygous mutant plants exhibited lower levels of COX activity and cyanide-sensitive respiration but normal levels of total respiration at the expense of an increase in alternative respiration. AtCOX10 seems to be implicated in the onset and progression of senescence since heterozygous mutant plants showed a faster decrease in chlorophyll content and photosynthetic performance than wild-type plants after natural and dark-induced senescence. These results highlight the relevance of heme *o* synthesis in plants and suggest that this process is a limiting factor that influences COX activity levels, mitochondrial respiration and plant senescence.

HCC1 is a plant homolog of the Sco proteins, which are involved in trafficking and insertion of copper into COX. Another similar protein, HCC2, is only present in plants, and it lacks the copper binding domain. Nevertheless, HCC2 presents high similarity with other Sco proteins and is conserved in all flowering plants. To study the role of HCC1 and HCC2, we analyzed the global transcriptional profile of mutant plants in *HCC2* (*hcc2*) and plants expressing an *HCC1* antisense RNA (As-HCC1). A significant number of genes presented opposite transcriptional profiles in these lines. The *hcc2* plants showed increased levels of stress responsive transcripts, while the opposite pattern was observed in As-HCC1 plants. Furthermore, a correlation between the genes induced in the *hcc2* mutants and genes regulated by reactive oxygen species (ROS) was observed. Instead, As-HCC1 plants showed an opposite regulation of these genes. In line with this, *hcc2* plants were more tolerant to NaCl stress while As-HCC1 plants were more sensitive. Moreover, measuring respiration rate during the stress showed an earlier decrease in COX respiration and a concomitant increase of alternative respiration in As-HCC1 plants, whilst *hcc2* plants showed a lower decrease of COX respiration than wild-type plants. This shows the existence of a correlation between the COX

respiratory pathway and stress tolerance. On the other hand, the stress responsive genes showed an earlier or higher induction after short term treatments with NaCl in *hcc2* plants. Instead, this response was inhibited in As-HCC1 plants. Assays of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) showed interaction between HCC1 and HCC2 *in vivo*. The results suggest that plant Sco proteins have opposite roles in modulating the stress response. As HCC2 does not have the amino acid residues involved in copper binding, we postulate that it could modulate HCC1 activity through protein-protein interactions.

3.3. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo de tesis es realizar estudios funcionales de proteínas relacionadas con la inserción de cobre y hemo en la citocromo *c* oxidasa mitocondrial de plantas. Se analizó el papel de estas proteínas durante el desarrollo vegetal y en respuesta frente a estrés.

3.3.1. LOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS SON:

1. Obtener plantas de *Arabidopsis thaliana* con niveles reducidos de las proteínas HCC1 y COX10, involucradas en la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa.
2. Evaluar el rol fisiológico y molecular de estas proteínas en plantas con niveles alterados de las mismas.
3. Analizar el transcriptoma de plantas con niveles reducidos de HCC1 y de plantas deficientes en HCC2, una proteína con secuencia similar a HCC1.
4. Analizar la respuesta fisiológica y molecular de plantas con niveles alterados de las proteínas HCC frente a estrés.
5. Evaluar si las proteínas HCC1 y HCC2 son capaces de interactuar *in vivo*.

3.4. LUGAR DE REALIZACIÓN DE LA TESIS Y PUBLICACIONES

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (Universidad Nacional del Litoral-CONICET). Los resultados presentados en este trabajo han dado lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a Congresos:

3.4.1. PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES CON REFERATO ESTRICTO

Mansilla N, Garcia L, Gonzalez DH, Welchen E (2015) *AtCOX10, a protein involved in haem o synthesis during cytochrome c oxidase biogenesis , is essential for plant embryogenesis and modulates the progression of senescence*. J Exp Bot. 66: 6761-75.

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

4. INTRODUCCIÓN

4.1. MITOCONDRIAS, FUNCIONES GENERALES.

Las mitocondrias son organelas semiautónomas de doble membrana, distribuidas en los reinos animal, vegetal, fungi y protista. Tienen la capacidad de aumentar su número por fisión de manera independiente de la maquinaria de la célula en la que residen. Las mitocondrias tienen como funciones principales la oxidación de los ácidos orgánicos a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y la generación de energía en forma de ATP (adenosina trifosfato) (Figura 1 A-B). Los procesos que permiten la generación de ATP se encuentran compartimentalizados dentro de las mitocondrias como consecuencia de la presencia de dos membranas, la membrana externa (ME) y la membrana interna (MI). El compartimento que se encuentra encerrado entre ambas membranas se denomina espacio intermembrana (IMS), mientras que la MI delimita la matriz mitocondrial (Figura 1 C-D). La ME contiene poros proteicos que permiten el ingreso de iones y moléculas menores a 4000 Da, mientras que la MI es más selectiva, similar a la membrana plasmática de eucariotas. En la MI se encuentran integrados cinco complejos multienzimáticos encargados de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Figura 1 B). Mediante este proceso, se transforma el poder reductor, generado durante los distintos procesos catabólicos, en un gradiente de protones que finalmente es utilizado para la síntesis de ATP. El complejo I toma 2 electrones provenientes del NADH a la vez que transloca 4 protones (H^+) al IMS. El complejo I transfiere estos electrones al complejo III a través de la ubiquinona. El complejo II, que cataliza la oxidación del succinato a fumarato, transporta los electrones provenientes de esta reacción, mediante el $FADH_2$, hacia la ubiquinona, sin transportar H^+ . Luego, el complejo III o citocromo *c* reductasa transfiere los electrones de la ubiquinona reducida al citocromo *c* oxidado, proceso acoplado al transporte de 4 H^+ . Finalmente, el complejo IV toma los electrones del citocromo *c*, reduciendo el oxígeno a agua y transportando 2 H^+ al IMS. La energía proveniente del gradiente de protones es utilizada por la ATP sintetasa, o complejo V, para producir ATP a partir de ADP (Figura 1B).

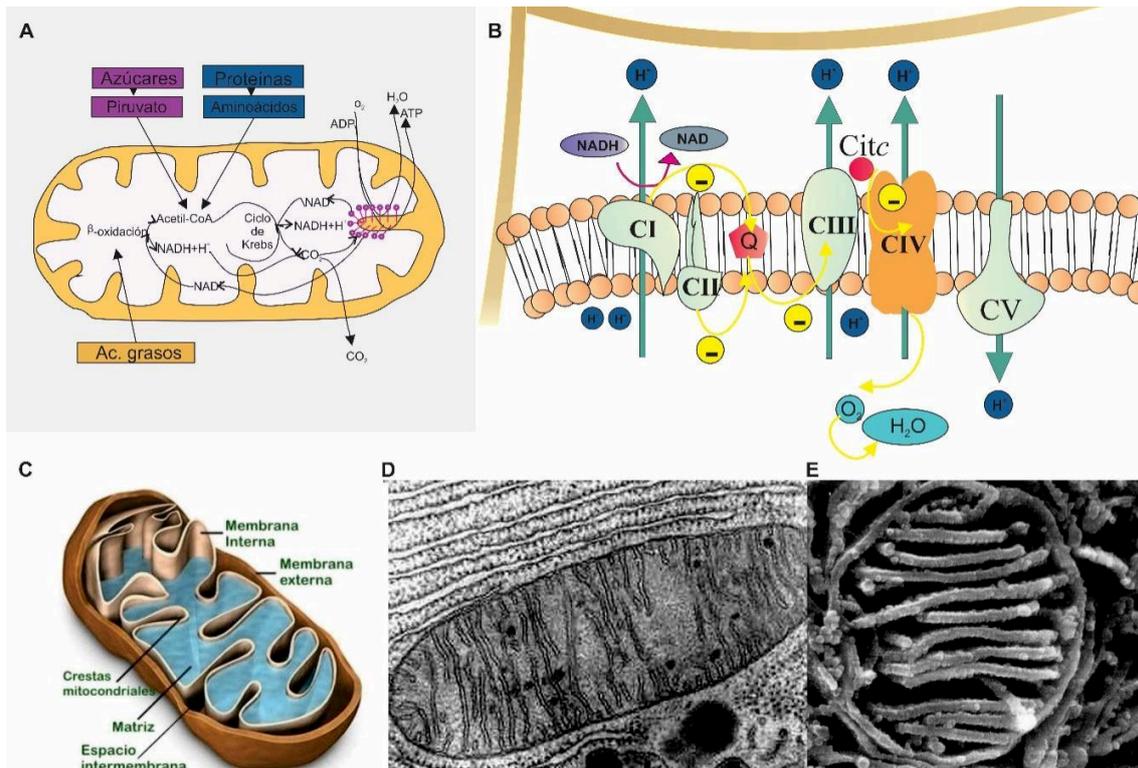


Fig. 1. Mitochondrias: función y estructura. A. Diagrama de las reacciones que ocurren en la matriz mitocondrial y permiten la generación de equivalentes de reducción que ingresan a la cadena transportadora de electrones. B. Diagrama de los complejos respiratorios de la MI de la mitocondria. La flecha amarilla muestra la dirección del transporte de electrones (círculos amarillos). La flecha verde indica el sentido del movimiento de los protones (H^+). C. Diagrama tridimensional que indica las membranas mitocondriales y los espacios delimitados por las mismas. D. Micrografía electrónica de transmisión de una mitocondria (corte longitudinal). E. Micrografía electrónica de una mitocondria (corte transversal). Adaptado de Lucila Garcia 2015, tesis doctoral.

4.2. LA IMPORTANCIA DE LAS MITOCONDRIAS EN ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS.

La naturaleza sésil de las plantas les ha permitido desarrollar diversos mecanismos para completar los distintos estadios de su desarrollo, aún bajo situaciones adversas o anómalas (Dangl y Jones, 2001; Esmo y col., 2005; Vickers y col., 2009). De forma resumida, las plantas integran señales que provienen del ambiente (señales nutricionales, de temperatura y calidad de luz) y de su interacción con otros organismos (Catalá y col., 2011; Depuydt y Hardtke, 2011; Ostaszewska y col., 2014). De esta forma, modulan la actividad energética dentro de la célula, cubriendo las demandas estructurales de crecimiento y de desarrollo en respuesta al ambiente. Las señales se transmiten mediante vías que involucran hormonas, sistemas redox (glutación y ascorbato), calcio, especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), entre

otras (Baudouin y Hancock, 2014; Considine y Foyer, 2014; Sierla y col., 2013). Este sistema de relevamiento de información está sujeto al reloj circadiano y es específico de tejido, órgano y especie (De Vleeschauwer y col., 2013). Se conoce que la mitocondria cumple un rol central en la integración de dichas señales (Colombatti y col., 2014; Jacoby y col., 2012; Schwarzländer y Finkemeier, 2013; Welchen y col., 2014). Estas organelas regulan su organización proteica, composición, forma y número permitiendo un fino ajuste de las actividades metabólicas asociadas con la producción de energía, así como con la síntesis de moléculas que intervienen en el metabolismo redox y mensajeros secundarios (Schwarzländer y Finkemeier, 2013) (Figura 2).

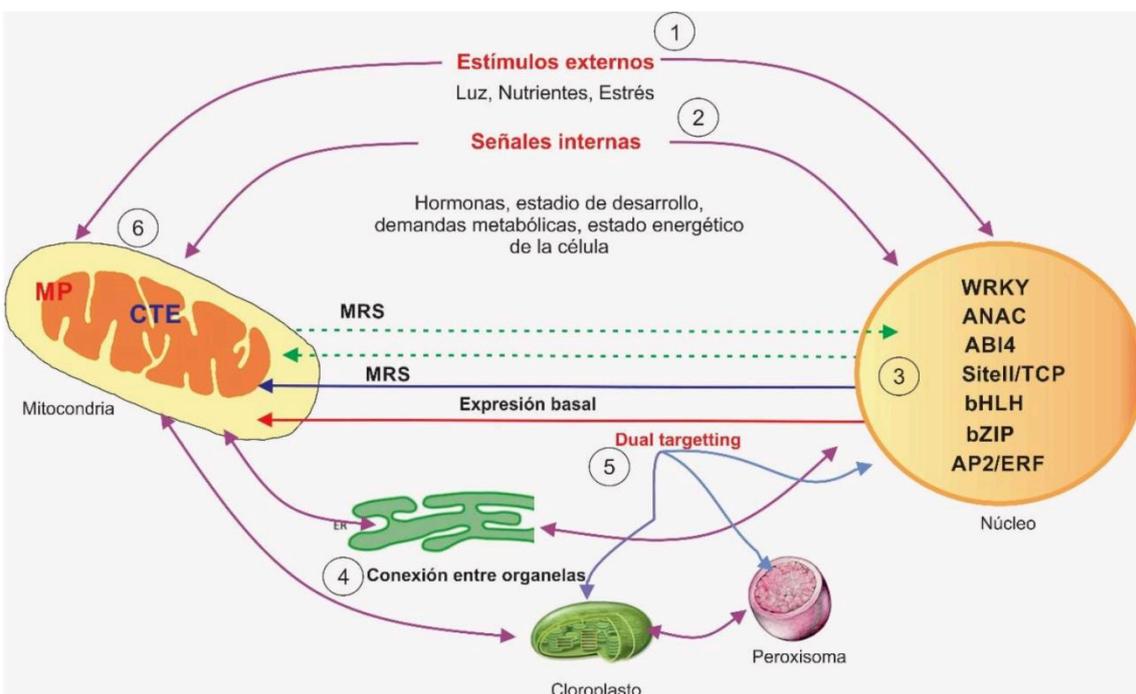


Fig. 2. Regulación de la biogénesis mitocondrial en plantas. La actividad mitocondrial debe integrar diversas señales, tanto externas (1) como internas (2). Dichas señales modifican la expresión de diversas familias de factores de transcripción (3). Los factores de transcripción de las familias TCP, bHLH, bZIP y AP2/ERF estarían involucrados en la regulación de la biogénesis mitocondrial y sus variaciones en diferentes condiciones de crecimiento (ej.: estrés). La localización dual de proteínas en distintas organelas constituye un punto de comunicación entre la mitocondria y el ambiente celular (4 y 5). La interacción física y funcional entre los complejos transportadores de electrones y los complejos de importación (MP) contribuyen a la regulación de la expresión génica y el ensamblaje de las proteínas (6). La mitocondria puede generar señales que modifican la expresión génica para ajustarla a las demandas energéticas de la célula (7). Factores de transcripción de las familias ANAC y WRKY y el factor ABI4 han sido involucrados en la señalización retrógrada mitocondrial (MRS). Modificado de Welchen y col., 2014.

El desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se enmarca dentro de una línea de investigación que intenta profundizar nuestro conocimiento sobre la biogénesis mitocondrial en plantas. En particular, esta línea de trabajo intenta entender cómo la

mitocondria coordina la actividad respiratoria con las demandas celulares y con las demandas del entorno. A continuación se desarrollan algunos conceptos necesarios para entender el objetivo e interpretar los resultados presentados dentro de esta línea de investigación.

4.3. LAS MITOCONDRIAS EN PLANTAS.

La fotosíntesis y la respiración son los principales procesos metabólicos que permiten la producción energética. Mientras la fotosíntesis requiere energía lumínica, CO₂ y H₂O para la generación de carbohidratos y O₂, la respiración utiliza estos carbohidratos para producir intermediarios carbonados, CO₂ y equivalentes de reducción, los que son utilizados para la reducción de oxígeno a agua y la producción de energía en forma de ATP. La glicólisis, la vía de las pentosas fosfato y el TCA son las principales vías metabólicas que utilizan los carbohidratos provenientes de la fotosíntesis para producir intermediarios carbonados para los procesos biosintéticos (Fernie y col., 2004). La oxidación de carbohidratos está asociada con la producción de equivalentes de reducción en la forma de NADH o NAD(P)H. Este poder reductor será utilizado en las vías de biosíntesis o será incorporado a los complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

El proteoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) ha sido ampliamente caracterizado a partir de la aplicación de diferentes estrategias de electroforesis (Heazlewood y col., 2004; Krufft y col., 2001; Lee y col., 2011; Millar y col., 2001; Taylor y col., 2011). En función de estos resultados, más de 1000 proteínas fueron identificadas como mitocondriales en *Arabidopsis* y en *Solanum tuberosum* (Rao y col., 2017). Por otro lado, según métodos bioinformáticos, más de 1500 proteínas tendrían localización mitocondrial en *Arabidopsis*. Es probable que las proteínas mitocondriales que presentan baja abundancia y/o alta hidrofobicidad aún no hayan sido identificadas. Asimismo, numerosas proteínas mitocondriales forman complejos proteicos (ej.: los complejos de la cadena transportadora de electrones) de los cuales solo se han caracterizado los complejos de elevada abundancia (Klodmann y col., 2011). Hasta el momento se han descrito los complejos respiratorios de papa (*Solanum tuberosum*, Jansch y col., 1996 [16 proteínas]; Bykova y col., 2003 [8 proteínas]), *Arabidopsis* (Werhahn y Braun, 2002 [14 proteínas]; Giegé y col., 2003 [26 proteínas]), arroz (*Oryza sativa*; Heazlewood y col., 2003a [57 proteínas]; Millar y col., 2004 [18

proteínas]) y *Arum maculatum* (Sunderhaus y col., 2006 [9 proteínas]). A continuación se describe la composición de los complejos respiratorios de Arabidopsis, dado que es la planta modelo de estudio en este trabajo de tesis, tratando de incluir la comparación con otras especies en las que se haya descrito la estructura de los mismos.

4.3.1. COMPLEJOS RESPIRATORIOS DE PLANTAS.

4.3.1.1. Complejo I o NADH deshidrogenasa.

El complejo I (CI) cataliza la transferencia de electrones del NADH, proveniente del TCA, hacia el *pool* de ubiquinona (Q). En forma acoplada a esta reacción, el CI transporta protones a través de la membrana interna mitocondrial. Estudios de microscopía electrónica mostraron que este complejo está compuesto por dos brazos dispuestos en una conformación ortogonal, adquiriendo una forma en L. Uno de los brazos es hidrofóbico y se encuentra embebido en la membrana interna, mientras que el otro, hidrofílico, alcanza la matriz mitocondrial (Hunte y col., 2010). Las subunidades que forman el CI han sido caracterizadas en distintos reinos. El estudio de este complejo en arroz (*Oryza sativa*), Arabidopsis y *Chlamydomonas reinhardtii* ha permitido identificar subunidades específicas de plantas (Dubinin y col., 2011; Heazlewood y col., 2003b ; Klodmann y Braun, 2011; Soto y col., 2015; Córdoba y col., 2016; Fromm y col., 2016). En Arabidopsis se han identificado al menos 40 subunidades, 9 de las cuales son de codificación mitocondrial (subunidades NAD), formando 10 subcomplejos que se distribuyen entre el brazo hidrofóbico y el brazo hidrofílico (Klodmann y col., 2010). Dentro de las subunidades que son específicas de plantas, muchas forman parte de un dominio específico de plantas asociado a la membrana interna y ubicado hacia la matriz mitocondrial. Este dominio presenta una forma esférica y está constituido por cinco proteínas de tipo γ -anhidrasa carbónica (CA). Se ha propuesto que este dominio estaría involucrado en la transferencia de CO₂ en la célula para proveer CO₂ mitocondrial para la fijación de carbono en el cloroplasto (Martin y col., 2009; Soto y col., 2015; Córdoba y col., 2016). Otra particularidad de plantas es la asociación estructural entre la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH) y el CI (Klodmann y col., 2010). Esta presencia de subunidades específicas en el reino vegetal le proporciona al CI funciones adicionales, además de las reacciones de oxidorreducción asociadas al transporte de electrones. Se ha propuesto que el CI es necesario para mantener el balance redox durante la fotosíntesis; además, la presencia de la GLDH proporciona una conexión

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

4.3.1.2. Complejo II (CII) o succinato deshidrogenasa (SDH).

El complejo SDH forma parte tanto del TCA como de la cadena transportadora de electrones, permitiendo la transferencia de electrones hacia la Q a partir de la oxidación del succinato a fumarato. Este complejo enzimático emplea FAD como cofactor. El CII está constituido por 8 subunidades en *Arabidopsis*, 4 de las cuales no tienen homología con subunidades del CII de mamíferos o bacterias (Millar y col., 2004). A diferencia de los otros 4 complejos de la OXPHOS, todas las subunidades SDH son de codificación nuclear. En forma similar a lo observado para el CI, la composición del complejo SDH difiere según la especie vegetal, si bien en general se conservan las 4 subunidades específicas mencionadas. Las mutantes en las subunidades SDH1 y SDH2 han sido ampliamente estudiadas (Huang y col., 2010). La disminución de la expresión de estas subunidades tiene un claro efecto sobre la eficiencia fotosintética, aumentando la tasa de fijación de CO₂ y la conductancia estomática (Araujo y col., 2011; Fuentes y col., 2011). Por otro lado, una deficiencia en el factor de ensamblaje SDHF2 (de sus siglas en inglés Succinate Dehydrogenase Factor 2) altera el desarrollo normal de la raíz debido a una disminución en el consumo de oxígeno (Huang y col., 2013). Finalmente, se ha reportado que este complejo sería de importancia en la respuesta a patógenos, siendo un sitio de producción de ROS mediada por ácido salicílico (Gleason y col., 2011; Belt y col., 2017)

4.3.1.3. Complejo III (CIII) o citocromo *c* reductasa.

El complejo citocromo *c* reductasa es el tercer complejo de la cadena transportadora de electrones y cataliza la oxidación de la dihidrobiquinona (QH₂) a partir de la reducción del citocromo *c*. En forma acoplada a este proceso se transportan protones al IMS. El CIII de plantas está formado por 10 subunidades. Las subunidades citocromo *b*, citocromo *c*₁ y proteína RIESKE participan en el transporte de electrones, mientras que otras dos subunidades forman el núcleo enzimático. Seis de las subunidades de este complejo se presentan en forma de dímeros (α -MPP, citocromo *c*₁,

proteína RIESKE, QCR6₂, QCR7 y QCR8) (Klodmann y col., 2011; Meyer y col., 2008).

4.3.1.4. Complejo IV o citocromo c oxidasa (COX).

COX es el complejo terminal de la cadena transportadora de electrones y se encarga de transportar dos electrones desde el citocromo *c* para catalizar la reducción del oxígeno a agua. En *Arabidopsis* se han identificado 14 subunidades en este complejo: COX1, COX2, COX3, COXVb, COXVc, COXVIa, COXVIb, COXVIc y COXX1-X6. Las subunidades COXX1 a COXX6 son específicas de plantas (Millar y col., 2004). Este complejo se presenta en diferentes isoformas, las que incluyen distintas subunidades. La isoforma mayoritaria tiene un tamaño de 210 kDa (Senkler y col., 2017). A su vez, el CIV ha sido encontrado formando parte de supercomplejos mitocondriales (Eubel y col., 2004; Klodmann y col., 2011; Senkler y col., 2017). El núcleo de este complejo está formado por las tres subunidades de codificación mitocondrial (COX1, COX2 y COX3). Las subunidades COX1 y COX2 requieren la inserción de iones de magnesio (Mg), así como hemo *a* y centros metálicos de cobre (Cu). La subunidad COX1 coordina un centro metálico binuclear formado por un átomo de Cu (Cu_B) y un átomo de hemo *a*₃, mientras que la subunidad COX2 contiene un centro de Cu binuclear (Cu_A).

4.3.1.5. Supercomplejos mitocondriales.

Los supercomplejos se definen como asociaciones de proteínas complejas cuya formación es beneficiosa para una función celular particular (Eubel y col., 2004). La formación de supercomplejos entre los complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria fue descrita hace más de diez años como un mecanismo que permite aumentar u optimizar el transporte de electrones entre los complejos I a IV, disminuyendo la distancia de difusión de los electrones (Krause y col., 2004; Lenaz y Genova, 2012). La formación de supercomplejos parece ser una característica conservada entre organismos eucariotas (Eubel y col., 2003). La estructura supramolecular de estos complejos ha sido estudiada sistemáticamente a través de la solubilización de las membranas mitocondriales con detergentes y posterior separación en geles *Blue Native* (BN) y segunda dimensión en SDS-PAGE (Meyer y col., 2008; Senkler y col., 2017). En *Arabidopsis*, el supercomplejo más abundante incluye al CI y al CIII en una relación 1:2 (I+III₂). Los supercomplejos de menor abundancia incluyen

la asociación I₂+III₄, III₂+IV₍₁₋₂₎ y, finalmente, el supercomplejo I+II₂+IV₍₁₋₄₎, denominado “respirasoma” (Klodmann y col., 2011; Krause y col., 2004; Senkler y col., 2017). Sin embargo, la composición de los supercomplejos es dependiente del tejido, de la condición de crecimiento de la planta y de la técnica que se emplee para la purificación de los mismos (Liu y col., 2008; Ramirez Aguilar y col., 2011).

4.3.2. VIAS DE TRANSPORTE DE ELECTRONES ALTERNATIVAS EN PLANTAS.

El proteoma mitocondrial es altamente dependiente de la especie que se estudie y del contexto celular en el cual se encuentre la organela (Lotz y col., 2014). En plantas y hongos, la característica distintiva respecto de otros eucariotas es la presencia de una cadena respiratoria ramificada, como consecuencia de la presencia de dos vías de transporte de electrones alternativas, representadas por la enzima oxidasa alternativa (AOX) y las enzimas NAD(P)H deshidrogenasas (NDs) de Tipo II o alternativas (Kerscher, 2000; van Dongen y col., 2011) (Figura 3). La presencia de una amplia variedad de NDs en plantas tiene como consecuencia que los puntos de ingreso de electrones a la cadena transportadora se diversifiquen respecto de otros eucariotas (Schertl y Braun, 2014). La segunda característica distintiva de las mitocondrias en células de especies fotosintéticas es el hecho de que deban coexistir y cooperar funcionalmente con otra organela como el cloroplasto (Yoshida y Noguchi, 2011). La necesidad de esta coexistencia podría explicar las diferencias observadas entre los complejos de plantas y los complejos mitocondriales en otros reinos (Schertl y Braun, 2014). Finalmente, las enzimas de la vía alternativa no forman supercomplejos; sin embargo, algunos autores proponen que la formación de estas supraestructuras podría regular indirectamente la actividad de las vías alternativas. Se ha observado, además, que las oxidasas alternativas y las NDs forman complejos de 160 kDa o de 150-700 kDa (Klodman y col., 2011; Senkler y col., 2017).

La presencia de vías respiratorias alternativas le permite a las plantas un nivel más de regulación y coordinación entre la producción de ATP y el proceso metabólico a partir del cual derivan los equivalentes de reducción NADH y NADPH (NAD(P)H).

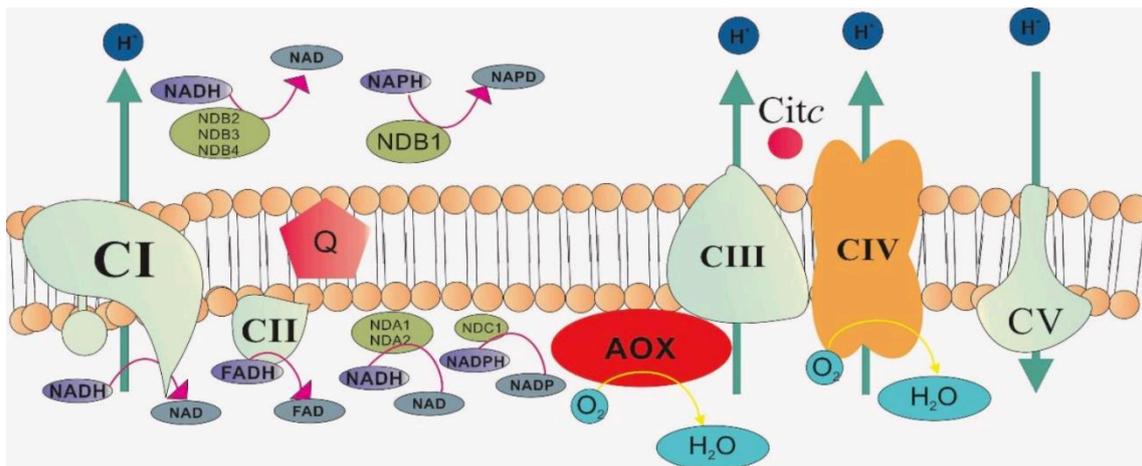


Fig. 3. Esquema de la cadena de transporte de electrones en plantas. Se muestran los complejos respiratorios comunes a los organismos eucariotas (CI, CII, CIII, CIV y CV) y las vías alternativas (NAD(P)H deshidrogenasas y AOX) presentes en el reino vegetal. Q: ubiquinona. Adaptado de Lucila Garcia 2015, tesis doctoral.

4.3.2.1. *NAD(P)H deshidrogenasas alternativas.*

La primera vía alternativa está integrada por un grupo de deshidrogenasas que transportan los electrones del NADH o del NADPH a la Q, pertenecientes a la familia de NDs de Tipo II. Estas enzimas se localizan tanto en la cara interna como en la cara externa de la MI. Es importante recordar que la MI no es permeable al pasaje del NADH o del NADPH, con lo cual esta membrana separa físicamente los equivalentes de reducción provenientes de la matriz, originados en el TCA, de los provenientes del IMS y del citosol. La lanzadera de malato/oxalacetato es la encargada de crear la conexión entre el estado de reducción del citosol y la matriz mitocondrial. Las NDs ubicadas hacia el IMS se denominan deshidrogenasas externas, mientras que las de la matriz se denominan deshidrogenasas internas. En *Arabidopsis*, se han identificado tres familias de genes que codifican enzimas NDs de Tipo II, denominadas *NDA*, *NDB* y *NDC*. La familia *NDA* codifica dos NDs internas (*NDA1* y *NDA2*), la familia *NDB* codifica tres NDs externas (*NDB1*, *NDB2* y *NDB4*) y una aun no caracterizada (*NDB3*) y la familia *NDC* codifica solo una ND interna (*NDC1*) (Elhafez y col., 2006; Geisler y col., 2007; Michalecka y col., 2003). Los primeros resultados obtenidos en relación con la localización de las NDs de Tipo II habían mostrado que estas enzimas tenían localización mitocondrial; sin embargo, resultados posteriores muestran que varios de los integrantes de esta familia presentan localización dual, mitocondria-cloroplasto o mitocondria-peroxisoma (Carrie y col., 2008). Sin embargo, la función de estas enzimas en cloroplastos y peroxisomas aún no ha sido dilucidada (Wallstrom y col., 2014a). Aunque estas enzimas emplean los electrones provenientes de las nicotinamidas para

reducir la Q, imitando la función del CI, la actividad de las NDs no está acoplada al transporte de H⁺ hacia el IMS. Nuevamente, la Q reducida es oxidada luego por el CIII para transportar electrones al citocromo *c* y, finalmente, al CIV. De acuerdo con esto, la vía dependiente de NDs es bloqueada por el inhibidor del CIII antimicina A, así como por cianuro que actúa sobre el CIV, pero no por el inhibidor del complejo I rotenona. Además, la actividad de las deshidrogenasas externas es regulada por cationes divalentes como el calcio (Ca) y por cambios en los niveles de pH. Esta regulación no ocurre para las deshidrogenasas internas (Rasmusson y col., 2004). Si bien la actividad ND externa ha sido demostrada tiempo atrás, su rol fisiológico aún es materia de debate. La función de estas enzimas debe entenderse considerando que son capaces de regular los niveles de reducción del NADH y del NADPH. Dada la multiplicidad de rutas metabólicas que incluyen a estas moléculas, es de esperarse que participen en gran parte de los procesos celulares. Las deshidrogenasas externas podrían regular y/o detectar el estado de reducción del NADH y del NADPH en el citoplasma. De esta manera, podrían influenciar la actividad de vías metabólicas relacionadas con el metabolismo del carbono, la asimilación de nitrógeno, la defensa ante patógenos y la actividad de vías de biosíntesis y de respuesta a estrés abiótico (Rasmusson y col., 2004; Rasmusson y Wallstrom, 2010). Recientemente, se ha demostrado que plantas de *Arabidopsis* mutantes en la enzima NDB1 (ND externa) presentan niveles reducidos de NADP⁺. Esta reducción disminuye los niveles de azúcares solubles y los intermediarios del TCA en hojas. Además, las plantas *ndb1* modifican la expresión de genes que participan en la defensa ante patógenos mediada por el ácido jasmónico. Finalmente, la reducción de la actividad NDB1 afecta el normal desarrollo de las hojas en *Arabidopsis* (Wallström y col., 2014a). Resultados obtenidos en plantas de tabaco (*Nicotiana glauca*) que expresan la enzima NDB1 de papa mostraron que esta enzima regula los niveles de NADP⁺/NADPH en hojas, sin modificar la relación NAD⁺/NADH. Además, la disminución de la expresión de *NDB1* incrementa la expresión de genes de la vía de la AOX de manera similar a lo observado en mutantes del CI (mutantes CMSII) (Liu y col., 2008). Si bien la enzima NDB1 es regulada por luz, en las plantas con niveles alterados no se observaron cambios en el estado de oxidorreducción del cloroplasto. Esto indicaría que la regulación de los equivalentes de reducción exportados desde el cloroplasto no estaría asociada con el estado de oxidorreducción del citosol (Liu y col., 2008). Se ha sugerido que la principal vía que es afectada por cambios en la relación

NADP⁺/NADPH en el citosol es el ciclo de la oxidación de las pentosas fosfato (Rasmusson y Wallstrom, 2010).

La actividad ND de Tipo II ha sido ampliamente asociada con el proceso de fotorrespiración y la respuesta a estrés abiótico (Vanlerberghe y col., 2009). La fotorrespiración incrementa drásticamente la producción de NADH en la matriz mitocondrial. La actividad deshidrogenasa alternativa podría regular el estado reducido del NADH evitando la saturación de la cadena transportadora de electrones y el bloqueo de los procesos metabólicos que esto implicaría. En este punto, es necesaria la actividad coordinada de las NDs alternativas y de la vía de la AOX. De acuerdo con esta idea, los genes que codifican proteínas de las vías alternativas se encuentran coordinadamente regulados a nivel transcripcional durante situaciones de estrés y en diferentes estadios del desarrollo (Clifton y col., 2006; Ho y col., 2007; Rasmusson y col., 2009; Van Aken y col., 2009b). Considerando este resultado, la deshidrogenasa NDB2 (ND externa), la NDA2 (ND interna) y una de las isoformas de AOX (AOX1a) integrarían una misma vía alternativa coordinada. Ho y col. (2007) han propuesto que la enzima NDB4 regularía de manera coordinada con la vía de la AOX (a través del producto génico de *AOX1c*) el estado redox de la célula en diferentes estadios del desarrollo. Notablemente, plantas de *Arabidopsis* mutantes en *NDB4* presentan alteraciones en el desarrollo de las hojas en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, bajo condiciones de estrés las plantas mutantes inducen genes que codifican la vía de la AOX y los genes *NDB2* y *NDB1*. Esta reorganización transcripcional explicaría la mayor tolerancia a estrés por NaCl evidenciada en estas plantas.

4.3.2.2. La oxidasa alternativa.

La enzima AOX es una ubiquinol oxidasa presente en la mitocondria de la mayoría de las plantas estudiadas y en otros organismos como hongos y protistas, incluyendo microorganismos patógenos como *Trypanosoma brucei* y *Cryptosporidium parvum*. En α -proteobacterias y en algunas especies primitivas del reino animal también se han encontrado homólogos de esta enzima (Vanlerberghe, 2013). AOX ha sido localizada en la MI de la mitocondria de distintos eucariotas. En plantas, la forma activa de la enzima es un homodímero (Moore y Albury, 2008; Moore y col., 2013). Aparentemente, esta sería una particularidad de plantas dado que los homólogos de AOX en hongos y en protistas pierden las cisteínas necesarias para la formación del

homodímero (Umbach y col., 2006; Umbach y Siedow, 2000). Si bien no se la ha encontrado asociada a ninguno de los supercomplejos mitocondriales hasta ahora conocidos, se cree que la inclusión o no de AOX en supercomplejos es dinámica (Kakizaki y col., 2012). AOX cataliza la oxidación de la QH₂, transfiriendo los electrones necesarios para la reducción del oxígeno a agua. Considerando los sustratos y los productos de la catálisis de esta enzima, AOX puede cumplir la función oxidativa realizada por los complejos III y IV en la mitocondria. Dado que esta enzima no puede transportar H⁺, el transporte de electrones mediado por AOX produce una reducción dramática de la producción de ATP. Sin embargo, si los electrones aún ingresan a través del CI, AOX puede mantener una producción mínima de ATP (Vanlerberghe, 2013). En plantas, se ha sugerido que esta vía alternativa cumpliría un rol clave durante el metabolismo celular y ante situaciones de estrés biótico y abiótico. Se propone que esta enzima podría aliviar el transporte de electrones acoplado a la producción de ATP. De esta manera, actuaría como un componente amortiguador entre el metabolismo del carbono y la producción de energía. (Van Aken y col., 2009a, Dinakar y col., 2016). Además de una función en el metabolismo primario, se cree que esta enzima podría actuar como una molécula de señalización, indicando el estado reducido u oxidado de la mitocondria. AOX podría regular los niveles ROS y RNS a través de la regulación de los niveles de moléculas antioxidantes como el glutatión (GSH) y el ascorbato (Millar y col., 2011) o modificando la expresión de genes nucleares de respuesta a estrés (Van Aken y col., 2009a; Van Aken y col., 2009b).

En el reino vegetal, las proteínas AOX están codificadas por dos subfamilias génicas, *AOX1* y *AOX2*. En plantas dicotiledóneas se han encontrado genes pertenecientes a ambas subfamilias, mientras que en monocotiledóneas solo se han identificado genes pertenecientes a la subfamilia *AOX1* (Considine y col., 2002). Los genes pertenecientes a la subfamilia *AOX1* son inducidos ante diversas situaciones de estrés, mientras que los genes pertenecientes a la subfamilia *AOX2* no responden a situaciones adversas pero presentan una expresión diferencial según el órgano y el estadio de desarrollo de la planta (Clifton y col., 2006; Van Aken y col., 2009a). En *Arabidopsis*, se han identificado cinco genes que codifican AOX, *AOX1a-d* y *AOX2* (Saish y col., 2001). Los primeros estudios que intentaron dilucidar la función y regulación de AOX en *Arabidopsis* mostraron que *AOX1a* es inducido por los inhibidores de los complejos de la cadena respiratoria, inhibidores del TCA e

inhibidores del flujo de calcio, así como por diversas situaciones de estrés biótico y abiótico (Juszczuk y col., 2012; Vanlerberghe y McIntosh, 1996). El análisis de la secuencia promotora de *AOX1a* y ensayos de retardo en gel permitieron identificar un elemento represor que es unido por el factor de transcripción ABI4 (de su nombre en inglés ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4) (Giraud y col., 2009). Dado que ABI4 participa en la regulación retrógrada por señales del cloroplasto, este resultado permite pensar en la existencia de un punto de coordinación entre la mitocondria y la organela fotosintética (Giraud y col., 2009).

Se ha demostrado que la sobreexpresión del factor de transcripción WRKY15 inhibe la inducción de *AOX1a* en plantas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de estrés salino (Vanderauwera y col., 2012). Este resultado es coincidente con la existencia de cajas-W5 en el promotor de este gen (Dojcinovic y col., 2005). Además, la expresión de *AOX1a* en *Arabidopsis* sería regulada por factores de transcripción de la familia ANAC, otros miembros de la familia WRKY y por MYB29 (De Clercq y col., 2013; Ng y col., 2013b; Van Aken y col., 2013; Zhang y col., 2017). Finalmente, se ha descrito en un modelo *in vitro* que las diferentes proteínas de la subfamilia AOX1 serían capaces de ser activadas en forma alostérica por distintos metabolitos mitocondriales como piruvato, succinato y glioxilato. Esta regulación podría deberse a la capacidad de las cisteínas ubicadas en el dominio amino terminal de interactuar con estos metabolitos (Selinski y col., 2017).

4.3.2.3. Proteínas desacoplantes.

Hasta su descubrimiento en mitocondrias de papa, se creía que las proteínas desacoplantes (UCP) eran una evolución tardía solo presente en el tejido pardo de mamíferos (Vercesi y col., 1995). Estas proteínas permiten el transporte de aniones lipídicos a través de la MI. Los aniones lipídicos inducen el transporte de H⁺ (Garlid y col., 1996). Este mecanismo le permite a la mitocondria desacoplar el transporte de protones hacia la matriz de la producción de ATP. Se ha propuesto que los aniones de ácidos grasos son producto de reacciones de peroxidación lipídica en la matriz mitocondrial, consecuencia de la generación de ROS (Vercesi y col., 2006). Las especies reactivas pueden originarse como subproductos de la respiración (ver en la próxima sección) o como consecuencia de una situación adversa. Cualquiera fuese el caso, la presencia de las UCP permite mantener, o incluso incrementar, la tasa de

transporte de electrones aun cuando los niveles de ATP son elevados (Smith y col., 2004).

Recientemente, se descubrió que plantas de tabaco que sobreexpresan la UCP1 son capaces de tolerar situaciones de estrés osmótico y de toxicidad por iones Na^+ (Begcy y col., 2011). Finalmente, la actividad de estas proteínas no solo influiría sobre el gradiente de protones sino también sobre la actividad del TCA (Smith y col., 2004).

4.3.3. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS EN LA MITOCONDRIA.

Como resultado de la actividad respiratoria, las mitocondrias son organelas productoras de ROS (mtROS). El transporte de electrones mediante los complejos I, III y IV puede generar aniones superóxido (O_2^-), dado que los electrones que se transportan tienen suficiente energía libre para reducir directamente el oxígeno molecular. Los aniones O_2^- generados serán luego dismutados a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como consecuencia de la actividad de la enzima superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) (Moller, 2001). Esta isoforma se ha localizado en la matriz mitocondrial (Kliebenstein y col., 1998). Luego, parte del H_2O_2 producido en la matriz podría ser detoxificado por enzimas del sistema de peroxirredoxinas o por enzimas del ciclo ascorbato-glutación (Dietz y col., 2006; Locato y col., 2009). Además, el H_2O_2 puede reaccionar con cationes Fe^{2+} o Cu^+ para producir radicales aún más tóxicos. Por otro lado, dada la falta de polaridad del H_2O_2 , esta molécula puede atravesar las membranas mitocondriales, abandonar la mitocondria y salir al citosol (Moller y Sweetlove, 2010; Morgan y col., 2008). La producción de O_2^- en la mitocondria se incrementa cuando la organela no produce ATP, ya que entonces el potencial de membrana es elevado y las relaciones NADH/NAD^+ y QH_2/Q se incrementan. Este es un mecanismo común en organismos eucariotas (Blokhina y Fagerstedt, 2010; Cvetkovska y col., 2013a; Navrot y col., 2007). Los electrones de la QH_2 son altamente reactivos y pueden atacar el oxígeno molecular (Moller, 2001). Esto se ha demostrado en mitocondrias aisladas, donde la producción de O_2^- se incrementa de una manera dependiente de sustrato y en presencia de inhibidores del CIV y de la AOX en plantas (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2013; Moreno-Sanchez y col., 2013). Además, se ha postulado que la actividad del CII es la determinante de la producción de mtROS en respuesta a ácido salicílico (Belt y col., 2017).

En condiciones normales de funcionamiento, la producción de O_2^- es mínima y no hay evidencias de que bajo estas condiciones las mtROS generen algún tipo de daño (Sena y Chandel, 2012). Sin embargo, cuando los niveles de mtROS se incrementan, éstas pueden generar daño a nivel del ADN mitocondrial (mtADN), de los complejos mitocondriales y de los lípidos que constituyen las membranas (Kristensen y col., 2004; Millar y Leaver, 2000; Rhoads y col., 2006; Rurek, 2014). El daño o la alteración en la función mitocondrial podría originar consecuencias que incluyen la modificación de la transcripción (comunicación retrógrada) e incluso la muerte celular (Schwarzlander y col., 2012; Simon y col., 2000). Sin embargo, se cree que las ROS, en cierto rango de concentraciones, podrían actuar como moléculas de señalización sin generar daño y transmitiendo el estado oxidativo de los diferentes compartimentos de la célula (Hamanaka y Chandel, 2010).

La implicancia de las ROS producidas en la célula durante la repuesta a estrés en plantas ha sido ampliamente demostrada (revisado por Sharma y col. 2002). Además, su función no se restringe a la respuesta a estrés, sino que actúan como reguladores de distintos procesos (Considine y Foyer, 2014; Karkonen y Kuchitsu, 2014). El estudio del rol de las mtROS, distinguiéndolas de las ROS generadas en el resto de la célula, es complejo y dicha complejidad se evidencia en las escasas publicaciones que distinguen el origen de las ROS producidas. Se ha demostrado que, en células de la raíz, las mitocondrias son las principales productoras de ROS tanto en condiciones adecuadas de crecimiento como en presencia de ácido salicílico (Gleason y col., 2011). Además, la disminución de la actividad del CII disminuye los niveles de H_2O_2 mitocondriales, generando plantas incapaces de activar la expresión del gen *GST8* (*GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE 8*). La falta de expresión de *GST8* o la falta de señalización mediada por H_2O_2 mitocondrial genera plantas más sensibles al ataque por patógenos fúngicos (Gleason y col., 2011, Belt y col., 2017). En línea con esta idea, un estudio en el que se analizan las mtROS mediante microscopia sugiere que la generación de aniones superóxido en la mitocondria es una señal necesaria para que se desencadene la respuesta hipersensible en plantas de tabaco infectadas con *Pseudomonas syringae* incompatible pv. Maculicola (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2013). En forma contraria a lo observado en las plantas deficientes en el CII, las plantas mutantes en *AOX1a* aumentan los niveles de mtROS pero presentan una respuesta hipersensible retardada luego de la infección con *P. syringae* incompatible pv. Maculicola. Es decir que los

niveles de AOX en plantas determinan la magnitud de la producción de aniones superóxido en la mitocondria y la magnitud de la respuesta hipersensible (Cvetkovska y Vanlerberghe, 2013).

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

Los electrones ingresan a la cadena transportadora de electrones a través de la oxidación del NAD(P)H generado en la matriz mitocondrial, en el IMS o en el citosol debido a la actividad de diversas deshidrogenasas. Además, los nucleótidos de flavina (FADH₂, FMNH₂) unidos pueden hacer ingresar electrones a la cadena transportadora. Finalmente, distintas deshidrogenasas pueden ingresar electrones directamente a la Q o al citocromo *c* (Liu y col., 2008; Rasmusson y Wallstrom, 2010). Se pueden definir cuatro vías de ingreso de electrones a la cadena transportadora de electrones (Schertl y Braun, 2014): 1) La vía del NAD(P)H de la matriz; 2) la vía del FADH₂ de la matriz; 3) la vía del NAD(P)H del IMS y 4) la vía del FADH₂ del IMS (Figura 4).

4.3.4.1. NAD(P)H de la matriz.

El NAD(P)H en la matriz es generado como consecuencia del TCA (Ferne y col., 2004) y de la actividad de distintas deshidrogenasas de la matriz. Entre ellas podemos nombrar: α -cetoglutarato deshidrogenasa, deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada, formato deshidrogenasa, glicina descarboxilasa, glutamato deshidrogenasa, histidinol deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, enzima málica, metilmalonato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, succinato semialdheído deshidrogenasa y sacaropina deshidrogenasa.

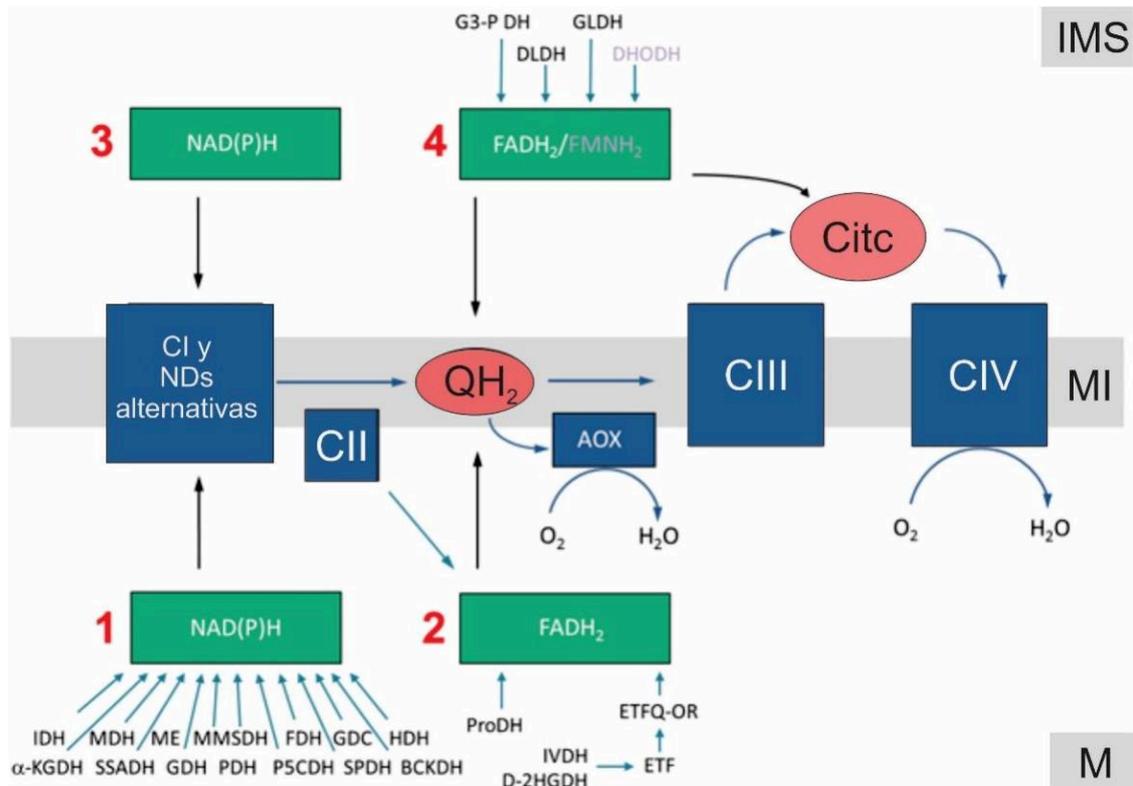


Fig. 4. Vías metabólicas que pueden ingresar electrones a la cadena transportadora de electrones en plantas. Los electrones ingresan a la cadena transportadora de electrones en plantas a través de distintas vías (detalladas en el cuerpo de este trabajo). 1. Distintas deshidrogenasas transfieren electrones en forma de NADH a la cadena transportadora a través del CI. 2. Enzimas que utilizan FAD oxidan compuestos carbonados y transfieren electrones directa o indirectamente a la ubiquinona. 3. El NAD(P)H citoplasmático ingresa electrones a la ubiquinona a través de las deshidrogenasas alternativas. 4. Las enzimas que contienen FAD/FMN oxidan compuestos carbonados en el IMS y transfieren electrones directamente a la ubiquinona o al citocromo c. Adaptado de Lucila Garcia 2015, tesis doctoral.

4.3.4.2. *FADH₂ de la matriz.*

El FADH₂ es generado en la matriz como consecuencia del metabolismo de la prolina a partir de la enzima prolina deshidrogenasa (Szabados y Savoure, 2010). La enzima isovaleril deshidrogenasa, involucrada en el catabolismo de los aminoácidos ramificados, y la enzima D-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa, involucrada en el catabolismo de la lisina, transfieren electrones a un sistema enzimático formado por dos flavoproteínas (Araujo y col., 2010), la enzima flavoproteína de transferencia de electrones y la flavoproteína de transferencia de electrones-ubiquinona oxidoreductasa (ETFQ-QR). Las enzimas prolina deshidrogenasa y ETFQ-QR podrían transferir electrones directamente a la Q sin necesidad de la actividad del CII (Szabados y Savoure, 2010).

4.3.4.3. NAD(P)H del IMS.

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

4.3.4.4. FADH₂ del IMS.

El FADH₂ es generado en el IMS como consecuencia de metabolismos mitocondriales específicos de plantas. El paso final de la síntesis del ascorbato en plantas se realiza en la mitocondria (Bartoli y col., 2000). La oxidación del precursor del ascorbato (L-galactono-1,4-lactona; GL), catalizada por la enzima GL deshidrogenasa (GLDH), transfiere electrones al nucleótido de flavina de esta enzima. Además, las enzimas D-Lactato deshidrogenasa (DLDH), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y orotato deshidrogenasa (DHODH) pueden transferir electrones a sus nucleótidos de flavina como consecuencia de la oxidación de productos carbonados. Todas estas enzimas podrían transferir electrones directamente a la Q o al citocromo *c*.

Las distintas vías de ingreso de electrones a la cadena de transporte de electrones de la mitocondria reflejan la flexibilidad de este proceso en plantas. Cuando las plantas crecen bajo condiciones de suficiencia de carbohidratos, el TCA es el principal proveedor de NAD(P)H y FADH₂. Lo mismo ocurre en tejidos no fotosintéticos o durante la noche (Sweetlove y col., 2010). Esta forma de transferencia de electrones es similar a la observada en mamíferos. Sin embargo, durante el día, cuando la fotosíntesis ocurre, los niveles de NAD(P)H provenientes del TCA disminuyen drásticamente dado que los intermediarios carbonados son utilizados para reacciones anabólicas. En paralelo, las reacciones de la fotorrespiración aumentan los niveles de NADH como consecuencia de la activación de la enzima GDC (Sweetlove y col., 2010). En situaciones adversas de crecimiento, las plantas nuevamente modifican las vías de ingreso de electrones para asegurar su supervivencia. A modo de ejemplo, cuando *Arabidopsis* es crecida en presencia de elevadas concentraciones de NaCl, el aminoácido prolina es utilizado como osmoprotector. Luego de la situación de estrés, este aminoácido es usado como una de las fuentes principales de electrones a través de la ProDH (Szabados y Savoure, 2010). De esta manera, las plantas adaptan la actividad

de los centros respiratorios a los requerimientos celulares, tanto en condiciones de crecimiento normal como ante situaciones de estrés.

4.4. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL.

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

mtROS durante la muerte celular programada (Yoshinaga y col., 2005). Estas evidencias refuerzan la idea del rol central de la mitocondria en las distintas funciones celulares.

Además de la regulación de la biogénesis en términos de la dinámica mitocondrial, la génesis mitocondrial incluye otro nivel de regulación y complejidad. Como consecuencia de la migración de genes de la mitocondria y del cloroplasto al núcleo, el genoma de las organelas se ha empobrecido y la mayoría de los productos génicos que requieren las funciones que éstas desarrollan son codificados en el núcleo, sintetizados en los ribosomas del citosol e importados a las organelas. En este contexto, el ensamblaje de los complejos respiratorios es un proceso complejo que debe coordinar la síntesis de las subunidades de codificación mitocondrial con la síntesis de las subunidades y proteínas accesorias de codificación nuclear. Es decir que se requiere la coordinación entre dos genomas y sus respectivas maquinarias de expresión y la maquinaria de transporte e inserción de proteínas en las membranas mitocondriales, en la matriz o en el IMS.

Distintos mecanismos permiten controlar la expresión de genes mitocondriales (MGE) a partir de la regulación de la expresión de genes nucleares (NGE). Estas vías de señalización se denominan señales anterógradas. Por otro lado, el ensamblado de complejos y supercomplejos debe atender a los requerimientos celulares, en concordancia con el cambio en número, forma y posición de las mitocondrias que se mencionaron anteriormente. En este contexto, la regulación de la NGE debe contemplar información sobre el estado metabólico y el estadio de desarrollo de la organela. La información proveniente de las organelas que genera una modificación en la NGE se denomina señal retrógrada. En este escenario de comunicación, con diversos protagonistas, muchas de las señales que permiten el diálogo aún no han sido identificadas.

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

4.5. GENOMA MITOCONDRIAL.

Se han identificado 1500 productos génicos en las mitocondrias. Sin embargo, no se han identificado más de 45 proteínas de codificación mitocondrial en *Arabidopsis* (Emanuelsson y col., 2000; Gagliardi y Binder, 2007; Lee y col., 2013). Se ha propuesto que los genes nucleares requeridos para la función mitocondrial son el resultado de la migración de genes desde la mitocondria al núcleo durante el curso de la evolución. El genoma mitocondrial (mtADN) de plantas superiores presenta particularidades respecto de otros genomas mitocondriales eucariotas. En relación con la conformación del mtADN, se ha observado que es más grande que el de otros eucariotas, es heterogéneo entre especies de plantas y, además, puede adoptar una conformación lineal (Backert y col., 1997a). Esta característica le permitiría replicarse mediante un mecanismo de círculo rodante, a diferencia de la replicación tipo *theta* observada en el genoma mitocondrial de mamíferos (Backert y col., 1997b).

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

El genoma mitocondrial de *Arabidopsis*, descrito por Unseld y col. (1997), contiene 57 genes distribuidos en 367 Kpb, representando menos del 5% de los productos génicos encontrados en la mitocondria. Entre los genes presentes en este genoma se encuentran los que codifican las proteínas NAD1 a NAD9 del CI, el gen que codifica la proteína COB del CIII, los genes que codifican las tres subunidades que forman el núcleo enzimático del CIV (COX1, COX2 y COX3) y los genes que codifican las proteínas ATP1, 6 y 9 del complejo ATP sintetasa. Además, se han

encontrado genes que codifican proteínas involucradas en la biogénesis del citocromo *c*, genes que codifican los ARNr 26S, 18S y 5S, y los que codifican las proteínas ribosomales RPL2, 5 y 16 y RPS3, 4, 7 y 12. Finalmente, se han identificado 22 ARNt codificados en el genoma mitocondrial (Kadowaki y col., 1996).

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

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

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

4.7. EXPRESIÓN COORDINADA DE LOS GENES NUCLEARES DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES.

La expresión de los genes de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo debe estar finamente coordinada con las demandas celulares y ambientales a lo largo del

desarrollo de la planta. Es de esperarse, entonces, que existan mecanismos que permitan la expresión concertada de estos genes. De acuerdo con esta idea, los genes que codifican proteínas constituyentes de los complejos respiratorios muestran un patrón similar de expresión, observándose una acumulación en los niveles de transcritos durante un mismo momento del desarrollo, como la floración (Ribichich y col., 2001). El incremento de la expresión de genes respiratorios durante la floración estaría directamente relacionado con el rol fundamental que cumple la mitocondria durante el desarrollo del polen. Además de responder a un programa de desarrollo, se ha mostrado que la expresión de estos genes es dependiente del tejido (Skirycz y col., 2010; Welchen y col., 2004). Peters y col. (2012) han demostrado que la relación de proteínas que componen los Complejos I y II difiere en tejidos fotosintéticos respecto de tejidos no fotosintéticos. Los genes de proteínas mitocondriales de codificación nuclear no solo muestran una expresión coordinada según el estado de desarrollo y de diferenciación celular de la planta. Se ha observado que los genes que codifican subunidades del CIV y del CI modifican su expresión en función de la disponibilidad de nutrientes, frente al tratamiento con hormonas, cuando las plantas son crecidas en diferentes ciclos de luz y oscuridad y bajo distintas intensidades lumínicas (Comelli y Gonzalez, 2009; Gibala y col., 2009; Giege y col., 2005; Welchen y col., 2002, 2004). De forma particular, la regulación transcripcional de los genes respiratorios de codificación nuclear incorpora un punto de balance y comunicación entre la función mitocondrial y la actividad sintética de los cloroplastos (Gonzalez y col., 2007). Finalmente, se ha observado una respuesta coordinada de los genes nucleares que codifican subunidades de los complejos respiratorios ante situaciones que generan estrés oxidativo, luego de la infección con patógenos o durante una situación de estrés abiótico (Attallah y col., 2007; Cvetkovska y col., 2013; Ho y col., 2008; Rurek, 2014; Van Aken y col., 2009b; Van Aken y col., 2013).

Distintas evidencias sugieren que la coordinación de la expresión de los genes respiratorios de codificación nuclear podría ocurrir a nivel transcripcional y principalmente debido a la interacción de factores de transcripción que unen elementos comunes encontrados en los promotores de estos genes. Se ha propuesto que los elementos denominados site II (5'-TGGGCC/T-3') podrían participar en la coordinación de la expresión de los genes respiratorios (Giraud y col., 2010; Welchen y Gonzalez, 2005; Welchen y Gonzalez, 2006). Estos sitios se han identificado en más del

80% de los genes que codifican subunidades del CI, CIII, CIV y del complejo ATP sintetasa en *Arabidopsis* y en *O. sativa* y serían unidos por factores de transcripción pertenecientes a la familia TCP (Welchen y Gonzalez, 2006). Dada la función de las proteínas TCP en los procesos de crecimiento en plantas, se ha propuesto que la interacción TCP-siteII permitiría coordinar la expresión de los genes de proteínas mitocondriales con las demandas de la célula durante el crecimiento y la proliferación (Uberti-Manassero y col., 2012; Uberti-Manassero y col., 2013). Considerando que estos elementos han sido encontrados en genes que codifican proteínas ribosomales, proteínas del cloroplasto y proteínas peroxisomales, se ha sugerido que formarían parte de un mecanismo global de coordinación de la expresión génica durante el desarrollo y la proliferación (Welchen y col., 2014).

Además de los elementos site II, estudios bioinformáticos sugieren que habría un enriquecimiento de las secuencias consenso para los factores de transcripción ABI4, MNB1A, DOF2 y DOF3 en los promotores de los genes de la OXPHOS de codificación nuclear (Leister y col., 2011). Otros factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los genes respiratorios de codificación nuclear pertenecen a las familias bZip, AP2/ERF y bHLH (Comelli y Gonzalez, 2009; Comelli y col., 2012; Welchen y col., 2009).

4.8. REGULACIÓN RETRÓGRADA EN ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS.

La biogénesis de los complejos respiratorios requiere que el estado energético de la mitocondria sea transmitido al núcleo para modificar la expresión de genes nucleares que participan en la síntesis de componentes de la cadena de transporte de electrones. Como se mencionó en la introducción de esta sección, esta red de señales se denomina señalización retrógrada mitocondrial (SRM). Una de las principales complicaciones al momento de estudiar este tipo de mecanismos es poder diferenciar cuáles son las señales que se generan exclusivamente en la mitocondria. En plantas, la presencia de una segunda organela portadora de información génica y de función relevante en la célula incorpora un punto más de complejidad al momento de estudiar el proceso de señalización retrógrada debido a la interacción entre las dos organelas (Van Aken y Whelan, 2012). De hecho, un estudio sobre la función de una prolil-tRNA sintetasa de localización dual (mitocondria-cloroplasto) demostró que es necesaria la perturbación de la traducción en ambas organelas para que se dispare la señalización retrógrada. En

los últimos años distintos grupos de investigación se han abocado al estudio y determinación de las moléculas o señales que participan en la SRM (De Clercq y col., 2013; Leister y col., 2011; Schwarzlander y col., 2012; Van Aken y col., 2013; Ng y col., 2013a; Zhang y col., 2017). La forma de estudiar este proceso, en términos generales, es someter las plantas a inhibidores de la cadena respiratoria, a inhibidores de los fotosistemas o a situaciones que generan un estrés general en la célula y evaluar los cambios transcripcionales y metabólicos que ocurren. Estos resultados se comparan con los obtenidos a partir de plantas mutantes en proteínas mitocondriales o del cloroplasto que podrían presentar una disfunción en alguna de las dos organelas. A partir de estos resultados, se han establecido grupos de elementos en *cis* que podrían participar en esta señalización, posibles vías reguladas mediante señalización retrógrada y genes blancos de la regulación retrógrada (Leister y col., 2011; Van Aken y Whelan, 2012; Van Aken y col., 2013; Vanderauwera y col., 2012; Ng y col., 2013b; Zhang y col., 2017). Schwarzländer y Finkemeier (2013) revisaron posibles señales mitocondriales, sugiriendo que los procesos que involucran cambios redox serían señales estratégicas para transmitir el estado metabólico mitocondrial. De acuerdo con esto, metabolitos como el ascorbato y el glutatión han sido postulados como candidatos en la señalización retrógrada del cloroplasto (Foyer y Noctor, 2011). Si bien a las ROS se les ha adjudicado un rol como moléculas señalizadoras, su función en la señalización retrógrada aún no ha sido determinada. Como se mencionó anteriormente, el H₂O₂ generado en la mitocondria podría atravesar las membranas mitocondriales y alcanzar el citosol y luego el núcleo. Distintos factores de transcripción específicos de plantas son sensibles al H₂O₂ y a diferentes cambios en el estado redox (Hiltscher y col., 2014; Shaikhali y col., 2008; Shaikhali y col., 2012; Viola y col., 2013). Sin embargo, se ha sugerido que la estabilidad del H₂O₂ no es compatible con un rol directo de esta molécula en el proceso de señalización (Vestergaard y col., 2012).

Las moléculas propuestas como protagonistas en la señalización retrógrada en el cloroplasto son moléculas asociadas a procesos sintéticos (Beale, 2011; Rintamaki y col., 2009). En esta vía, metabolitos intermediarios de la síntesis de tetrapirroles, como la Mg-protoporfirina, actúan como moléculas señalizadoras. Estavillo y col. (2011) mostraron que la 3'-fosfoadenosina 5'-fosfato (PAP) se acumula bajo condiciones de alta intensidad de luz o sequía en el cloroplasto y migra hacia el núcleo, donde activa la transcripción de genes de respuesta a estrés. La acumulación de PAP en la organela en

condiciones normales de crecimiento estaría regulada por la fosfatasa SAL1. Esta fosfatasa también ha sido localizada en la mitocondria. Se propuso, además, que cambios en la concentración de ácido cítrico, un intermediario del TCA, modifican la expresión génica en el núcleo.

A partir de los distintos estudios de transcriptómica realizados se han identificado una serie de genes de proteínas mitocondriales y elementos en *cis* que participarían en la señalización retrógrada. El gen que codifica una de las isoformas de la oxidasa alternativa *AOX1a* fue el primer gen indicado como blanco de la señalización retrógrada (Clifton y col., 2006; Giraud y col., 2009; Umbach y col., 2005; Umbach y col., 2006). La expresión de este gen es inducida en *Arabidopsis* cuando la cadena transportadora de electrones es inhibida con rotenona (inhibidor del CI). Sin embargo, este aumento en la expresión no se observa cuando se tratan con rotenona plantas mutantes en el factor de transcripción ABI4 (*abi4-1*) (Giraud y col., 2009). Dado que en estas mutantes la expresión del gen *AOX1a* se encuentra inducida, se postuló que es necesaria la represión de este gen para permitir su inducción ante situaciones de estrés.

Posteriormente, se demostró que ABI4 se une a un elemento, denominado elemento B (CGTGAT), que reprime la expresión del gen *AOX1a*. En el promotor de *AOX1a* la secuencia del elemento B se solapa con el elemento CE1 (CACCG) y con un elemento CGTG (Giraud y col., 2009). Estos elementos son unidos por ABI4 y se ha identificado una región similar en el promotor del gen *LHCB* (Staneloni y col., 2008). La regulación de la expresión de *AOX1a* mediada por ABI4 provee una conexión molecular entre la regulación retrógrada mitocondrial y la del cloroplasto, dado que *LHCB* es blanco de esta última (León y col., 2012). El hecho de que *AOX1a* participe en la regulación retrógrada se ha utilizado para buscar componentes de la SRM. El análisis de plantas mutantes *rao* (*response alternative oxidase*) que no responden al tratamiento con antimicina A (inhibidor del CIII) ha permitido identificar distintos miembros de la familia de factores de transcripción ANAC como involucrados en la SRM, así como un grupo de genes blancos de la SRM. Los genes pertenecientes a este grupo (34 genes) se denominan genes MDS (de sus siglas en inglés *Mitochondrial Dysfunction Stimulon*). La secuencia consenso de unión para los factores ANAC definida a partir del análisis de las secuencias promotoras de los genes MDS ha sido encontrada en más de 70 genes que no responden a disfunciones mitocondriales pero están relacionados con la

respuesta durante situaciones de estrés. Si bien 24 de los genes MDS presentan potenciales sitios de unión para proteínas ANAC, solo se ha demostrado la interacción con ANAC013 y ANAC017. El factor de transcripción ANAC013 une 11 de los 24 genes MDS, siendo *AOX1a*, *UPOX* y *At5g09570* los que presentan mayores valores de interacción en experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina. Con respecto a ANAC017, se ha demostrado que frente a una inhibición del CIII con antimicina A se generan señales que permiten el clivado de esta proteína unida a la membrana del retículo endoplasmático. La porción N-terminal de ANAC017 migra al núcleo y se une al promotor de *AOX1a*, activando su transcripción. Si bien los genes MDS se clasificaron según su variación de expresión luego de una disfunción mitocondrial, su agrupamiento considerando diferentes situaciones de estrés sugiere que este grupo de genes estaría involucrado principalmente en respuestas a estrés salino, estrés por exposición a radiación UV y deficiencia de hierro (De Clercq y col., 2013). Además de los unidos por proteínas pertenecientes a la familia ANAC, se han propuesto distintos elementos en *cis* que se encontrarían enriquecidos en genes que modifican su expresión ante una disfunción mitocondrial, si bien su funcionalidad aún no ha sido probada (Schwarzlander y col., 2012). En un estudio que incluye información transcripcional proveniente de 27 perturbaciones mitocondriales y cloroplásticas diferentes, se identificó un grupo de 12 genes que responden exclusivamente a perturbaciones en la mitocondria, 14 genes que responden solo a perturbaciones en el cloroplasto y 14 genes que responden a ambas perturbaciones (Van Aken y Whelan, 2012). Curiosamente, los genes que se comparten entre este grupo y el grupo de genes MDS pertenecen al grupo de genes que responde a ambas perturbaciones. Si bien se han identificado diversos genes involucrados en la regulación retrógrada, los procesos que realmente son influidos por la regulación retrógrada mitocondrial aún no se han estudiado en profundidad. Las plantas *rao1* son deficientes en una quinasa involucrada en el ciclo celular denominada CDKE1 (de sus siglas en inglés *Cycling Dependent Kinase E1*). CDKE1 participaría en la integración de señales provenientes del medio ambiente con el desarrollo de la planta, el crecimiento y la elongación celular (Ng y col., 2013a). El hecho de que la mutación en una quinasa dependiente de ciclinas altere la inducción de *AOX1a* por antimicina A es un indicio de la integración de la SRM en el contexto regulatorio general de la célula (Ng y col., 2013a). De manera similar, las mutantes *rao3-6* son deficientes en proteínas involucradas en la señalización por auxinas, generándose así una relación entre una

respuesta retrógrada en una condición de estrés y la modificación del crecimiento ante esa situación (Ivanova y col., 2014).

En el trabajo desarrollado por Van Aken y Whelan (2012), los autores proponen un nuevo marcador mitocondrial de respuesta a estrés, el gen At5g09570. Este gen codifica una proteína denominada MSM1, que presenta un dominio CHCH similar al reportado para la proteína MIC17 del IMS de levaduras. Las características de esta proteína sugieren que podría actuar como una molécula señalizadora, detectando y transmitiendo el estado redox del IMS, y no como un blanco de regulación retrógrada. El IMS de *Arabidopsis* presentaría varias proteínas que presentan cisteínas susceptibles de regulación redox agrupadas en motivos similares a los de MSM1, como AtCOX17-1, AtCOX17-2 y AtCOX19. En forma similar a lo observado para MSM1, los promotores de los genes que codifican estas proteínas son inducidos ante diversas condiciones de estrés (Attallah y col., 2007). Estas evidencias, en conjunto con el hecho de que las proteínas del IMS serían transportadas y plegadas correctamente por un sistema regulado por el estado redox de la mitocondria, apuntan al IMS como un espacio capaz de detectar y transmitir señales desde la mitocondria hacia el citosol (Chatzi y Tokatlidis, 2013).

4.9. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS A LA MITOCONDRIA DE PLANTAS.

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

4.9.1. COMPLEJOS DE LA MEMBRANA EXTERNA MITOCONDRIAL.

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

En *Arabidopsis*, existen tres isoformas de TOM40; sin embargo, solo las mutantes insercionales en *AtTOM40-1* no son viables (Lister y col., 2004). *AtTOM9* es el homólogo funcional de TOM22, es más pequeña y no presenta cara citosólica. La pérdida de la cara citosólica evitaría el reconocimiento de proteínas que se localizan en el cloroplasto (Lister y col., 2007). El homólogo de TOM70 no ha sido encontrado en plantas; sin embargo, se ha identificado un receptor anclado en la ME específico del reino vegetal y parálogo del receptor del cloroplasto TOC64, denominado OM64 (Duncan y col., 2013; Lister y col., 2007).

El ensamblado del complejo TOM está asociado a las proteínas del complejo SAM (ScSAM50, ScSAM35, ScSAM37) (Chan y Lithgow, 2008). Sólo *AtSAM37* tendría una función vital en la biogénesis mitocondrial en *Arabidopsis* (Duncan y col., 2011). En levaduras, el complejo TOM y el complejo SAM están estrechamente vinculados con el complejo ERMES (de sus siglas en inglés *Endoplasmic Reticulum Mitochondrial Encounter Structure*) que participaría en el movimiento de fosfolípidos y el transporte de calcio (Michel y Kornmann, 2012). El complejo TOM y el complejo SAM se encuentran físicamente conectados con el complejo MINNOS (de sus siglas en inglés *Mitochondrial Inner Organising System*) de la membrana interna. El complejo MINNOS está compuesto por seis subunidades en levaduras: FCJ1, MIO10, AIM5, AIM13, AIM37 y MIO27 (Herrmann, 2011). La mutación de cualquiera de las subunidades modifica la morfología de las crestas de la MI. Mientras que este complejo está altamente conservado entre levaduras y mamíferos, en plantas los ortólogos candidatos solo muestran un 27-32% de identidad (Zerbes y col., 2012).

4.9.2. IMPORTACIÓN DE PROTEÍNAS AL IMS.

El IMS contiene proteínas TIM pequeñas (TIM 8, 9, 10 y 13), que son proteínas solubles ricas en cisteínas que forman una estructura similar a un anillo de seis caras (Ceh-Pavia y col., 2013). Estas proteínas están involucradas en la importación de proteínas transportadoras que se insertan en la MI o de proteínas de tipo barril- β destinadas a insertarse nuevamente en la ME (Truscott y col., 2002). La importación de estas proteínas TIM pequeñas requiere la maquinaria MIA (Milenkovic y col., 2007). Este sistema de importación está constituido por dos proteínas con actividad azufre oxidasa/reductasa, denominadas MIA40 y ERV1 (Terziyska y col., 2007). Estas dos proteínas son responsables del plegamiento oxidativo y de la maduración de las proteínas ricas en cisteínas del IMS, permitiendo la formación de puentes disulfuro entre los residuos de cisteína (Sideris y col., 2009). Además de las proteínas TIM pequeñas, el sistema MIA permite el transporte de un grupo de proteínas solubles del IMS que presentan los dominios conservados C(X)₃C y C(X)₉C (Koch y Schmid, 2014). En levaduras, MIA40 permite el transporte y correcto plegamiento de proteínas del IMS oxidando los puentes disulfuro de la proteína transportada, mientras que ERV1 mantiene los puentes disulfuro de MIA40 oxidados (Chatzi y Tokatlidis, 2013). En plantas, se han identificado los ortólogos de MIA40 y ERV1; sin embargo, se observan diferencias funcionales. MIA40 no es una proteína esencial en *Arabidopsis* y está localizada tanto en el IMS como en peroxisomas, aunque se la ha localizado únicamente en mitocondrias en *Physcomitrella patens* (musgo) (Xu y col., 2013). La doble localización de MIA40 habría ocurrido en paralelo con la aparición de la isoforma de la enzima Cu/ZnSOD del peroxisoma (CSD3) y de su proteína chaperona CCS (Carrie y col., 2010a). Curiosamente, AtERV1 es esencial en plantas superiores igual que su ortólogo en levaduras; sin embargo, su estructura secundaria es más similar a ERV2 del parásito *Trypanosoma cruzi* que a ERV1 de levaduras (Eckers y col., 2013). Aún más interesante, en *T. cruzi* no se ha identificado el ortólogo de MIA40 de levaduras (Carrie y col., 2010b; Eckers y col., 2013).

4.9.3. COMPLEJOS DE LA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL.

Los componentes de la membrana interna mitocondrial de plantas muestran mayor conservación en términos de genes ortólogos con respecto a levaduras que lo observado en los componentes de la membrana externa (Carrie y col., 2010b). Sin

embargo, las asociaciones propuestas entre los integrantes del complejo TIM y los complejos respiratorios dan indicios de neo o subfuncionalizaciones para las proteínas TIM de plantas (Murcha y col., 2012). Tanto en levaduras como en Arabidopsis, todos los precursores proteicos de proteínas cuyo destino es la MI deben pasar a través del complejo TIM17:23 (Murcha y col., 2003; van der Laan y col., 2010). El complejo TIM17:23 existe en dos conformaciones: una de ellas (SORT) recibe los precursores proteicos provenientes de TOM40 y cuyo destino es la MI. La otra conformación (PAM) recibe precursores proteicos cuyo destino es la matriz mitocondrial (Chacinska y col., 2010). El complejo TIM17:23 interacciona de manera dinámica formando supercomplejos tanto con el complejo TOM como con los complejos respiratorios I, III y IV en levaduras y con el CI en Arabidopsis (Duncan y col., 2013; Stuart, 2008). Estas interacciones aumentarían la eficiencia del proceso de importación aprovechando el potencial de membrana (Wang y col., 2012).

Se ha propuesto que la cantidad de complejo TIM17:23 es una determinante de la abundancia del CI o, al menos, de la cantidad de CI disponible para formar otros supercomplejos (Murcha y col., 2012). Asimismo, las mutantes *knock-out* en subunidades del CI muestran un incremento en la abundancia de AtTIM23-1. Además, la subunidad PRAT del CI es compartida con el complejo TIM17:23 (Murcha y col., 2012; Wang y col., 2012). Es interesante que el aumento en la abundancia de AtTIM23-2 resulte en un incremento de la expresión de los genes respiratorios de codificación mitocondrial, proteínas ribosomales y translocasas. Genes mitocondriales de codificación nuclear también incrementan su actividad cuando AtTIM23-2 es sobreexpresada (Murcha y col., 2012; Wang y col., 2012). Estos resultados indican que la disponibilidad de los complejos TIM modifica la biogénesis mitocondrial. Otro indicativo de la coordinación entre estas dos entidades mitocondriales queda reflejado durante el proceso de germinación, momento en el cual la actividad mitocondrial es fundamental para movilizar energía desde el endosperma, antes de que la fotosíntesis sea establecida. Estudios detallados en arroz revelaron que el aumento de la respiración durante la germinación es bifásico y comienza inmediatamente luego de la imbibición de la semilla. El segundo incremento en el consumo de oxígeno es acompañado por cambios a nivel transcripcional y proteico de los componentes de las membranas mitocondriales (Howell y col., 2007; Howell y col., 2006; Taylor y col., 2010). Estos resultados son similares a los obtenidos en Arabidopsis (Law y col., 2012).

4.10. BIOGÉNESIS DEL COMPLEJO IV

El CIV o complejo COX es un complejo enzimático multimérico que cataliza la oxidación del O₂ a H₂O a partir de la oxidación del citocromo *c* a través de los cuatro centros metálicos de sus subunidades estructurales (Soto y col., 2012). Los electrones ingresan a COX a través del centro de cobre binuclear (Cu_A), localizado en la subunidad COX2. Los electrones son transferidos al hemo *a* de bajo spin situado en la subunidad COX1. Posteriormente, ocurre una transferencia intramolecular desde el hemo *a* al sitio activo de COX1, donde está presente el centro bimetálico hemo *a*₃-Cu_B. Este centro bimetálico permite la unión del oxígeno molecular. La transferencia de electrones está acoplada a la translocación de protones (Brunori y col., 2005; Soto y col., 2012).

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

4.10.1. SUBUNIDADES ESTRUCTURALES DE CODIFICACIÓN MITOCONDRIAL.

Las subunidades estructurales COX1, COX2 y COX3 están codificadas en el genoma mitocondrial (Tabla I) (Khalimonchuk y Rodel, 2005). COX1 es la subunidad más grande e hidrofóbica del núcleo de COX. En su estructura se identifican dos hélices transmembrana que se unen en un rulo extramembrana. COX1 participa en la translocación de protones a través de dos canales de tipo D y K (aspartato y lisina). Estos canales están formados por residuos hidrofílicos que parecen estar unidos a una red de moléculas de agua. El canal D guía los protones desde la matriz hacia un residuo de glutamato conservado, mientras que el canal K conecta la matriz con el centro Cu_B (Tsukihara y col., 1995, 1996).

La subunidad COX2 posee un centro binuclear Cu_A de valencia mixta, el cual está expuesto al IMS y es el sitio de interacción con el citocromo *c*. Su núcleo hidrofóbico está compuesto sólo por dos dominios transmembrana (Tsukihara y col., 1995, 1996). La subunidad COX3 es una proteína hidrofóbica que atraviesa siete veces la membrana interna y no posee grupos prostéticos. Aún no se conoce su papel en la función enzimática de COX. Se propone que está involucrada en el ensamblado y/o estabilidad de la enzima (Khalimonchuk y Rodel, 2005). En base a estudios de los homólogos de COX de *Rhodobacter sphaeroides*, se demostró que COX3 no es requerida para la unión de los centros metálicos (Bratton y col., 2000; Svensson-Ek y col., 2002).

4.10.2. SUBUNIDADES ESTRUCTURALES DE CODIFICACIÓN NUCLEAR.

El centro catalítico de COX está rodeado por subunidades de codificación nuclear. La función de las mismas en el proceso de fosforilación oxidativa aún es desconocida. Sin embargo, se ha postulado que podrían influir en la estabilización estructural del complejo, como se ha sugerido para el citocromo *c*, así como formar parte de un sistema de protección para COX ante la generación de ROS en la mitocondria (Barrientos y col., 2009; Bourens y col., 2013; Welchen y col., 2012). Estas subunidades se nombran con números consecutivos desde el 4 (COX4) hasta el 9 (COX9) (Millar y col., 2004). En caso de observarse más de una isoforma, se utilizan letras (a o b) para diferenciarlas.

Es interesante destacar que, para una misma especie, no siempre todas las subunidades de codificación nuclear forman el CIV, sino que se observa una dependencia de tejido o condición de crecimiento. En levaduras, la isoforma COX5a se expresa durante el crecimiento en condiciones de aerobiosis, mientras que COX5b aparece en presencia de niveles de oxígeno reducidos (Burke y Poyton, 1998). En la Tabla I se muestra una comparación de las subunidades del CIV codificadas en el genoma nuclear de levaduras, humanos y plantas. Experimentos de electroforesis 2D mostraron que los CIV de *Arabidopsis*, *S. tuberosum* y *Vicia faba* presentan ocho subunidades similares a las identificadas en otros eucariotas y seis subunidades específicas del reino vegetal (Millar y col., 2004). La separación del CIV de *Arabidopsis* es compleja debido a su solapamiento con proteínas del complejo TOM (Millar y col., 2004). En mitocondrias de *Arabidopsis*, pueden observarse dos isoformas

del CIV: una isoforma mayor denominada IVa, que incluye proteínas TOM, y una menor denominada IVb (Eubel y col., 2003). En estas dos isoformas se han reconocido las subunidades de codificación nuclear COX5b, COX5c y COX6a, reconocidas en otros eucariotas, y las subunidades COXX1-8, específicas del reino vegetal (Millar y col., 2004). Si bien no se ha identificado mediante esta técnica, *Arabidopsis* presenta un gen homólogo a *COX6b* de levaduras (Eubel y col., 2003).

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

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

El estudio de la expresión de los genes estructurales de codificación nuclear ha permitido identificar patrones de expresión particulares para estas subunidades. Los genes *COX6b* y *COX6a* se expresan en anteras y regiones meristemáticas (Mufarrege y col., 2009). De forma similar, *COX5b-1* se expresa en tejido meristemático, tejido vascular, polen y anteras (Welchen y col., 2004). Otra característica común a los genes *COX* de codificación nuclear es que son inducidos cuando se incorporan al medio de cultivo de *Arabidopsis* azúcares metabolizables o compuestos nitrogenados (Comelli y col., 2009; Mufarrege y col., 2009). Se ha propuesto que uno de los mecanismos que permite regular la expresión concertada de los genes *COX* es la disponibilidad de carbohidratos. Como se mencionó anteriormente, esta regulación opera a nivel transcripcional a través de elementos comunes presentes en los promotores de estos

genes (Gonzalez y col., 2007). La proteína COX5b es codificada por dos genes distintos, denominados *COX5b-1* y *COX5b-2*, que responden de forma diferente a distintos estímulos (Comelli y Gonzalez, 2009b). Se ha propuesto que uno de los genes ha retenido su función ancestral mientras que el otro ha adquirido nuevos elementos de respuesta (Comelli y Gonzalez, 2009a).

4.10.3. ENSAMBLADO DE COX.

El ensamblado de COX ha sido descrito como un proceso lineal, en el cual las diferentes subunidades y cofactores se adicionan de manera ordenada (Soto y col., 2012). El concepto del ensamblado como un proceso secuencial fue demostrado a principios de los años 80 en estudios realizados en mitocondrias de hígado de rata. Este modelo fue posteriormente confirmado mediante electroforesis en geles nativos (*Blue Native*). El estudio de los intermediarios permitió demostrar que el ensamblado comienza a partir de un núcleo formado por la subunidad COX1 y prosigue con la formación de varios intermediarios discretos, los que probablemente representan pasos limitantes de la velocidad (para una revisión consultar Soto y col., 2012). En este proceso lineal de síntesis, las dos subunidades principales, COX1 y COX2, siguen líneas de adición de subunidades relativamente independientes. Esto implica que las subunidades maduran por separado y luego se ensamblan en la membrana. Por otro lado, los intermediarios subensamblados podrían interactuar con otros complejos respiratorios formando supercomplejos y las subunidades importadas desde el citosol pueden integrarse no solo en la holoenzima COX sino también con los complejos intermedios (para revisiones consultar Khalimonchuk y Rodel, 2005; Soto y col., 2012). Algunos autores describen el proceso de ensamblado de COX como un proceso “asistido por proteínas”, considerando la cantidad de factores de ensamblado, estructurales y no estructurales, que son requeridos para producir la maduración de las subunidades y la formación de los centros metálicos antes de la inserción en la membrana.

4.10.4. SÍNTESIS E INSERCIÓN DEL HEMO A EN COX

La actividad de COX depende de la presencia de cofactores metálicos, cationes y grupos prostéticos (átomos de Cu, hemo *a*, Mg^{2+} , Zn^{2+} y Na^+), que son requeridos para el correcto ensamblado de una enzima funcional y estable (Barrientos y col., 2009; Soto y col., 2012). COX1 es la mayor de las subunidades, contiene un hemo *a* y un centro

binuclear formado por un hemo a_3 y un centro de CuB, y es la encargada de la reducción del O_2 a agua. El hemo a es un cofactor esencial para la respiración en un amplio rango de organismos. Proteínas relacionadas con la biosíntesis del hemo a han sido estudiadas en bacterias (Saiki y col., 1992, 1993; Mogi y col., 1994; Brown y col., 2004), levaduras (Barros y Tzagoloff, 2002; Wang y col., 2009), *Trypanosoma cruzi* (Buchensky y col., 2010) y humanos (Glerum y Tzagoloff, 1994; Pecina y col., 2004). La síntesis del hemo a , partiendo del hemo b , requiere dos pasos catalíticos. En el primero, la hemo o sintasa COX10 cataliza la transferencia de un grupo farnesilo al grupo vinilo del carbono 2 del hemo b (Glerum y Tzagoloff, 1994). En una segunda reacción, COX15 oxida el grupo metilo del anillo de pirrol D a un aldehído, convirtiendo el hemo o en hemo a (Barros y col., 2001; Brown y col., 2002). Debido a que el hemo es tóxico para la célula, la síntesis y la inserción de este cofactor debe estar perfectamente coordinada. Hay numerosas líneas de evidencia que sugieren la existencia de una regulación fina entre la síntesis de hemo a y su inserción en COX1. Mientras que la interacción entre COX10 y COX15 no pudo ser demostrada en levaduras (Barros y Tzagoloff, 2002), proteínas homólogas de *Rhodobacter sphaeroides* co-purifican cuando son expresadas en *Escherichia coli*, sugiriendo la existencia de una interacción física entre ambas (Brown y col., 2004).

Como otras mutaciones en factores del ensamblado de COX, la deficiencia de hemo a causa una completa ausencia de actividad COX y de respiración en levaduras (Glerum y col., 1997). En humanos, hay reportes de que diferentes mutaciones puntuales en COX10 y COX15 causan deficiencia de COX, generando el síndrome de Leigh y cardiomiopatía hipertrófica (Antonicka y col., 2003). Además, la expresión del gen *COX10* es regulada por el microRNA miR-210, que es inducido bajo hipoxia o deficiencia de hierro para reducir los niveles de COX10 y así regular la tasa de consumo de oxígeno y el metabolismo mitocondrial (Chan y col., 2009). Sin embargo, nada se conoce de estas proteínas en plantas.

4.10.5. METALOCHAPERONAS E INSERCIÓN DEL COBRE EN COX.

Como se mencionó anteriormente, el ensamblado de los centros catalíticos de COX requiere la inserción de átomos de cobre y hemo a . La inserción del cobre en COX1 y COX2 es mediada por proteínas chaperonas solubles del IMS y por proteínas chaperonas transmembrana unidas a la MI (Tabla II) (Horn y Barrientos, 2008).

Resultados obtenidos en *Saccharomyces cerevisiae* sugieren que las reservas de cobre presentes en la matriz mitocondrial son la fuente de $\text{Cu}^{1+/2+}$ para las subunidades COX1 y COX2 (Cobine y col., 2004a, b). Es ampliamente aceptado que las metalochaperonas del IMS pueden unir y liberar $\text{Cu}^{1+/2+}$; sin embargo, se desconoce cómo el cobre es transportado desde el citosol o desde la matriz mitocondrial al IMS. En levaduras y mamíferos, la función de COX17, COX11 y proteínas SCO como chaperonas involucradas en la inserción del cobre ha sido muy bien caracterizada (para una revisión consultar Robinson y Winge, 2010). COX17 es una proteína pequeña y soluble del IMS que contiene cuatro cisteínas arregladas en dos dominios CX9C y dos cisteínas adicionales, conservadas en eucariotas. Estas dos cisteínas están involucradas en la unión del cobre en conjunto con una de las cisteínas del primer dominio CX9C. ScCOX17 puede adquirir distintas conformaciones como consecuencia de su capacidad de unir distinto número de átomos de cobre, en función de las interconversiones redox que puede tolerar. Además, puede adoptar distintos estados de oligomerización en función de la cantidad de átomos de cobre unidos (Palumma y col., 2004; Voronova y col., 2007). Existen también en el IMS otras 2 metalochaperonas, COX19 y COX23, las cuales aun no poseen una función clara (Barros y col, 2004; Rigby y col, 2007). SCO1 y COX11 se encuentran unidas a la MI a través de un dominio transmembrana presente en su extremo N-terminal. El dominio globular, hacia el extremo C-terminal, se localiza en el IMS. Ambas proteínas unen cobre a través de sus cisteínas conservadas (SCO1 también utiliza una histidina conservada para la unión) ubicadas en el dominio globular (Balatri y col., 2003; Banci y col., 2011; Carr y col., 2002; Horng y col., 2005).

En el modelo más simple que permite explicar la transferencia e inserción del cobre en las subunidades de COX, COX17 cedería átomos de Cu^{+1} a COX11 y SCO1. Se ha postulado que el sistema redox glutatión reducido/glutatión oxidado participaría en el mantenimiento del estado redox de las cisteínas de COX17. Luego, las chaperonas de membrana transferirían los átomos de cobre a COX1 y COX2, respectivamente (Robinson y Winge, 2010). La función de estas chaperonas es apoyada por la observación de que ambas pueden unir y liberar cobre (Carr y col., 2002; Horng y col., 2005). Además, mutaciones en cualquiera de las tres chaperonas inducen deficiencia en la actividad COX en mamíferos y levaduras (Carr y col., 2002; Oswald y col., 2009).

LEVADURAS		HUMANOS		PLANTAS		
Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	
A. Factores de ensamblaje del CIV y codificados en el núcleo.						Función descrita en plantas
<i>COX17</i>	Cox17p	<i>COX17</i>	COX17	AT3G15352	COX17-1	Inserción del cobre en SCO1 y en COX11.
				AT1G53030	COX17-2	
<i>SCO1</i>	Sco1p	<i>SCO1</i>	SCO1	AT3G08950	HCC1	Inserción del cobre en COX2 y/o mantención del estado reducido de las cisteínas en COX2.
<i>SCO2</i>	<i>Sco2p</i>	<i>SCO2</i>	AT1G02410			
-	-	-	-	AT4G39740	HCC2	Participación de la respuesta a estrés por UV-B.
<i>COX11</i>	Cox11p	<i>COX11</i>	COX11	AT1G02410	COX11	Inserción del cobre en COX1.
<i>COX10</i>	Cox10p	<i>COX10</i>	COX10	AT2G44520	COX10	Conversión de hemo <i>b</i> a hemo <i>o</i> .
<i>COX15</i>	Cox15p	<i>COX15</i>	COX15	AT5G56090	COX15	Conversión de hemo <i>o</i> a hemo <i>a</i> .
B. Proteínas con dominios CX9C del IMS que podrían participar en la biogénesis del CIV.						
<i>COX19</i>	Cox19p	<i>COX19</i>	COX19-1	AT1G66590	COX19-1	
			COX19-2	AT1G69750	COX19-2	
<i>COX23</i>	Cox23p	<i>COX23</i>	COX23	AT1G2160		
<i>PET191</i>	Pet191p	<i>PET191</i>	PET191	AT1G10865		
<i>CMC1</i>	Cmc1p	<i>CMC1</i>	CMC1	AT5G16060		
<i>CMC2</i>	Cmc2p	<i>CMC2</i>	CMC2	AT4G21192		
<i>YMR002w</i>	mic17p	<i>CHCHD2</i>	MIC17	AT5G09570		
<i>YDR512c</i>	emi1p	<i>C22orf39</i>	EMI1	AT4G25315		
<i>YKL053c-a</i>	mdm35p	<i>TRIAP1</i>	MDM35	AT4G33100		
<i>YEL059c-a</i>	som1p	-	-	-		
<i>YDR031w</i>	mic14p	<i>CHCHD5</i>	MIC14	-		

Tabla II. Factores de ensamblado de COX y proteínas con dominios CX9C del IMS.

La deficiencia respiratoria observada en las mutantes de levaduras *cox17* es restaurada cuando se adiciona Cu²⁺ al medio de cultivo o cuando se incrementa el número de copias de *ScSCO1*. El incremento de la expresión de *ScSCO2*, una proteína cuya mutación en levaduras no produce deficiencia respiratoria, también revierte la deficiencia respiratoria en mutantes *cox17* (Glerum y col., 1996). Considerando que la sobreexpresión de *ScCOX17* no restaura la deficiencia respiratoria en las mutantes *sco1* de levaduras, se ha postulado que COX17 actúa en un paso previo a SCO1. Además, la función de COX17 podría ser reemplazada por otra metalochaperona, al menos cuando la concentración de cobre en el medio es elevada. Esto podría reflejar la activación de otros mecanismos de transferencia de cobre hacia COX ante la presencia de una situación de estrés oxidativo, como es la generada por la alta concentración de metales de transición. Estudios por resonancia magnética nuclear permitieron demostrar la existencia de un mecanismo de transferencia del cobre desde COX17 a SCO1 (Banci y col., 2008). La presencia de un motivo de tipo tiorredoxina en SCO1 sugiere que esta

chaperona actuaría como una tioldisulfuro isomerasa durante la captación del cobre (Williams y col., 2005). De acuerdo con esta idea, Abriata y col. (2008) mostraron que la inserción del cobre en COX2 de *Thermus thermophilus* requiere la actividad de una nueva metalochaperona (PCuAC), mientras que SCO1 sería requerida para mantener el estado de oxidación de las cisteínas aceptoras en el centro de Cu_A de COX2. Además, el hecho de que las proteínas SCO estén presentes en procariotas que no contienen oxidasas con centros de Cu_A sugiere que estas proteínas cumplen también funciones no relacionadas con el ensamblado de COX (Banci y col., 2007). En la variedad patogénica de *Neisseria monocitogenes* se ha demostrado que SCO está involucrada en la respuesta frente al estrés oxidativo (Seib y col., 2003). Además de COX17, otras proteínas con dominios CX9C o CX3C se localizan en el IMS (Khalimonchuk y Winge, 2008; Longen y col., 2009). Este motivo forma una doble hélice en horquilla estabilizada por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos y por la formación de puentes disulfuro (Abajian y col., 2004; Banci y col., 2009; Longen y col., 2009). En levaduras, la mutación de la mayoría de estas proteínas produce una deficiencia respiratoria, sugiriendo que participarían en el ensamblado de COX.

Como se describió anteriormente, la incorporación de estas proteínas al IMS está mediada por el sistema MIA (Fraga y col., 2014; Terziyska y col., 2007). Considerando que los electrones provenientes de las etapas de oxidorreducción asociadas a MIA40/ERV1 son dirigidos a la cadena transportadora de electrones a través del citocromo *c*, se plantea una conexión directa entre las proteínas del IMS y la cadena respiratoria. Se ha demostrado que la importación de proteínas a través del sistema MIA en mamíferos es dependiente de la relación GSH/GSSG y del potencial de membrana (Fischer y col., 2013), planteándose así una conexión entre el estado redox de la mitocondria y la cantidad de proteínas importadas al IMS (Figura 5).

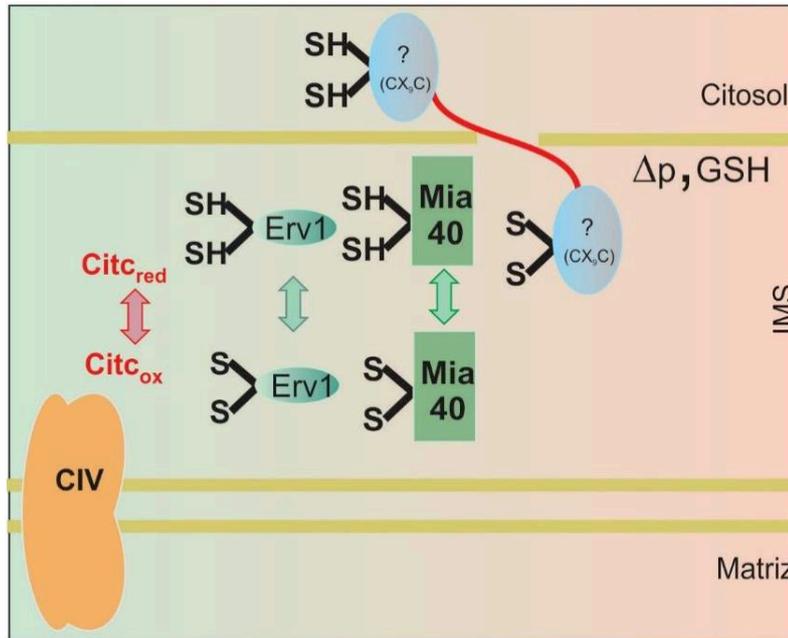


Fig. 5. Conexión entre la actividad del CIV y el estado redox de la mitocondria a través de la importación de proteínas con dominios de cisteína. La importación y el correcto plegamiento de proteínas con dominios CX9C o CX3C son realizados a través del sistema MIA40/ERV1. Este transporte está asociado al potencial de membrana, requiere glutatión reducido y deriva en sucesivas reacciones de oxidorreducción. Los electrones puestos en juego ingresan al CIV a través del citocromo *c*. De acuerdo a esto, el estado de reducción de la cadena transportadora de electrones podría determinar la importación de proteínas al IMS. CIV, complejo IV; Citc, citocromo *c*; GSH, glutatión reducido; Δp , potencial de membrana. Adaptado de Lucila Garcia 2015, tesis doctoral.

4.11. METALOCAPERONAS EN PLANTAS.

Se han identificado proteínas similares a los factores de ensamblado de COX en plantas (para una revisión consultar García y col., 2014). En *Arabidopsis*, los genes *AtCOX17-1* (At3g15352) y *AtCOX17-2* (At1g53030) codifican dos proteínas COX17 capaces de complementar la mutante nula *cox17* de levaduras (Wintz y Vulpe, 2002). Estudios de microscopía confocal indicaron que COX17 tiene localización mitocondrial, lo que está de acuerdo con la función propuesta en la biogénesis de COX (García y col., 2016). Se ha reportado que la disminución de la expresión de cada uno de los genes *AtCOX17* en forma individual no afecta el desarrollo de las plantas. Sin embargo, la disminución de los niveles de expresión de ambos genes en forma simultánea retrasa el crecimiento de *Arabidopsis*. El fenotipo observado puede deberse a una deficiencia en la actividad del Complejo IV (García y col., 2016). Esto sugiere la existencia de redundancia funcional entre *AtCOX17-1* y *AtCOX17-2* en la biogénesis

del Complejo IV. Sin embargo, la disminución de la expresión de los genes *AtCOX17* de manera individual genera plantas cuya respuesta frente a estrés se encuentra alterada, ya que presentan una menor inducción de genes de respuesta a estrés y mayores niveles de anión superóxido y lípidos peroxidados luego de un tratamiento con NaCl (García y col., 2016). Por el contrario, plantas con mayores niveles de *AtCOX17-1* presentan menores niveles de lípidos peroxidados y mayor diámetro de roseta luego del tratamiento con NaCl, lo que sugiere que estas plantas son menos sensibles a este tipo de estrés. Se ha postulado que las proteínas *AtCOX17* serían necesarias para que ocurra una respuesta eficiente frente al estrés en plantas (García y col., 2016).

Arabidopsis también contiene dos genes diferentes, *AtCOX19-1* y *AtCOX19-2*, que codifican proteínas homólogas a *COX19* de levaduras (Attallah y col., 2007). *AtCOX19-1* produce dos transcritos, los que codifican proteínas que difieren en el extremo N-terminal, como consecuencia de un evento de *splicing* alternativo. Experimentos de importación a mitocondrias de papa mostraron que ambas proteínas se importan al IMS, quedando asociadas a la MI. Asimismo, estudios de microscopía confocal indicaron que estas proteínas tienen localización mitocondrial en plantas (García 2015, tesis doctoral). Sin embargo, solo la isoforma corta complementa levaduras mutantes en *COX19* (Attallah y col., 2007). La proteína codificada por *AtCOX19-2* es idéntica a la forma corta producida por *AtCOX19-1* (Attallah y col., 2007). También se estudió la homeostasis de metales en plantas con niveles alterados de *AtCOX19*. El silenciamiento de *AtCOX19* genera plantas con menores niveles de hierro y que activan mecanismos relacionados con la deficiencia de dicho metal, sugiriendo que *AtCOX19* podría estar involucrada en el transporte y/o la distribución del metal en *Arabidopsis* (García 2015, tesis doctoral).

Proteínas homólogas a *SCO1* de humanos, denominadas *HCC1* y *HCC2*, han sido identificadas en *Arabidopsis* (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). Sin embargo, *HCC2* pierde, dependiendo de la especie vegetal, una o ambas cisteínas involucradas en la unión del cobre en *SCO1*. Además, la histidina conservada en las proteínas *SCO* que estaría involucrada en la unión del cobre tampoco está presente en *HCC2*. *HCC1*, en cambio, presenta las cisteínas y la histidina conservadas. Además, el dominio soluble de *HCC1* fusionado al dominio transmembrana de *SCO1* de levaduras complementa la mutante nula *sco1* de levaduras. De acuerdo con esto, la mutación de

HCC1 es letal, obteniéndose embriones detenidos en la fase corazón que presentan una disminución significativa de la actividad COX (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). Por el contrario, mutantes nulas en *HCC2* muestran niveles de actividad COX normales (Steinebrunner y col., 2014), sugiriendo que esta proteína tiene una función diferente a la de *HCC1*.

En el genoma de *Arabidopsis*, se ha identificado un gen (At1g02410) homólogo al gen de levaduras que codifica la proteína COX11 (Welchen y Gonzalez, 2005). Las proteínas AtCOX11 y ScCOX11 muestran un alto grado de similitud en su secuencia (32% de identidad de aminoácidos) y en su estructura secundaria (Radin y col., 2015). Notoriamente, la alta similitud observada no es suficiente para que AtCOX11 complemente la mutante nula *cox11* de levaduras. Sin embargo, COX11 ha sido localizada en la MI de la mitocondria en células de raíz de *Arabidopsis*. Resultados recientes muestran que la deficiencia de *AtCOX11* (30% de expresión del transcripto) disminuye en un 45% la actividad COX cuando esta actividad es evaluada como el consumo de oxígeno en presencia de citocromo *c* reducido (Radin y col., 2015). Sorpresivamente, las plantas que sobreexpresan (4-6 veces) *AtCOX11* también muestran una disminución en la actividad del complejo COX. Además, ambos tipos de plantas muestran una disminución en la longitud de la raíz y en la velocidad de germinación del polen, dos procesos regulados por la eficiencia respiratoria. Es interesante que la deficiencia observada en las raíces de las plantas que sobreexpresan *AtCOX11* sea revertida si se adiciona cobre en el medio de crecimiento, mientras que la deficiencia del mismo exacerba el acortamiento de la raíz. Las plantas deficientes en *AtCOX11* no responden a los cambios de los niveles de cobre en el medio de crecimiento (Radin y col., 2015). Los autores proponen que la disminución en los niveles de AtCOX11 en las plantas deficientes limita la posibilidad de la inserción del Cu, independientemente de la disponibilidad del mismo en el medio. En las plantas que sobreexpresan *AtCOX11*, la unión de cobre por cantidades elevadas de AtCOX11 podría limitar la cantidad de cobre disponible para AtHCC1 y así afectar el normal ensamblado de COX.

Arabidopsis también contiene homólogos de otras proteínas CX9C de levaduras (Longen y col., 2009). Sin embargo, no hay reportes sobre la función de estos homólogos en plantas, excepto para la proteína AtMSM1 (*Arabidopsis Mitochondrial Stress Marker 1*), la que ha sido propuesta como un marcador de respuesta a estrés

mitocondrial (Van Aken y Whelan, 2012) y podría participar en la señalización retrógrada mitocondrial.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas utilizadas.

Todos los clonados fueron realizados utilizando la cepa de *E. coli* DH5 α [supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (Na1r) thi-1 relA1) (Hanahan, 1983). Para la transformación de *Arabidopsis* se empleó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LB4404. Esta cepa presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/l). Esta cepa utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomicina (300 mg/l)) en la cepa Ach5. Esta cepa además posee el plásmido pTi/pRi pTiAch5

5.2. Vectores utilizados.

pBI101. Vector binario que permite el clonado de regiones promotoras frente al gen GUS, confiriendo resistencia a kanamicina tanto en bacterias como en plantas (Jefferson y col., 1987).

pBI121. El plásmido pBI121 es un derivado del vector pBI101 que contiene un fragmento de 800 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) frente al gen GUS (Jefferson y col., 1987)

pENTR-3C. Vector de entrada (Entry vector) para el sistema Gateway (Life Technologies). Este vector permite el clonado de la secuencia de ADN de interés entre los sitios denominados attL. La secuencia clonada entre estos sitios puede recombinarse entre los sitios attR del vector de destino (Destination Vector). Este vector genera resistencia a kanamicina (100 μ g/ml) en bacterias. Todas las secuencias de ADN clonadas en este vector fueron recuperadas como productos de PCR empleando oligonucleótidos específicos para el vector denominados AHLF y AHLR.

pEarlygate100. Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar el gen de interés en plantas bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Genera resistencia a estreptomicina (300 μ g/ml) y espectinomicina (100 μ g/ml) en bacterias y a herbicida BASTA (Bayer) en plantas.

pGWB554. Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la secuencia codificante de la proteína roja fluorescente monomérica (mRFP) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Genera resistencia a estreptomicina (300 µg/ml) y espectinomicina (100 µg/ml) en bacterias y a higromicina (25 µg/ml) en plantas (Nakagawa y col., 2007).

pAS054. Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la secuencia N-terminal mCitrina, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Este vector confiere resistencia a espectinomicina (100 µg/ml).

pAS054. Vector de destino para el sistema Gateway. Este vector permite expresar en plantas el gen de interés fusionado a la dominio C-terminal mCitrina, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Este vector confiere resistencia a espectinomicina (100 µg/ml).

pSoup. Vector requerido para la transformación eficiente de *Agrobacterium tumefaciens* al utilizar los vectores pAS054 y 059.

5.3. Material vegetal y condiciones de crecimiento

El ecotipo de *Arabidopsis thaliana* Heyhn. Columbia (Col-0) fue comprado a Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA). Las líneas mutantes insercionales SAIL_1283_D03.V1 (AtCOX10), Salk_008313 (HCC2-2) y GABI-Kat 843H01(HCC2-1) fueron obtenidas del Arabidopsis Biological Resource Centre, Ohio State University, OH, USA. La localización de la inserción del ADN-T y la presencia del alelo salvaje en plantas mutantes, se realizó usando oligonucleótidos específicos (Ver Anexo II) realizando PCR sobre ADN genómico. Para la localización proteica por microscopía de escaneo laser confocal (CLSM), se usó la línea de *Arabidopsis* mt-gk (NASC ID N16263; Nelson y col., 2007), que fue provista por el Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre. Las plantas fueron crecidas en tierra en macetas de 8 cm de diámetro y 7 cm de altura, en condiciones de día largo (16h de luz/8h de oscuridad) a 22-24 °C a una intensidad lumínica aproximada de 100 µmol.m⁻².s⁻¹. Alternativamente, las semillas de *Arabidopsis* se les esterilizo la superficie con una solución de etanol 70% (v/v) durante 5 minutos y luego SDS 0,1% (p/v) por 15 minutos, seguido a esto fueron lavadas con agua

destilada estéril y sembradas en placas de Petri que contenían medio Murashige y Skoog (MS) 0.5× y agar al 1% (p/v). Las placas fueron estratificadas en frío a 4 °C por 2 días y transferidas a la cámara de crecimiento a condiciones de día largo.

5.4. Clonado de genes y generación de líneas transgénicas de *Arabidopsis*

Para obtener plantas que expresen una fusión de AtCOX10 a la proteína fluorescente roja monomérica (mRFP), un fragmento BamHI/XhoI de 1328 pb abarcando la secuencia codificante entera de *AtCOX10* fue amplificado a partir de un clon de ADNc (RAFL19-72-F12) usando oligonucleótidos específicos (Ver Anexo II) y clonado en pENTR 3c (Life Technologies). Este fragmento, en conjunto con sus sitios de recombinación flaqueantes, fue amplificado por PCR y transferido al vector binario de destino pGWB554 (Nakagawa y col., 2007), usando el sistema de clonado Gateway (Life Technologies). Este vector permite la fusión en el C-terminal de las proteínas a la mRFP, bajo el control del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor 35S. Las construcciones fueron introducidas en la línea mt-GK (Nelson y col., 2007), que sobreexpresa la proteína verde fluorescente (GFP) en mitocondria (mt-GFP). Se usaron plántulas T1 resistentes a kanamicina (para pGWB554) e higromicina (para la línea mt-gk) para la microscopia confocal.

Para obtener plantas de *Arabidopsis* que expresen el promotor de *AtCOX10* fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa (*GUS*), fue amplificado, utilizando oligonucleótidos específicos (Ver Anexo II), un fragmento extendiéndose entre los nucleótidos -533 y +95 relativos al sitio de inicio de la transcripción de *AtCOX10*. El fragmento resultante fue clonado en el vector binario pBI101.3 en frente de la región codificante del gen *GUS*. Plantas T3 homocigotas resistentes a kanamicina (del vector pBI101.3) fueron usadas para el análisis de expresión del gen reportero mediante microscopía óptica. La actividad GUS fue analizada por tinción histoquímica usando el sustrato cromogénico ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-glucurónico como describe Hull y Devic (1995).

Para obtener plantas que expresen *AtCOX10* bajo el control de su propio promotor, un fragmento BamHI/SacI de 1328 pb comprendiendo la secuencia codificante entera de *AtCOX10* fue amplificado a partir de un clon de ADNc (RAFL19-72-F12)

usando y fue clonado cadena abajo del promotor de *AtCOX10* reemplazando la región codificante del gen *GUS* del vector descrito en el párrafo anterior.

Para el silenciamiento de *HCC1* se seleccionó la región entre los nucleótidos +93 y +443 transcripto de *HCC1*. Se amplificó dicho fragmento a partir de un clon de ADNc ya disponible en utilizando oligonucleótidos específicos (Ver Anexo II). El mismo fue clonado en el vector de entrada pENTR 3C (Invitrogen) en los sitios EcoRI/XhoI. Finalmente se realizó la recombinación al vector de destino. Se seleccionó el vector pEarleyGate 100, el cual utiliza el promotor CaMV35S y confiere resistencia a BASTA.

Para las construcciones utilizadas en los experimentos de BiFC, se amplificaron las regiones codificantes de los genes *HCC1*, *HCC2* a partir de los clones de ADNc (RAFL09-74-H16, U82355) y *D-LACTATO DESHIDROGENASA D-LDH* (1002, 831 y 1704pb respectivamente) obviando el codón de detención se clono utilizando oligonucleótidos específicos (Ver Anexo II). Estos amplicones fueron clonados en el vector pENTR 3C utilizando los sitios BamHI/XhoI. La recombinación se realizó utilizando los vectores pAS054 y pAS059 de la serie pGREEN IIS. Las regiones N-terminal y dominio transmembrana (N+TM) fueron seleccionadas utilizando la base de datos ARAMEMNON (<http://aramemnon.uni-koeln.de/>). En base a esto se amplificaron dichas regiones (423 pb y 246 pb para HCC1 y HCC2 respectivamente) utilizando oligonucleótidos específicos (Ver Anexo II). El clonado y la recombinación se realizaron de igual manera que para los fragmentos completos.

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

Las reacciones de amplificación para obtener fragmentos de ADN para su posterior clonado se realizaron en un volumen final de 50 μ L. Brevemente, en cada reacción se empleó solución amortiguadora, $MgCl_2$ 2 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos específicos (500 ng) y 1,5 U de la enzima *Taq*DNA polimerasa. A esta mezcla de reacción se le adicionó el ADN molde y se procedió a la reacción de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PxE 0,2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) utilizando los programas apropiados para cada caso y en donde la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$].

Las reacciones de amplificación en las que se utilizó como molde ADN procedente de colonias de bacterias tomadas directamente desde la placa de Petri se realizaron en un volumen final de 15 μL , conservando las proporciones de todos los reactivos. Los productos de amplificación se separaron y visualizaron en geles de agarosa.

5.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

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

5.7. Purificación de fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN se purificaron a partir de geles de agarosa, empleándose el equipo comercial Gel Purification (AXYGEN, USA).

5.8. Digestión con endonucleasas de restricción.

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos fueron utilizadas entre 1 y 5 U de enzima por cada μg de ADN a digerir en un volumen final que varió entre 20 y 50 μL , dependiendo de la cantidad de ADN. Para la digestión de los vectores provenientes de las mini preparaciones de ADN, se adicionó a la reacción de corte la enzima ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

5.9. Ligación de moléculas de ADN.

La ligación de fragmentos de ADN se realizó empleando 1 U de la enzima T4 DNA ligasa (Promega) en un volumen final de reacción de 10 μL . En la mezcla de reacción se

incorporaron la solución amortiguadora y los fragmentos a ligar en las proporciones sugeridas por el fabricante.

5.10. Transformación de bacterias de *E. coli* con ADN plasmídico.

La preparación de células de *E. coli* competentes para transformación por electroporación se realizó según las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). Luego de la electroporación las células de *E. coli* se recuperaron en 1 mL de medio LB y se incubaron durante 1h a 37°C. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 µL de medio LB y se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado. Las placas se incubaron toda la noche (o hasta la aparición de colonias) a 37°C. Luego de la aparición de colonias, las mismas se utilizaron para realizar PCR en colonia como se describió anteriormente. Cuando la PCR fue positiva (presencia de un amplicón del tamaño adecuado) se procedió al repique de la colonia correspondiente para realizar posteriormente mini-preparación de ADN plasmídico.

5.11. Transformación de bacterias de *A. tumefaciens* con ADN plasmídico.

La preparación de células competentes de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante del equipo de electroporación para *E. coli*, modificando la solución amortiguadora en la que se conservan las bacterias. Luego del disparo eléctrico las bacterias se recuperaron en 1 mL de LB y se incubaron durante 2 horas a 28°C. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 100 µL y se sembró en placas de Petri con LB-agar suplementado con estreptomicina (300 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml) y el antibiótico correspondiente al plásmido con el que se procedió a la transformación.

5.12. Mini-preparación de ADN plasmídico.

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *E. coli* transformadas se realizaron según el protocolo de Birnboim y Dolly (1979). Se centrifugaron 1,5 mL de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado, a 5000 x g durante 5 min. El sedimento celular fue resuspendido en 100 µL de solución de miniprep I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 200 µL de solución de miniprep II

(NaOH 0,2 M, SDS 0.1% p/v). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Se agregaron 150 µL de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 400 µL de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó durante 5 min a 8000 x g a temperatura ambiente y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 2 h a 20°C con 2 vol. de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2). El ADN plasmídico se recuperó por centrifugación a 12000 x g durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 µL de agua destilada estéril.

Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad se utilizó el kit comercial Mini-preps DNA Purification (AXYGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante

5.13. Transformación de plantas

Para la transformación estable de plantas, fue usada la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con las construcciones respectivas para obtener plantas de transgénicas de *Arabidopsis* mediante el procedimiento de inmersión floral (Clough y Bent, 1998). Fueron usadas quince líneas independientes para seleccionar plantas T3 y T4 homocigotas, para analizar niveles de expresión y fenotipos. Las plántulas transgénicas fueron seleccionadas en placas con 50 mg L⁻¹ de kanamicina o en tierra con 0.1% de glufosinato de amonio (BASTA) dependiendo de la resistencia aportada por el ADN-T.

La transformación transitoria, se realizó adaptando el protocolo de (Waadt, y col., 2014). Para ello se crecieron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* ON (incluyendo un clon para expresar la proteína viral p19), luego se les retiró el sobrenadante y se las resuspendió en solución amortiguadora de infiltración (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5,7, acetosiringona 150 µM) e incubados por 3 h en agitación suave. Seguido a esto se llevaron todos los cultivos a un DO₆₀₀=0.5 y se realizaron las diferentes combinaciones en una relación 2:2:1 (Constr.A:Constr.B:p19). Finalmente se infiltró, con jeringas sin agujas, la cara abaxial de hojas de plantas de 15 a 20 d de *Nicotiana benthamiana*.

5.14. Mini-preparación de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.

La extracción de ADN genómico se realizó sobre una hoja de roseta la cual fue disgregada durante 15 segundos con un pilón plástico a temperatura ambiente. Luego, se adicionaron 700 μ L de solución de extracción (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%), se mezcló en vórtex durante 15 segundos y se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó con 600 μ L de isopropanol y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet con el ADN genómico se secó y se disolvió en 50 μ L de H₂O-MQ estéril.

5.15. Complementación de una levadura mutante Δ cox10 con AtCOX10

Para la complementación de la cepa de levadura mutante Δ cox10, un fragmento BamHI/ HindIII de 1328 pb comprendiendo la secuencia codificante entera de AtCOX10 fue amplificado a partir de un clon de ADNc (RAFL19-72-F12) usando oligonucleótidos específicos (tabla suplementaria S2) y fue clonado en el vector de expresión de levaduras pMV611 (Wang, y col., 2004). Las construcciones con el inserto y con el vector vacío fueron introducidas en la cepa nula de cox10 BY4742/ Δ cox10 (BY4742; Mata α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; YHL019c::kanMX4), obtenidas de EUROSCARF, utilizando el método estándar de transformación de acetato de litio. Los clones capaces de crecer en medio mínimo sin leucina fueron analizados para la presencia del plásmido mediante PCR y luego se probó su crecimiento en medio fermentable (YPD: 2% glucosa, 1% extracto de levaduras, 2% peptona) y no fermentable (YEPG: 3% glicerol, 2% etanol, 1% extracto de levaduras, 2% peptona). La cepa parental BY4742 (Mata α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys3 Δ 0; ura3 Δ 0) fue usada como control positivo de crecimiento.

5.16. Microscopía de escaneo laser confocal (CLSM)

Para visualizar la localización de la proteína AtCOX10, se tomaron imágenes de raíces de plántulas de 7 días, montadas en agua, con un microscopio de escaneo laser confocal Zeiss LSM 780 como fue descrito por Steinebrunner y col. (2014). Para el análisis de colocalización, gráficos de dispersión de intensidad fueron generados con los plugins “Coloc 2” y “Colocalization Threshold” del software Fiji (Schindelin y col., 2012).

Para el ensayo de BiFC, se tomaron al menos 15 imágenes de distintas hojas de *N. benthamiana* infiltradas con las distintas construcciones. Cada captura fue realizada utilizando un apilamiento en Z de 4.18 μM (6 imágenes) utilizando la lente 63X. Las imágenes fueron tomadas usando un microscopio Leica SP8, las muestras fueron excitadas con el láser de 514 nm (intensidad 50%) y los detectores fueron colocados en 524-560 nm con una ganancia de 653 (para Citrina) y 640-670 nm con una ganancia de 627 (para clorofila). El procesamiento y cuantificación de las imágenes se realizó en el software Fiji (Schindelin y col., 2012). Se procesaron diez imágenes para cada combinación, cuantificando los 50 puntos de mayor intensidad de cada una. Seguido de esto, se realizó una eliminación de valores extremos y se analizaron las distribuciones mediante Kruskal-Wallis (test para muestras no paramétricas) para evaluar si existían diferencias significativas.

5.17. Aislamiento y análisis de ARN.

Las muestras para RNA fueron preparadas con Trizol (Invitrogen). Se llevó a cabo el análisis mediante retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de acuerdo a O'Connell (2002). La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó utilizando un oligonucleótido (dT)18 usando la transcriptasa reversa MMLV (Moloney murine leukemia virus) (Promega) bajo condiciones estándares de reacción. La PCR cuantitativa fue realizada en una alícuota de la reacción de síntesis del ADNc con oligonucleótidos específicos (Ver Anexo II). La RT-qPCR fue llevada a cabo en equipo MJ Research Chromo4. Los valores de expresión fueron normalizando usando los niveles de transcritos PP2AA3 o ACT2 como estándares (Charrier y col., 2002; Czechowski y col., 2005).

5.18. Determinaciones de respiración.

Para el consumo de oxígeno, las plantas fueron mantenidas en oscuridad por al menos 40 minutos, y luego la cuarta, quinta y sexta hoja fueron transferida a la cámara de medición con 2.5 ml of de solución amortiguadora de medición [manitol 300 mM, BSA 1% (p/v), fosfato de potasio 10 mM (pH 7,2), KCl 10 mM, MgCl₂ 25 mM]. Las mediciones fueron realizadas a 25 °C usando un electrodo de oxígeno del tipo Clark (Hansatech, Norfolk, UK). La capacidad de la vía COX fue determinada como el consumo de O₂ sensible a 1mM de KCN en presencia de 10mM de ácido salicilhidroxámico (SHAM). La capacidad de la vía alternativa, fue determinada como el

consumo de oxígeno sensible a 10 mM de SHAM en presencia de 1 mM de KCN (Welchen y col., 2012). El consumo de oxígeno en levaduras fue medido a una $DO_{600}=0.6$ en medio YPD en un volumen final de 2mL.

5.19. Electroforesis de geles de poliacrilamida azul nativos (BN-PAGE) de extractos enriquecidos en mitocondrias.

Los extractos enriquecidos en mitocondrias fueron preparados a partir de plantas crecidas durante 10 días en condiciones de día largo en medio líquido MS, como fue descrito por Steinebrunner y col. (2011, 2014). Las proteínas de las fracciones mitocondriales crudas fueron separadas por BN-PAGE de acuerdo al protocolo descrito por Wittig y col. (2006). La solubilización de las proteínas de membrana se realizó utilizando digitonina (en una proporción 4:1 de detergente:proteína). En cada línea se sembraron iguales cantidades de proteínas mitocondriales calculadas a partir de la actividad citrato sintasa. Las proteínas fueron visualizadas usando una tinción con Coomassie Brilliant Blue (Neuhoff y col., 1988). La tinción de actividad COX fue realizada como describe Steinebrunner y col. (2014). El precipitado marrón indicador de la actividad COX fue seguido durante el tiempo.

5.20. Análisis de western blot.

Para el análisis de western blot, las proteínas preparadas de los extractos crudos mitocondriales fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana Hybond-ECL (GE Healthcare). Las membranas fueron enfrentadas a anticuerpos policlonales de ratón contra AtCOX2 o AtVDAC1 (Agrisera) en una dilución 1:2500 y detectados con un anticuerpo anti inmunoglobulina de ratón conjugados a peroxidasa de rábano picante. Para la detección se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Pierce).

5.21. Tratamientos con NaCl

Para los tratamientos prolongados con NaCl, semillas de *Arabidopsis* fueron sembradas en macetas con sustrato Kalsman TS1 y subirrigadas con agua y fertilizante durante 14 días en condiciones de Día largo. Al cabo de 14 días de crecimiento cada maceta se sobre-irrigó con 50 mL de NaCl 25mM (fase de aclimatación). Al día 16 de crecimiento cada maceta recibió el mismo tratamiento, pero con 50mM de NaCl. A los 18 días, la concentración fue elevada a 75mM. Luego de 21 días de tratamiento, las

plantas recibieron 50ml de NaCl 100 mM. Desde los 23 días hasta el final del tratamiento, cada maceta fue sobre-irrigada con 50 ml de NaCl 130 mM cada 2 días. Plantas crecidas en estas condiciones fueron empleadas para la cuantificación del contenido de clorofila, mediciones de parámetros de la fluorescencia de la clorofila, respiración y para extracción de ARN, para la determinación de los niveles transcritos de interés.

Para los tratamientos a tiempos cortos con NaCl, se crecieron 7 a 10 semillas de *Arabidopsis* por pocillo en placas multiwell en medio MS 0.5X durante 7 días en condiciones de día largo. Luego de esto, las plántulas fueron tratadas con una concentración de NaCl de 250mM. Se recolectaron muestras antes del tratamiento y luego de 90 y 180 minutos para realizar extracciones de ARN y cuantificación de transcritos de interés.

5.22. Determinación del contenido de clorofila e inspección visual de la senescencia.

La inspección visual de la senescencia estuvo basada en el amarilleo de las hojas. El inicio de la senescencia fue determinado como cuando la punta de la primera hoja se tornó color amarillo. La senescencia completa fue cuando la planta completa estaba amarilla. El contenido de clorofila fue medido espectrofotométricamente como es descrito por Porra (2002). Los resultados son expresados como contenido de clorofila/(g de peso fresco). Para la senescencia inducida por oscuridad, la cuarta y quinta hoja de plantas (cuatro plantas por cada genotipo y por tiempo de incubación) fueron colectadas e incubadas en oscuridad en solución amortiguadora de fosfato 5 mM (pH 5,7) a 23 °C por 0 a 7 días. Luego de esto, las muestras fueron analizadas por inspección visual y se les determinó el contenido de clorofila.

5.23. Medición de parámetros fotosintéticos.

La fluorescencia en hojas fue medida usando un sistema portable de fotosíntesis Li-6400 (Li-Cor). Antes de las mediciones, cada hoja fue adaptada a 60 minutos de oscuridad y cuatro o cinco replicas biológicas fueron medidas usando diferentes plantas de cada genotipo.

5.24. Inspección microscópica de embriones en desarrollo.

Las silicuas fueron fijadas en formaldehído al 1% y luego decoloradas por 2h en solución de Hoyer conteniendo 100 g de hidrato de cloral, 2.5 g de goma arábica y 5 ml de glicerol en 30 ml de agua. La semillas aclaradas de distintos estadios de desarrollo fueron observadas usando un microscopio Nikon E800 usando una óptica de Nomarski y fotografiadas con una cámara Nikon DXM1200.

5.25. Análisis histoquímico de actividad COX y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPC) en embriones

El análisis histoquímico fue realizado como describe Attallah y col. (2011). La actividad GAPC (EC 1.2.1.12) fue ensayada como describió previamente Piattoni y col., 2013, con las modificaciones necesarias para la histoquímica in situ de embriones de *Arabidopsis* (Baud y Graham, 2006). Los embriones fijados fueron incubados en solución amortiguadora de reacción que contenía 50 mM de Tricina/NaOH (pH 8,5), 1 mM de NAD⁺, 10 de mM arsenato de sodio, 0.4 U aldolasa (de musculo de conejo), 1,2 mM de fructosa-1,6-bisfosfato y 0.8 mM de n Azul nitro-tetrazolio (NBT). Para los controles negativos, la fructosa-1,6-bisfosfato fue omitida de la reacción. Los embriones fueron analizados en un microscopio Nikon E200 y fotografiados usando una cámara Panasonic DMC-F3.

5.26. Análisis transcriptómico de plantas *As-HCC1* y *hcc2*

Se crecieron plantas en condiciones de día largo durante 20 días. Para la toma de muestras, se tomaron tres grupos de 5 plantas cada uno para la preparación de las 3 réplicas biológicas de cada genotipo. Seguido a esto se realizó la extracción de ARN total como se describió anteriormente. Las muestras fueron enviadas al servicio de secuenciación del The Genome Technology Access Center de la universidad de Washington en St Luis. Se utilizó un equipo Illumina HiSeq y se utilizó una línea de secuenciación de 50 pb en la cual se incluyeron las 9 muestras marcadas con adaptadores específicos. Las muestras fueron analizadas con el modelo lineal generalizado EdgeR, el cual normaliza las lecturas en base al tamaño de la biblioteca. Finalmente se utilizó un test de FDR para eliminar posibles falsos positivos.

Para los análisis de ontología génica, se subieron los datos a los servidores AGRIGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>), Virtual Plant 1.3

(<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/>) y REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>), donde fueron analizados para enriquecimientos de términos. Los análisis comparativos fueron realizados utilizando la herramienta Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), y los valores de probabilidad y enriquecimiento de las intersecciones fueron calculados con utilizando el test exacto de Fischer para conteo de datos.

5.27. Análisis de alineamiento de secuencias y árbol filogenético

La secuencia proteica correspondiente a los homólogos de plantas de Cox10p de *Saccharomyces cerevisiae* fueron descargadas de Phytozome 9.1 (<http://www.phytozome.net/>) (Goodstein y col., 2012). Las secuencias correspondientes a otros organismos fueron buscadas usando la herramienta blast de proteínas (BlastP: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del National Center for Biotechnology Information. El alineamiento de secuencias fue hecho en el servidor WebPRANK (Löytynoja y Goldman, 2012), utilizando los parámetros preestablecidos. El árbol filogenético fue corrido usando el software Seaview 4.5.0, este fue realizado con el método Maximum-likelihood y con 1000 pseudoreplicas de bootstrap con algoritmo PhyML-aLRT(SH-LIKE) con 100 comienzos aleatorios. El árbol obtenido fue representado usando el software FigTree v1.4.0 (Gouy y col., 2010).

La secuencia proteica correspondiente a los homólogos de plantas de HCC1 y HCC2 de organismos con genomas secuenciados, fueron descargadas de Phytozome 11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>). Además se realizó una búsqueda en con la herramienta BlastP utilizando para encontrar secuencias de organismos cuyos genomas aun no estaban secuenciados. El alineamiento de secuencias fue hecho en el servidor WebPRANK (Löytynoja y Goldman, 2012), utilizando los parámetros preestablecidos. El árbol filogenético fue corrido usando el software Seaview 4.5.0, este fue realizado con el método Maximum-likelihood y con 1000 pseudoreplicas de bootstrap con algoritmo PhyML-aLRT(SH-LIKE). El árbol obtenido fue representado usando graficado usando iTOL (<http://itol.embl.de/itol.cgi>).

5.28. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA y las medias fueron comparadas por Tukey o test de Fisher (LSD). El análisis estadístico fue realizado usando InfoStat versión 2013 para Windows.

6. ESTUDIOS FUNCIONALES DE ATCOX10 DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

Como se mencionó en la introducción, estudios en levaduras y humanos determinaron que la biosíntesis del hemo *a* comienza con la acción de COX10, que cataliza la transformación de hemo *b* en hemo *o*. La ausencia de esta proteína genera una deficiencia respiratoria debida a un ensamblado ineficiente de COX. A pesar del amplio conocimiento disponible en levaduras y humanos, nada se conoce sobre el proceso de síntesis de hemo *a* en plantas y de su relevancia fisiológica. Por esto, nos propusimos caracterizar a la hemo *o* sintasa COX10 de *Arabidopsis thaliana* (AtCOX10).

6.1. RESULTADOS

6.1.1. Identificación y caracterización de un homólogo de COX10 en *Arabidopsis*

Una búsqueda de secuencias similares a Cox10p permitió identificar probables homólogos de esta proteína en todos los dominios de la vida, incluyendo *archaea* y *eubacteria*, indicando que COX10 es una proteína ancestral, clave para la respiración celular. Esto es probablemente debido al rol de COX10 en la síntesis de hemo *a*, necesario para la respiración en todos los organismos que contienen oxidasas terminales del tipo *aa₃*. Las secuencias proteicas de COX10 de 39 organismos fueron usadas para el ensamblado de un árbol filogenético (Fig. 6). Este muestra una clara separación en distintos clados entre las secuencias de COX10 de los distintos reinos. Solamente se encuentra una copia de *COX10* en la mayoría de los genomas analizados. La excepción a esto ocurre en plantas, donde la divergencia en dos copias génicas que codifican COX10 fue observada en *Zea mays*, *Glycine max*, *Brassica rapa* y *Panicum virgatum* (Fig. 6). Debido a que esto se observa en diversos clados, probablemente la presencia de más de un gen se deba a eventos de duplicación independientes. Asimismo, las copias de *Z. mays* y *G. max* fueron divergentes de sus parálogos, indicando, posiblemente, procesos de neofuncionalización recientes. Por otro lado, las duplicaciones presentes en *B. rapa* y *P. virgatum* mostraron una alta identidad de secuencia, indicando que probablemente provengan de eventos recientes de duplicación.

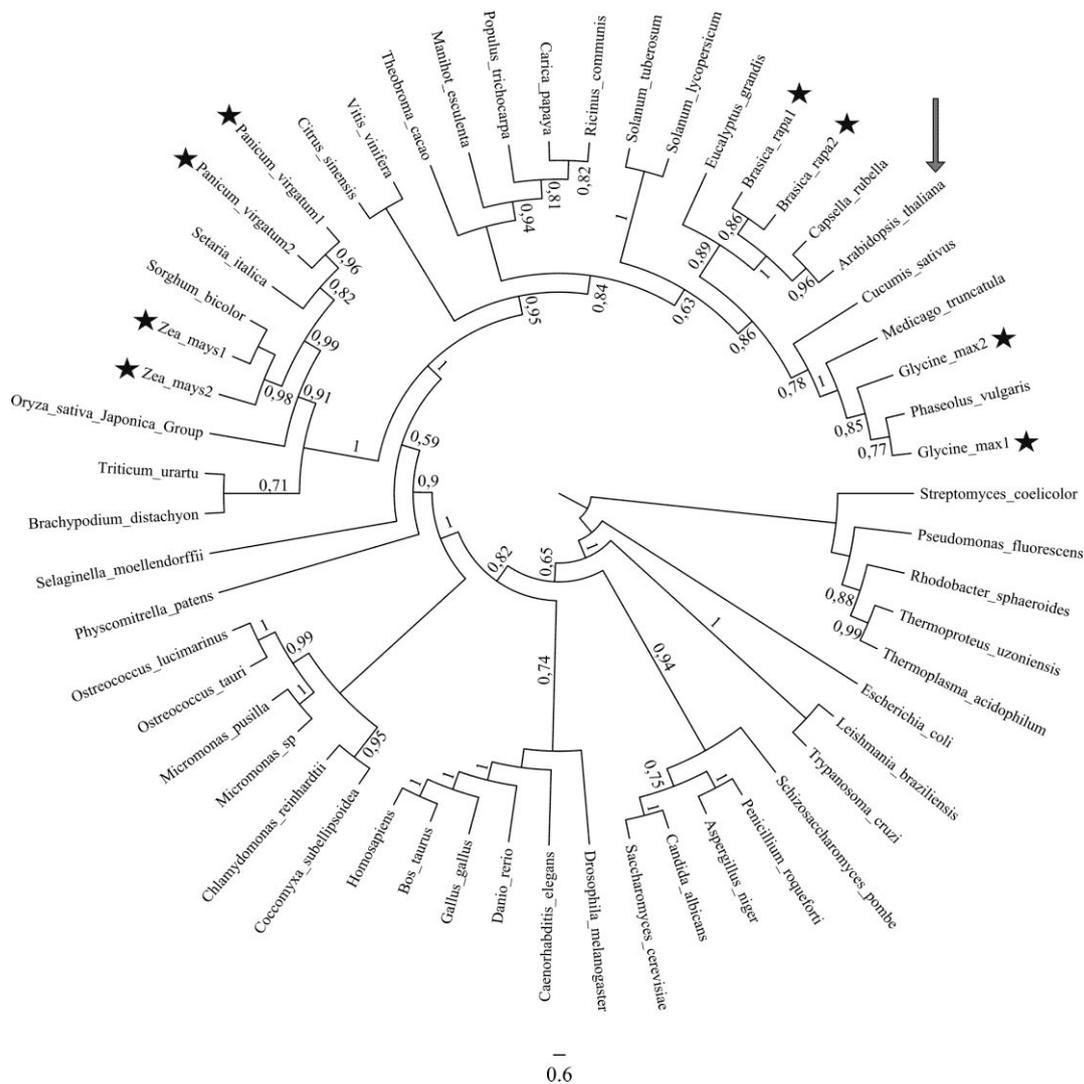


Fig. 6. Árbol filogenético de las proteínas COX10 de diferentes organismos. La secuencia proteica correspondiente a los homólogos de plantas de Cox10p de *Saccharomyces cerevisiae* fueron descargadas de Phytozome 9.1 (<http://www.phytozome.net/>) (Goodstein y col., 2012). Las secuencias correspondientes a otros organismos fueron buscadas usando la herramienta blast de proteínas (BlastP) del NCBI. El alineamiento de secuencias fue hecho en el servidor WebPRANK, utilizando los parámetros preestablecidos. El árbol de reconstrucción filogenética fue corrido usando el software Seaview 4.5.0 y fue realizado con el método Maximum-likelihood con 1000 pseudorréplicas de bootstrap con algoritmo PhyML-aLRT(SH-LIKE) con 100 comienzos aleatorios. El árbol obtenido fue representado usando el software FigTree v1.4.0.

La proteína codificada por el gen *COX10* de *Arabidopsis* (*AtCOX10*) tiene 431 aa, comparada con los 462 y 443 aa de las proteínas de levaduras y humanos, respectivamente. Un análisis de las secuencias de proteínas COX10 de levaduras, humanos y *Arabidopsis* indicó que los residuos esenciales responsables de la función enzimática en levaduras y humanos se encuentran conservados en la proteína de *Arabidopsis* (Fig. 7A, flechas verticales). COX10 de humanos y de levaduras son proteínas integrales de la membrana interna mitocondrial con 8 a 9 hélices

transmembrana predichas (Nobrega y col., 1990). AtCOX10 comparte esta característica, mostrando nueve dominios transmembrana que se solapan casi a la perfección con aquellos descritos para humanos y levaduras (información no mostrada). Estas observaciones sugieren que AtCOX10 de *Arabidopsis* podría cumplir una función comparable con aquella descrita para las proteínas COX10 de humanos y levaduras.

6.1.2. AtCOX10 es capaz de complementar levaduras mutantes nulas en *cox10*

Para analizar si AtCOX10 es efectivamente capaz de reemplazar la función de Cox10p de levaduras, se llevó a cabo un ensayo de complementación de las mutantes nulas para *cox10* de levaduras. Para hacer esto, se transformaron las levaduras mutantes Δcox10 con una construcción que expresaba el ADNc de *AtCOX10* bajo el control del promotor fuerte constitutivo *GPD* (Mumberg y col., 1995). Se observó que la expresión de *AtCOX10* fue capaz de restaurar el crecimiento de la mutante Δcox10 en medio con fuentes de carbono no fermentables, aunque a niveles no estrictamente comparables con aquellos de la cepa salvaje utilizada como control (Fig. 7B).

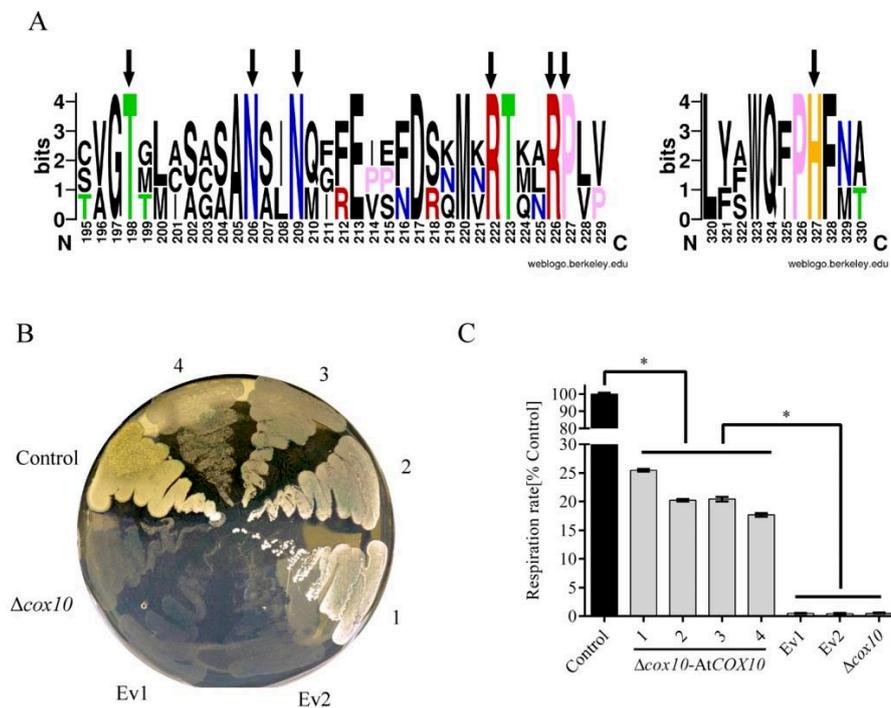


Fig. 7. AtCOX10 complementa funcionalmente a levaduras mutantes Δcox10 . (A) WEBLogo realizado sobre el alineamiento de secuencia hecho con ClustalW2.0 en el que se incluyeron las proteínas COX10 de *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, y *A. thaliana*. Se muestran los residuos de aminoácidos conservados en AtCOX10 (indicados por flechas verticales), previamente reportados como esenciales para la síntesis del hemo *a* y la actividad de COX en levaduras y humanos. (B) Ensayo de complementación de levaduras: las levaduras Δcox10 fueron transformadas con una construcción que permite expresar *AtCOX10* bajo el control de un

promotor constitutivo. Diferentes clones (1-4) de las células mutantes transformadas (Δcox10 -AtCOX10) fueron capaces de crecer con fuentes no fermentables de carbono. Como control, se usaron células salvajes (Control) y mutantes Δcox10 transformadas con el vector vacío (Ev1, Ev2). (C) Tasa de consumo de oxígeno en células salvajes (control), varios clones de células complementadas (1-4), células mutantes Δcox10 transformadas con el vector vacío (Ev1, Ev2) y células mutantes Δcox10 .

Además, se evaluó la capacidad respiratoria de las levaduras complementadas con la proteína de plantas usando un electrodo de oxígeno de tipo Clark. Mientras que las células Δcox10 transformadas con el vector vacío mostraron tasas de consumo de oxígeno cercanas a cero, confirmando que Cox10p es necesaria para la normal respiración en levaduras (Nobrega y col., 1990), las células transformadas con la construcción que expresa la proteína de Arabidopsis mostraron valores de respiración de un 20 a un 25% relativos a las células control (Fig. 7C). Estos resultados muestran que AtCOX10 es capaz de restaurar, al menos en forma parcial, la respiración de levaduras mutantes nulas Δcox10 , sugiriendo que la proteína de plantas tiene actividad hemo *o* sintasa y es capaz de participar en el ensamblado de COX en levaduras.

6.1.3. Localización de AtCOX10 *in vivo* en mitocondrias de plantas.

Para cumplir su rol en la biogénesis de COX, se espera que AtCOX10 esté localizada en la mitocondria, como sus homólogos de otros organismos eucariotas. En efecto, la localización mitocondrial puede ser inferida de la mayoría de los programas de predicción de localización subcelular (Heazlewood y col., 2007). Para obtener evidencia experimental que soporte la localización mitocondrial, la proteína AtCOX10 fue fusionada en su extremo C-terminal a la proteína fluorescente mRFP y expresada en la línea de Arabidopsis mt-gk, que expresa GFP en mitocondrias (mt-GFP; Nelson y col., 2007). Varias líneas que co-expresaban AtCOX10-mRFP y mt-GFP fueron analizadas por microscopía confocal (CLSM). En todas ellas, la fluorescencia de GFP de las mitocondrias, mayormente en forma de puntos, colocalizó con la fluorescencia de la mRFP (Fig. 8), indicando que AtCOX10 está presente en la mitocondria. Como control, la localización intracelular de la mRFP sola fue examinada en las plantas mt-gk. En este caso, la señal de la mRFP apareció en el citosol y no colocalizó con la señal de mt-GFP. Este control demostró que AtCOX10 provee la información para el transporte a mitocondrias de la mRFP y que la colocalización observada no fue debida a un artefacto de los canales de detección de GFP y RFP.

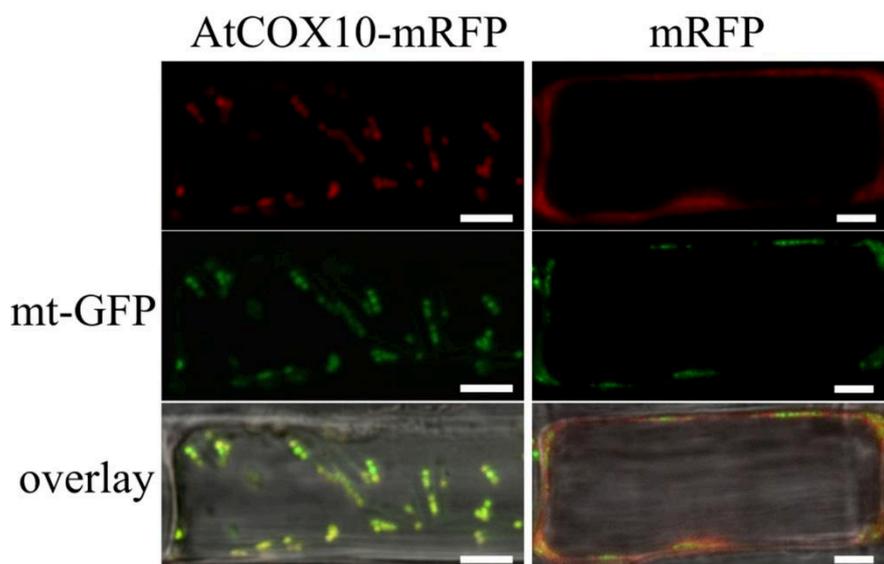


Fig. 8. Localización subcelular de AtCOX10-mRFP. Raíces de 7 días de plantas transgénicas que coexpresaban mt-GFP (verde) y AtCOX10-mRFP (rojo) fueron analizadas por CLSM. Se muestra una célula en la que la señal para los canales de fluorescencia verde y rojo colocalizan como una señal amarilla cuando se superponen. Barra, 5 μ m.

6.1.4. *AtCOX10* es expresado en embriones, endosperma y regiones meristemáticas.

Para analizar el patrón de expresión de *AtCOX10*, se fusionó el gen reportero *uidA* (*GUS*) a un fragmento de 628 pb (−533 to +95) correspondiente a la región promotora putativa de *AtCOX10*. La detección histoquímica de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con esta construcción reveló expresión en el primer y segundo par de hojas (Fig. 9A, B). La expresión de GUS también fue observada en el tejido vascular y en el ápice de la raíz (Fig. 9C). En las flores, la expresión fue evidente en el saco polínico y en los granos de polen, y se observó débilmente en la base de los sépalos (Fig. 9D). La expresión fue también observada en el endosperma, en un estadio específico de las semillas en desarrollo (Fig. 9E-G). Este patrón de expresión conferido por el promotor de *AtCOX10* es similar al descrito para otros genes que codifican proteínas mitocondriales involucradas en el ensamblado de COX (Auger y col., 2001) u otras actividades mitocondriales (Chen y col., 2014). La inspección de la región promotora usando las bases de datos PLACE, AGRIS y PlantCare (Higo y col., 1999; Lescot y col., 2002; Palaniswamy y col., 2006) mostró la presencia de varios motivos que pueden estar relacionados con el patrón de expresión observado (Fig. 9H). Entre ellos, fueron encontrados 2 elementos site II (entre las posiciones −174 y −117 relativas al sitio de inicio de la transcripción), relevantes para la expresión de genes que codifican componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Welchen y Gonzalez, 2005; Welchen y Gonzalez, 2006). Además, fueron observados motivos Lat52 y Lat52/56

(posiciones -413 y -156, respectivamente), específicos para la expresión en polen y saco polínico (Twell y col., 1991; Muschietti y col., 1994; Eyal y col., 1995), un elemento GCN4 (posición -5; Wu y col., 2000) y cajas de Prolamina (-234 y -144; Vicente-Carbajosa y col., 1997; Mena y col., 1998), que regulan la expresión en endosperma.

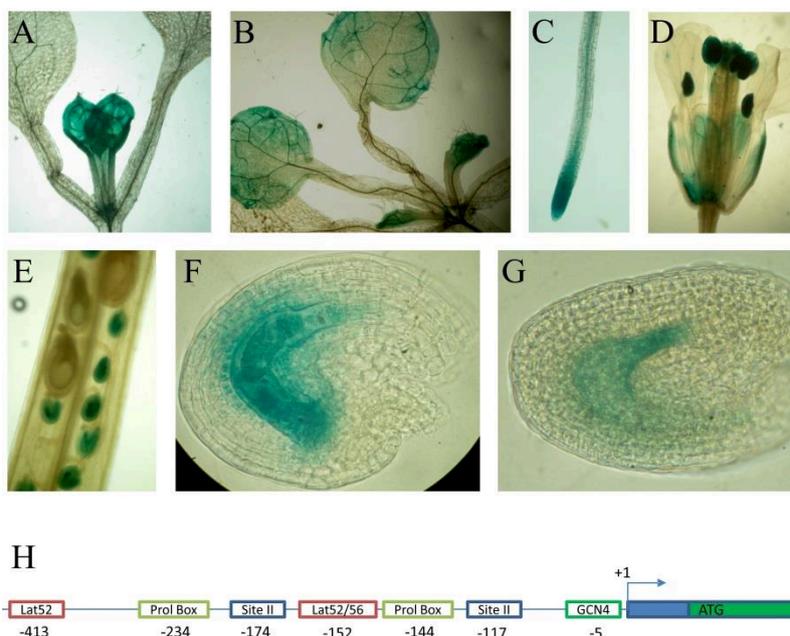


Fig. 9. Análisis del patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtCOX10*. (A-G) La expresión fue observada en el primer y segundo par de hojas (A, B), en el cilindro vascular y el ápice de la raíz (C), en el saco polínico y en los granos de polen, y débilmente en la base de los sépalos (D). La expresión fue detectada también en semillas (E), más precisamente en el endosperma unos pocos días post-fecundación (F, G). La expresión de GUS no fue observada en ningún otro tejido o estadio de desarrollo. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio óptico. (H) Representación esquemática de la región promotora de *AtCOX10*. Las diferentes cajas corresponden a los elementos previamente reportados involucrados en la regulación de la transcripción.

6.1.5. *AtCOX10* es esencial en las etapas tempranas del desarrollo de la planta.

Para dilucidar el rol de *AtCOX10* en plantas, se estudió una línea mutante insercional de *Arabidopsis* con una inserción de ADN-T en el segundo exón del gen *AtCOX10* (Fig. 11A). No fue posible identificar plantas homocigotas mutantes para esta línea en generaciones sucesivas (Fig. 10A). El análisis de plantas heterocigotas (*AtCOX10/atcox10*) reveló que aproximadamente el 25% de las semillas presentes en las silicuas mostraban una morfología anormal (Fig. 10B). Estas eran más pequeñas y tenían un color amarronado, en comparación con las semillas normales (similares a las de las plantas salvajes) de la misma silicua, las que lucían más verdes (Fig. 10B). Las semillas inmaduras anormales contenían embriones que detenían su desarrollo, llegando hasta el estadio torpedo (Fig. 11C). Usando microscopía de Nomarski, se observó que el tamaño

del endosperma de semillas anormales estaba disminuido (Fig. 11D). Sumado a esto, los embriones en estas semillas estaban posicionados cerca del centro, mientras que en las semillas normales se localizaron cerca de la base (Fig. 11D).

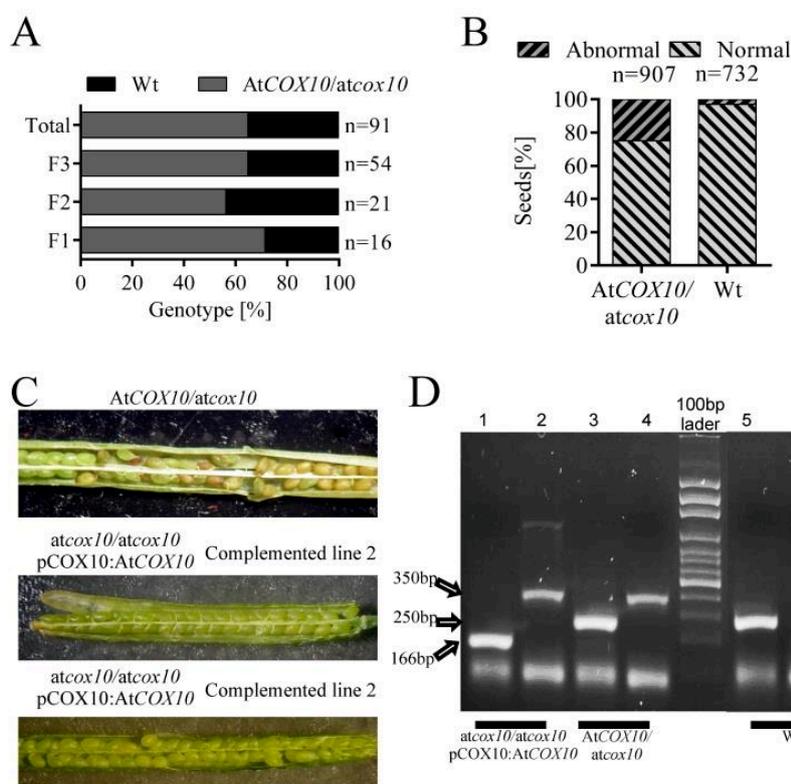


Fig. 10. Caracterización de una mutante insercional de ADN-T para *AtCOX10*. (A) Proporción de plantas salvajes (barras negras) y heterocigotas (barras grises) en la progenie de plantas *AtCOX10/atcox10* a través de generaciones sucesivas (de F1 a F3), deducida a partir del análisis de PCR de ADN genómico. No se pudieron identificar plantas *atcox10/atcox10*. (B) Las plantas mutantes *AtCOX10/atcox10* fueron complementadas con una construcción que expresa *AtCOX10* bajo el control de su propio promotor (*pCOX10:AtCOX10*). Se muestran silicuas correspondientes a una planta *AtCOX10/atcox10* y 2 plantas homocigotas (*atcox10/atcox10*) complementadas. (D) Análisis por PCR sobre DNA genómico de distintas líneas de mutantes *atcox10/atcox10* complementadas, mostrando la presencia del ADN-T insertado en el gen *AtCOX10* endógeno y la ausencia del alelo salvaje. En las calles 1, 3 y 5 fueron usados los oligonucleótidos Cox10FS y Cox10RS, que detectan la presencia de la copia salvaje de *AtCOX10*, mientras que pDAP-RB3 y Cox10RS, que detectan la presencia de la inserción del ADN-T, fueron usados en las calles 2, 4 y 6 (Ver Fig. 11 para más detalles). Las bandas de 166, 250 y 350 pb corresponden a la presencia en el genoma del ADNc de *AtCOX10*, del gen salvaje *AtCOX10* y del alelo mutante con la inserción del ADN-T, respectivamente.

El desarrollo del embrión es un proceso altamente demandante de energía. De acuerdo con esto, el fenotipo de letalidad embrionaria de las mutantes *atcox10* podría ser indicativo de su rol esencial en la biogénesis de COX. Para responder a esta pregunta, se realizó la detección histoquímica de la actividad COX, usando 3,3'-diaminobenzidina

(DAB) como sustrato, en embriones en etapas de desarrollo similares provenientes tanto de semillas de plantas salvajes como de semillas normales y anormales de plantas *AtCOX10/atcox10*. En presencia de DAB, los embriones de las semillas normales produjeron un precipitado marrón, indicativo de la oxidación del DAB, en el sistema vascular en desarrollo de raíces, hipocotilo y cotiledones (Fig. 11E, paneles I y II). Los embriones de las semillas anormales mostraron una tinción muy débil (Fig. 11E, paneles VI, y VII), sugiriendo que los embriones mutantes homocigotas *atcox10* tienen muy baja actividad COX en comparación con los embriones salvajes. Para confirmar que la tinción por DAB fuera indicativa de la actividad COX, se utilizó KCN como inhibidor de COX en solución amortiguadora de reacción. Observamos que el KCN anula la aparición del precipitado marrón en los embriones (Fig. 11E, paneles III y VIII), indicando que la oxidación del DAB es generada por la actividad COX. Para evaluar si los embriones contenían otra actividad enzimática, realizamos la detección histoquímica de la actividad GAPC. Los embriones anormales mostraron niveles similares a los salvajes de actividad GAPC (Fig. 11E, paneles IV, IX, y X), sugiriendo que la carencia de actividad COX no fue debida a un proceso general de disminución en los niveles de enzimas. De acuerdo con estas observaciones, asumimos que *AtCOX10* es requerido para la biogénesis de COX y que la letalidad de embriones es, probablemente, una consecuencia de una disponibilidad energética disminuida para la proliferación celular y el desarrollo, debida a los bajos niveles de actividad COX.

Para analizar si la letalidad en embriones es causada por la mutación en el gen *AtCOX10*, se realizó un ensayo de complementación de la mutante. Para esto, se transformaron plantas mutantes heterocigotas con una construcción que expresa el ADNc de *AtCOX10* bajo el control de su propio promotor. Luego de la transformación y proliferación de estas plantas, se pudieron aislar plantas con la inserción de ADN-T en ambas copias de *AtCOX10* (Fig. 10D), las que mostraron un 100% de semillas con fenotipo normal (Fig. 10C). Esto demuestra que la letalidad en embriones es debida a la falta de un gen *AtCOX10* funcional en los embriones mutantes.

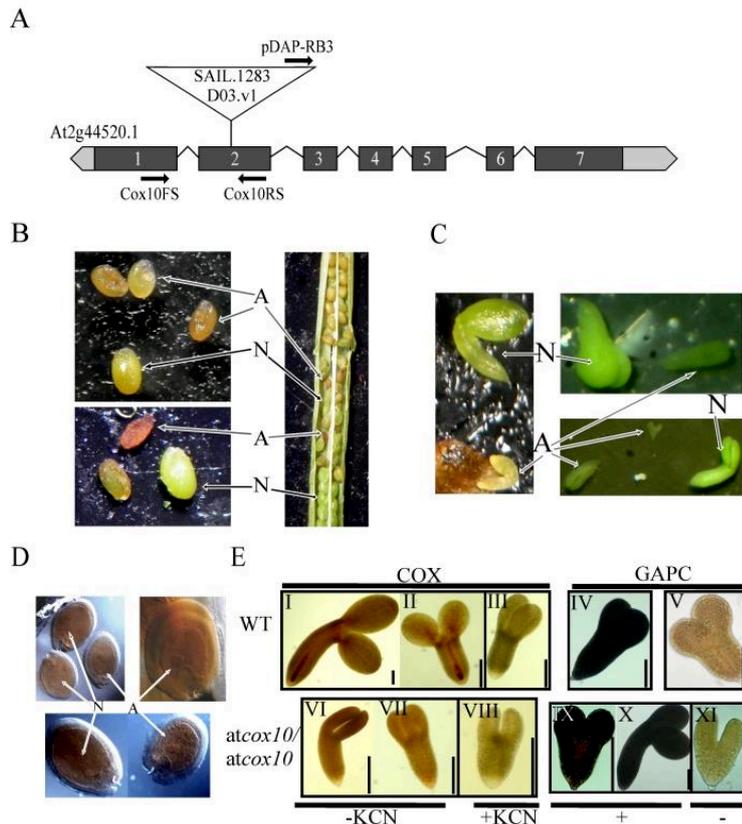


Fig. 11. *AtCOX10* es esencial para la embriogénesis. (A) Representación esquemática del gen *AtCOX10*. Las UTR son representadas como cajas color gris claro. Las regiones codificantes (exones 1-7) son de color gris oscuro. Las líneas delgadas partidas representan los intrones. Se muestran la posición de la inserción del ADN-T en la línea mutante SAIL_1283 y los oligonucleótidos usados para determinar la presencia de los alelos mutantes o salvajes. (B) Silicua representativa de una planta *AtCOX10/atcox10* mostrando semillas normales (N) y anormales (A) distribuidas aleatoriamente a lo largo de la silicua. (C) Embriones normales (N) y anormales (A) en diferentes estadios de desarrollo, colectados a partir de plantas *AtCOX10/atcox10*. (D) Inspección de embriones usando microscopia de Nomarski. Notar que los embriones anormales (A) están posicionados en el centro de la semilla, mientras que los normales (N), en estadio torpeda, están localizados cerca de la base de la semilla. (E) Ensayo histoquímico de actividades COX y GAPC en embriones de plantas salvajes y *AtCOX10/atcox10*. La actividad COX fue observada como un precipitado marrón debido a la oxidación del DAB. La actividad GAPC fue observada como un precipitado azul oscuro debido a la oxidación del NBT. KCN 10 mM fue agregado para inhibir la actividad COX; (-) indica un control negativo para la reacción de GAPC en el que se omitió el agregado de fructosa-1,6-bisfosfato.

6.1.6. Una disminución parcial en la expresión de *AtCOX10* afecta la actividad de COX

Para evaluar la importancia de *AtCOX10* en la biogénesis de COX y en la respiración mitocondrial, se analizaron parámetros respiratorios y de actividad COX en plantas mutantes *AtCOX10/atcox10*. Los niveles de transcritos de *AtCOX10* en estas plantas son aproximadamente del 50% de los de plantas salvajes (Fig. 12A). En semillas embebidas provenientes de plantas heterocigotas, la tasa de respiración total fue similar a la observada en semillas salvajes (Fig. 12B). Sin embargo, esos valores son alcanzados a

expensas de un leve incremento de la respiración alternativa, o sensible a SHAM, y una consecuente disminución de la respiración sensible a cianuro (dependiente de COX) (Fig. 12B). Además, se midieron los mismos parámetros en hojas de roseta completamente expandidas de plantas de 4 semanas de crecimiento. En este estadio, la disminución en la respiración sensible a cianuro fue más pronunciada (Fig. 12C). Nuevamente, la respiración total fue similar a la de plantas salvajes. Para analizar directamente los niveles de actividad COX, se realizaron ensayos en geles BN-PAGE con extractos proteicos enriquecidos en proteínas mitocondriales preparados a partir de plantas mutantes heterocigotas y plantas salvajes. Se detectó una disminución en la actividad COX en las plantas mutantes *AtCOX10/atcox10*, en comparación con plantas salvajes (Fig. 12D), lo que sugiere que la disminución en la respiración sensible a cianuro es debida a un menor nivel de actividad COX.

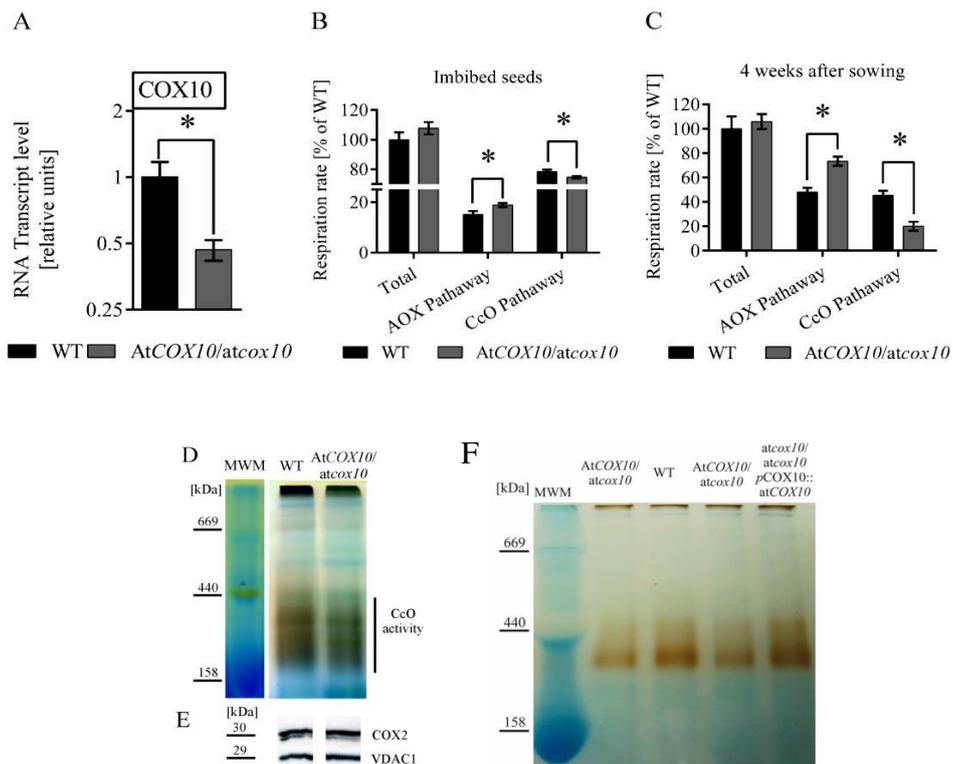


Fig. 12. Las plantas *AtCOX10/atcox10* muestran una disminución en la actividad COX y en la respiración sensible a cianuro. (A) Niveles del transcripto de *AtCOX10* en hojas de roseta de plantas Wt (negro) y *AtCOX10/atcox10* (gris oscuro). (B, C) Tasa de respiración (representada como el porcentaje relativo a la respiración total de plantas salvajes) en semillas embebidas (B) y en hojas de roseta de plantas de 4 semanas (C), medida usando un electrodo de O₂ de tipo Clark. La capacidad de la vía COX fue determinada como el consumo de oxígeno sensible a 1 mM KCN en presencia de 10 mM SHAM. La capacidad de la vía alternativa fue medida como el consumo de oxígeno sensible a 10 mM SHAM en presencia de 1 mM KCN. Los asteriscos indican diferencias significativas con plantas Wt ($p < 0.05$). (D) Tinción de actividad COX en extractos proteicos de plantas salvajes y *AtCOX10/atcox10* luego de la

separación por BN-PAGE. (E) Western blots con anticuerpos contra COX2 y VDAC1. (F) Tinción de la actividad COX en extractos proteicos de plantas salvajes y *AtCOX10/atcox10* y plantas complementadas (*atcox10/atcox10, pCOX10:AtCOX10*) luego de la separación por BN-PAGE. En (D), (E) y (F) se sembraron extractos enriquecidos en proteínas mitocondriales correspondientes a igual cantidad de actividad citrato sintasa, usada como estándar de cantidad de mitocondrias. MWM: Marcador de peso molecular. El precipitado marrón, debido a la oxidación del DAB, corresponde a la actividad COX.

Por otro lado, las plantas mutantes *atcox10/atcox10* complementadas mostraron niveles de actividad COX comparables a los de plantas salvajes (Fig. 12F). Este resultado confirma que la disminución en la actividad COX en las plantas *AtCOX10/atcox10* es debida a una deficiencia en AtCOX10. En paralelo, se evaluaron los niveles de COX2 y VDAC1 mediante Western blot. Los niveles de estas proteínas fueron similares en todas las muestras analizadas (Fig. 12E). En el caso de COX2, esto probablemente sea debido a la presencia de subunidades no ensambladas en los extractos mitocondriales, ya que ha sido reportado que los niveles de subunidades de codificación mitocondrial no siempre se correlacionan con las cantidades de complejos ensamblados (Giegé y col., 2005).

6.1.7. Una disminución en la expresión de AtCOX10 afecta el inicio y la progresión de la senescencia

Se realizó una caracterización fenotípica detallada de plantas heterocigotas *AtCOX10/atcox10*, así como de plantas complementadas y salvajes. Todas estas plantas fueron morfológicamente indistinguibles durante la mayoría de los estadios de desarrollo. Parámetros tales como diámetro de roseta, tiempo de floración y elongación del tallo floral, entre otros, fueron similares a los de plantas salvajes (Fig. 13). Como se describió en la sección anterior, uno de los parámetros que está afectado es la producción de semillas, ya que las plantas *AtCOX10/atcox10* muestran silicuas con semillas anormales. Sumado a esto, las plantas heterocigotas mostraron una senescencia más temprana comparadas con las plantas salvajes (Fig. 14A). Una inspección detallada de este proceso indicó que las rosetas de plantas heterocigotas senescieron aproximadamente 7 días antes que las de plantas salvajes (Fig. 14B). La progresión de la senescencia en plantas mutantes *atcox10/atcox10* complementadas fue similar a la de plantas salvajes (Fig. 14B), indicando que la senescencia acelerada es debida a la deficiencia de AtCOX10.

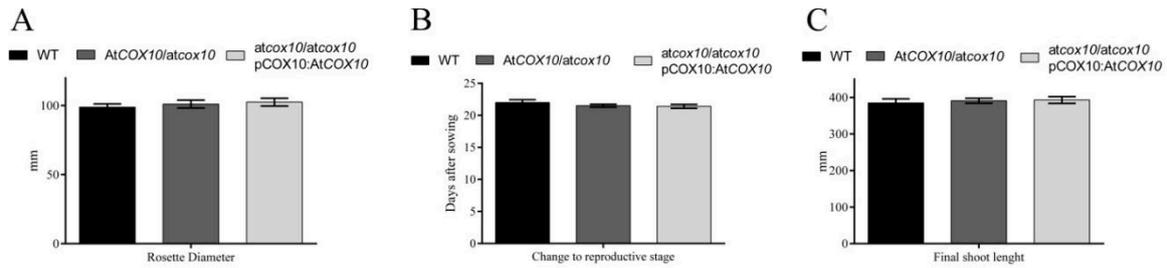


Fig. 13. Parámetros fenotípicos de plantas salvajes, *AtCOX10/atcox10* y complementadas en condiciones normales de crecimiento. Se determinaron el diámetro de la roseta (A), la transición a la fase reproductiva (B) y la altura del tallo (C) en plantas salvajes, *AtCOX10/atcox10* y complementadas.

Para caracterizar mejor la progresión de la senescencia, se midió el contenido de clorofila en rosetas enteras entre los días 42 y 62 luego de la siembra. Mientras que a los 42 días el contenido de clorofila de plantas salvajes y *AtCOX10/atcox10* no presentó diferencias significativas, a los 55 días las plantas heterocigotas alcanzaron una caída casi total de los niveles de clorofila, mientras que las plantas Wt aún tenían alrededor del 50% de los niveles iniciales (Fig. 14C). Debido a que la senescencia progresa de forma diferente en hojas de diferentes edades, se midieron parámetros asociados a la fluorescencia de la clorofila (Fv/Fm) en hojas individuales, como un indicador del rendimiento del fotosistema II. Los resultados para la quinta hoja indican que las plantas *AtCOX10/atcox10* ya mostraban una pronunciada caída en los valores de Fv/Fm a los 45 días post-siembra, mientras que esto no fue observado en plantas salvajes y complementadas hasta el día 54 (Fig. 14D). Los valores de Fv/Fm obtenidos para todas las hojas de roseta a los días 33, 40, 45 y 54 luego de la siembra se muestran en la Fig. 15A. Las hojas 1 y 2 de plantas *AtCOX10/atcox10* presentaron signos de senescencia a los 33 días, cuando las hojas de plantas salvajes y complementadas mostraban parámetros de plantas saludables. Mediciones entre los días 40 y 54 mostraron que el inicio de la senescencia en las diferentes hojas ocurre más temprano en plantas *AtCOX10/atcox10* (Fig. 15A).

Otro parámetro relacionado con la función de *AtCOX10* que puede ser afectado durante la senescencia es la respiración. Para evaluar esto, se midieron la respiración total, la sensible a cianuro y la alternativa en hojas de plantas de 5 y 6 semanas de crecimiento. Tal como se observó en plantas antes de la senescencia (Fig. 12C), no se observaron diferencias significativas en la respiración total, pero las plantas

AtCOX10/atcox10 mostraron un incremento de la respiración alternativa y una disminución similar de la respiración sensible a cianuro (Fig. 15B).

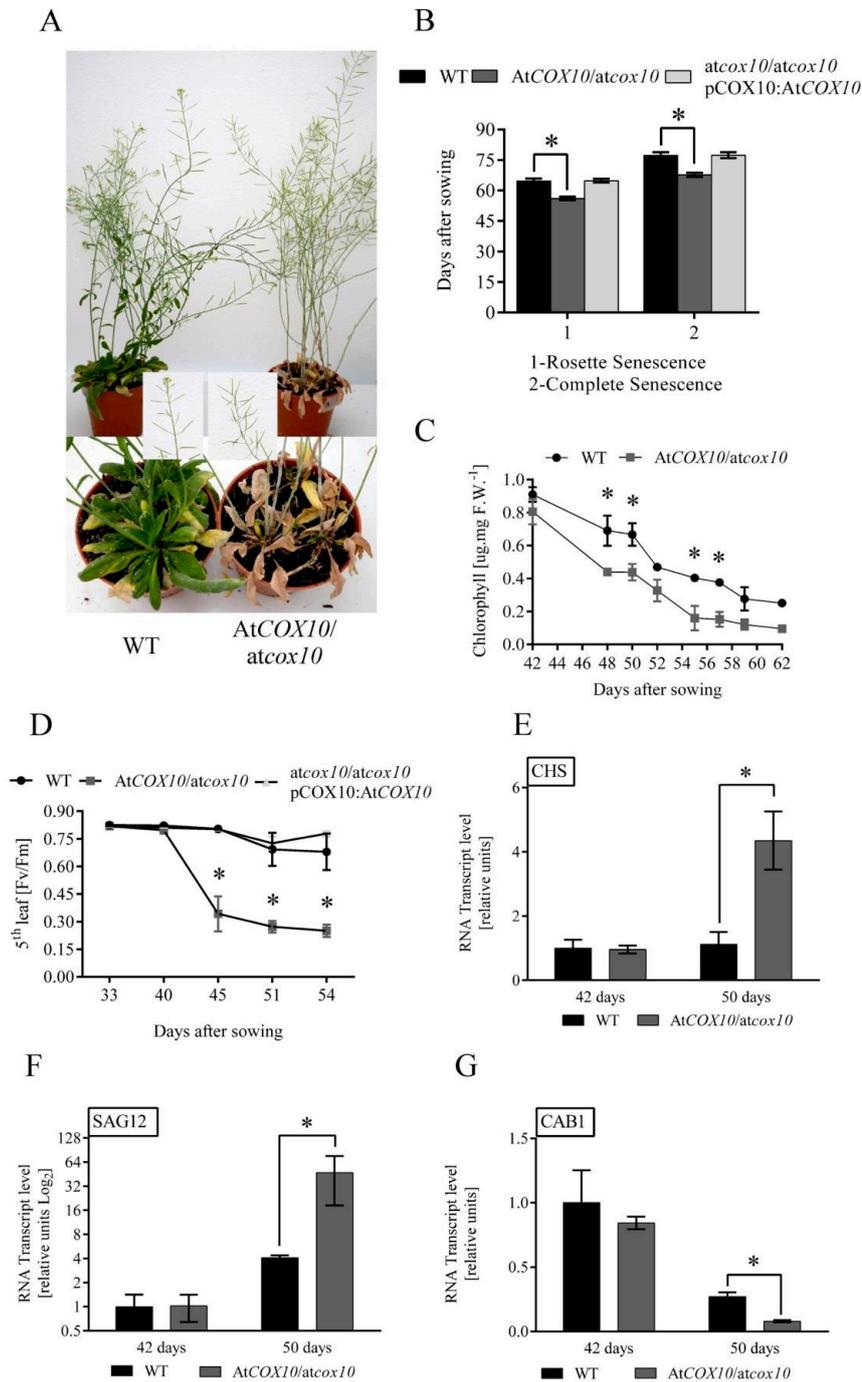


Fig. 14. Las plantas *AtCOX10/atcox10* muestran una senescencia acelerada. (A) Fenotipo de plantas Wt y *AtCOX10/atcox10* de 50 días, crecidas en día largo. (B) Evolución de la senescencia en plantas Wt, *AtCOX10/atcox10* y complementadas (*atcox10/atcox10*, *pCOX10:AtCOX10*). Se determinó el número de días requeridos para el inicio de la senescencia

(1) y para su finalización (2) mediante inspección visual. (C) Contenido de clorofila, medido diferentes días luego de la siembra. (D) Cambios en la medida Fv/Fm en la quinta hoja en diferentes días luego de la siembra. (E-G) Niveles de transcritos de genes marcadores de senescencia (*CHS* y *SAG12*, inducidos durante la senescencia; *CABI*, reprimido durante la senescencia) en plantas de 42 y 50 días post-siembra, medidos por RT-qPCR. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

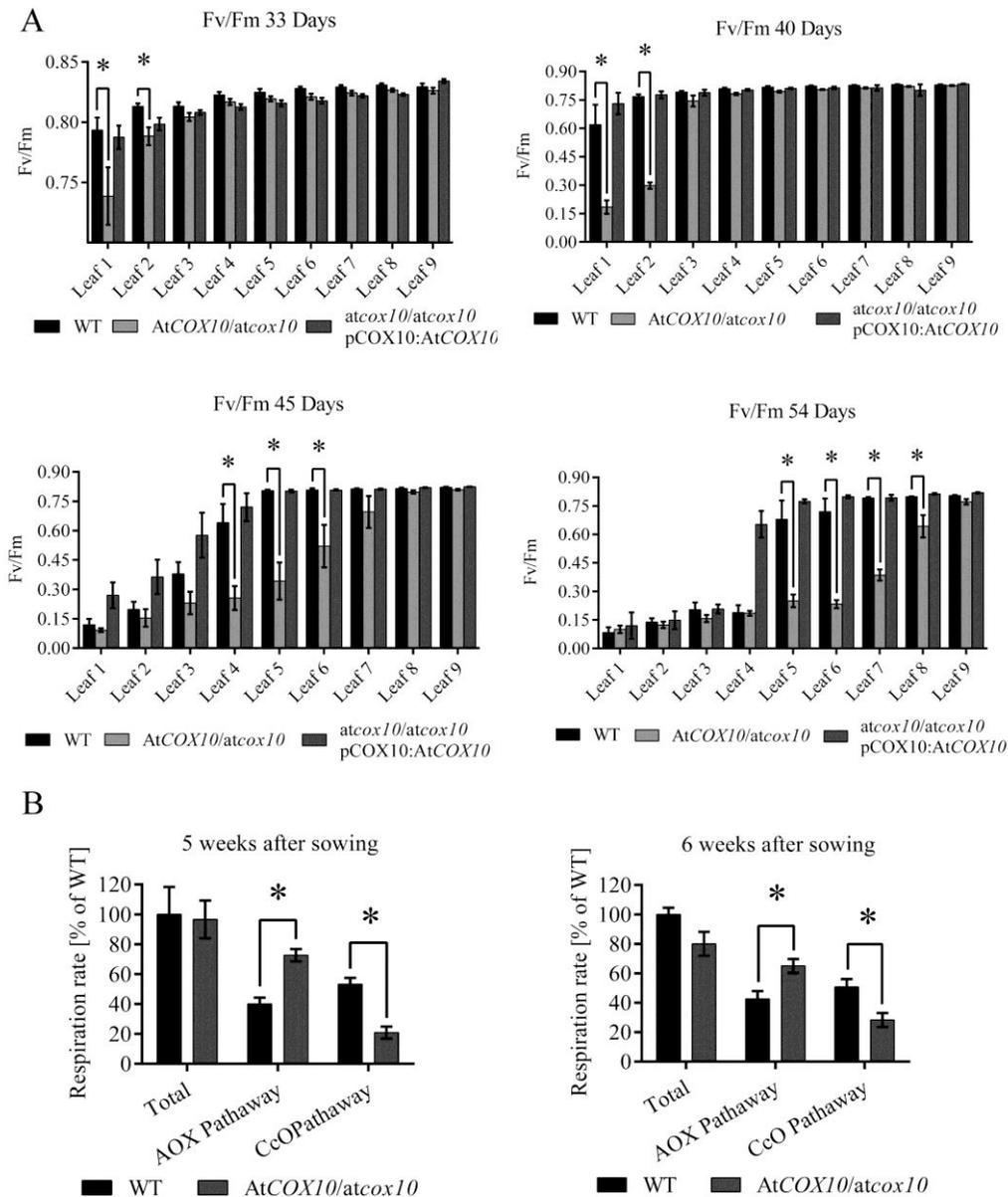


Fig. 15. Caracterización de la progresión de la senescencia en plantas *AtCOX10/atcox10*. (A) La progresión de la senescencia fue analizada en plantas Wt (barras negras), heterocigotas (gris claro) y mutantes homocigotas complementadas (gris oscuro) por medición del parámetro Fv/Fm en todas las hojas de la roseta de plantas de 33, 40, 45 y 54 días post-siembra. (B) La respiración total, la dependiente de COX y la alternativa (AOX) fueron medidas en hojas de roseta de plantas de 5 y 6 semanas de edad. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

También se analizó la respuesta de las plantas heterocigotas a la senescencia inducida por oscuridad. Para hacer esto, se incubaron hojas de roseta escindidas en oscuridad durante varios días, siguiendo el protocolo descrito por Guo y Crawford (2005). Como un indicador de senescencia, se analizaron las hojas visualmente y se midió su contenido de clorofila. De acuerdo con estos parámetros, las plantas heterocigotas parecen ser más sensibles que las Wt a la senescencia inducida por oscuridad (Fig. 16).

Para evaluar la senescencia a nivel molecular, se midió la expresión de genes marcadores de senescencia, previamente caracterizados, mediante RT-qPCR. Los niveles de transcritos de *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* y *SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 12 (SAG12)*, dos genes inducidos durante condiciones de senescencia (Guo y col., 2004; Buchanan-Wollaston y col., 2005), fueron similares a los de plantas salvajes a los 42 días pero se incrementaron considerablemente en plantas heterocigotas a los 50 días post-siembra (Fig. 14E, F). En cambio, los niveles de transcritos de *CABI (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1)*, que codifica un componente del fotosistema II y es reprimido durante la senescencia (van der Graaff y col., 2006), disminuyeron más rápido en plantas *AtCOX10/atcox10* (Fig. 14G) que en plantas salvajes.

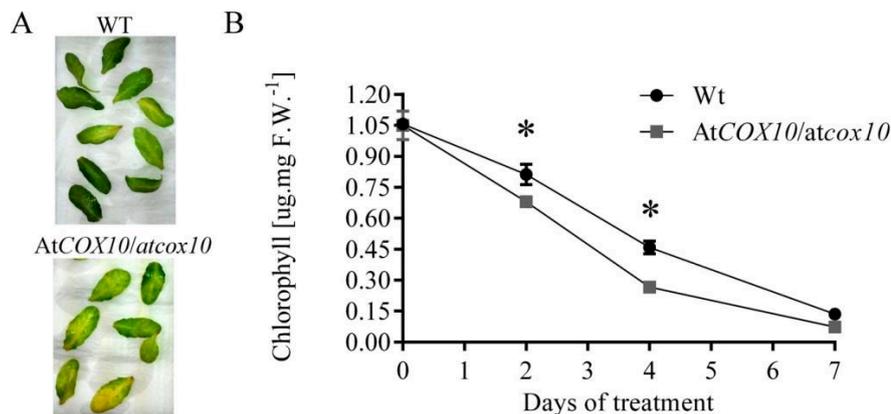


Fig. 16. Senescencia inducida por oscuridad en plantas salvajes y *AtCOX10/atcox10*. (A) Fenotipo de hojas de roseta cortadas de plantas de 4 semanas de edad e incubadas en oscuridad durante 2 días. (B) Contenido total de clorofila medido en hojas mantenidas en oscuridad durante 2, 4 y 7 días.

6.2. DISCUSIÓN

La biogénesis de COX es un proceso secuencial estrictamente controlado que involucra numerosas proteínas auxiliares llamadas factores de ensamblado de COX (Nijtmans y col., 1998; Fontanesi y col., 2008). El proceso de ensamblado está finamente descrito en levaduras y hay una gran cantidad de información en humanos, debido a su importancia en procesos de salud humana (Valnot y col., 2000; Antonicka y col., 2003). Sin embargo, hay poca información disponible acerca de la biogénesis de COX en plantas, quizás debido a la letalidad resultante de la deficiencia de COX que dificulta la realización de estudios detallados. Además, dado que las plantas tienen una vía respiratoria alternativa que conduce los electrones al oxígeno sin la participación de COX, los efectos de una deficiencia leve de COX pueden estar mitigados o permanecer indetectables. Hasta ahora, se encuentra disponible información acerca de la regulación de la expresión de subunidades estructurales de COX codificadas en el núcleo (Welchen y col., 2004; Comelli y col., 2009, 2012) y de factores involucrados en el transporte e incorporación de cobre en COX (Attallah y col., 2007, 2011; Steinebrunner y col., 2014). Sin embargo, nada se sabe acerca de la síntesis del hemo *a* y su transporte e inserción en COX en plantas. Debido a la toxicidad del hemo libre para la célula y a que el hemo *a* está involucrado en pasos esenciales durante el transporte de electrones a través de COX, se deduce que la síntesis del hemo *a* y su transporte deben ser estrictamente controlados y coordinados. En todos los organismos donde la síntesis del hemo *a* fue estudiada, esta vía es llevada a cabo por la participación secuencial de las proteínas COX10 y COX15 (hemo *o* y hemo *a* sintasa, respectivamente) con la ayuda de otras proteínas, caracterizadas principalmente en levaduras y humanos, responsables de la inserción final del cofactor en COX1. Las mutaciones en *COX10* de humanos conducen a pacientes con deficiencia en COX, síndrome de Leigh, leucodistrofia y encefelocardiomiopatía infantil (Valnot y col., 2000; Bestwick y col., 2010), demostrando la importancia de COX10 para el ensamblado de COX.

Mientras que en eucariotas COX10 está localizado en la mitocondria, la proteína también está presente en procariotas que contienen oxidasas del tipo *aa₃*, indicando que esta proteína está, probablemente, universalmente involucrada en la síntesis del hemo *a*. En el caso de *Arabidopsis*, los resultados presentados aquí sugieren que AtCOX10 está también localizada en la mitocondria de plantas.

6.2.1. AtCOX10 es capaz de reemplazar a su homólogo de levaduras.

La complementación de levaduras deficientes en Cox10p con AtCOX10 restaura su capacidad de crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables. Las células complementadas con AtCOX10 alcanzan un 20-25% de la tasa de respiración de levaduras Wt, mientras el consumo de oxígeno es prácticamente nulo en la mutante. Esto sugiere que AtCOX10 puede reemplazar a su homólogo de levaduras, aunque solo parcialmente. La comparación de las secuencias de las proteínas COX10 de humanos, levaduras y *Arabidopsis* indica que los aminoácidos críticos para la actividad catalítica (Valnot y col., 2000; Bestwick y col., 2010; Buchensky y col., 2010) están conservados, a pesar de que la identidad de secuencia de las proteínas es de alrededor del 34%. La identidad de secuencia es particularmente baja en la porción N-terminal de las proteínas, que contiene la presecuencia necesaria para la importación a mitocondrias. De acuerdo con esto, una posibilidad es que AtCOX10 no sea importada y procesada eficientemente en levaduras. Otro aspecto importante es que Cox10p es activa como un complejo en la membrana interna de mitocondrias de levaduras (Bestwick y col., 2010; Khalimonchuk y col., 2010). El factor de ensamblado Coa2p es responsable de la hemilación de Cox1p, pero para que esto suceda Cox10p necesita formar un complejo de alto peso molecular a través de interacciones con el dominio C-terminal de Cox1p (Pierrel y col., 2008; Khalimonchuk y col., 2010, 2012). La proteína Coa2p es crucial para acoplar la presencia de Cox1p recién sintetizada a la oligomerización de Cox10p (Khalimonchuk y col., 2010, 2012). No fue posible encontrar supuestos homólogos para Coa2p o Coa1p, Coa3p, Mss51p y Cox14p en el genoma de *Arabidopsis*, todas ellas proteínas accesorias necesarias para la inserción de Cox1p en la membrana interna mitocondrial de levaduras (Bestwick y col., 2010; Fontanesi y col., 2010; Khalimonchuk y col., 2010, 2012). Considerando que Cox10p establece múltiples interacciones proteína-proteína en la membrana interna mitocondrial y que también está involucrada en la inserción del hemo α , además de su síntesis, la explicación más probable es que la carencia de una restauración respiratoria completa sea debida a que AtCOX10 no es capaz de interaccionar de forma óptima con las demás proteínas de levaduras. Sumado a esto, la expresión simultánea de AtCOX10 y AtCOX15 en células Δcox10 no incrementó la tasa de respiración más allá de la observada con AtCOX10 sola (información no mostrada), sugiriendo que Cox15p no es un factor limitante. En su conjunto, nuestros resultados

sugieren que AtCOX10 es capaz de participar en la síntesis del hemo *a* y puede ser también importante para el ensamblado e inserción de este cofactor en COX1.

6.2.2. *AtCOX10 se expresa en tejidos con elevada demanda energética*

El patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtCOX10* es similar al descrito para numerosos genes nucleares que codifican proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (Elorza y col., 2004; Welchen y col., 2004; Welchen y Gonzalez, 2005; Comelli y col., 2009; Attallah y col., 2011). Además, los análisis bioinformáticos para identificar elementos regulatorios localizados en la región promotora de *AtCOX10* indicaron la presencia de elementos site II (TGGGCC/T), frecuentemente presentes en genes nucleares que codifican componentes de la cadena respiratoria (Welchen y Gonzalez, 2005, 2006; Gonzalez y col., 2007; Giraud y col., 2010). El promotor de *AtCOX10* también dirige la expresión en endosperma. Además, *AtCOX10* es expresado durante la fase II del desarrollo embrionario, entre los estadios globular y corazón (<http://www2.bri.nrc.ca/plantembryo/>). Estas fases se caracterizan por una intensa morfogénesis y desarrollo del tejido meristemático y la energía provista por la mitocondria puede ser relevante para estos procesos. Elementos GCN4 y cajas de Prolamina, responsables de la expresión de genes durante el desarrollo del endosperma (Vicente-Carbajosa y col., 1997; Wu y col., 2000), también están presentes en el promotor de *AtCOX10*. La expresión en regiones meristemáticas y en primordios de hojas puede estar relacionada con la elevada demanda energética generada por las altas tasas de proliferación celular, como se describió para genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales. El patrón de expresión conferido por la región promotora de *AtCOX10* está de acuerdo con su posible función en la síntesis del hemo *a* y su inserción en COX, para asegurar una adecuada producción de energía por parte de la respiración mitocondrial.

6.2.3. *La carencia de AtCOX10 genera letalidad embrionaria*

Realizamos un análisis funcional de *AtCOX10* a través del estudio de una mutante insercional. Se observó que las mutantes homocigotas con un gen *AtCOX10* no funcional no eran viables. Mientras que la carencia de *AtCOX10* causa detención del desarrollo de los embriones en estadio corazón o torpedo, la complementación de las mutantes con *AtCOX10* expresado bajo el control de su propio promotor fue suficiente para restaurar el desarrollo normal de los embriones y la producción de semillas. Esto indica que

AtCOX10 es una proteína esencial, probablemente debido a su rol en la síntesis del hemo *a* y en la biogénesis de COX. La detención del crecimiento de los embriones puede deberse a una producción de energía insuficiente, la cual es necesaria para la proliferación celular que tiene lugar durante los estadios de corazón y torpedo (Mansfield y Briarty, 1990; Boissard-Lorig y col., 2001; Guitton y col., 2004). Esto está de acuerdo con el hecho de que la actividad de COX fue casi indetectable en embriones provenientes de plantas mutantes heterocigotas en una proporción de alrededor del 25%. Además, la fase II del desarrollo embrionario está caracterizada por una elevada expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la glicólisis, la vía de las pentosas fosfato, del metabolismo del piruvato y de los ácidos grasos (Xiang y col., 2011). Todas esas actividades celulares están conectadas con la actividad mitocondrial. Una interrupción en la cadena respiratoria al nivel de COX, debida a una falta de inserción y/o síntesis de hemo *a*, puede acarrear la detención del desarrollo incluso en presencia de la respiración alternativa, ya que esta vía no está involucrada en la producción de energía (Finnegan y col., 2004). De hecho, hay varios reportes de mutantes de *Arabidopsis* defectivos en el ensamblado y la función de citocromo *c* (Meyer y col., 2005; Welchen y col., 2012), en proteínas accesorias encargadas de la inserción del cobre en COX (Attallah y col., 2011; Steinnebrunner y col., 2011) y en proteínas PPR, requeridas para la expresión de las subunidades de codificación mitocondrial (Dahan y col., 2014), que presentan letalidad embrionaria. Por el contrario, hay varios ejemplos de plantas que carecen de componentes del complejo I que son viables y tienen mínimos desórdenes fenotípicos (Meyer y col., 2009, 2011; Häili y col., 2013; Braun y col., 2014; Zhu y col., 2014), indicando que el complejo I no es esencial para la supervivencia de la planta. Sumado a esto, defectos en la actividad respiratoria pueden impactar en el desarrollo del endosperma. Como se mencionó, las semillas anormales, muy probablemente correspondientes a las mutantes homocigotas *atcox10/atcox10*, son más pequeñas que las salvajes y muestran un endosperma más pequeño y rugoso, indicando también la presencia de anomalías en este tejido. El endosperma se forma inmediatamente después de la fertilización para nutrir y proteger al embrión (Berger, 2003). Al igual que el embrión, el endosperma experimenta numerosas divisiones celulares y nucleares durante la maduración. Estos procesos son altamente demandantes de energía y tiene lugar una intensa actividad metabólica durante esta etapa (Xiang y col., 2011).

6.2.4. La deficiencia de *AtCOX10* afecta el inicio y la progresión de la senescencia.

Se observó que la deficiencia de *AtCOX10* impacta sobre el inicio y la progresión de la senescencia en *Arabidopsis*. La senescencia comienza más temprano y avanza más rápido en las plantas *AtCOX10/atcox10* que en las plantas salvajes, lo que no ocurre cuando las plantas mutantes son complementadas con una construcción que expresa *AtCOX10* bajo el control de su propio promotor. La senescencia es crucial para asegurar la descendencia de la planta. La senescencia es considerada como un proceso altruista, mediante el cual las hojas modifican su metabolismo y movilizan el carbono y el nitrógeno, transfiriéndolo a las semillas en desarrollo (Hopkins y col., 2007). Durante la senescencia, el cambio más significativo es el desmantelado del cloroplasto, ya que más del 70% de la proteína de la hoja y una gran proporción de los lípidos celulares se encuentran presentes en esta organela (Hoertensteiner y Feller, 2002). En concordancia con esto, observamos que los niveles de clorofila y la eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm), usados como marcadores de senescencia, decaen de manera más temprana y rápida en plantas *AtCOX10/atcox10*. Esto indica que el desmantelamiento del cloroplasto está acelerado como consecuencia de una deficiencia en la síntesis de hemo *a*. Por otra parte, la mitocondria y el núcleo son los últimos compartimentos en ser desensamblados durante el proceso de senescencia, permitiendo una eficiente coordinación del suministro de energía (Nam, 1997; Guo y col., 2004; Keech y col., 2007). Durante este proceso, la acetil-CoA es formada en glioxisomas por la β -oxidación de los ácidos grasos generados durante la degradación de las membranas (Gut y Matile, 1988; DeBellis y col., 1990; Froman y col., 2000; Page y col., 2001). La acetil-CoA puede ser convertida en oxalacetato dentro de la mitocondria para así entrar en gluconeogénesis y ser usada para la síntesis de sacarosa, que es entonces exportada a los tejidos sumideros (Eastmond y Graham, 2001; Cornah y Smith, 2002). Ya que este es un proceso que demanda energía, se puede especular que la deficiencia de *AtCOX10*, la cual causa una disminución en la capacidad de COX, puede originar defectos en la producción de energía durante la senescencia. De hecho, la respiración mitocondrial sensible a cianuro se vio afectada en las plantas *AtCOX10/atcox10* y esto fue compensado mediante un incremento de la respiración alternativa. Este desbalance en la respiración puede implicar que se produce menos ATP por unidad de carbono oxidado y que un incremento en el consumo de nutrientes es necesario para soportar la demanda energética asociada con la remobilización de nutrientes. Por lo tanto, el acelerado uso de reservas puede explicar

por qué las plantas *AtCOX10/atcox10* senescen más rápido que las plantas salvajes. Si este fuera el caso, otras mutantes defectivas en la actividad COX deberían mostrar también senescencia acelerada. Se conocen mutantes con una disminución parcial de la actividad COX como aquellas en los genes que codifican citocromo *c* (Welchen y col., 2012) y mutantes heterocigotas en el factor de ensamblado de COX HCC1 (Steinebrunner y col., 2014). Ninguna de esas mutantes muestra senescencia temprana, lo que apunta a un rol más específico de *AtCOX10* en este proceso. Una posibilidad es que *AtCOX10*, y no las otras proteínas, sea un factor limitante para la biogénesis de COX al inicio de la senescencia. Una segunda posibilidad es que la senescencia temprana no esté directamente relacionada con una disminución en la capacidad de COX, sino con defectos en el ensamblado que conduzcan a la producción de intermediarios con efectos deletéreos. Finalmente, el rol de *AtCOX10* en la progresión de la senescencia puede ser independiente de su rol en la biogénesis de COX. Son necesarios estudios adicionales con mutantes disponibles que presenten defectos en la capacidad de COX para evaluar estas posibilidades. El hecho de que en plantas no haya otras proteínas conocidas, más allá de COX, que requieran hemo *a* para su función y que la mutante de *AtCOX10* muestre una disminución de la respiración sensible a cianuro al inicio de la senescencia sugiere que el rol de *AtCOX10* en la progresión de este proceso está probablemente relacionado con su rol en el ensamblado de COX.

En conclusión, nuestros resultados indican que *AtCOX10* es un factor limitante en la biogénesis de COX en plantas y resaltan el rol de la hemo *o* sintasa en la modulación de los niveles de actividad de COX, la respiración mitocondrial y la senescencia.

7. LAS PROTEÍNAS HCC TIENEN EFECTOS OPUESTOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS SALINO EN *A. THALIANA*.

Se han identificado en el genoma de *Arabidopsis* genes que codifican probables homólogos de proteínas SCO (Attallah y col., 2011). Las proteínas SCO de plantas han sido llamadas HCC1 y HCC2, por *homologue of copper chaperone* (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). En el caso de *HCC1*, que codifica una proteína que posee las cisteínas conservadas, se observó que la anulación de la expresión del gen es letal, produciéndose una detención del crecimiento en estadios tempranos del desarrollo embrionario (Attallah y col., 2011). Los embriones mutantes poseen muy baja actividad COX, lo que sugiere que HCC1 es esencial para la biogénesis de este complejo y que muy probablemente esta sea la causa de la letalidad observada. Por otra parte, al realizar geles azul nativos para poder separar los complejos de la cadena de transporte mitocondrial, se observó que las mutantes heterocigotas en *HCC1* poseían alrededor de la mitad de la capacidad COX de las plantas salvajes (Steinebrunner y col., 2014). Esto enfatiza aún más el rol de esta proteína en la inserción del Cu y la biogénesis de COX.

En el caso de HCC2, codifica una proteína que conserva una gran identidad con HCC1, pero que perdió el motivo CxxxC, así como el residuo de histidina responsables de la unión del Cu (Attallah y col., 2011). Además, las plantas mutantes homocigotas en *HCC2* solo presentan alteraciones menores en su desarrollo y no se observaron cambios en la capacidad COX en relación con plantas salvajes, lo que sugiere que esta proteína no participa en forma directa en el ensamblado de COX (Steinebrunner y col., 2014).

7.1. RESULTADOS

7.1.1. Análisis filogenético de las proteínas HCC

Dado que en los últimos años el número de genomas y transcriptomas de distintas especies vegetales secuenciados ha crecido de forma notable, se decidió profundizar en el análisis filogenético de las proteínas HCC1 y HCC2. Para ello, se descargaron todas las secuencias de proteínas Sco disponibles en la base de datos Phytozome 11 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>). Se obtuvieron las proteínas Sco de un total de 62 organismos: 6 clorofitas, 3 embriofitas, 1 licofita y 52 angiospermas. Además, se decidió realizar una búsqueda bioinformática más amplia incluyendo transcriptomas de organismos que no tienen un genoma ensamblado utilizando la herramienta BlastP del

NCBI sobre la base de datos no redundante de proteínas. De esta forma, se sumaron secuencias pertenecientes a 8 gimnospermas, 1 clorofita y una 1 pteridofita, totalizando 72 organismos. Luego de esto, se eliminaron las proteínas generadas por variantes de splicing. Esto concluyó con un total de 164 secuencias de proteínas Sco de plantas. Las mismas fueron alineadas utilizando el servidor on-line webPrank (<http://www.ebi.ac.uk/goldman-srv/webprank/>) con sus parámetros por defecto. Con este alineamiento, se procedió a realizar un árbol filogenético utilizando el software Seaview 4.5.0. El árbol se corrió con el método PhyML, utilizando como soporte de las ramas el algoritmo aLRT (SH-Like) con 1000 réplicas.

Como se puede observar en la Fig. 17, todas las secuencias pertenecientes a clorofitas, embriofitas, licofitas y pteridofitas (algas, musgos y helechos) se agrupan cercanas a la raíz del árbol (Fig. 17, línea roja punteada). Además de esto, el resto de las proteínas que se agrupan por fuera de este subclado, a partir de esta misma rama, pertenecen a la subclase HCC1, es decir que poseen el dominio de unión a cobre conservado. Por fuera de esto, se agrupan las proteínas HCC2, que no poseen el dominio de unión a cobre conservado. Proteínas de este tipo están presentes solo en gimnospermas y angiospermas, indicando que la probable duplicación que dio origen a las proteínas HCC1 y HCC2 ocurrió en un ancestro común de estos clados. Además, prácticamente todas las especies de gimnospermas y angiospermas analizadas (ver excepciones más abajo) poseen genes que codifican ambas proteínas.

Un caso particular se observó en la monocotiledónea *Oropetium thomaeum*, donde la proteína Sco1_2 (recuadro verde), que se agrupa con secuencias pertenecientes a HCC1 de monocotiledóneas (color naranja), presenta varias regiones faltantes, entre ellas el motivo CxxxC y la histidina distal. Esto es llamativo, ya que la otra proteína Sco presente en este organismo se agrupa junto con la subclase HCC2. No se conocen otras proteínas que puedan reemplazar a las proteínas Sco en el proceso de inserción del cobre en COX2. Ambas proteínas Sco de este organismo poseen un motivo Cx₅C en la región donde debería estar la histidina distal. Una posibilidad es que estas proteínas sean capaces de unir cobre y catalizar su inserción en COX a través de estos motivos. Otra posibilidad es que el gen *Sco1_2* de *O. thomaeum* sea un pseudogen y exista otro gen, no detectado, que codifique una proteína HCC1 funcional. Finalmente, es posible que existan errores en la secuenciación responsables de las alteraciones observadas.

Al analizar más en detalle las secuencias de las proteínas HCC2, se observó que, dentro de monocotiledóneas, las proteínas de gramíneas (Fig. 17, cajas de color rojo) presentan la primera cisteína del motivo CxxxC conservada, excepto en *Brachypodium distachyon* y *Brachypodium stacei* (Fig. 17, cajas de color naranja). Además, todas las secuencias de monocotiledóneas presentaron en la región C-terminal el motivo Cx₅C mencionado con anterioridad y una histidina conservada distante 8 aminoácidos de este motivo (Fig. 17B), sugiriendo que la aparición de estas características debe haber sucedido temprano durante la evolución de las monocotiledóneas. Posiblemente esto sea un indicio de neofuncionalización de estas proteínas. Por otra parte, *Spirodela polyrhiza* (monocotiledónea ancestral) *Picea sitchensis* (gimnosperma) y *Phaseolus vulgaris* (dicotiledónea) parecen haber perdido la copia correspondiente al gen *HCC2*. Dado que los demás miembros del clado poseen una copia de *HCC2*, estos parecen eventos aislados e independientes. En forma opuesta, *Picea lambertina* parecería haber eliminado la copia de *HCC1* y conservar la de *HCC2*. Sin embargo, los datos de este organismo fueron tomados de bases de datos de transcriptomas, siendo probable que la información no esté completa.

En conclusión, HCC2 es una proteína exclusiva de las gimnospermas y angiospermas y probablemente haya surgido antes de la divergencia de ambos grupos, dado que la mayoría de sus miembros posee ambas proteínas. La conservación de las proteínas HCC2 durante la evolución sugiere que esta proteína, a pesar de no poseer los residuos involucrados en la unión del cobre, tiene alguna función relevante para el funcionamiento vegetal.

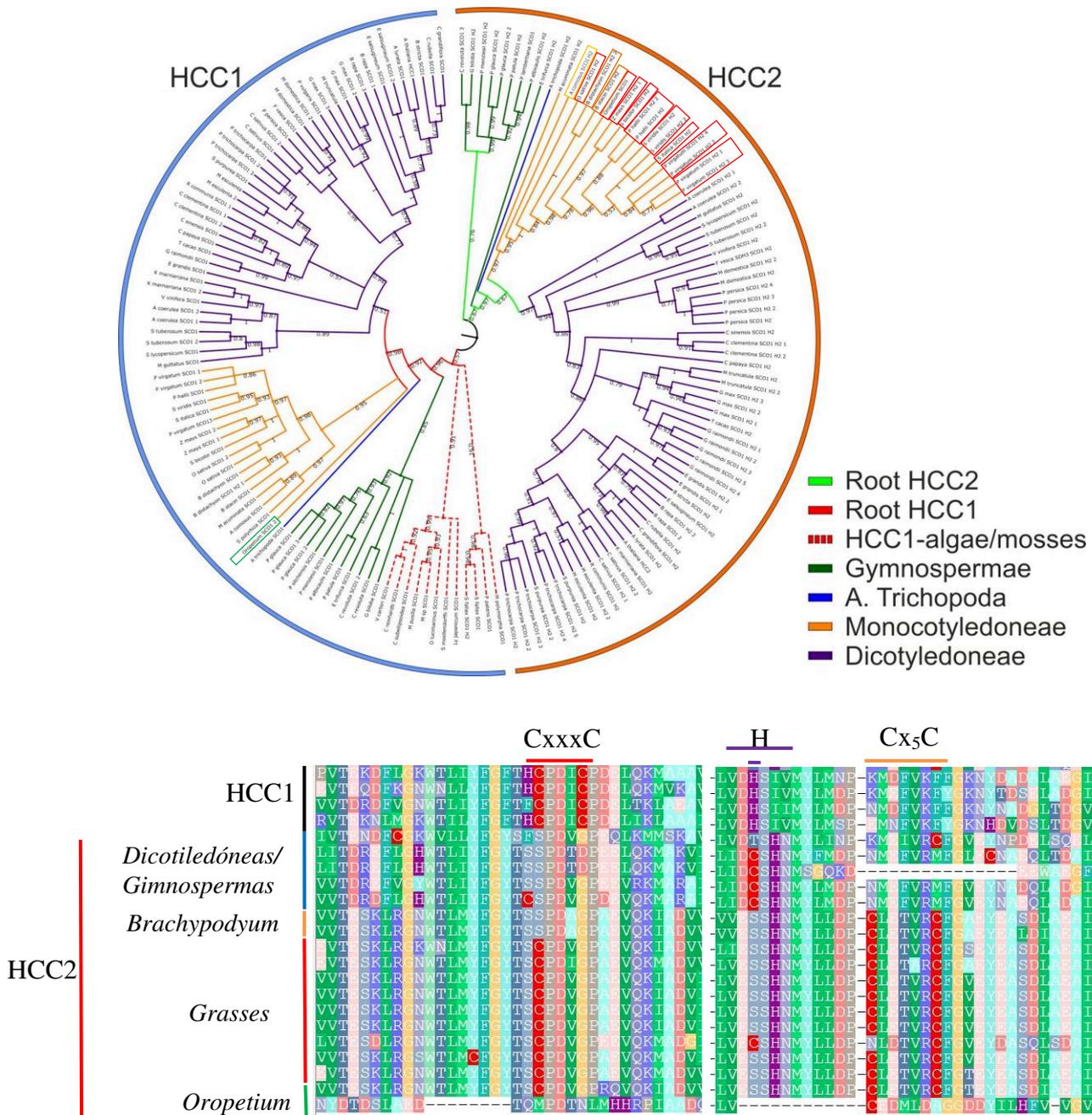


Fig. 17. Análisis bioinformático de las secuencias de proteínas HCC de plantas. (A) Árbol filogenético construido con 72 especies y 164 secuencias de proteínas Sco de especies vegetales. Se construyó el árbol con el programa PhyML y el soporte de las ramas fue realizado con aLRT (SH-Like) con 1000 réplicas. Las cajas de colores hacen referencia a organismos con características particulares en las secuencia (ver texto). El árbol fue graficado usando iTOL (<http://itol.embl.de/itol.cgi>). (B) Alineamiento de secuencias de proteínas HCC que presentan características distintivas en las regiones claves para la unión del cobre. Las últimas dos secuencias pertenecen a *Oroperium*, que no parece poseer una proteína HCC con el dominio de unión a cobre canónico. En la parte superior del diagrama se muestran los motivos de interés. A la izquierda, la proteína analizada y el grupo al que corresponde. La imagen fue adaptada de BioEdit 7.2.5.

7.1.2 Silenciamiento de *HCC1*

El hecho de que las plantas mutantes homocigotas en *HCC1* no sean viables y que las plantas heterocigotas no presenten diferencias con respecto a las salvajes dificulta el estudio de este gen. Por tal motivo, se decidió realizar el silenciamiento del mismo para obtener plantas con bajos niveles de expresión. Para abordar esta estrategia, se decidió realizar el silenciamiento mediante la sobreexpresión de un ARN antisentido. Se seleccionó una región que cubre el primer tercio del ARN mensajero de *HCC1* (ver Materiales y Métodos), dado que dicha porción es la que presenta mayor variabilidad entre *HCC1* y *HCC2* (menos de 15% de identidad de secuencia). Asimismo, se realizó una búsqueda bioinformática utilizando la herramienta BLAST. De esta forma, se corroboró que no hubiera otros posibles blancos en el genoma de *Arabidopsis*, de modo de lograr un silenciamiento específico para *HCC1*. El fragmento de ADN que codifica el ARN antisentido se colocó bajo el control del promotor *CaMV35S* y se transformaron plantas salvajes (Col-0) mediante inmersión floral con *Agrobacterium* con la construcción obtenida.

Luego de la transformación, se obtuvieron numerosas líneas independientes que resistieron al agente de selección. Estas líneas se denominaron As-HCC1. En la segunda filial, un grupo de 10 líneas fue crecido en tierra para evaluar si presentaban diferencias fenotípicas con plantas Col-0 y si éstas estaban correlacionadas con el nivel de silenciamiento medido por RT-qPCR. Como se puede observar en la figura 18, las líneas 1, 7 y 2 mostraron una floración adelantada con respecto a las plantas salvajes. Al cuantificar los niveles de transcritos de *HCC1* en estas plantas, pudimos corroborar que tenían entre un 20% y un 40% de los niveles de plantas salvajes. Por otro lado, las líneas 8 y 6 mostraron un bajo nivel de silenciamiento, teniendo alrededor de 70% a 80% de los niveles de transcritos de las plantas Col-0. Esto se correlacionó con el hecho de que estas plantas no presentaron alteraciones en su crecimiento. Durante el resto de la tesis, se llevaron a cabo los trabajos experimentales utilizando indistintamente las líneas As-HCC1 1 y 7.



Fig. 18. Segunda filial de plantas As-HCC1. Se puede observar que las líneas 1, 2 y 7 presentan alteraciones con respecto a las plantas Col-0. Ver el texto para más detalles.

7.1.2.1. Caracterización fenotípica de plantas As-HCC1

Se crecieron tanto plantas silenciadas como salvajes en tierra y se determinaron distintos parámetros de crecimiento. Se pudo evidenciar que las plantas con bajos niveles de expresión de *HCC1* presentaban una floración adelantada, tanto en días luego de la siembra como en número de hojas al momento de la floración. Como se muestra en la Fig. 19A, las plantas As-HCC1 florecieron en promedio 4 días antes que las plantas salvajes. En cuanto al número de hojas, tuvieron, en promedio, 2 hojas menos que las salvajes al momento de la floración. Sin embargo, a los 18 días de crecimiento, justo cuando las plantas As-HCC1 realizan la transición a floración, no se observaron diferencias en el número de hojas ni en el radio máximo de la roseta (Fig. 19A).

Cuando nos enfocamos en el aspecto morfológico, se observaron algunas alteraciones en la forma de la hoja. Se pudo ver que las hojas de plantas silenciadas no presentaban la normal curvatura de la lámina de la hoja hacia abajo (epinastia). En cambio, éstas eran planas e incluso en algunos casos presentaban los márgenes de la lámina curvados hacia arriba (hiponastia). Además de esta morfología, se pudo observar que los peciolo de las plantas silenciadas también presentaban una marcada hiponastia (Fig. 19B).

Es conocido que tanto la curvatura de la lámina como la hiponastia de la roseta están regulados por auxinas (Sandalio y col., 2016). Sumado a esto, algunos trabajos plantean la existencia de una regulación de los niveles de esta hormona por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gao y col., 2014; Ivanova y col., 2014). Se ha observado

que mutantes en el gen *CATALASE 2 (CAT2)*, las cuales no son capaces de degradar el H_2O_2 de forma eficiente, poseen niveles mayores a los normales de ROS y esto a su vez reduce la transcripción de genes de biosíntesis de auxinas. Esta menor cantidad de hormona genera una curvatura de la lámina de la hoja hacia arriba (Gao y col., 2014). Es posible que el fenotipo observado en las plantas As-HCC1 se deba a la presencia de mayores niveles de ROS debido a un defecto en el ensamblado de COX. En relación con esto, se ha reportado que, frente a una disminución de la inserción de cobre en COX2, se podrían generar intermediarios de COX1 con los sitios catalíticos expuestos que serían pro-oxidantes (Bourens y col., 2013). Se hallan en proceso estudios para determinar los niveles de ROS y la señalización por auxinas en las plantas As-HCC1. Para esto, se planea evaluar la expresión del reportero de auxinas *DR5::GUS*, los niveles de expresión de genes de la vía de biosíntesis de auxinas y los niveles de ROS.

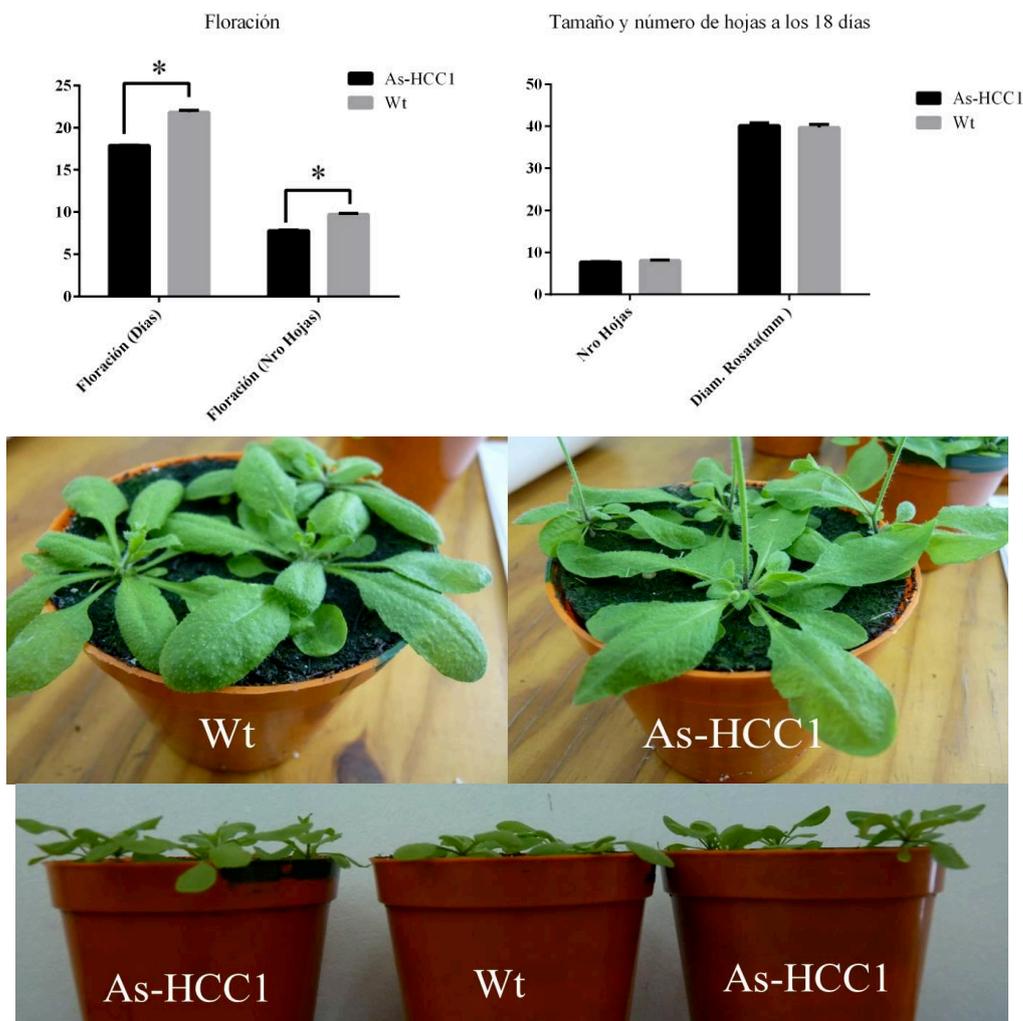


Fig. 19. Parámetros de desarrollo de plantas As-HCC1. (A) Evolución de la floración en plantas crecidas en condiciones de día largo. (B) Fenotipo de roseta de plantas As-HCC1 de

23 días (imagen superior) y de 18 días (imagen inferior) donde se observan las alteraciones en el desarrollo de la lámina.

7.1.3. Análisis transcriptómico global de plantas con niveles alterados de las proteínas HCC.

Se decidió realizar un análisis transcripcional global de plantas mutantes en *HCC2* (*hcc2*) y plantas silenciadas en *HCC1* (As-HCC1), de modo de evaluar posibles cambios originados por la carencia de las proteínas respectivas. Para ello, se extrajo ARN total (ver Materiales y Métodos) de plantas de 20 días crecidas en condiciones control. Se enviaron triplicados biológicos de cada genotipo (As-HCC1, *hcc2* y Wt) para la realización de RNAseq. La secuenciación se realizó según lo descrito en Materiales y Métodos.

El análisis transcriptómico arrojó como resultado un total de 1065 genes regulados diferencialmente (al menos 1,5 veces de cambio y FDR menor a 0,05) en las plantas As-HCC1. De éstos, 683 estaban reprimidos y 382 tuvieron expresión aumentada. Se analizaron estos datos utilizando los softwares AGRIGO, Virtual Plant 1.3 y REVIGO, los cuales permiten realizar una clasificación mediante ontología génica (GO). Se observó que numerosos términos presentaban enriquecimiento, pero resultó de principal interés que la mayor parte de ellos correspondía a “respuesta a estímulo” y “respuesta a estrés” (Fig. 20). A su vez, cuando se realizó el análisis de enriquecimiento en forma individual con los genes que estaban inducidos o reprimidos, solo se observó enriquecimiento dentro del grupo de genes regulados en forma negativa y el resultado fue similar al encontrado con el conjunto completo de genes (ver anexo I).

En el caso de las plantas *hcc2*, mostraron expresión diferencial 762 genes. De éstos, 321 se encontraron reprimidos mientras que 441 se encontraron inducidos. Luego del análisis de ontología génica, nuevamente se encontraron sobrerrepresentados términos asociados con “respuesta a estímulo” y “respuesta a estrés” (Fig. 20). Cabe destacar que cuando se realizó el mismo análisis en forma independiente para los genes inducidos o reprimidos solo se halló enriquecimiento en el grupo de genes inducidos, los que presentaban los mismos términos enriquecidos que en el análisis general (ver anexo I).

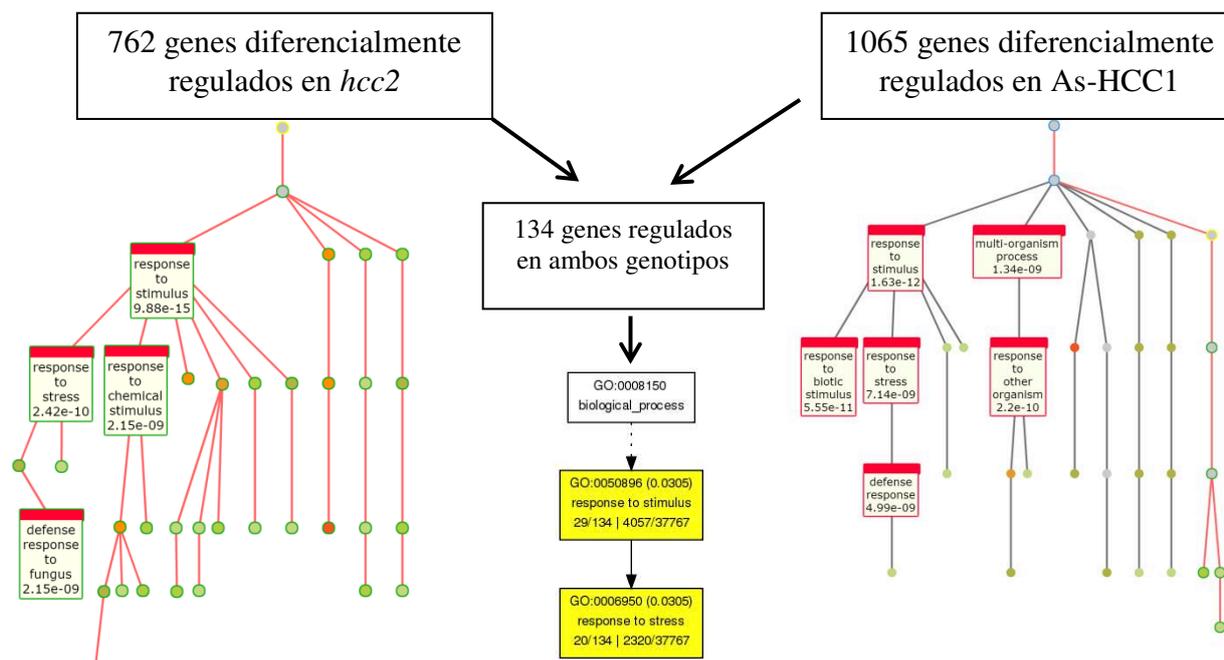


Fig. 20. Análisis de ontología génica para los transcriptomas de plantas *hcc2* y *As-HCC1*. Fueron analizados los genes cuya expresión está alterada en plantas *hcc2* o *As-HCC1*. Solo se muestran los términos con enriquecimiento significativo, con valor de $p < 10^{-9}$. En la parte central se muestra el enriquecimiento para los 134 genes con expresión alterada en ambos genotipos.

Luego del análisis arriba mencionado, evaluamos si ambos genotipos presentaban genes regulados en común. Se encontró que 134 genes modificaron su expresión en ambos genotipos, un número significativamente mayor al esperado por azar (4,4 veces de enriquecimiento, $p = 1.5 \times 10^{-38}$). Al realizar un análisis de enriquecimiento sobre este grupo de genes, se observó que muchos de ellos estaban relacionados, nuevamente, con respuesta a estrés y a estímulos. Resulta notorio que el 71% de los genes (94) está regulado en forma opuesta en ambos genotipos (Fig. 21). Este resultado sugiere que una deficiencia en HCC1 produce cambios de expresión génica opuestos a los causados por una deficiencia en HCC2. Además, en ambos casos parece haber cambios relacionados con la expresión de genes de respuesta a estrés. Un análisis previo, en el cual se analizaron plantas deficientes en COX17 (*amiCOX17*), que es la proteína encargada de ceder el cobre a HCC1 para la biogénesis de COX, también mostró un enriquecimiento en genes asociados con la respuesta a estrés (García y col., 2016). Debido a que COX17 y HCC1 participan en la misma vía, se decidió analizar si había alguna correlación entre los genes regulados en los genotipos en estudio y en plantas *amiCOX17*. Un total de 185 genes mostraron expresión alterada tanto en plantas *amiCOX17* como en plantas *As-HCC1*. En forma interesante, el 78% de éstos mostró cambios en el mismo sentido en los

2 genotipos, la mayoría de ellos con expresión disminuida (Fig. 21). Al realizar un análisis de GO, se observaron numerosos términos sobrerrepresentados. De forma similar a lo observado anteriormente, los términos relacionados con “respuesta a estímulo” y “respuesta a estrés” fueron mayoritarios (Fig. 22, Anexo I)

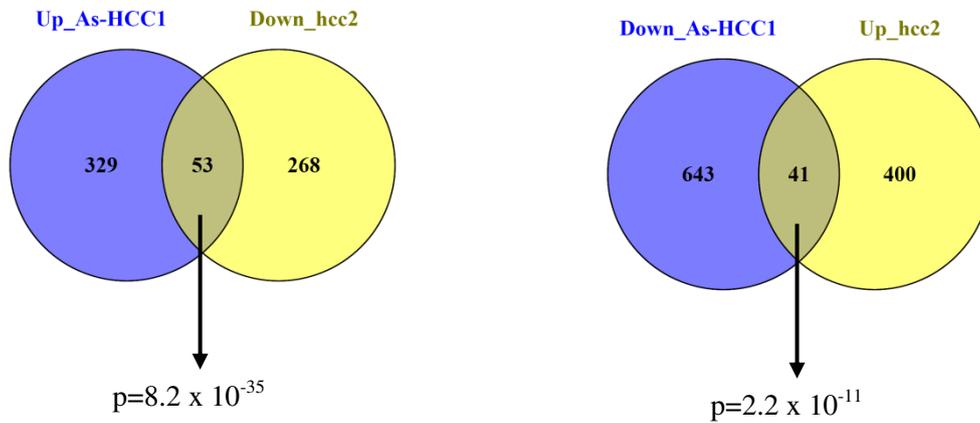


FIG. 21. Diagramas de Venn representando los genes regulados en forma opuesta en plantas *As-HCC1* y *hcc2*.

Por otro lado, al realizar la comparación con el transcriptoma de plantas mutantes en *HCC2*, se encontraron 175 genes regulados en ambos genotipos, un 67% en forma opuesta. La mayoría de estos genes se encontraban reprimidos en las plantas *amiCOX17* e inducidos en las plantas mutantes en *HCC2*. Nuevamente, el análisis de GO mostró sobrerrepresentadas las categorías asociadas con “respuesta a estímulo” y “respuesta a estrés” (Fig. 22, Anexo I)

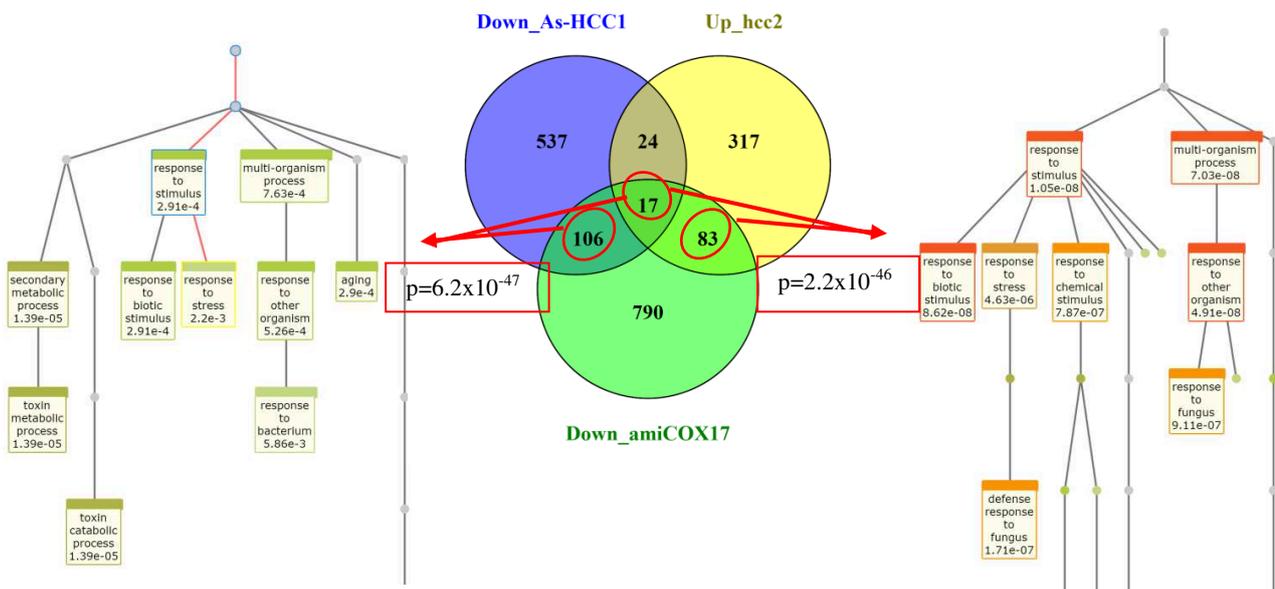
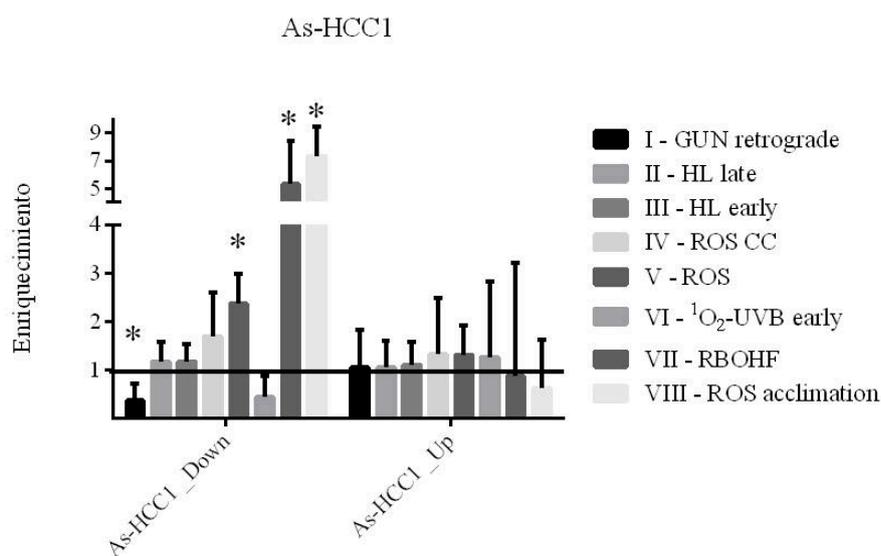


Fig. 22. Diagrama de Venn esquematizando los genes regulados en los genotipos As-HCC1, *hcc2* y *amiCOX17*. Se compararon los 683 genes regulados en forma negativa en plantas As-HCC1 con los 441 genes inducidos en plantas *hcc2* y los 996 genes reprimidos en plantas *amiCOX17*. En el análisis GO de la izquierda se analizan los 123 genes regulados en forma negativa tanto en plantas As-HCC1 como en plantas *amiCOX17*. En el diagrama de la derecha, se muestra el resultado del análisis para los genes regulados en forma positiva en plantas *hcc2* y reprimidos en plantas *amiCOX17*.

Recientemente se ha reportado un metaanálisis en el que se incluyeron 79 ensayos de microarreglos, totalizando 157 sets de datos, asociados con tratamientos y/o mutantes que tienen un balance redox y/o producción de ROS alterados (Willems y col., 2016). En este estudio, se realiza un análisis de agrupamiento por similitud de los distintos sets de datos y se definen 8 clusters, los cuales presentan comportamientos transcripcionales que se pueden diferenciar de acuerdo al tipo de estrés al que fueron sometidas las muestras (Willems y col., 2016). Se realizó una comparación de los datos de transcriptoma obtenidos para las plantas con niveles alterados de las proteínas HCC con los componentes de los distintos clusters (ver anexo I, tablas suplementarias 8.1.5 a 8.1.8). Como se observa en la figura 23, los transcriptos con niveles disminuidos en las plantas As-HCC1 mostraron enriquecimiento en 3 clusters (V-ROS, VII-RBOHF y VIII-ROS acclimation). En cambio, este grupo de genes se vio empobrecido en genes asociados a la regulación retrógrada del cloroplasto (I-GUN retrograde). Por otra parte, los genes inducidos en plantas As-HCC1 no presentaron diferencias con lo esperado por azar.



hcc2

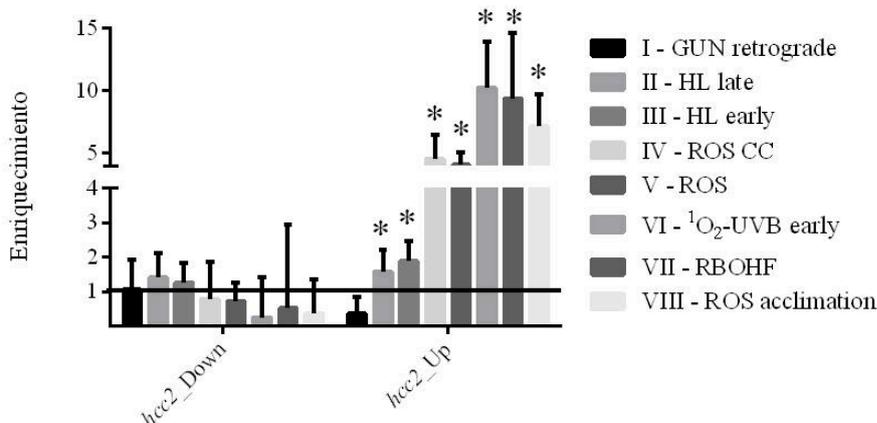


Fig. 23. Enriquecimiento en componentes de los distintos clusters asociados a ROS entre los genes regulados en las plantas As-HCC1 y *hcc2*. La línea negra horizontal denota el enriquecimiento medio producido por mero azar. Las barras muestran un intervalo de confianza del 95%. Los asteriscos marcan los enriquecimientos significativos, con $p < 10^{-3}$.

Las plantas mutantes en *HCC2* mostraron un patrón opuesto al de las plantas silenciadas en *HCC1*, presentando enriquecimiento en sus genes inducidos. Esto se observó de manera más fuerte en los clusters 4 a 8 (IV-ROS CC, V-ROS, VI-¹O₂-UVB early, VII-RBOHF, VIII-ROS acclimation). Este resultado es similar al obtenido en los análisis de ontología génica realizados anteriormente, en donde solo se observó enriquecimiento en los genes inducidos en plantas *hcc2* y en los genes reprimidos en plantas As-HCC1. Aproximadamente un 20% del total de los genes regulados negativamente en plantas silenciadas en *HCC1* (130 de 683; $p = 1,06 \times 10^{-22}$) pertenecen a alguno de los clusters arriba mencionados (V, VII y VIII; 1376 genes) (Figura 24; anexo I, tabla suplementaria 8.1.9). Un análisis similar realizado para los genes inducidos en las plantas *hcc2* indicó que aproximadamente un tercio de los transcritos regulados (149 de 421; $p = 1,25 \times 10^{-34}$) se encuentran presentes en al menos uno de los clusters analizados (IV al VIII; 1696 genes) (Figura 24; anexo I, tabla suplementaria 8.1.10).

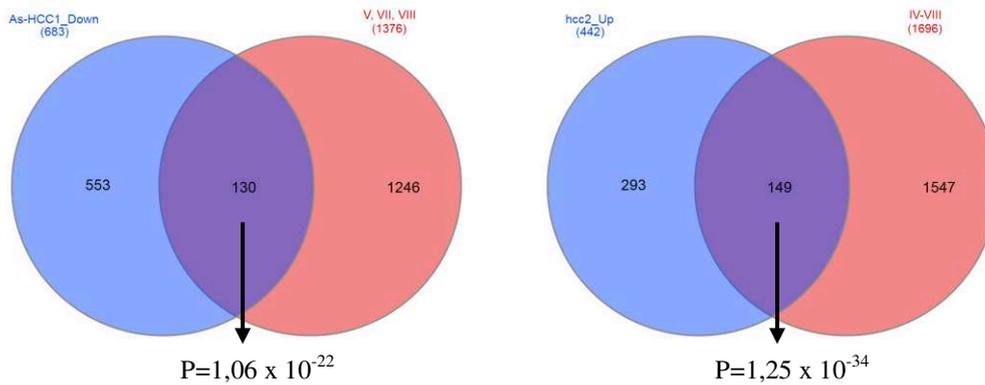


Fig. 24. Diagrama de Venn de los genes regulados en las plantas con niveles de expresión alterados de los genes *HCC* y los presentes en los clusters descritos por Willems y col, 2016. A la izquierda se muestran los genes regulados negativamente en plantas As-HCC1 comparados con los presentes en los clusters V, VII y VIII. Del lado derecho se grafican los genes inducidos en las plantas *hcc2* y los pertenecientes a los clusters IV al VIII.

De acuerdo a los análisis mostrados, se encuentran enriquecimientos relacionados con la respuesta a estrés en los genes regulados de forma negativa en las plantas As-HCC1 y en los inducidos en las mutantes *hcc2*. Sin embargo, en los análisis de ontología génica no se puede introducir información sobre cómo estos transcritos están regulados por estrés. Los sets de datos generados por Willems y col. (2016) contienen esta información. Se procedió entonces a correlacionar los cambios de expresión observados en las plantas en estudio con los reportados por Willems y col. (2016) para el grupo de genes comunes. En el caso de genes que presentan cambios de expresión en el mismo sentido en más de un cluster, se realizó un promedio de los valores correspondientes. En el caso de que los cambios fueran en sentido opuesto, se tomó el comportamiento mayoritario (ej. regulados positivamente en dos clusters y negativamente en uno, se tomaron solo los cambios positivos). Como se puede observar en la figura 25, de los 130 genes regulados en forma negativa en las plantas As-HCC1 presentes en alguno de los grupos arriba mencionados, 122 (93%) mostraron regulación positiva en los clusters. Solamente 8 genes se encontraron reprimidos en ambos sets de datos. En contraposición, en las plantas mutantes *hcc2* el 87% de los 149 genes en común se mostraron inducidos en los clusters IV al VIII (Fig. 25). Este análisis indica que las plantas As-HCC1 tendrían reprimidos una cantidad importante de genes que se inducen en respuesta a ROS. En cambio, las mutantes *hcc2* presentan inducidos un gran número de genes inducidos en condiciones de estrés.

Se informó que los genes presentes en los clusters V y VI presentan una elevada correlación con transcriptomas de plantas sometidas a distintos estreses ambientales, entre ellos estrés osmótico, estrés salino, sequía y frío (Willems y col., 2016). Teniendo en cuenta esta información, se podría postular que las plantas *hcc2* estarían transcripcionalmente preparadas para la respuesta a este tipo de estreses. En cambio, las plantas As-HCC1 podrían presentar un comportamiento opuesto al de plantas *hcc2*.

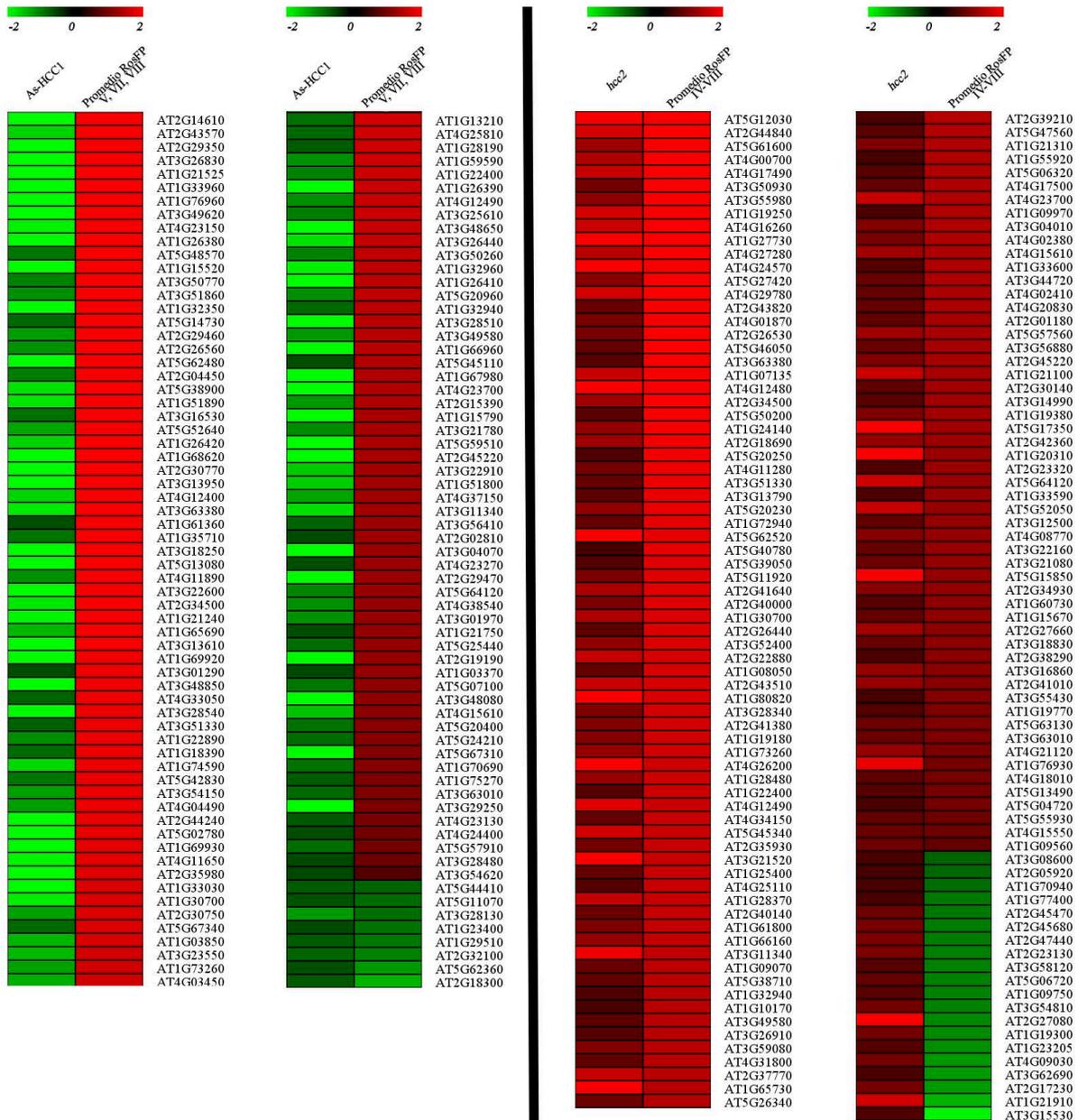


Fig. 25. Mapa de calor (*heat map*) mostrando los cambios de expresión de los genes regulados negativamente en las plantas silenciadas en *HCC1* y positivamente en las mutantes *hcc2*. Se muestran los genes que están presentes en los clusters asociados a ROS (Willems y col., 2016). Los cambios de expresión se muestran en escala logarítmica (\log_2). RosFP: distintos clusters asociados a ROS.

7.1.4. Caracterización de la tolerancia a estrés por NaCl de plantas As-HCC1 y hcc2.

García y col. (2016) reportaron que las plantas con niveles alterados de COX17 presentan respuestas transcripcionales diferenciales frente a distintos tipos de estreses abióticos. Asimismo, observaron que las plantas que sobreexpresan *COX17* presentan mayor tolerancia frente a estrés por NaCl. Todo esto, junto con los datos de transcriptómica de las plantas deficientes en *HCC1* y *HCC2*, nos impulsó a evaluar el efecto del tratamiento con NaCl sobre plantas con niveles alterados de las proteínas HCC.

Se cultivaron líneas de las plantas en estudio durante 15 días en condición de día largo y, luego de este período, se realizaron riegos periódicos con soluciones de concentración creciente de NaCl hasta alcanzar 150 mM (ver Materiales y Métodos). Se realizó un seguimiento fenotípico y se colectaron muestras para realizar diferentes determinaciones.

A lo largo del tratamiento, fue evidente que las plantas As-HCC1 fueron las que primero mostraron clorosis en sus hojas, lo opuesto a lo observado en las plantas *hcc2*, las que permanecieron saludables por mayor tiempo que las plantas salvajes (Col-0). Luego de 17 días de tratamiento, las únicas plantas que no se vieron afectadas fueron las *hcc2*. La diferencia fue aún más notoria luego de los 35 días, ya que todas las plantas As-HCC1 mostraban ausencia total de clorofila, mientras que las plantas *hcc2* se mostraban significativamente más saludables que las salvajes (Fig. 26). Estas observaciones se correlacionaron con el contenido de clorofila de las distintas líneas luego del tratamiento, medido en forma cuantitativa mediante un ensayo espectrofotométrico. De acuerdo con éste, al día 17 de tratamiento se observó que las plantas As-HCC1 presentaban una mayor caída en los niveles de clorofila que las plantas salvajes. Por otra parte, dos líneas de mutantes *hcc2* evaluadas no mostraron reducción alguna en este tiempo (Fig. 26). Luego de 25 días de tratamiento, todas las plantas se mostraron notoriamente afectadas. Sin embargo, en las plantas As-HCC1 el contenido de clorofila se redujo más de un 80% mientras que las plantas salvajes aún poseían un 30% de los valores iniciales. Finalmente, las plantas mutantes en *HCC2* aún retenían más del 50% de su clorofila. A los 31 días se observó que las plantas salvajes alcanzaron los niveles de clorofila de las plantas As-HCC1, mientras que las plantas *hcc2* aún retenían 30-40% de la clorofila

inicial (Fig. 26). Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre plantas crecidas en condición control.

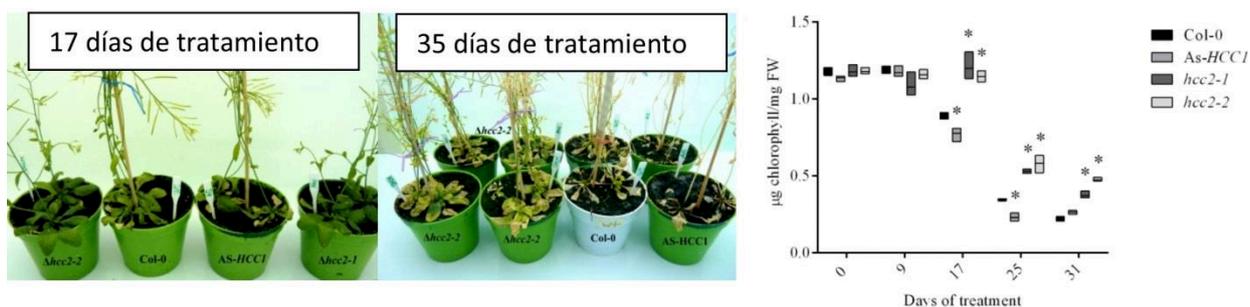


Fig. 26. Efecto del tratamiento con NaCl sobre plantas As-HCC1 y hcc2. Las plantas fueron tratadas con concentraciones crecientes de NaCl a partir del día 15 después de la siembra (considerado día 0 de tratamiento). A la izquierda se muestran imágenes representativas distintos días después de iniciado el tratamiento. A la derecha se muestra el contenido de clorofila de las plantas analizadas. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$) con plantas Col-0.

Para profundizar el estudio de la tolerancia a NaCl, se determinó la eficiencia cuántica del fotosistema II (Fv/Fm; ver Materiales y Métodos). Se conoce que este parámetro disminuye frente a situaciones de estrés, así como durante la senescencia (Baker, 2008; Mishra y col., 2011; Mansilla y col., 2015). Se realizaron determinaciones a diferentes días de tratamiento. Como se puede observar en la Fig. 27, luego de 15 días de tratamiento las 4 primeras hojas de las plantas As-HCC1 mostraron una mayor caída del parámetro Fv/Fm, lo que indicaría que son afectadas en mayor grado que las plantas salvajes (Wt). En cambio, en las plantas hcc2 la caída en este parámetro fue menor que en plantas Wt. De forma similar, a los 19 días las hojas 4 y 5 de plantas As-HCC1 se mostraron más afectadas, arrojando valores de Fv/Fm menores que los de plantas salvajes. Esto fue opuesto en plantas hcc2. Finalmente, a los 24 días de tratamiento se observaron resultados similares en las hojas 6 a 8 (Fig. 27). La cuantificación del parámetro Fv/Fm en plantas control (no tratadas), no arrojó diferencias entre los genotipos (Fig. 27).

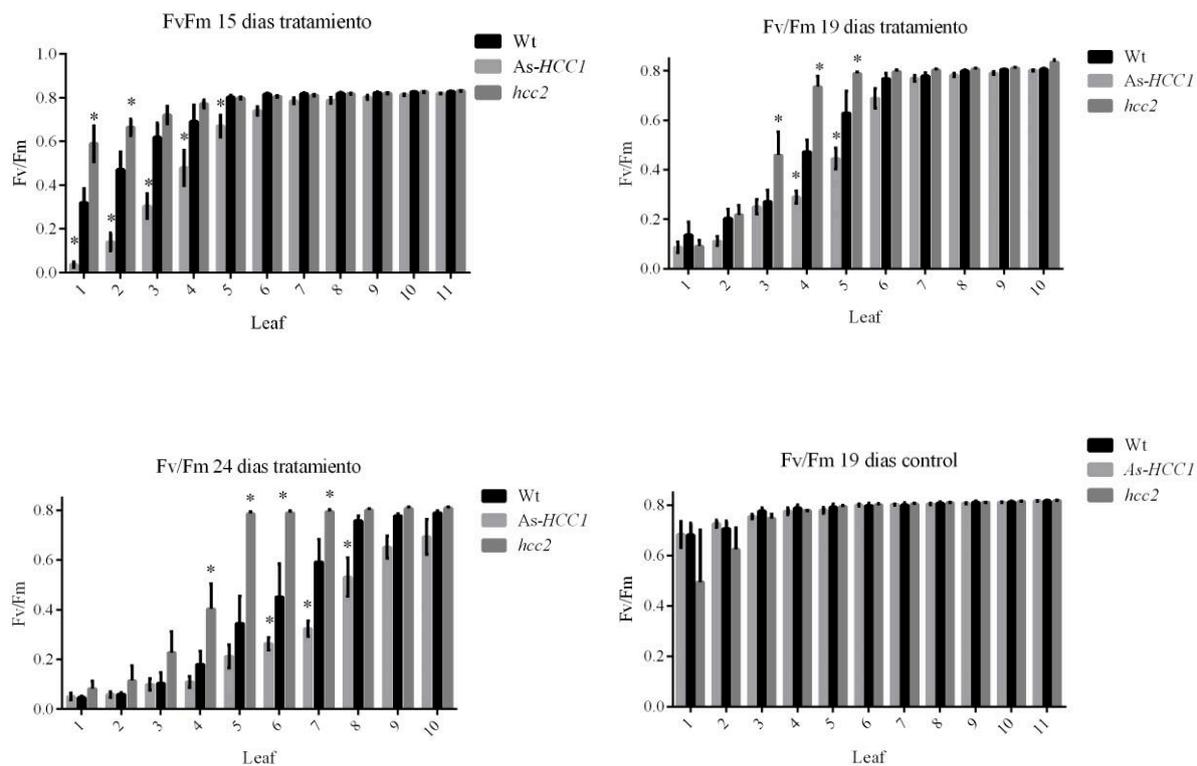


Fig. 27. Eficiencia cuántica del fotosistema II durante el tratamiento con NaCl. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$; 5 replicas biológicas independientes) con plantas salvajes (Wt).

Los resultados obtenidos indican que las plantas As-HCC1 son más sensibles al tratamiento con NaCl, mientras que las plantas *hcc2* son más tolerantes. Es conocido que durante situaciones de estrés algunos genes bajan su transcripción debido al proceso de senescencia anticipada que genera el tratamiento. Este es el caso de *CAB1* (*CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1*). Como se observa en la Fig. 28, al inicio del tratamiento tanto las plantas As-HCC1 como las *hcc2* poseen mayores niveles de transcritos de *CAB1* que las plantas salvajes. Sin embargo, luego de 17 días de tratamiento los niveles de transcritos de *CAB1* en las plantas silenciadas As-HCC1 caen abruptamente, por debajo de los observados en plantas salvajes. Por otro lado, la caída en los niveles de transcritos de *CAB1* es significativamente menor en las plantas *hcc2* (Fig. 28). Esto concuerda con los cambios observados en los niveles y la fluorescencia de la clorofila. Por otro lado, numerosos genes son inducidos en situaciones de estrés, como por ejemplo *ANAC019*, *AOX1a*, *COX17-1* y *RD29b* (Van Aken y col., 2009a, Attallah y col., 2006; Garcia y col., 2016). Al evaluar *AOX1a*, no se observaron diferencias antes de

iniciar el tratamiento. Sin embargo, a los 17 días de tratamiento se vio una inducción exacerbada en las plantas As-HCC1 en comparación con las plantas salvajes. Por otro lado, las plantas *hcc2* presentaron una menor inducción de este gen. Algo similar se observó en el caso de *ANAC019*, *COX17-1* y *RD29b* luego del tratamiento (Fig. 28).

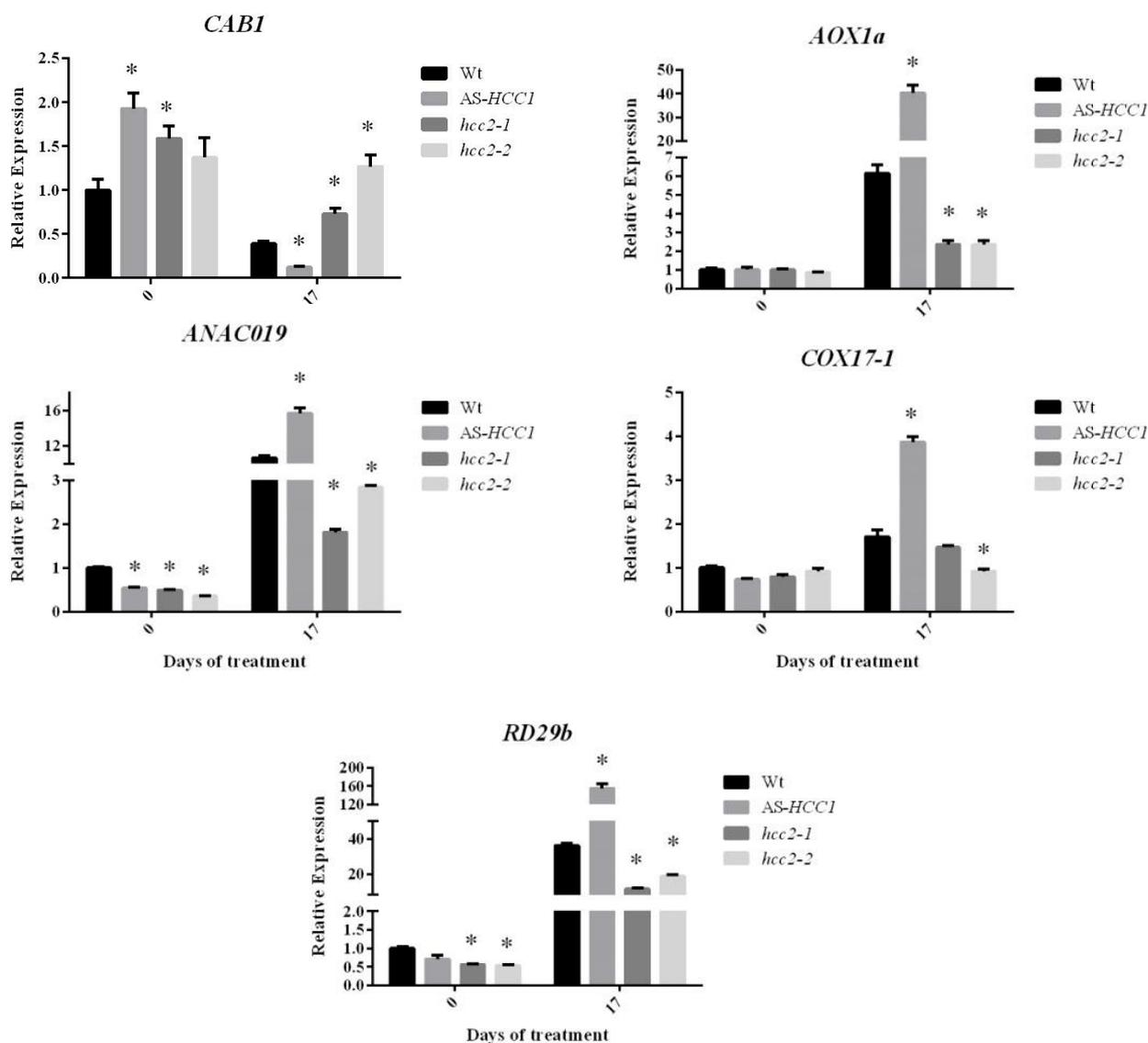


Fig. 28. Análisis de transcritos asociados a senescencia y estrés durante el tratamiento con NaCl. Se cuantificaron por RT-qPCR (ver Materiales y Métodos) los niveles de transcritos del gen asociado a la fotosíntesis *CABI* y de los genes marcadores de estrés *AOX1a*, *ANAC019*, *COX17-1* y *RD29b*. Los valores son relativos a los de plantas Wt antes del tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas con plantas Wt en la misma condición ($p < 0,05$; tres muestras biológicas independientes).

La mayor inducción de genes marcadores de estrés como *ANAC019*, *RD29b*, *AOX1a* y *COX17-1*, así como la disminución de *CABI*, sugieren que las plantas As-HCC1 perciben una situación de mayor estrés en comparación con las plantas salvajes a

los 17 días de tratamiento. Por el contrario, las plantas *hcc2* se verían menos afectadas por el tratamiento, en concordancia con los otros parámetros analizados.

Durante distintos procesos de estrés celular, la mitocondria, y en especial la cadena de transporte de electrones, cumple un papel fundamental, ya sea detoxificando productos, dirigiendo la síntesis de metabolitos hacia moléculas osmocompatibles, como la prolina, o disminuyendo el exceso de poder reductor generado (De Clercq y col., 2013; Ho y col., 2007; Clifton y col., 2006; Ng y col., 2013b; Rasmusson y col., 2009; Szabados y Savoure, 2010; Van Aken y col., 2009b; Van Aken y col., 2013; Vanlerberghe y col., 2009; Zhang y col., 2017). Cabe destacar que la inducción de *AOX1a* y de *COX17* no solo ocurre en situaciones de estrés salino u osmótico, sino que además suele observarse en condiciones de estrés mitocondrial. Más específicamente, suele darse cuando se produce un bloqueo en la cadena de transporte de electrones, como es el caso del tratamiento con Antimicina A, que bloquea el transporte a nivel del complejo III (De Clercq y col., 2013; Ng y col., 2014; Garcia y col., 2016). Entonces, es posible que la distinta respuesta observada tenga relación con diferencias en el funcionamiento mitocondrial.

Teniendo en cuenta el papel de las proteínas SCO, es posible hipotetizar que la alteración de los niveles de las proteínas HCC genera cambios en el ensamblado de COX durante el estrés. Se ha demostrado que los embriones originados de plantas *hcc1/HCC1*, en una proporción que se correlaciona con los supuestos homocigotas mutantes, detienen su desarrollo, y esto va acompañado con una marcada reducción de la actividad COX (Attallah y col., 2011). Además, luego de purificar mitocondrias de plantas *hcc1/HCC1* y realizar corridas electroforéticas en geles nativos se observó una menor actividad COX, lo que fue confirmado con ensayos polarimétricos de respiración, mientras que las mitocondrias provenientes de plantas *hcc2* no presentaron cambios en dicha actividad (Steinebrunner y col., 2014). De acuerdo a esto, nos propusimos determinar cómo se encontraban los parámetros asociados a la actividad COX durante la progresión del estrés.

7.1.4.1. Caracterización de parámetros asociados a la actividad de la citocromo c oxidasa durante el estrés por NaCl.

Para evaluar si la respuesta diferencial al estrés observada en plantas con alteraciones en la función de las proteínas HCC podía asociarse con un comportamiento

diferencial de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, decidimos realizar mediciones del consumo de oxígeno en hojas de plantas sometidas al tratamiento con NaCl. Las medidas de respiración fueron realizadas de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

Luego de 6 días de tratamiento, no se observaron diferencias en los niveles de respiración entre los genotipos en estudio (Fig. 29). Como se menciona en el punto 7.1.4, tampoco se observaron signos de estrés o disminución de los niveles de clorofila en estemomento. A los 15 días de tratamiento, se pudo observar que las hojas 4, 5 y 6 de las plantas en estudio mostraron una reducción de la respiración por la vía COX (medida como el consumo de oxígeno sensible a KCN; Fig. 29). Esta reducción en la respiración por COX se compensó con un aumento de magnitud similar de la respiración alternativa (medida como la respiración sensible a SHAM en presencia de KCN). La reducción en la respiración a través de la vía COX fue significativamente mayor en las plantas As-HCC1, llegando a valores mayores al 90% de la respiración total (Fig. 29). Sin embargo, no se observaron diferencias entre las plantas salvajes y *hcc2*. Algo similar se observó a los 19 días de tratamiento (Fig. 29). Luego de 24 días, las plantas *hcc2* aún mantenían niveles de respiración por la vía COX de alrededor de un 30%, mientras que las plantas salvajes presentaban una reducción drástica del consumo de oxígeno por esta vía, similar al observado en las plantas As-HCC1 a los 15 días de tratamiento (Fig. 29). En todos los casos, las diferencias en la respiración dependiente de COX fueron compensadas por diferencias en la respiración alternativa (Fig. 29).

Se ha reportado que en condiciones de estrés celular hay una fuerte inducción de la vía alternativa y una reducción de la vía COX. Esto se debería a que, bajo condiciones no favorables, se produce una inhibición de la vía COX y es necesario continuar con el transporte de electrones mitocondrial para soportar la producción de esqueletos carbonados, consumir el exceso de poder reductor generado en el cloroplasto y reducir la producción de ROS (Dinakar y col., 2016; Vishwakarma y col., 2015).

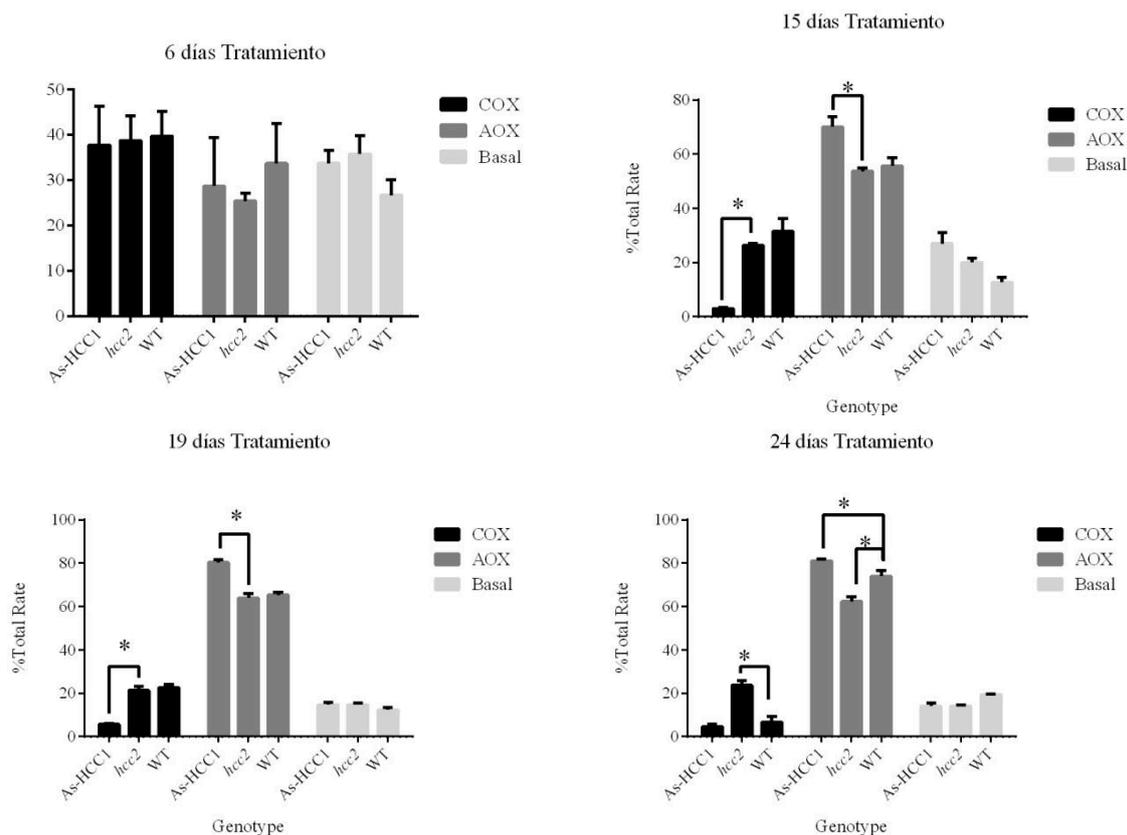


Fig. 29. Evolución de la tasa de respiración durante el estrés por NaCl. Se midió el consumo de oxígeno en las hojas 4, 5 y 6 en los tiempos indicados, antes y después del agregado de 1 mM KCN. La respiración por la vía COX se estimó como el consumo de oxígeno sensible a KCN. La respiración alternativa se midió como la respiración sensible a 10 mM SHAM en presencia de KCN. La respiración por cada vía está expresada como porcentaje de la respiración total. Los asteriscos indican diferencias significativas con plantas Wt ($p < 0,05$).

Los resultados de respiración indican que, ante una deficiencia de HCC1, se produce un descenso más marcado de la respiración dependiente de COX como consecuencia del estrés por NaCl. En función del rol de HCC1, esto sugiere que la función de esta proteína sería necesaria para sostener el ensamblado de COX en estas condiciones. A su vez, la deficiencia en el ensamblado de COX podría explicar, al menos en parte, la menor tolerancia a estrés mostrada por las plantas As-HCC1. Por el contrario, en las plantas *hcc2* la caída en la respiración dependiente de COX fue menor que en las plantas salvajes. Esto se correlaciona con la mayor tolerancia a estrés de estas plantas y podría indicar que HCC2 tiene un rol negativo en el mantenimiento de la actividad COX. También es posible que el perfil transcripcional generado por la falta de HCC2 conlleve ventajas a la hora de responder al estrés por NaCl, pudiendo mantener el ensamblado de COX de forma más eficiente.

7.1.5. Caracterización de la respuesta transcripcional al NaCl.

Las plantas As-HCC1 presentan una mayor sensibilidad al tratamiento con NaCl. Sumado a esto, se observó una disminución de la respiración dependiente de COX, la cual parece tener relación con el rápido avance de la senescencia que experimentan estas plantas en comparación con las plantas salvajes. Las plantas *hcc2* se comportan de forma opuesta, presentando signos de estrés más tardíos y mayor respiración por la vía asociada a COX durante todo el periodo de estrés. El estrés por NaCl activa numerosos genes de respuesta que codifican, entre otras proteínas, factores de transcripción, chaperonas, canales de agua y osmotinas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Nakashima y col., 2009). Dentro del grupo de los factores de transcripción inducidos por estrés, se encuentran miembros de la familia NAC, como NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN19 (ANAC019), ANAC055, y ANAC072/RESPONSIVE TO DESICCATION26 o RD26 (Fujita y col., 2004; Tran y col., 2004). Otros genes cuya expresión es inducida en respuesta a estrés son *RD29A* y *B*, *AOX1a*, *NDB2*, *BCS1/OM66* y *COX17* (Elhafez y col., 2006; Rayirath y col., 2009; Garcia y col., 2016).

En plantas deficientes en la chaperona de cobre COX17 se observó que la inducción de genes de respuesta a estrés está disminuida (Garcia y col., 2016). Dadas las similitudes observadas entre los transcriptomas de plantas *amiCOX17* y As-HCC1, se decidió evaluar la respuesta transcripcional al NaCl en estas últimas. Para ello, se crecieron plántulas durante 7 días y se realizaron tratamientos con NaCl 250 mM durante distintos tiempos (90 ó 180 minutos) según se describe en Materiales y Métodos. Luego de esto, se hicieron extracciones de ARN y se realizaron ensayos de RT-qPCR (ver Materiales y Métodos) para cuantificar los niveles de transcritos de interés (*RD29b*, *ANAC019*, *CAT3* (*CATALASE 3*), *AOX1a*, *NDB2*, *BCS1/OM66*, *COX17-1*, *HCC1* y *HCC2*; ver ANEXO II).

Como se observa en la Figura 30, la inducción de *RD29b*, *ANAC019* y *BCS1* por tratamiento con NaCl fue significativamente menor, tanto a los 90 como a los 180 minutos, en las plantas As-HCC1. Por otro lado, *NDB2* presentó niveles más bajos de transcripto, tanto a tiempo inicial como a los 90 minutos de tratamiento. Sin embargo, se alcanzaron los valores del control luego de 3 h de tratamiento. En el caso de *COX17-1*, se observaron niveles menores de transcripto en todos los tiempos ensayados (Fig. 30).

Las plantas *hcc2* presentaron mayor expresión de *ANAC019*, *AOX1a*, *BCS1* y *COX17-1* al inicio del tratamiento (Fig. 30). Notoriamente, estas plantas también mostraron mayores niveles de transcripto de *HCC1*. La expresión de estos genes también fue mayor en las plantas *hcc2* que en las plantas salvajes luego de 180 min de tratamiento, lo que también resultó evidente para *NDB2* (Fig. 30).

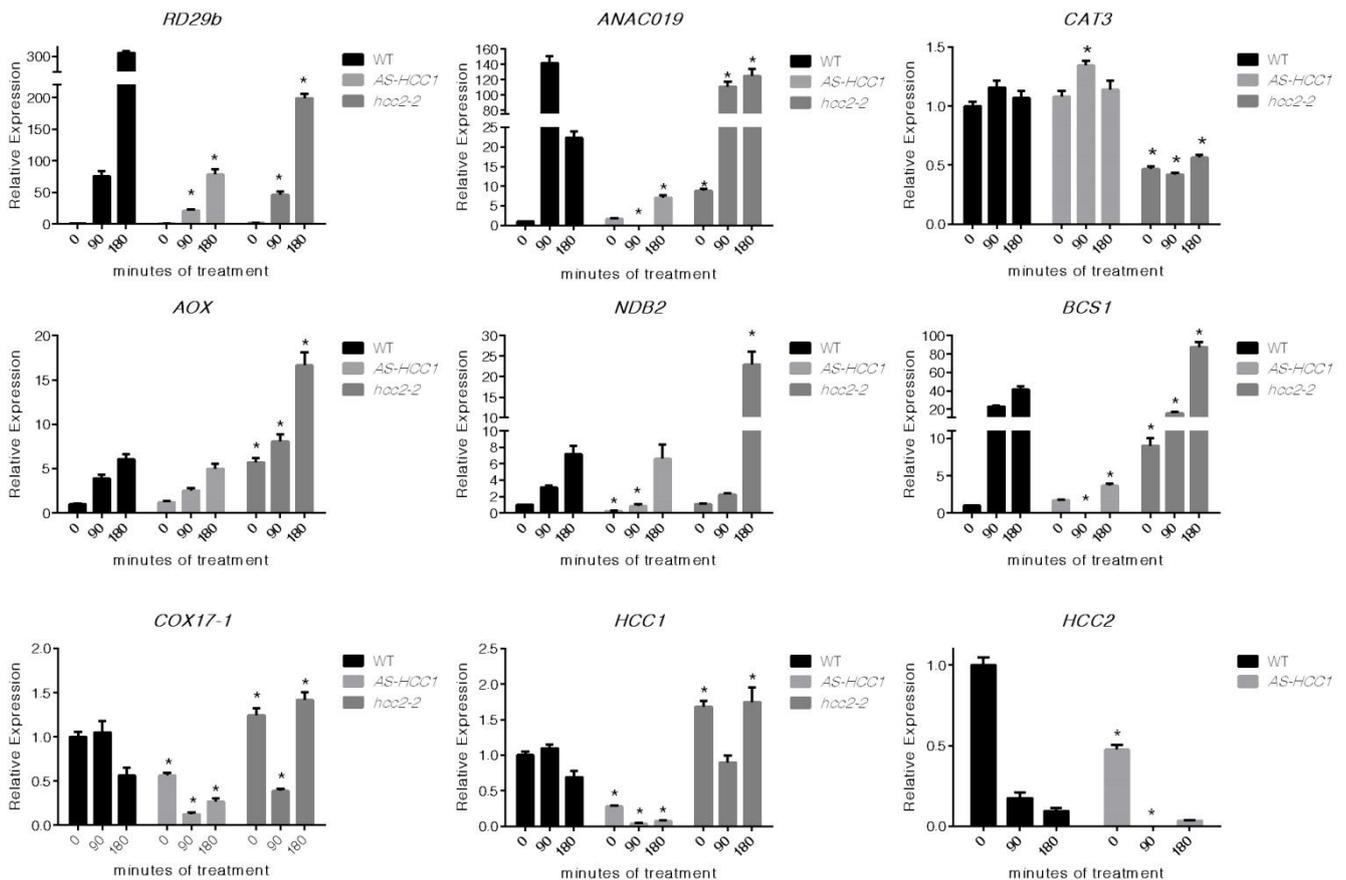


Fig. 30. Análisis de la respuesta transcripcional luego del tratamiento con NaCl. Se cuantificaron por RT-qPCR los niveles de transcripto de genes de respuesta a estrés (*RD29b*, *ANAC019*, *CAT3*, *AOX1a*, *NDB2*, *BCS1* y *COX17-1*) y de los genes en estudio (*HCC1* y *HCC2*). Los valores se expresan en forma relativa a los niveles de plantas Wt antes del tratamiento. Los asteriscos indican diferencias significativas con plantas Wt en la misma condición (p < 0,05; tres muestras biológicas independientes).

Por último, al cuantificar los niveles de transcripto de *HCC2* en plantas salvajes se observó una reducción significativa luego del tratamiento, alcanzando valores cercanos al 10% de los iniciales luego de 3 h de tratamiento. En plantas As-HCC1 se observó una respuesta similar pero con niveles menores en todas las condiciones ensayadas (Fig. 30).

Analizados en forma general, los resultados indican que las plantas As-HCC1 son incapaces de inducir en forma adecuada varios genes de respuesta a estrés. Esto podría estar relacionado con la mayor sensibilidad de estas plantas a un tratamiento prolongado con NaCl. Es posible que la respuesta de menor nivel que presentan estas plantas sea desfavorable al momento de inducir los mecanismos necesarios para desarrollar una mejor tolerancia frente al estrés. Es conocido que la sobreexpresión de genes de la familia de *RD26* (*ANAC019*, *ANAC055* y *ANAC102*) genera fenotipos de tolerancia a estrés por sequía. Además de esto, cuando se bloquea la inducción de éstos frente a deficiencia de agua, las plantas son más sensibles (Ye y col., 2017). En el caso de *NDB2*, se sabe que participa en una vía alternativa de ingreso de electrones de la cadena respiratoria y resulta necesaria en situaciones de estrés. Además, la baja inducción de *BCSI* podría afectar la tolerancia, ya que se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen induce tolerancia al estrés por sequía (Zhang y col., 2014).

Por otro lado, la mutante *hcc2* presenta una inducción similar que las plantas salvajes para el caso de *RD29b*, pero una inducción significativamente mayor de *ANAC019*. Dado que ambos factores participan en la respuesta a estrés y su sobreexpresión genera fenotipos de tolerancia, podría ser este uno de los motivos de la mayor tolerancia encontrada en este genotipo. Por su parte, los bajos niveles de expresión de *CAT3* podrían ser explicados por los bajos niveles de ROS que poseen las plantas *hcc2* (Attallah y col., 2011). A su vez, esto podría deberse a los altos niveles de expresión de otros genes, como *AOX1a*, *BCSI* y *NDB2*, los cuales reducen la generación de ROS por la cadena de transporte mitocondrial (Smith y col., 2011; Zhang y col., 2014). Además, se ha reportado que las mutantes en *AOX1a* son sensibles a distintos tipos de estreses (Giraud y col., 2008). Sumado a esto, la sobreexpresión de *BCSI*, cuya expresión está aumentada en las plantas *hcc2*, genera tolerancia al estrés por sequía. Se puede concluir que la mayor inducción de varios factores relacionados con la respuesta a estrés en las plantas mutantes en *HCC2* podría ser responsable de la tolerancia de estas plantas al NaCl.

Finalmente, es notorio el comportamiento de *HCC2* a nivel transcripcional, ya que su expresión se reduce de manera drástica ante un tratamiento con NaCl. Esto concuerda con el hecho de que la ausencia de *HCC2* genera una mejor respuesta frente al

NaCl, sugiriendo que esta proteína actuaría de forma negativa sobre dicha respuesta. Por otra parte, *HCC1* parece tener un comportamiento opuesto al de *HCC2*.

Se ha observado, en geles nativos seguidos de espectrometría de masa, que en *Paracoccus denitrificans* la proteína ScoB migra preferentemente con un complejo de 66 kDa, que podría estar compuesto por un dímero de ScoB (monómero de 23 kDa) y una subunidad COX2 (28 kDa) (Fig. 31A; Schimo y col., 2017). Esto indicaría que, al menos en el contexto del ensamblado de COX, ScoB interactúa consigo misma (Schimo y col., 2017). Sumado a esto, cuando se realizan experimentos de geles 2D (azul nativo seguido de SDS-PAGE) de extractos mitocondriales de *Arabidopsis* se observa, de acuerdo a la aplicación web “GelMap” (Senkler y Braun, 2012), que HCC1 migra en la primera dimensión con una masa aparente de 93 kDa y en la segunda dimensión con una de 36 kDa (monómero). Esto podría indicar la existencia de un dímero de HCC1 unido a una subunidad COX2 (28 kDa) también en *Arabidopsis*. En un estudio más reciente, desarrollado utilizando espectrometría de masa de diferentes porciones de geles nativos (Senkler y col., 2017), se observó que HCC1 y HCC2 tiene patrones de migración prácticamente idénticos, formando complejos de 90-100 kDa, siendo las masas de los monómeros de 36 y 30 kDa, respectivamente (Fig. 31B). Esto sugiere que HCC1 y HCC2 podrían formar complejos entre sí. Por tal motivo, decidimos analizar si ambas proteínas eran capaces de interactuar *in planta*.

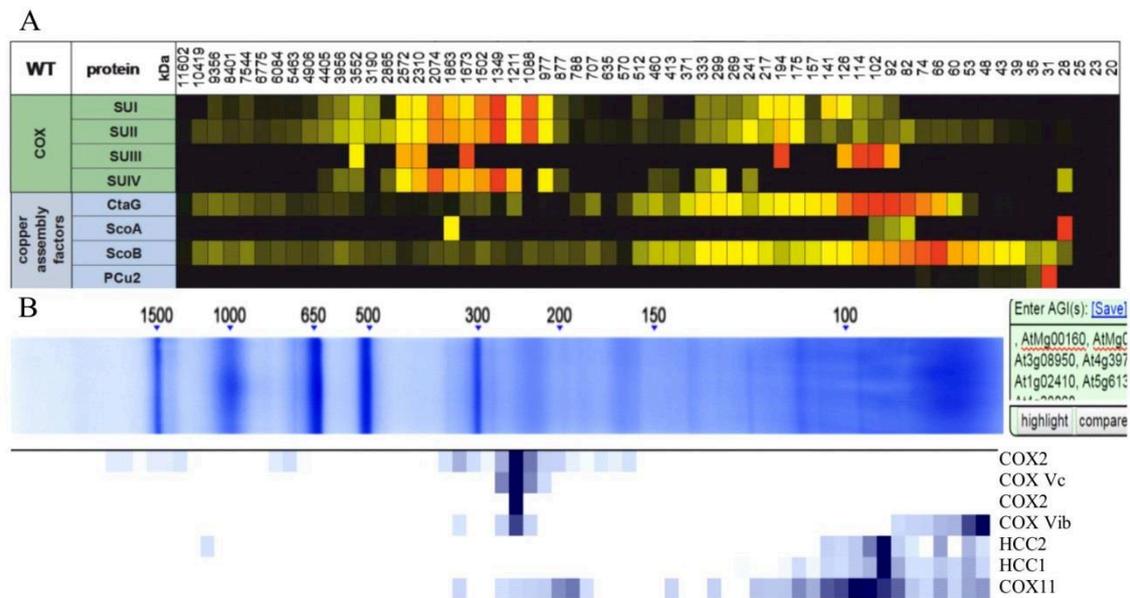


Fig. 31. Esquema de los patrones de migración de proteínas Sco de *P. denitrificans* y *Arabidopsis thaliana*. A) Imagen modificada de Schimo y col. (2017). Se muestra la migración en geles nativos de las subunidades de COX (SUI a IV), así como de las proteínas encargadas de la inserción del cobre: CtaG (COX11), ScoA y B y metalochaperona de cobre PCu2. B) Imagen adaptada de “complexomemap.de” donde se seleccionó la migración de las subunidades COX2,

COX Vc y COX VIb, así como las proteínas HCC1, COX11 (encargadas de la inserción del cobre) y HCC2.

7.1.6. Evaluación de la interacción in planta entre HCC1 y HCC2 mediante Complementación Biomolecular de la Fluorescencia.

Para analizar si HCC1 y HCC2 son capaces de interactuar en el contexto de mitocondrias de plantas, se decidió utilizar la técnica de Complementación Biomolecular de la Fluorescencia o BiFC por sus siglas en inglés. Esta técnica consiste en realizar fusiones traduccionales de las proteínas en estudio a las mitades N-terminal y C-terminal de una proteína fluorescente (las cuales no fluorescen por si mismas). En caso de que las proteínas en estudio sean capaces de interactuar, se restaura la fluorescencia (para una revisión actualizada, ver Kudla y Bock, 2016). En nuestro caso, se utilizaron fusiones en el extremo C-terminal de las proteínas HCC. Esto fue así ya que una fusión en el extremo N-terminal podría interferir con la importación a mitocondrias y/o ser clivada en la matriz mitocondrial. Además, el dominio C-terminal de las proteínas Sco es el encargado de unir cobre e interactuar con COX2. Como proteína fluorescente se usó la Citrina y la expresión se hizo bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S* (ver Materiales y Métodos). Para expresar las proteínas se realizaron agroinfiltraciones de hojas de *Nicotiana benthamiana*. La toma de imágenes se realizó mediante microscopía confocal y se procesaron las imágenes utilizando el programa ImageJ (ver Materiales y Métodos).

7.1.6.1. Interacción de las proteínas completas

En una primera etapa, se decidió evaluar las versiones completas de ambas proteínas HCC. Luego de infiltrar hojas de *N. benthamiana* con construcciones que expresan la región codificante de HCC1 fusionada a ambas mitades de la citrina se pudo observar restauración de la fluorescencia en estructuras con forma de puntos, probablemente mitocondrias, lo que coincide con la localización de esta proteína (Fig. 32). Además de esto, cuando se expresó la proteína HCC1 con la proteína D-LACTATO DESHIROGENASA (LDH), la cual fue seleccionada como control negativo ya que posee una localización similar a HCC1, no se observó fluorescencia en ninguna de las combinaciones. Cuando el ensayo fue realizado con la proteína HCC2 se observó un resultado similar al de HCC1 (Fig. 32). Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que ambas proteínas son capaces de formar homodímeros u homoligómeros. En forma interesante, cuando se co-expresaron HCC1 y HCC2 fusionadas a distintas mitades de la Citrina también se observó restauración de la fluorescencia (Fig. 32). La

cuantificación de la intensidad de fluorescencia (ver Materiales y Métodos) indicó la existencia de valores similares para todas las interacciones registradas (Fig. 33). Esto sugiere que las proteínas HCC1 y HCC2 son capaces de interactuar en mitocondrias de plantas.

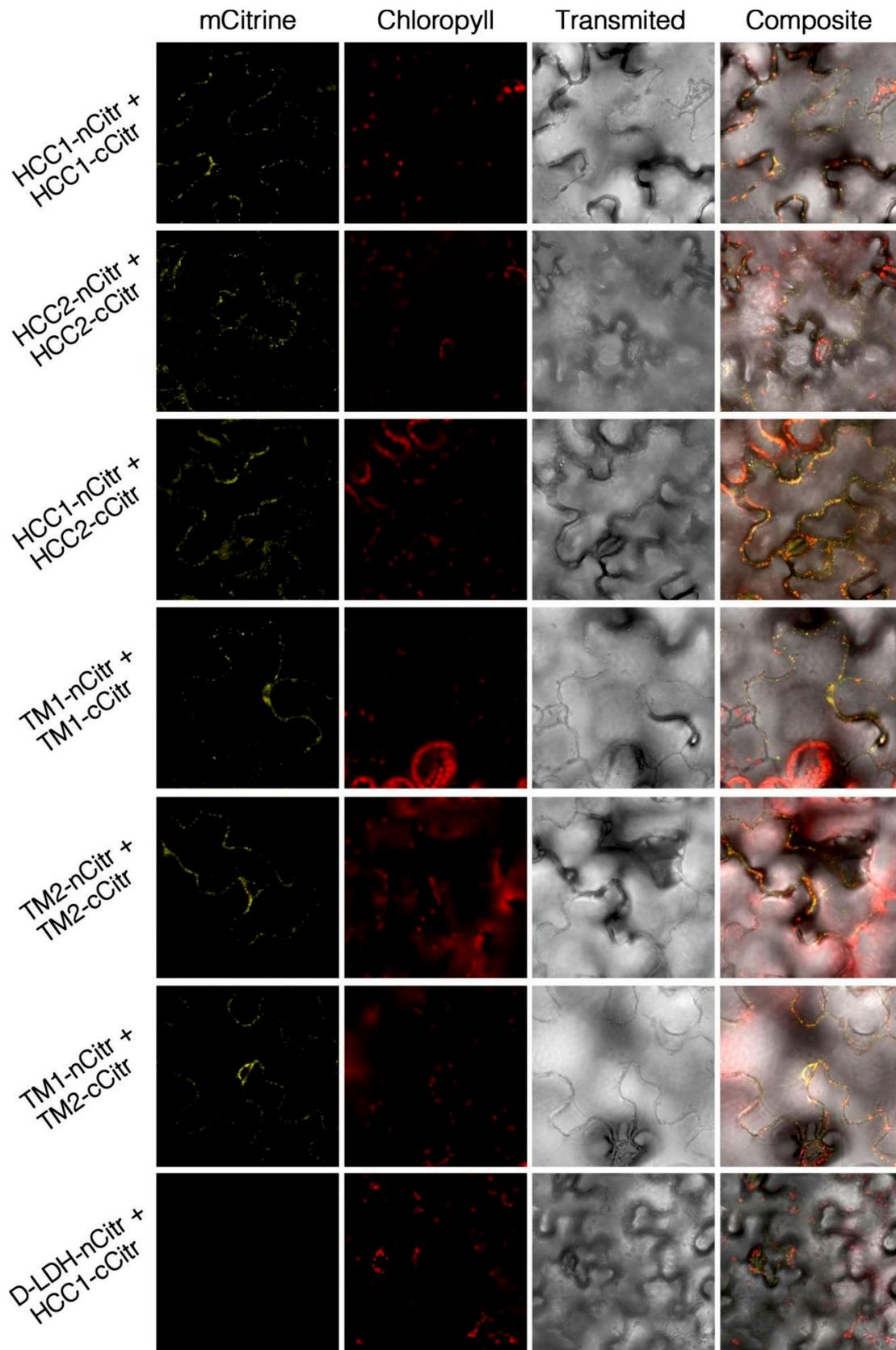


Fig. 32. Imágenes de BiFC en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con construcciones que expresan fusiones de las proteínas indicadas a las regiones N- o C-terminal de la Citrina. Todas las imágenes fueron tomadas excitando a 514 nm. Los detectores fueron establecidos en 524-560 nm (para Citrina) y 640-670 nm (para clorofila).

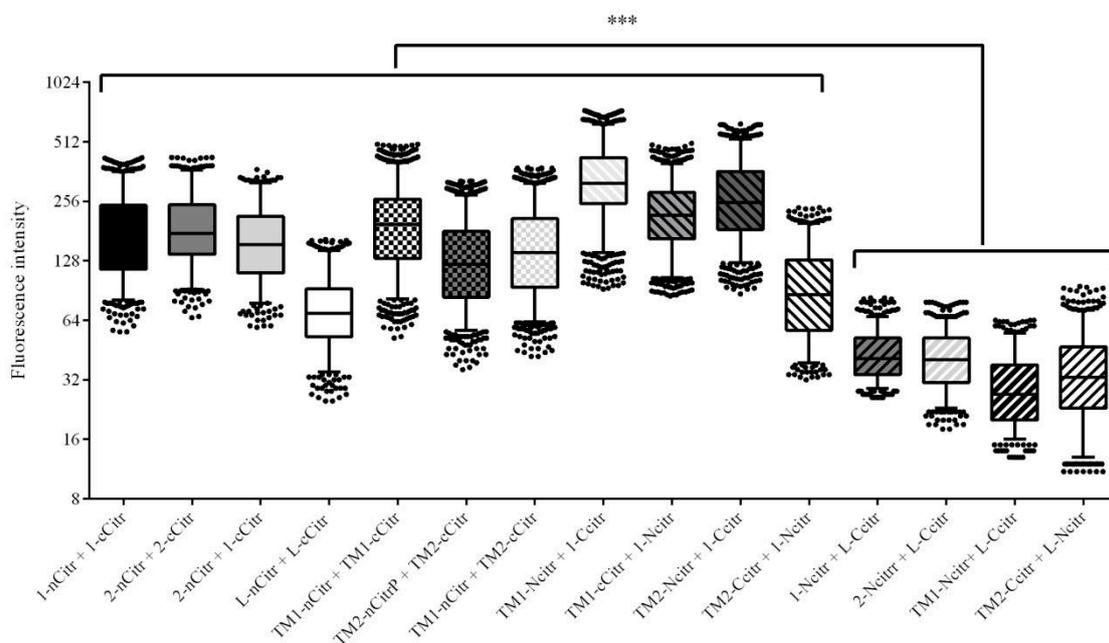


Fig. 33. Cuantificación de la fluorescencia del ensayo del BiFC mostrado en la figura anterior. Se graficó la distribución de intensidades de fluorescencia de las distintas interacciones, cuantificando las 50 mitocondrias más intensas en 10 imágenes para cada interacción. Los 3 asteriscos marcan una diferencia significativa $p < 10^{-4}$.

7.1.6.2 Interacción de las porciones N-terminal de las proteínas HCC.

Luego del resultado observado con las proteínas completas, nos planteamos el interrogante de si la porción globular ubicada en el espacio intermembrana es necesaria para la interacción. Para analizar esto, se clonaron las regiones N-terminales, incluyendo los dominios transmembranas (N+TM) predichos para ambas proteínas utilizando la herramienta ARAMEMNON (Schwacke y col., 2003). Esto incluyó los primeros 141 aminoácidos en el caso de HCC1 y los primeros 85 aminoácidos en el caso de HCC2. Todas las construcciones se realizaron en los mismos vectores utilizados en el punto anterior (ver Materiales y Métodos).

Se pudo observar que la región N+TM de HCC1, fusionada a cada uno de los dominios de la citrina, es capaz de restaurar la fluorescencia (Fig. 32). Lo mismo se observó para HCC2 y para la interacción entre HCC1 y HCC2 (Fig. 32). Además de esto,

ambas regiones N+TM fueron capaces de interactuar con la proteína HCC1 completa. Ninguna de las regiones N+TM analizadas fue capaz de interactuar con la LDH, usada como control negativo (Fig. 33).

Los resultados sugieren que ambas proteínas HCC podrían interactuar *in vivo*. Posiblemente, los complejos de alrededor de 93 kDa observados en geles nativos podrían estar formados por dos proteínas HCC (ya sea HCC1, HCC2 o ambas) más una subunidad COX2. Sin embargo, no se tienen evidencias de una interacción directa y estable entre las proteínas HCC y COX2 en plantas. Otra alternativa es que las proteínas HCC formen trímeros de distinta composición.

7.2. CONCLUSIONES

7.2.2. Plantas con niveles alterados de las proteínas HCC presentan cambios transcripcionales asociados a la respuesta a estrés.

El análisis transcripcional de las plantas silenciadas en *HCC1* y mutantes nulas de *hcc2* arrojó un enriquecimiento en genes asociados con la respuesta a estrés en ambos genotipos. Además, se observó que un número significativo de estos genes se regulaban en ambas plantas en forma opuesta. Al comparar los datos obtenidos en este trabajo con datos previos de plantas con bajos niveles de la chaperona de cobre COX17, se observó una elevada correlación con los genes regulados de la misma manera en las plantas As-HCC1 y en forma opuesta en las plantas *hcc2*. Dado que se ha reportado que la sobreexpresión de COX17 genera tolerancia al estrés por NaCl, se decidió evaluar el comportamiento de las plantas deficientes en *HCC1* y *HCC2* frente a este tipo de estrés.

7.2.3. La alteración de los niveles de las proteínas HCC afecta la tolerancia al estrés por NaCl.

Se observó que las plantas As-HCC1 presentan una menor tolerancia al estrés por NaCl. Esto se vio reflejado en una más rápida disminución de los niveles de clorofila y de la eficiencia cuántica del fotosistema II con respecto a plantas salvajes. Las plantas mutantes en *HCC2* presentaron un comportamiento opuesto al de las plantas As-HCC1, mostrando mayor tolerancia. Al analizar la expresión de genes asociados a la senescencia y al estrés, se corroboró que las plantas As-HCC1 mostraban una senescencia avanzada y mayores niveles de genes de respuesta a estrés en comparación con las plantas salvajes, mientras que las plantas *hcc2* presentaban un comportamiento opuesto.

En concordancia con los resultados mencionados, al realizar medidas de respiración en hojas durante el tratamiento se observó una disminución en la respiración dependiente de COX y un aumento de la vía alternativa o dependiente de AOX. Estos cambios fueron más pronunciados en las plantas As-HCC1. Con el progreso del tratamiento, las plantas salvajes presentaron cambios similares, pero éstos fueron observados varios días después. En cambio, las plantas mutantes en *HCC2* mantuvieron valores de respiración dependiente de COX significativamente mayores hasta etapas avanzadas del tratamiento. Estos cambios en la respiración podrían ser uno de los factores que determinan el avance diferencial de la senescencia asociada al estrés por NaCl en las plantas en estudio.

7.2.4. La percepción del estrés por NaCl se ve modificada en plantas *As-HCC1* y *hcc2*.

Las plantas con niveles alterados de las proteínas HCC presentaron una respuesta transcripcional diferencial luego de tratamientos relativamente breves con NaCl. Las plantas *As-HCC1* presentaron una inducción menor de genes asociados a la respuesta a estrés por NaCl o a una disfunción mitocondrial. En cambio, las plantas *hcc2* presentaron una respuesta exacerbada en comparación con las plantas salvajes, teniendo incluso genes inducidos antes del tratamiento. Estas observaciones pueden correlacionarse con lo visto a nivel fenotípico, ya que la ausencia de inducción de genes claves en la respuesta a estrés puede conllevar efectos a largo plazo, como la tolerancia disminuida de las plantas *As-HCC1*. En cambio, lo observado en las plantas *hcc2* podría indicar que las mismas estarían preparadas para afrontar el estrés de una mejor manera que las plantas salvajes.

7.2.5. Las proteínas tipo *Sco* de *Arabidopsis* son capaces de interactuar en mitocondrias de plantas.

La información disponible en bases de datos nos permitió observar que las proteínas HCC de *Arabidopsis* migran en geles nativos con un tamaño que es alrededor de 3 veces el de los monómeros. Esto hace suponer que podrían estar formando complejos entre ellas o con otras proteínas. De acuerdo a los ensayos de BiFC, se pudo observar que ambas proteínas son capaces de interactuar consigo mismas y con la otra proteína HCC.

En base a los resultados obtenidos, postulamos que HCC2 podría modular la acción de HCC1 mediante la interacción descrita. Esta modulación podría deberse a diferentes causas. Por ejemplo, al interactuar, HCC2 secuestraría a HCC1 de los complejos de ensamblado de COX. Otra posibilidad es que se produzca un intermediario en el cual HCC1 tenga oculto su sitio de unión a cobre. Una tercera posibilidad es que la interacción induzca cambios conformacionales en HCC1 que le impidan interactuar de forma correcta con COX2. En condiciones normales, donde los niveles de expresión de ambas proteínas son similares (según *Arabidopsis* eFP Browser, <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), HCC2 regularía los niveles de HCC1 capaces de participar en el ensamblado de COX, dejando libre suficiente proteína como para producir un ensamblado basal (Fig. 34). En cambio, frente a una situación de estrés,

los niveles de HCC2 caerían notablemente debido a una represión en la transcripción del gen correspondiente, lo que se traduciría en un aumento de HCC1 libre. Esto serviría para mantener el ensamblado de COX y, en consecuencia, la respiración dependiente de este complejo en condiciones de estrés (Fig. 34). De acuerdo a esto, la mayor o menor tolerancia a estrés observada en las plantas deficientes en *HCC2* o *HCC1*, respectivamente, estaría relacionada con la capacidad de mantener la respiración dependiente de COX, involucrada en la síntesis de ATP. Sin embargo, el análisis de los cambios transcripcionales que ocurren en condiciones basales o luego de tiempos breves de tratamiento con NaCl sugiere que las proteínas HCC también modulan la expresión de genes de respuesta a estrés. En el caso de la metalochaperona COX17, encargada de ceder el cobre a HCC1 para el ensamblado de COX, se postuló su accionar en la señalización de la respuesta a estrés. Dadas las similitudes en los cambios observados en plantas deficientes en *COX17* y en *HCC1*, se puede postular un rol similar para HCC1 o para toda la vía de ensamblado de cobre en COX. Resta determinar si esa señalización depende de la actividad de alguna de las proteínas de esta vía en forma directa o si también está relacionada con el ensamblado de COX. Para HCC2, el modelo postulado en el que actúa como un modulador negativo de la actividad de HCC1 también es aplicable al supuesto rol de HCC1 en la modulación de la respuesta transcripcional a estrés. De acuerdo a esto, las plantas habrían integrado componentes ya existentes, relacionados con el ensamblado de COX, a las vías de señalización relacionadas con la respuesta a estrés.

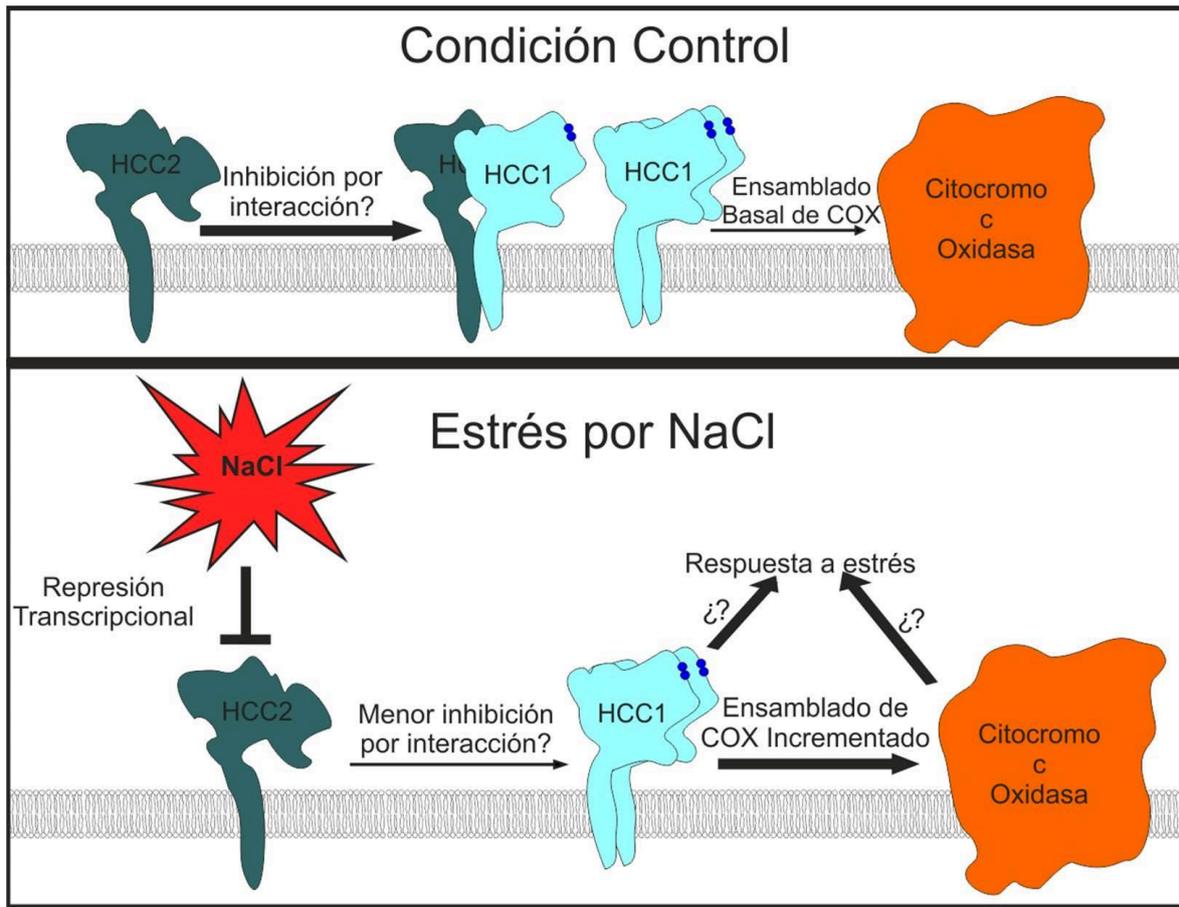


Fig. 34. Modelo de acción postulado para las proteínas HCC. En una condición normal de crecimiento, la interacción entre ambas proteínas regularía un nivel de ensamblado óptimo acorde con las necesidades energéticas de la planta. En una situación de estrés, el nivel transcripcional de *HCC2* desciende, posibilitando la existencia de una mayor cantidad de HCC1 libre para el ensamblado de COX. Esto permitiría mantener el ensamblado de COX bajo condiciones de estrés, contribuyendo a una mejor tolerancia bajo estas condiciones adversas. A su vez, los niveles de HCC1 o de COX influirían positivamente sobre la respuesta transcripcional a estrés.

8. ANEXOS.

8.1 ANEXO I.

8.1.1. Tabla de términos GO enriquecidos en plantas As-HCCL.

Identificador GO	Término	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	p-value
0050896	response to stimulus	229 de 914 genes, 25,1%	3689 de 24961 genes, 14,8%	1,44x 10 ⁻¹²
0009607	response to biotic stimulus	66 de 914 genes, 7,2%	610 de 24961 genes, 2,4%	5,29x 10 ⁻¹¹
0051707	response to other organism	61 de 914 genes, 6,7%	558 de 24961 genes, 2,2%	2,11x 10 ⁻¹⁰
0051704	multi-organism process	61 de 914 genes, 6,7%	589 de 24961 genes, 2,4%	1,28x 10 ⁻⁰⁹
0006952	defense response	69 de 914 genes, 7,5%	747 de 24961 genes, 3%	4,76x 10 ⁻⁰⁹
0006950	response to stress	139 de 914 genes, 15,2%	2104 de 24961 genes, 8,4%	6,62x 10 ⁻⁰⁹
0019748	secondary metabolic process	42 de 914 genes, 4,6%	364 de 24961 genes, 1,5%	8,98x 10 ⁻⁰⁸
0009617	response to bacterium	32 de 914 genes, 3,5%	256 de 24961 genes, 1%	1,61x 10 ⁻⁰⁶
0009404	toxin metabolic process	13 de 914 genes, 1,4%	46 de 24961 genes, 0,2%	1,2x 10 ⁻⁰⁵
0009407	toxin catabolic process	13 de 914 genes, 1,4%	46 de 24961 genes, 0,2%	1,2x 10 ⁻⁰⁵
0045087	innate immune response	30 de 914 genes, 3,3%	256 de 24961 genes, 1%	1,21x 10 ⁻⁰⁵
0006955	immune response	30 de 914 genes, 3,3%	260 de 24961 genes, 1%	1,5x 10 ⁻⁰⁵
0002376	immune system process	32 de 914 genes, 3,5%	292 de 24961 genes, 1,2%	1,57x 10 ⁻⁰⁵
0012501	programmed cell death	25 de 914 genes, 2,7%	197 de 24961 genes, 0,8%	2,78x 10 ⁻⁰⁵
0042742	defense response to bacterium	25 de 914 genes, 2,7%	201 de 24961 genes, 0,8%	3,64x 10 ⁻⁰⁵
0008219	cell death	27 de 914 genes, 3%	234 de 24961 genes, 0,9%	4,35x 10 ⁻⁰⁵
0016265	death	27 de 914 genes, 3%	234 de 24961 genes, 0,9%	4,35x 10 ⁻⁰⁵
0009698	phenylpropanoid metabolic process	19 de 914 genes, 2,1%	152 de 24961 genes, 0,6%	0,00065
0010033	response to organic substance	71 de 914 genes, 7,8%	1148 de 24961 genes, 4,6%	0,00152
0006915	apoptosis	17 de 914 genes, 1,9%	142 de 24961 genes, 0,6%	0,00275
0042221	response to chemical stimulus	103 de 914 genes, 11,3%	1892 de 24961 genes, 7,6%	0,00332
0050832	defense response to fungus	16 de 914 genes, 1,8%	131 de 24961 genes, 0,5%	0,00332
0009699	phenylpropanoid biosynthetic process	15 de 914 genes, 1,6%	121 de 24961 genes, 0,5%	0,00457

0009620	response to fungus	18 de 914 genes, 2%	167 de 24961 genes, 0,7%	0,00479
0009628	response to abiotic stimulus	78 de 914 genes, 8,5%	1360 de 24961 genes, 5,4%	0,00497
0019438	aromatic compound biosynthetic process	21 de 914 genes, 2,3%	218 de 24961 genes, 0,9%	0,00532
0009814	defense response, incompatible interaction	13 de 914 genes, 1,4%	99 de 24961 genes, 0,4%	0,00669

8.1.2. Tabla de términos GO enriquecidos en plantas *hcc2*.

Identificador GO	Término	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	p-value
0050896	response to stimulus	182 de 648 genes, 28,1%	3689 de 24961 genes, 14,8%	8,36x 10 ⁻¹⁵
0006950	response to stress	113 de 648 genes, 17,4%	2104 de 24961 genes, 8,4%	2,18x 10 ⁻¹⁰
0042221	response to chemical stimulus	102 de 648 genes, 15,7%	1892 de 24961 genes, 7,6%	2,04x 10 ⁻⁰⁹
0050832	defense response to fungus	23 de 648 genes, 3,5%	131 de 24961 genes, 0,5%	2,08x 10 ⁻⁰⁹
0009620	response to fungus	24 de 648 genes, 3,7%	167 de 24961 genes, 0,7%	2,43x 10 ⁻⁰⁸
0010033	response to organic substance	68 de 648 genes, 10,5%	1148 de 24961 genes, 4,6%	1,44x 10 ⁻⁰⁷
0051707	response to other organism	43 de 648 genes, 6,6%	558 de 24961 genes, 2,2%	1,72x 10 ⁻⁰⁷
0009607	response to biotic stimulus	44 de 648 genes, 6,8%	610 de 24961 genes, 2,4%	6,02x 10 ⁻⁰⁷
0051704	multi-organism process	43 de 648 genes, 6,6%	589 de 24961 genes, 2,4%	6,02x 10 ⁻⁰⁷
0009628	response to abiotic stimulus	72 de 648 genes, 11,1%	1360 de 24961 genes, 5,4%	2,32x 10 ⁻⁰⁶
0006952	defense response	46 de 648 genes, 7,1%	747 de 24961 genes, 3%	1,73x 10 ⁻⁰⁵
0010200	response to chitin	16 de 648 genes, 2,5%	127 de 24961 genes, 0,5%	6,28x 10 ⁻⁰⁵
0009743	response to carbohydrate stimulus	20 de 648 genes, 3,1%	203 de 24961 genes, 0,8%	9,02x 10 ⁻⁰⁵
0009409	response to cold	23 de 648 genes, 3,5%	269 de 24961 genes, 1,1%	0,00013
0007165	signal transduction	52 de 648 genes, 8%	985 de 24961 genes, 3,9%	0,000168
0009719	response to endogenous stimulus	49 de 648 genes, 7,6%	920 de 24961 genes, 3,7%	0,000233
0071702	organic substance transport	22 de 648 genes, 3,4%	261 de 24961 genes, 1%	0,000233
0006810	transport	77 de 648 genes, 11,9%	1732 de 24961 genes, 6,9%	0,000292
0051234	establishment of localization	77 de 648 genes, 11,9%	1745 de 24961 genes, 7%	0,000358
0065007	biological regulation	137 de 648 genes, 21,1%	3661 de 24961 genes, 14,7%	0,000403
0051716	cellular response to stimulus	42 de 648 genes, 6,5%	772 de 24961 genes, 3,1%	0,000581
0050794	regulation of cellular process	116 de 648 genes, 17,9%	3050 de 24961 genes, 12,2%	0,0011
0050789	regulation of biological process	127 de 648 genes, 19,6%	3434 de 24961 genes, 13,8%	0,00141
0070887	cellular response to chemical stimulus	25 de 648 genes, 3,9%	374 de 24961 genes, 1,5%	0,00148
0009725	response to hormone stimulus	43 de 648 genes, 6,6%	849 de 24961 genes, 3,4%	0,00191

0071495	cellular response to endogenous stimulus	20 de 648 genes, 3,1%	267 de 24961 genes, 1,1%	0,00191
0071310	cellular response to organic substance	23 de 648 genes, 3,5%	337 de 24961 genes, 1,4%	0,00199
0006979	response to oxidative stress	20 de 648 genes, 3,1%	278 de 24961 genes, 1,1%	0,00298
0009266	response to temperature stimulus	25 de 648 genes, 3,9%	399 de 24961 genes, 1,6%	0,00325
0009414	response to water deprivation	16 de 648 genes, 2,5%	202 de 24961 genes, 0,8%	0,00508
0009611	response to wounding	13 de 648 genes, 2%	145 de 24961 genes, 0,6%	0,00663
0006869	lipid transport	13 de 648 genes, 2%	146 de 24961 genes, 0,6%	0,00684
0080167	response to karrikin	12 de 648 genes, 1,9%	127 de 24961 genes, 0,5%	0,00695
0009415	response to water	16 de 648 genes, 2,5%	211 de 24961 genes, 0,8%	0,00712

8.1.3. Tabla de términos GO enriquecidos en genes co-regulados en plantas *As-HCC1* y *amiCOX17*.

Identificador GO	Término	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	p-value
0009404	toxin metabolic process	6 de 125 genes, 4,8%	46 de 24961 genes, 0,2%	3,49x 10 ⁻⁰⁵
0009407	toxin catabolic process	6 de 125 genes, 4,8%	46 de 24961 genes, 0,2%	3,49x 10 ⁻⁰⁵
0019748	secondary metabolic process	12 de 125 genes, 9,6%	364 de 24961 genes, 1,5%	3,49x 10 ⁻⁰⁵
0050896	response to stimulus	41 de 125 genes, 32,8%	3689 de 24961 genes, 14,8%	3,49x 10 ⁻⁰⁵
0009607	response to biotic stimulus	14 de 125 genes, 11,2%	610 de 24961 genes, 2,4%	0,000196
0051707	response to other organism	13 de 125 genes, 10,4%	558 de 24961 genes, 2,2%	0,000322
0051704	multi-organism process	13 de 125 genes, 10,4%	589 de 24961 genes, 2,4%	0,000485
0006950	response to stress	25 de 125 genes, 20%	2104 de 24961 genes, 8,4%	0,00185
0009617	response to bacterium	8 de 125 genes, 6,4%	256 de 24961 genes, 1%	0,00206
0007568	aging	5 de 125 genes, 4%	85 de 24961 genes, 0,3%	0,00298
0042221	response to chemical stimulus	22 de 125 genes, 17,6%	1892 de 24961 genes, 7,6%	0,00567

8.1.4. Tabla de términos GO enriquecidos en genes regulados en forma opuesta en plantas *hcc2* y *amiCOX17*.

Identificador GO	Término	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	p-value
0050896	response to stimulus	42 de 100 genes, 42%	3689 de 24961 genes, 14,8%	2,22x 10 ⁻⁰⁸
0051707	response to other organism	17 de 100 genes, 17%	558 de 24961 genes, 2,2%	2,61x 10 ⁻⁰⁸
0050832	defense response to fungus	10 de 100 genes, 10%	131 de 24961 genes, 0,5%	2,92x 10 ⁻⁰⁸
0051704	multi-organism process	17 de 100 genes, 17%	589 de 24961 genes, 2,4%	2,92x 10 ⁻⁰⁸
0009607	response to biotic stimulus	17 de 100 genes, 17%	610 de 24961 genes, 2,4%	3,93x 10 ⁻⁰⁸
0009620	response to fungus	10 de 100 genes, 10%	167 de 24961 genes, 0,7%	1,7x 10 ⁻⁰⁷
0042221	response to chemical stimulus	26 de 100 genes, 26%	1892 de 24961 genes, 7,6%	1,32x 10 ⁻⁰⁶
0006950	response to stress	26 de 100 genes, 26%	2104 de 24961 genes, 8,4%	9,41x 10 ⁻⁰⁶
0006952	defense response	15 de 100 genes, 15%	747 de 24961 genes, 3%	1,67x 10 ⁻⁰⁵
0010033	response to organic substance	18 de 100 genes, 18%	1148 de 24961 genes, 4,6%	3,21x 10 ⁻⁰⁵
0010200	response to chitin	7 de 100 genes, 7%	127 de 24961 genes, 0,5%	4,39x 10 ⁻⁰⁵
0009743	response to carbohydrate stimulus	8 de 100 genes, 8%	203 de 24961 genes, 0,8%	7,54x 10 ⁻⁰⁵
0071702	organic substance transport	8 de 100 genes, 8%	261 de 24961 genes, 1%	0,000414
0043562	cellular response to nitrogen levels	3 de 100 genes, 3%	16 de 24961 genes, 0,1%	0,00174
0009617	response to bacterium	7 de 100 genes, 7%	256 de 24961 genes, 1%	0,00241
0009719	response to endogenous stimulus	13 de 100 genes, 13%	920 de 24961 genes, 3,7%	0,00241
0009725	response to hormone stimulus	12 de 100 genes, 12%	849 de 24961 genes, 3,4%	0,00413
0000160	two-component signal transduction system (phosphorelay)	4 de 100 genes, 4%	67 de 24961 genes, 0,3%	0,00448
0009723	response to ethylene stimulus	5 de 100 genes, 5%	134 de 24961 genes, 0,5%	0,00542
0051716	cellular response to stimulus	11 de 100 genes, 11%	772 de 24961 genes, 3,1%	0,00624
0043090	amino acid import	2 de 100 genes, 2%	5 de 24961 genes, 0%	0,00664

8.1.5. Tabla de clusters asociados a ROS enriquecidos en el grupo de 382 genes regulados positivamente en las plantas As-HCC1

Cluster evaluado	Intersec As-Down	Total de genes en el cluster	% del cluster	p-value	Tasa de enriquecimiento	Intervalo del 95% de confianza	
I	13	694	1,9%	0,772	1,051	0,552	1,831
II	23	1233	1,9%	0,825	1,047	0,653	1,601
III	33	1686	2,0%	0,569	1,098	0,742	1,575
IV	10	425	2,4%	0,356	1,320	0,623	2,478
V	28	1206	2,3%	0,183	1,303	0,850	1,923
VI	6	266	2,3%	0,485	1,265	0,457	2,817
VII	2	130	1,5%	1	0,868	0,104	3,220
VIII	4	362	1,1%	0,540	0,623	0,168	1,623

8.1.6. Tabla de clusters asociados a ROS enriquecidos en el grupo de 683 genes regulados negativamente en las plantas As-HCC1.

Cluster evaluado	Intersec As-Up	Total de genes en el cluster	% del cluster	p-value	Tasa de enriquecimiento	Intervalo del 95% de confianza	
I	8	694	1,2%	1,56X 10⁻⁰³	0,362	0,155	0,721
II	46	1233	3,7%	0,320	1,171	0,844	1,589
III	63	1686	3,7%	0,225	1,172	0,887	1,527
IV	23	425	1,9%	0,019	1,698	1,057	2,604
V	91	1206	7,5%	1,20X 10⁻¹¹	2,368	1,867	2,975
VI	8	266	3,0%	0,018	0,444	0,190	0,885
VII	22	130	16,9%	2,81X 10⁻⁰⁹	5,309	3,195	8,450
VIII	85	362	23,5%	3,01X 10⁻³⁹	7,367	5,677	9,476

8.1.7. Tabla de clusters asociados a ROS enriquecidos en el grupo de 441 genes regulados positivamente en las plantas hcc2.

Cluster evaluado	Intersec hcc2-Down	Total de genes en el cluster	% del cluster	p-value	Tasa de enriquecimiento	Intervalo del 95% de confianza	
I	5	694	0,7%	0,0119	0,351	0,113	0,829
II	40	1233	3,2%	8,39X 10⁻⁰³	1,580	1,108	2,199
III	65	1686	3,9%	1,44X 10⁻⁰⁵	1,878	1,418	2,454
IV	40	425	9,4%	1,08X 10⁻¹³	4,574	3,177	6,432
V	101	1206	8,4%	6,56X 10⁻²⁷	4,070	3,220	5,104
VI	56	266	21,1%	2,11X 10⁻³³	10,226	7,411	13,925
VII	25	130	19,2%	2,73X 10⁻¹⁵	9,347	5,771	14,591
VIII	53	362	14,6%	3,96X 10⁻²⁵	7,115	5,149	9,674

8.1.8. Tabla de clsters asociados a ROS enriquecidos en el grupo de 321 genes regulados negativamente en las plantas hcc2

Cluster evaluado	Intersec hcc2-Up	Total de genes en el cluster	% del cluster	p-value	Tasa de enriquecimiento	Intervalo del 95% de confianza	
I	11	694	1,6%	0,752	1,058	0,520	1,931
II	26	1233	2,1%	0,096	1,408	0,902	2,112
III	32	1686	1,9%	0,215	1,267	0,849	1,832
IV	5	425	1,2%	0,838	0,785	0,252	1,867
V	13	1206	1,1%	0,323	0,720	0,378	1,253
VI	1	266	0,4%	0,194	0,251	0,006	1,421
VII	1	130	0,8%	1	0,514	0,013	2,933
VIII	2	362	0,6%	0,184	0,369	0,044	1,353

8.1.9. Tabla de genes regulados negativamente en plantas As-HCC1 presentes en los clústeres V, VII y VIII

Cluster evaluado	Intersec As-Down	Total de genes en los clusteres	% As-Down	p-value	Tasa de enriquecimiento	Intervalo del 95% de confianza	
V, VII y VIII	130	1376	19,2%	$1,06 \times 10^{-22}$	2,964	2,419	3,611

8.1.10. Tabla de genes regulados positivamente en plantas hcc2 presentes en los clústeres IV, V, VI, VII y VIII

Cluster evaluado	Intersec As-Down	Total de genes en los clusteres	% As-Down	p-value	Tasa de enriquecimiento	Intervalo del 95% de confianza	
IV, V, VI, VII y VIII	149	1696	34,0%	$1,25 \times 10^{-34}$	3,818	3,131	4,637

8.2. ANEXO II.

8.2.1. Lista de oligonucleótidos usados.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Descripción
pDAP-RB3	TAACAATTTACACAGGAAACAGCTATAC	Análisis de T-DNA la mutante insercional SAIL_1283_D03.V1 (AtCOX10)
COX10F-Sail	CGCTCGTTGTTATTGGGAGCTTTCTAA	Amplificación del alelo salvaje de AtCOX10
COX10R-Sail	CAAGGAATTAGCAGATGCAGCAAT	
COX10P-FHind	GGGAAGCTTCAATGATGAACATCTTCTTC	Amplificación del promotor de AtCOX10 para la fusión a GUS
COX10P-RBam	CCCGGATCCGTTAAGCCGTCAGAATTTT	
COX10c-FBam	CTTGGATCCCGATGTGGCGAAGATCTG	Amplificación de la región codificante de AtCOX10 para la complementación en plantas, levaduras y la fusión a mRFP.
COX10-RSac	GGTGAGCTCCCAAAAATTCAATAGCTTG	Amplificación de la región codificante de AtCOX10 para la complementación en plantas.
COX10R-RFP	GCGCTCGAG GGAGAGTAGAAGGAAG	Amplificación de la región codificante de AtCOX10 para la fusión a mRFP.
AHL1	TAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGC	Amplificación de fragmentos para recombinar.
AHL2	CAGAGCTGCAGCTGGATGGC	
35S-1b	GCTCCTACAAATGCCATCATTGC	Chequeo de plantas
RFP R	CCTTGGTCACCTTCAGCTTG	Chequeo de plantas
AtRFP B1F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTA CCATGGCCTCCTCCGAGGAC	
AtRFP B2R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TAGGCGCCGGTGGAGTG	
10aqrhind	GCGAAGCTTTTCATGGAGAGTAGAAGGAA	Amplificación de la región codificante de AtCOX10 para la complementación en levaduras.
Sco1.1	TCGAAACATGACTCAGGT	Amplificación del alelo salvaje de HCC1
Sco1.2	AATAGTAGTCTACACTCTA	
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Análisis de mutantes Salk
ScoL-F	CGGGGATCCATGCTTCCTTGTCGCC	Amplificación de la región codificante de HCC2
Hcc1-Fbam	CCGCGGATCCATGGCGTCTGCTCTATGTAG	Amplificación de la región codificante de HCC1
HCC1-BIFC-R	GCGCTCGAGCTTCCGGTACTGACGGATCTC	Amplificación de los fragmentos utilizados para realizar las construcciones de BiFC
HCC2-BIFC-R	GCGCTCGAGCTGTGAAACAGAAGCAACTTC	
TM-HCC2-Bifc R	GCGCTCGAGAAGAAAGCCGACGAATCCGGC	
TM-HCC1-Bifc R	GCGCTCGAGGACCAATCCAGCTCCAGTAGC	
LDH-BIFC-F-Bam	CGCGGATCCATGGCTTTCGCTTCAAATTCG	

LDH-BIFC-R-Eco	GCGGAATTCACATACATGAGGAGGAATTAAC	
Sco1-RNAiXho	GCGCTCGAGCTGCAAGCCGTCTTCGTT	Amplificación del fragmento para el antisentido para HCC1
Sco1-RNAiEco	GGCGAATTCCGGCCCTCCACGAACGTC	

8.2.2. Lista de oligonucleótidos usados en RT-qPCR

Gene	Locus	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
PP2AA3	At1g13320	CCTGCGGTAATAACTGC ATCT	CTTCACTTAGCTCCACCA AGCA
COX10	At2g44520	ACATGATCCCTCTCGGTT TCATCGCCT	TTGCACATCTCTGCCGC AAT
SAG12	At5g45890	AAGCGACTGGCGGCTTG ACA	ACCGGTTGGTGTGCCAC TGC
CAB1	AT1G29930	TGGGCCTCGCTACTGAC CCC	GCCAAGTGGTCCGCGAG GTT
CHS	AT5G13930	ACATGTCGAGCGCGTGC GTT	AGGAACGCTGTGCAAGA CGACT
ANAC019	At1g52890	TCTCGTAGAAACGGAAG CACT	GTCGTGGACGAAGTACC GTT
ACTIN	ACT2/ACT8 At3g18780/ At1g49240	GGTAACATTGTGCTCAG TGGTGG	AACGACCTTAATCTTCA TGCTG C
BCS1	At3g50930	GAACAGCTAGTGAGGAA TGAC CGTGT	TGTTTGGCTTTATCTTGG TCGT CCTCG
CAT3	At1g20620	GGGCACCAGACAGGCAA GACA	CCAAGGATCGATCAGCC TGAG ACCA
COX171	At3g15352	CAGCCAGCACAAAATGG A	GGCAGCAGCCTTGCTTG GCT
NDB2	At4g05020	TGGACACAGCAGCCAGT GGC	TGTGTATTGGAGCCTTG GAGG
RD29b	At5g52300	GGAGCGGTCACTTCTTG GCTC G	AACTCCCTTACCTCCGCC ACTG C
HCC1	AT3G08950	GGCCCGATCTTACCGGG TTT	AACGCCGTCTGTCAACG AG
HCC2	AT4G39740	CGGATGTTGGACCTGAG CAA	TGCACTTGCAGTCCCGG TTA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abriata, L.; Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Gkazonis, P.; Spyroulias, G.A., Vila, A.J.; Wang, S. (2008) *Mechanism of Cu(A) assembly*. Nat. Chem. Biol. 4: 599–601.
- Antonicka, H.; Leary, S.C.; Guercin, G.H.; Agar J.N.; Horvath R.; Kennaway N.G.; Harding C.O.; Jaksch M.; Shoubridge E.A. (2003). *Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple early onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency*. Hum. Mol. Genet. 12, 2693–2702
- Araujo, W.L.; Ishizaki, K.; Nunes-Nesi, A.; Larson, T.R.; Tohge, T.; Krahnert, I. y col. (2010). *Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria*. Plant cell 22: 1549-1563.
- Araujo, W.L.; Nunes-Nesi, A.; Osorio, S.; Usadel, B.; Fuentes, D.; Nagy, R. y col. (2011). *Antisense inhibition of the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase enhances photosynthesis and growth in tomato via an organic acid-mediated effect on stomatal aperture*. Plant cell 23: 600-627.
- Attallah, C.V.; Welchen, E.; Gonzalez, D.H. (2006) *The promoters of Arabidopsis thaliana genes AtCOX17-1 and -2, encoding a copper chaperone involved in cytochrome c oxidase biogenesis, are preferentially active in roots and anthers and induced by biotic and abiotic stress*. Physiol. Plant. 129: 123–134
- Attallah, C.V.; Welchen, E.; Martin, A.P.; Spinelli, S.V.; Bonnard, G.; Palatnik, J.F.; Gonzalez, D.H. (2011). *Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis*. J. Exp. Bot. 62: 4281-4294
- Attallah, C.V.; Welchen, E.; Pujol, C.; Bonnard, G.; Gonzalez, D.H. (2007.) *Characterization of Arabidopsis thaliana genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome c oxidase biogenesis*. Plant. Mol. Biol. 65: 343-355
- Auger, D.L.; Newton, K.J.; Birchler, J.A. (2001) *Nuclear gene dosage effects upon the expression of maize mitochondrial genes*. Genetics. 157: 1711-1721
- Backert, S.; Lurz, R.; Oyarzabal, O.A. y Borner, T. (1997). *High content, size and*

- distribution of single-stranded DNA in the mitochondria of Chenopodium album* (L.). *Plant. Mol. Biol.* 33: 1037-1050
- Balandin, T. y Castresana, C. (2002). *AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17*. *Plant Physiol.* 129: 1852-1857.
- Balatri, E.; Banci, L.; Bertini, I.; Cantini, F.; y Ciofi-Baffoni, S. (2003). *Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein Involved in cytochrome c oxidase assembly*. *Structure* 11: 1431–1443.
- Banci, L.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Ciofi-Baffoni, S.; (2011) *Seeking the determinants of the elusive functions of Sco proteins*. *FEBS J.* 278: 2244–2262
- Banci, L.; Bertini, I.; Cavallaro, G.; Rosato, A.; (2007) *The functions of Sco proteins from genome-based analysis*. *J. Proteome Res.* 6: 1568–1579.
- Banci, L.; Bertini, I.; Cefaro, C.; Ciofi-Baffoni, S.; Gallo, A.; Martinelli, M.; Sideris, D.P.; Katrakili, N.; Tokatlidis, K. (2009). *MIA40 is an oxidoreductase that catalyzes oxidative protein folding in mitochondria*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 198–206.
- Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Hadjiloi, T.; Martinelli, M.; Palumaa, P. (2008) *Mitochondrial copper(I) transfer from Cox17 to Sco1 is coupled to electron transfer*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 6803–6808.
- Barrientos, A.; Gouget, K.; Horn, D.; Soto, I.C. y Fontanesi F. (2009). *Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: insights into the COX assembly process*. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 97–107
- Barros, M.H.; Carlson, C.G.; Glerum, D.M. y Tzagoloff A. (2001). *Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O*. *FEBS Lett.* 492: 133-138
- Barros M.H.; y Tzagoloff A. (2002). *Regulation of the Heme A biosynthetic pathway in Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 516: 119-123
- Bartoli, C.G.; Pastori, G.M. y Foyer, C.H. (2000). *Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV*. *Plant Physiol.* 123(1): 335-344
- Bartoli, C.G.; Yu, J.; Gomez, F.; Fernandez, L.; McIntosh, L. y Foyer, C.H. (2006). *Interrelationships between light and respiration in the control of ascorbic acid*

- synthesis and accumulation in Arabidopsis thaliana leaves*. J. Exp. Bot. 57: 1621-1631
- Baudouin, E. y Hancock, J. (2014). *Nitric Oxide Signalling in Plants*. Front Plant Sci 10.3389/fpls.2013.00553
- Beale, S.I. (2011) *Chloroplast Signaling: Retrograde Regulation Revelations*. Curr. Biol. 21: 391-393
- Begcy, K.; Mariano, E.D.; Mattiello, L.; Nunes, A.V.; Mazzafera, P.; Maia, I.G. y col. (2011). *An Arabidopsis Mitochondrial Uncoupling Protein Confers Tolerance to Drought and Salt Stress in Transgenic Tobacco Plants*. PloS one. 6: e23776
- Belt, K.; Huang, S.; Thatcher, L.F.; Casarotto, H.; Singh, K.; Van Aken, O.; Millar, A.H. (2017) *Salicylic acid-dependent plant stress signalling via mitochondrial succinate dehydrogenase*. Plant Physiol 173: 2029-2040
- Berger, F. (2003). *Endosperm: the crossroad of seed development*. Curr Opin Plant Biol. 6: 42–50.
- Bestwick, M.; Khalimonchuk, O.; Pierrel, F.; y Winge, D.R. (2010) *The role of Coa2 in hemylation of yeast Cox1 revealed by its genetic interaction with Cox10*. Mol. Cell. Biol. 30, 172–185
- Blokhina, O.; y Fagerstedt, K.V. (2010). *Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems*. Physiol. Plant. 138: 447-462.
- Boisnard-Lorig C.; Colon-Carmona A.; Bauch M.; Hodge S.; Doerner P.; Bancharel E.; Dumas C.; Haseloff J. y Berger F. (2001). *Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in Arabidopsis show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains*. Plant Cell. 13: 495-509
- Bourens M.; Fontanesi F.; Soto IC.; Liu J. y Barrientos A. (2013). *Redox and reactive oxygen species regulation of mitochondrial cytochrome C oxidase biogenesis*. Antioxid Redox Signal 19: 1940–52
- Bratton, M.R.; Hiser, L.; Antholine, W.E.; Hoganson, C. y Hosler, J.P. (2000). *Identification of the structural subunits required for formation of the metal centers in subunit I of cytochrome c oxidase of Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry 39: 12989– 12995.

- Braun H.P.; Binder S.; Brennicke A.; y col. (2014) *The life of plant mitochondrial complex I*. *Mitochondrion* 19: 295–313.
- Brown K.R.; Allan B.M.; Do P. y Hegg E.L. (2002) *Identification of novel hemes generated by Heme a synthase: evidence for two successive monooxygenase reactions*. *Biochemistry* 41: 10906-10913
- Brown K.R.; Brown B.M.; Hoagland E.; Manye C.L. y Hegg E.L. (2004) *Heme a synthase does not incorporate molecular oxygen into the formyl group of Heme a*. *Biochemistry*. 43: 8616-8624
- Brunori, M.; Giuffre, A. y Sarti, P. (2005). *Cytochrome c oxidase, ligands and electrons*. *J. Inorg. Biochem.* 99: 324-336.
- Buchanan-Wollaston, V.; Page, T.; Harrison, E.; y col. (2005). *Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 567–85
- Buchensky, C.; Almiron, P.; Suarez Mantilla, B.; Silber, A.M.; Cricco, J.A. (2010). *The Trypanosoma cruzi proteins TcCox10 and TcCox15 catalyze the formation of heme A in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* . 312: 133–141
- Burke, P.V; y Poyton, R.O. (1998). *Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome c oxidase*. *J. Exp. Biol.* 201: 1163-75.
- Bykova N.V.; Egsgaard H. y Møller IM. (2003). *Identification of 14 new phosphoproteins involved in important plant mitochondrial processes*. *FEBS Lett.* 540: 141-6.
- Carr, H.S.; George, G.N. yWinge, D.R. (2002). *Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein*. *J. Biol. Chem.* 277, 31237–31242
- Carrie, C.; Giraud, E.; Duncan, O.; Xu, L.; Wang, Y.; Huang, S. y col. (2010a). *Conserved and novel functions for Arabidopsis thaliana MIA40 in assembly of proteins in mitochondria and peroxisomes*. *J. Biol. Chem.* 285: 36138- 36148.
- Carrie, C.; Murcha, M.W. y Whelan, J. (2010b). *An in silico analysis of the mitochondrial protein import apparatus of plants*. *BMC Plant Biol.* 10: 249.
- Carrie, C.; Murcha, M.W.; Giraud, E.; Ng, S.; Zhang, M.F.; Narsai, R. y col. (2013).

- How do plants make mitochondria?*. *Planta* 237: 429-439.
- Carrie, C.; Murcha, M.W.; Kuehn, K.; Duncan, O.; Barthet, M.; Smith, P.M. y col. (2008). *Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 582: 3073-3079.
- Catalá, R.; Medina, J. y Salinas, J. (2011). *Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108: 16475-16480.
- Ceh-Pavia, E.; Spiller, M.P. y Lu, H. (2013). *Folding and biogenesis of mitochondrial small Tim proteins*. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 16685-16705.
- Chacinska, A.; van der Laan, M.; Mehnert, C.S.; Guiard, B.; Mick, D.U.; Hutu, D.P. y col. (2010). *Distinct forms of mitochondrial TOM-TIM supercomplexes define signaldependent states of preprotein sorting*. *Mol Cell Biol.* 30: 307-318.
- Chan, S.Y.; Zhang, Y.; Hemann, C.; Mahoney, C.E.; Zweier, J.L.; Loscalzo, J. (2009) *MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2*. *Cell Metab.* 10, 273-284
- Chan, N.C. y Lithgow, T. (2008). *The peripheral membrane subunits of the SAM complex function codependently in mitochondrial outer membrane biogenesis*. *Mol. Biol. Cell.* 19: 126-136
- Charrier, B.; Champion, A.; Henry Y. y Kreis, M. (2002). *Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. *Plant Physiol.* 130: 577–590
- Chatzi, A. y Tokatlidis, K. (2013). *The mitochondrial intermembrane space: a hub for oxidative folding linked to protein biogenesis*. *Antioxid. Redox Signal.* 19: 54-62
- Chen, J.; Zeng, B.; Zhang, M. y col. (2014). *Dynamic Transcriptome Landscape of Maize Embryo and Endosperm Development*. *Plant Physiol.* 166: 252-264.
- Clifton, R.; Millar, A.H. y Whelan, J. (2006). *Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses*. *Biochim Biophys Acta* 1757: 730-741.
- Clough, S.J.; y Bent, A.F. (1998). *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.

- Cobine, P.A.; Pierrel, F. y Winge, D.R. (2006). *Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes*. *Biochim Biophys Acta*. 1763: 759–772
- Cobine, P.A.; McKay, R.T.; Zangger, K.; Dameron, C.T. y Armitage, I.M. (2004a). *Solution structure of Cu6 metallothionein from the fungus Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem*. 271: 4213-4221.
- Cobine, P.A.; Ojeda, L.D.; Rigby, K.M. y Winge, D.R. (2004b). *Yeast contain a nonproteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix*. *J. Biol. Chem*. 279: 14447-14455.
- Colombatti, F.; Gonzalez, D.H.; y Welchen, E. (2014). *Plant mitochondria under pathogen attack: A sigh of relief or a last breath?* *Mitochondrion*. 19: 238-244.
- Comelli R.N. y Gonzalez D.H. (2009). *Identification of regulatory elements involved in expression and induction by sucrose and UV-B light of the Arabidopsis thaliana COX5b-2 gene, encoding an isoform of cytochrome c oxidase subunit 5b*. *Physiol. Plant*. 137: 213-224
- Comelli R.N.; Viola I.L. y Gonzalez D.H. (2009). *Characterization of promoter elements required for expression and induction by sucrose of the Arabidopsis COX5b-1 nuclear gene, encoding the zinc-binding subunit of cytochrome c oxidase*. *Plant. Mol. Biol*. 69: 729-743
- Comelli, R.N.; Welchen, E.; Kim, H.J.; Hong, J.C. y Gonzalez, D.H. (2012). *Delta subclass HD-Zip proteins and a B-3 AP2/ERF transcription factor interact with promoter elements required for expression of the Arabidopsis cytochrome c oxidase 5b-1 gene*. *Plant. Mol. Biol*. 80: 157-167
- Considine, M.J. y Foyer, C.H. (2014). *Redox regulation of plant development*. *Antioxid. Redox Signal*. 21: 1305-1326.
- Cordoba, J.P.; Marchetti F.; Soto D.; Martin M.V.; Pagnussat G.C. y Zabaleta E. (2016) *The CA domain of the respiratory complex i is required for normal embryogenesis in Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot*. 67: 1589–1603
- Cornah J.E. y Smith S.M. (2002). *Synthesis and function of glyoxylate cycled enzymes*. Baker A.; Graham I.A.; eds. *Plant peroxisomes*. London, UK: Kluwer Academic Publishers, 57–101.
- Cvetkovska, M.; y Vanlerberghe, G.C. (2013). *Alternative oxidase impacts the plant*

- response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species.* Plant Cell Environ. 36: 721-732.
- Cvetkovska, M.; Alber, N.A. y Vanlerberghe, G.C. (2013a). *The signaling role of a mitochondrial superoxide burst during stress.* Plant Signal. Behav. 8: e22749.
- Czechowski, T.; Stitt, M.; Altmann, T.; Udvardi, M.K. y Scheible W.R. (2005). *Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis.* Plant Physiol. 139: 5–17.
- Dahan, J.; Tcherkez, G.; Macherel, D.; Benamar, A.; Belcram, K. y Quadrado, M. (2014) *Disruption of the CYTOCHROME C OXIDASE DEFICIENT1 Gene Leads to Cytochrome c Oxidase Depletion and Reorchestrated Respiratory Metabolism in Arabidopsis.* Plant Physiol. 166: 1788-1802
- Dangl, J.L. y Jones, J.D. (2001). *Plant pathogens and integrated defence responses to infection.* Nature. 411: 826-833.
- De Clercq, I.; Vermeirssen, V.; Van Aken, O.; Vandepoele, K.; Murcha, M.W. y col. (2013) *The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in Arabidopsis.* Plant Cell 25: 3472–90
- De Vleeschauwer, D.; Gheysen, G. y Hofte, M. (2013). *Hormone defense networking in rice: tales from a different world.* Trends in plant science 18: 555-565
- DeBellis, L; Picciarelli, P; Pistelli, L. y Alpi, A. (1990). *Localization of glyoxylate-cycle marker enzymes in peroxisomes of senescent leaves and green cotyledons.* Planta. 180: 435–439.
- Depuydt, S. y Hardtke, C.S. (2011). *Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation.* Curr Biol. 21: 365-73
- Dietz, K.J.; Jacob, S.; Oelze, M.L.; Laxa, M.; Tognetti, V.; de Miranda, S.M.y col. (2006). *The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism.* J. Exp. Bot. 57: 1697-1709
- Dinakar, C.; Vishwakarma, A.; Raghavendra, A.S. y Padmasree, K. (2016). *Alternative Oxidase Pathway Optimizes Photosynthesis During Osmotic and Temperature Stress by Regulating Cellular ROS, Malate Valve and Antioxidative Systems.* Front Plant Sci. 7: 1–17

- Dojcinovic, D.; Krosting, J.; Harris, A.J.; Wagner, D.J. y Rhoads, D.M. (2005). *Identification of a region of the Arabidopsis AtAOX1a promoter necessary for mitochondrial retrograde regulation of expression*. Plant. Mol. Biol. 58: 159-175.
- Dubinina, J.; Braun, H.P.; Schmitz, U. y Colditz, F. (2011). *The mitochondrial proteome of the model legume Medicago truncatula*. Biochim Biophys Acta. 1814: 1658-1668
- Duncan, O.; Murcha, M.W. y Whelan, J. (2013). *Unique components of the plant mitochondrial protein import apparatus*. Biochim Biophys Acta. 1833: 304-313.
- Eastmond P.J. y Graham I.A. (2001). *Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds*. Trends Plant Sci. 6: 72-78.
- Eckers, E.; Petrunaro, C.; Gross, D.; Riemer, J.; Hell, K. y Deponte, M. (2013). *Divergent molecular evolution of the mitochondrial sulfhydryl: cytochrome C oxidoreductase Cxv in opisthokonts and parasitic protists*. J. Biol. Chem. 288: 2676-2688.
- Elhafez, D.; Murcha, M.W.; Clifton, R.; Soole, K.L.; Day, D.A. y Whelan J. (2006) *Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: Intraorganelle location and expression*. Plant Cell Physiol. 47: 43–54
- Elorza, A.; León, G.; Gómez, I.; Mouras, A.; Holuigue, L.; Araya, A. y Jordana, X. (2004). *Nuclear SDH2-1 and SDH2-2 genes, encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II in Arabidopsis, have distinct cell-specific expression patterns and promoter activities*. Plant Physiol. 136, 4072-4087
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S. y von Heijne, G. (2000). *Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence*. J Mol Biol 300(4): 11.
- Esmon, C.A.; Pedmale, U.V. y Liscum E. (2005). *Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism*. Int J Dev Biol. 49: 665-74
- Estavillo, G.M.; Crisp, P.A.; Pornsiriwong, W.; Wirtz, M.; Collinge, D. y col. (2011). *Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis*. Plant cell 23: 3992-4012.
- Eubel, H.; Heinemeyer, J.; Sunderhaus, S. y Braun, H.P. (2004). *Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria*. P Plant Physiol Biochem. 42: 937-942.

- Eubel, H.; Jansch, L.; y Braun, H.P. (2003). *New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II*. Plant Physiol. 133: 274-286.
- Eyal, Y.; Curi, C y McCormick, S. (1995). *Pollen Specificity Elements Reside in 30 bp of the Proximal Promoters of Two Pollen-Expressed Genes*. Plant Cell. 7: 373-384
- Fernie, A.R.; Carrari, F. y Sweetlove, L.J. (2004). *Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport*. Curr Opin Plant Biol 7: 254-261.
- Fischer, M.; Horn, S.; Belkacemi, A.; Kojer, K.; Petrungraro, C.; y col. (2013). *Protein import and oxidative folding in the mitochondrial intermembrane space of intact mammalian cells*. Mol. Biol. Cell 24: 2160–2170.
- Fontanesi, F.; Soto, I.C. y Barrientos A. (2008). *Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation*. IUBMB Life. 60: 557-568
- Fontanesi, F.; Soto, I.C.; Horn, D. y Barrientos A. (2010). *Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome c oxidase biogenesis*. Mol. Cell. Biol. 30: 245–259
- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2011). *Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub*. Plant Physiol. 155(1): 2-18.
- Fraga, H.; Bech-Serra, J.J.; Canals, F.; Ortega, G.; Millet, O. y Ventura, S. (2014). *The mitochondrial intermembrane space oxidoreductase Mia40 funnels the oxidative folding pathway of the cytochrome c oxidase assembly protein Cox19*. J. Biol. Chem. 289: 9852-9864
- Froman, B.E.; Edwards, P.C.; Bursch, A.G. y Dehesh, K. (2000). *ACX3, a novel medium-chain Acyl-coenzyme A oxidase from Arabidopsis*. Plant Physiol. 123: 733–742.
- Fromm, S.; Senkler, J.; Eubel, H.; Peterhänsel, C. y Braun, H-P. (2016) *Life without complex I: proteome analyses of an Arabidopsis mutant lacking the mitochondrial NADH dehydrogenase complex*. J. Exp. Bot. 67: 3079–93
- Fuentes, D.; Meneses, M.; Nunes-Nesi, A.; Araujo, W.L.; Tapia, R.; Gomez, I. y col. (2011). *A deficiency in the flavoprotein of Arabidopsis mitochondrial complex II results in elevated photosynthesis and better growth in nitrogen-limiting*

- conditions*. Plant Physiol. 157: 1114-1127.
- Gagliardi, D.; y Binder, S. (2007). *Expression of the Plant Mitochondrial Genome*. En: Annual Plant Reviews Volume 31: Plant Mitochondria (Eds.:John Wiley & Sons, Inc., p. 50- 96.
- Gao, X.; Yuan H.M.; Hu Y.Q.; Li J. y Lu Y.T (2014). *Mutation of Arabidopsis CATALASE2 results in hyponastic leaves by changes of auxin levels*. Plant, Cell Environ. 37: 175–188
- Garcia, L.; Welchen, E.; Gey, U.; Arce, A.L.; Steinebrunner, I. y Gonzalez, D.H. (2016) *The cytochrome c oxidase biogenesis factor AtCOX17 modulates stress responses in Arabidopsis*. Plant, Cell Environ 39: 628–644
- Garlid, K.D.; Orosz, D.E.; Modrianský, M.; Vassanelli, S. y Jezek, P. (1996). *On the Mechanism of Fatty Acid-induced Proton Transport by Mitochondrial Uncoupling Protein*. J. Biol. Chem. 271: 2615-2620
- Geisler, D.A.; Broselid, C.; Hederstedt, L.; Rasmusson, A.G. (2007). *Ca²⁺-binding and Ca²⁺-independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 282: 28455–28464
- Gibala, M.; Kicia, M.; Sakamoto, W.; Gola, E.M.; Kubrakiewicz, J.; Smakowska, E. y col. (2009). *The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters Arabidopsis leaf morphology at the late stage of rosette development under short-day photoperiod*. Plant J. 59: 685-699.
- Giegé, P.; Lee, J.; Sweetlove, B.; Cognat, V. y Leaver, CJ. (2005). *Coordination of nuclear and mitochondrial genome expression during mitochondrial biogenesis in Arabidopsis*. Plant Cell. 17: 1497-1512
- Giegé, P. y Brennicke, A. (2001). *From gene to protein in higher plant mitochondria*. C R Acad Sci III. 324:209-17.
- Giegé, P.; Sweetlove, L.J. y Leaver, C.J. (2003). *Identification of mitochondrial protein complexes in Arabidopsis using two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis*. Plant Mol Biol Rep. 21: 11.
- Giraud, E.; Ho L.H.M.; Clifton, R.; Carroll, A.; Estavillo, G.; y col. (2008). *The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in Arabidopsis results in acute sensitivity to combined light and drought stress*. Plant Physiol 147: 595–610

- Giraud, E.; Ng, S.; Carrie, C.; Duncan, O.; Low, J. y col. (2010). *TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in Arabidopsis thaliana*. *Plant cell*. 22: 3921-3934.
- Giraud, E.; Van Aken, O.; Ho, L.H. y Whelan, J. (2009). *The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a*. *Plant Physiol*. 150: 1286-1296
- Gleason, C.; Huang, S.; Thatcher, L.F.; Foley, R.C.; Anderson, C.R. y col. (2011). *Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108: 10768–10773
- Glerum, D.M.; y Tzagoloff, A. (1994). *Isolation of a human cDNA for heme A: farnesyltransferase by functional complementation of a yeast cox10 mutant*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 91: 8452–8456
- Glerum, D.M.; Muroff, I.; Jin, C. y Tzagoloff, A. (1997). *COX15 codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase*. *J. Biol. Chem*. 272: 19088–19094
- Glerum, D.M.; Shtanko, A. y Tzagoloff, A. (1996). *SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. 271: 20531–20535.
- Gonzalez, D.H.; Welchen, E.; Attallah, C.V.; Comelli, R.N. y Mufarrege, E.F. (2007). *Transcriptional coordination of the biogenesis of the oxidative phosphorylation machinery in plants*. *Plant J*. 51: 105-116.
- Goodstein, D.M.; Shu, S.; Howson, R.; y col. (2011). *Phytozome: a comparative platform for green plant genomics*. *Nucleic Acids Res*. 40: 1178-1186
- Gouy, M.; Guindon, S. y Gascuel, O. (2010). *SeaView version 4, A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building*. *Mol. Biol. Evol*. 272: 221-224
- Guitton, A.E.; Page, D.R.; Chambrier, P.; Lionnet, C., Faure, J-E. y col. (2004). *Identification of new members of fertilization independent seed Polycomb group pathway involved in the control of seed development in Arabidopsis thaliana*. *Development*. 131, 2971–2981.

- Guo, Y.; Cai, Z. y Gan S. (2004). *Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence*. Plant Cell Environ. 27: 521–549.
- Gut, H. y Matile P. (1988). *Apparent induction of key enzymes of the glyoxylic acid cycle in senescent barley leaves*. Planta. 176: 548–550
- Haili, N.; Arnal, N.; Quadrado, M.; Amiar, S.; Tcherkez, G. y col. (2013). *The pentatricopeptide repeat MTSF1 protein stabilizes the nad4 mRNA in Arabidopsis mitochondria*. Nucleic Acids Res. 41: 6650–6663
- Hamanaka, R.B. y Chandel, N.S. (2010). *Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes*. Trends Biochem. Sci. 35: 505-513.
- Heazlewood, J.L.; Verboom, R.E.; Tonti-Filippini J.; Small I.; y Millar A.H. (2007). *SUBA: the Arabidopsis Subcellular Database*. Nucleic Acids Res. 35: 213-218
- Heazlewood, J.L.; Howell, K.A. y Millar, A.H. (2003b). *Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits*. Biochim Biophys Acta. 1604: 159-169
- Heazlewood, J.L.; Tonti-Filippini, J.S.; Gout, A.M.; Day, D.A., Whelan, J. y Millar, A.H. (2004). *Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins*. Plant cell 16: 241-256.
- Herrmann, J.M. (2011). *MINOS is plus: a Mitofilin complex for mitochondrial membrane contacts*. Dev. Cell. 21: 599-600
- Higo, K.; Ugawa, Y.; Iwamoto, M. y Korenaga, T. (1999). *Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database*. Nucleic Acids Res. 27: 297-300
- Hiltscher, H.; Rudnik, R.; Shaikhali, J.; Heiber, I.; Mellenthin, M., y col. (2014). *The radical induced cell death protein 1 (RCD1) supports transcriptional activation of genes for chloroplast antioxidant enzymes*. Front Plant Sci 5: 475.
- Ho, L.H.; Giraud, E.; Lister, R.; Thirkettle-Watts, D.; Low, J. y col. (2007). *Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development*. Plant Physiol. 143: 1519-1533.

- Hoertensteiner, S. y Feller, U. (2002). *Nitrogen metabolism and remobilization during senescence*. J. Exp. Bot. . 53, 927–937.
- Hopkins, M.; Taylor, C.; Liu, Z.; Ma, F.; McNamara, L.; y col. (2007). *Regulation and execution of molecular disassembly and catabolism during senescence*. New Phytol. 175: 201–21
- Horn, D. y Barrientos A. (2008). *Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase*. IUBMB Life. 60:421-9
- Horng, Y.C.; Leary, S.C.; Cobine, P.A.; Young, F.B.; George, G.N.; y col. (2005). *Human Sco1 and Sco2 function as copper-binding proteins*. J. Biol. Chem. 280: 34113–34122.
- Howell, K.A.; Cheng, K.; Murcha, M.W.; Jenkin, L.E.; Millar, A.H. y Whelan, J. (2007). *Oxygen initiation of respiration and mitochondrial biogenesis in rice*. J. Biol. Chem. 282: 15619-15631.
- Howell, K.A.; Millar, A.H. y Whelan, J. (2006). *Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with pro-mitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus*. Plant. Mol. Biol. 60: 201-223.
- Hull, G.A. y Devic M. (1995). *The beta-glucuronidase (gus) reporter gene system. Gene fusions; spectrophotometric, fluorometric, and histochemical detection*. Methods Mol. Biol. 49:125-141.
- Humphries, A.D.; Streimann, I.C.; Stojanovski, D.; Johnston, A.J.; Yano, M.; y col. (2005). *Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40*. J. Biol. Chem. 280: 11535-11543.
- Hunte, C.; Zickermann, V. y Brandt, U. (2010). *Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I*. Science. 329: 448-451.
- Hyde, B.B.; Twig, G. y Shirihai, O.S. (2010). *Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics*. Semin. Cell. Dev. Biol. 21: 575-581.
- Islam, M.S. y Takagi, S. (2010). *Co-localization of mitochondria with chloroplasts is a lightdependent reversible response*. Plant Signal Behav 5: 146-147
- Ivanova, A.; Law, S.R.; Narsai, R.; Duncan, O.; Lee, J-H. y col. (2014). *A Functional Antagonistic Relationship between Auxin and Mitochondrial Retrograde Signaling*

- Regulates Alternative Oxidase1a Expression in Arabidopsis*. Plant Physiol 165: 1233–1254
- Jacoby, R.P.; Li, L.; Huang, S.; Pong Lee, C.; Millar, A.H. y Taylor, N.L. (2012). *Mitochondrial composition, function and stress response in plants*. J. Integr. Plant Biol. 54: 887-906.
- Jänsch, L.; Krufft, V.; Schmitz, U.K. y Braun, H.P. (1996). *New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria*. Planta. 9: 11.
- Juszczuk, I.M.; Szal, B. y Rychter, A.M. (2012). *Oxidation-reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction*. Plant Cell Environ 35: 296-307.
- Kadowaki, K.; Kubo, N.; Ozawa, K. y Hirai, A. (1996). *Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signal*. EMBO J. 15: 9.
- Kakizaki, Y.; Moore, A.L. y Ito, K. (2012). *Different molecular bases underlie the mitochondrial respiratory activity in the homoeothermic spadices of Symplocarpus renifolius and the transiently thermogenic appendices of Arum maculatum*. Biochem J. 445: 237-246.
- Karkonen, A. y Kuchitsu, K. (2014). *Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants*. Phytochemistry. 112:22-32
- Kerscher, S.J. (2000). *Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases*. Biochim Biophys Acta. 1459: 274-283.
- Khalimonchuk, O.; Bestwick, M.; Meunier, B.; Watts, T.C. y Winge DR. (2010). *Formation of the redox cofactor centers during Cox1 maturation in yeast cytochrome oxidase*. Mol. Cell. Biol. 30: 1004–1017
- Khalimonchuk, O.; Kim, H.; Watts, T.; Perez-Martinez, X. y Winge D.R. (2012). *Oligomerization of heme o synthase in cytochrome oxidase biogenesis is mediated by cytochrome oxidase assembly factor Coa2*. J. Biol. Chem. 287, 26715-26726.
- Khalimonchuk, O. y Rödel G. (2005). *Biogenesis of cytochrome c oxidase*. Mitochondrion. 5, 363-388
- Klodmann, J. y Braun, H.P. (2011). *Proteomic approach to characterize mitochondrial*

complex I from plants. Phytochemistry 72: 1071-1080

- Klodmann, J.; Senkler, M.; Rode, C. y Braun, H.P. (2011). *Defining the protein complex proteome of plant mitochondria. Plant Physiol.* 157: 587-598.
- Klodmann, J.; Sunderhaus, S.; Nimtz, M.; Jansch, L. y Braun, H.-P. (2010). *Internal Architecture of Mitochondrial Complex I from Arabidopsis thaliana. Plant cell* 22: 797-810.
- Koch, J.R. y Schmid, F.X. (2014). *Mia40 targets cysteines in a hydrophobic environment to direct oxidative protein folding in the mitochondria. Nat. Commun.* 5: 3041.
- Krause, F.; Reifschneider, N.H.; Vocke, D.; Seelert, H.; Rexroth, S. y Dencher, N.A. (2004). *“Respirasome”-like Supercomplexes in Green Leaf Mitochondria of Spinach. J. Biol. Chem.* 279: 48369-48375.
- Kristensen, B.K.; Askerlund, P.; Bykova, N.V.; Egsgaard, H. y Moller, I.M. (2004). *Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Phytochemistry* 65: 1839-1851
- Kruft, V.; Eubel, H.; Jansch, L.; Werhahn, W. y Braun, H.P. (2001). *Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. Plant Physiol.* 127: 1694- 1710
- Kudla, J. y Bock, R. (2016). *Lighting the way to protein-protein interactions: recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analyses. Plant Cell.* 28:1002-8
- Kwasniak, M.; Majewski, P.; Skibior, R.; Adamowicz, A.; Czarna, M. y col. (2013). *Silencing of the nuclear RPS10 gene encoding mitochondrial ribosomal protein alters translation in arabidopsis mitochondria. Plant cell* 25: 1855-1867
- Law, S.R.; Narsai, R.; Taylor, N.L.; Delannoy, E.; Carrie, C. y col. (2012). *Nucleotide and RNA metabolism prime translational initiation in the earliest events of mitochondrial biogenesis during Arabidopsis germination. Plant Physiol.* 158: 1610-1627.
- Leary, S.C.; Cobine, P.A.; Nishimura, T.; Verdijk, R.M.; de Krijger, R. y col. (2013). *COX19 mediates the transduction of a mitochondrial redox signal from SCO1 that*

- regulates ATP7A-mediated cellular copper efflux*. Mol. Biol. Cell. 24: 683-691.
- Lee, C.P.; Eubel, H.; O'Toole, N. y Millar, A.H. (2011). *Combining proteomics of root and shoot mitochondria and transcript analysis to define constitutive and variable components in plant mitochondria*. Phytochemistry 72: 1092-1108.
- Lee, C.P.; Taylor, N.L. y Millar, A.H. (2013). *Recent advances in the composition and heterogeneity of the Arabidopsis mitochondrial proteome*. Front Plant Sci. 4: 4.
- Leister, D.; Wang, X.; Haberer, G.; Mayer, K.F.X. y Kleine, T. (2011). *Intracompartamental and Intercompartmental Transcriptional Networks Coordinate the Expression of Genes for Organellar Functions*. Plant Physiol. 157: 386-404.
- Lenaz, G. y Genova, M.L. (2012). *Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation*. Adv. Exp. Med. Biol. 748: 107-144.
- León, P.; Gregorio, J.; y Cordoba, E. (2012). *ABI4 and its role in chloroplast retrograde communication*. Front. Plant Sci. 3:304.
- Lescot, M.; Dehais, P.; Thijs, G.; Marchal, K. y col. (2002). *PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences*. Nucleic Acids Res. 30: 325-327.
- Liere, K.; Weihe, A. y Borner, T. (2011). *The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation*. J. Plant Physiol. 168: 1345-1360.
- Lister, R.; Carrie, C.; Duncan, O.; Ho, L.H.; Howell, K.A. y col. (2007). *Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria*. Plant cell. 19: 3739-3759.
- Lister, R.; Chew, O.; Lee, M.N.; Heazlewood, J.L.; Clifton, R. y col. (2004). *A transcriptomic and proteomic characterization of the Arabidopsis mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial dysfunction*. Plant Physiol. 134: 777-789
- Liu, Y.J.; Norberg, F.E.; Szilagyi, A.; De Paepe, R.; Akerlund, H.E. y Rasmusson, A.G. (2008). *The mitochondrial external NADPH dehydrogenase modulates the leaf NADPH/NADP+ ratio in transgenic Nicotiana sylvestris*. Plant Cell Physiol 49: 251-263.

- Locato, V.; de Pinto, M.C. y De Gara, L. (2009). *Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate-glutathione redox enzymes in heat shock responses*. *Physiol. Plant.* 135: 296-306
- Logan, D.C. y Leaver, C.J. (2000). *Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells*. *J. Exp. Bot.* 51(346): 865-871.
- Longen, S.; Bien, M.; Bihlmaier, K.; Kloeppe, C.; Kauff, F.; y col. (2009). *Systematic analysis of the twin Cx9C protein family*. *J. Mol. Biol.* 393: 356–368.
- Lotz, C.; Lin, A.J.; Black, C.M.; Zhang, J.; Lau, E. y col. (2014). *Characterization, design, and function of the mitochondrial proteome: from organs to organisms*. *J. Proteome Res.* 13: 433-446
- Löytynoja, A. y Goldman, N. (2012). *webPRANK: a phylogeny-aware multiple sequence aligner with interactive alignment browser*. *Nucleic Acids Res.* 11, 579
- Mackenzie, S. y McIntosh, L. (1999). *Higher plant mitochondria*. *Plant cell* 11: 571-586
- Mansfield, S.G. y Briarty L.G. (1990). *Development of the free nuclear endosperm in Arabidopsis thaliana (L.)*. *Arabidopsis Information Service.* 27: 53–64
- Mansilla, N.; Garcia, L.; Gonzalez, D.H. y Welchen, E. (2015). *AtCOX10, a protein involved in haem o synthesis during cytochrome c oxidase biogenesis, is essential for plant embryogenesis and modulates the progression of senescence*. *J. Exp. Bot.* 66:6761-75
- Martin, V.; Villarreal, F.; Miras, I.; Navaza, A.; Haouz, A.; y col. (2009). *Recombinant plant gamma carbonic anhydrase homotrimers bind inorganic carbon*. *FEBS Lett.* 583: 3425-3430.
- Mena, M.; Vicente-Carbajosa. J.; Schmidt. R.J. y Carbonero P. (1998). *An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamina-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm*. *Plant J.* 16: 53–62
- Meyer, E.H.; Giegé, P.; Gelhaye, E.; Rayapuram, N.; Ahuja, U. y col. (2005). *AtCCMH, an essential component of the c-type cytochrome maturation pathway in Arabidopsis mitochondria, interacts with apocytochrome c*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- Meyer, E.H.; Solheim, C.; Tanz, S.K.; Bonnard, G. y Millar A.H. (2011). *Insights into the composition and assembly of the membrane arm of plant complex I through analysis of subcomplexes in Arabidopsis mutant lines*. J. Biol. Chem. 286: 26081–26092
- Meyer, E.H.; Tomaz, T.; Carroll, A.J.; Estavillo, G.; Delannoy, E. y col. (2009). *Remodeled respiration in ndufs4 with low phosphorylation efficiency suppresses Arabidopsis germination and growth and alters control of metabolism at night*. Plant Physiol. 151: 603–619
- Meyer, E.H.; Taylor, N.L. y Millar, A.H. (2008). *Resolving and identifying protein components of plant mitochondrial respiratory complexes using three dimensions of gel electrophoresis*. J. Proteome Res 7(2): 786-794.
- Michalecka, A.M.; Svensson, A.S.; Johansson, F.I.; Agius, S.C.; Johanson, U. y col. (2003). *Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light*. Plant Physiol. 133: 642–52
- Michel, A.H. y Kornmann, B. (2012). *The ERMES complex and ER-mitochondria connections*. Biochem. Soc. Trans. 40: 445-450.
- Milenkovic, D.; Gabriel, K.; Guiard, B.; Schulze-Specking, A.; Pfanner, N. y Chacinska, A. (2007). *Biogenesis of the Essential Tim9–Tim10 Chaperone Complex of Mitochondria: SITE-SPECIFIC RECOGNITION OF CYSTEINE RESIDUES BY THE INTERMEMBRANE SPACE RECEPTOR Mia40*. J. Biol. Chem. 282: 22472-22480.
- Millar, A.H. y Leaver, C.J. (2000). *The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria*. FEBS Lett. 481: 117-121.
- Millar, A.H.; Eubel, H.; Jansch, L., Kruff, V.; Heazlewood, J.L. y Braun, H.P. (2004). *Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits*. Plant. Mol. Biol. 56: 77-90.
- Millar, A.H.; Sweetlove, L.J.; Giege, P. y Leaver, C.J. (2001). *Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome*. Plant Physiol. 127: 1711-1727

- Millar, A.H.; Whelan, J.; Soole, K.L. y Day, D.A. (2011). *Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants*. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 62: 79-104.
- Miller, G.; Schlauch, K.; Tam, R.; Cortes, D.; Torres, M.A.; y col. (2013). *The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli*. 2: ra45
- Mogi, T.; Saiki, K. y Anraku Y. (1994). *Biosynthesis and functional role of haem O and haem A*. *Molecular Microbiology*. 14: 391–398
- Moller, I.M. (2001). *PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561-591.
- Moller, I.M. y Sweetlove, L.J. (2010). *ROS signalling--specificity is required*. *Trends plant sci.* 15: 370-374
- Moore, A.L. y Albury, M.S. (2008). *Further insights into the structure of the alternative oxidase: from plants to parasites*. *Biochem. Soc. Trans.* 36: 1022-1026
- Moore, A.L.; Shiba, T.; Young, L.; Harada, S.; Kita, K. y Ito, K. (2013). *Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase*. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 64: 637-663.
- Moreno-Sanchez, R.; Hernandez-Esquivel, L.; Rivero-Segura, N.A.; Marin-Hernandez, A.; Neuzil, J. y col. (2013). *Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I*. *FEBS J.* 280: 927-938.
- Morgan, M.J.; Lehmann, M.; Schwarzlander, M.; Baxter, C.J.; Sienkiewicz-Porzucek, A.; y col. (2008). *Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis*. *Plant Physiol.* 147: 101-114.
- Mufarrege, E.F.; Curi, G.C. y Gonzalez, D.H. (2009). *Common sets of promoter elements determine the expression characteristics of three Arabidopsis genes encoding isoforms of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 6b*. *Plant Cell Physiol* 50: 1393- 1399.
- Mumberg, D.; Müller, R. y Funk M. (1995). *Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds*. *Gene.* 156: 119-122.

- Murcha, M.W.; Lister, R.; Ho, A.Y.Y. y Whelan, J. (2003). *Identification, Expression, and Import of Components 17 and 23 of the Inner Mitochondrial Membrane Translocase from Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131: 1737-1747.
- Murcha, M.W.; Wang, Y. y Whelan, J. (2012). *A molecular link between mitochondrial preprotein transporters and respiratory chain complexes*. *Plant Signal Behav* 7: 1594-1597.
- Murcha, M.W.; Wang, Y.; Narsai, R. y Whelan, J. (2014). *The plant mitochondrial protein import apparatus - the differences make it interesting*. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1233-1245.
- Muschietti, J.; Dircks, L.; Vancanneyt, G.; y McCormick, S. (1994). *LAT52 protein is essential for tomato pollen development: Pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization*. *Plant J.* 6: 321-338
- Nakagawa, T.; Suzuki, T.; Murata, S.; Nakamura, S.; Hino, T. y col. (2007). *Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 2095-2100
- Nam, H.G. (1997). *The molecular genetic analysis of leaf senescence*. *Curr Opin Biotechnol.* 8, 200–207.
- Navrot, N.; Rouhier, N.; Gelhaye, E. y Jacquot, J-P. (2007). *Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria*. *Physiol. Plant.* 129: 185-195.
- Nelson, B.K.; Cai, X. y Nebenführ, A. (2007). *A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants*. *Plant J.* 51: 1126-1136
- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D. y Ehrhardt, W. (1988). *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250*. *Electrophoresis* 6: 255–262
- Neupert, W. y Herrmann, J.M. (2007). *Translocation of proteins into mitochondria*. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 723-749.

- Ng, S.; De Clercq, I.; Van Aken, O.; Law, S.R.; Ivanova, A. y col. (2014). *Anterograde and retrograde regulation of nuclear genes encoding mitochondrial proteins during growth, development, and stress*. Mol. Plant. 7: 1075–1093
- Ng, S.; Ivanova, A.; Duncan, O.; Law, S.R.; Van Aken, O. y col. (2013). *A membrane-bound NAC transcription factor, ANAC017, mediates mitochondrial retrograde signaling in Arabidopsis*. Plant Cell 25: 3450–3471
- Ng, S.; Giraud, E.; Duncan, O.; Law, S.R.; Wang, Y. y col. (2013a). *Cyclin-dependent kinase E1 (CDKE1) provides a cellular switch in plants between growth and stress responses*. J. Biol. Chem. 288: 3449-3459.
- Nijtmans, L.G.J.; Taanman, J.W.; Muijsers, A.O.; Speijer, D.; Van den Bogert, C. (1998). *Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells*. Eur. J. Biochem. 254: 389-394.
- Nobrega, M.P., Nobrega, F.G, y Tzagoloff, A. (1990). *COX10 codes for a protein homologous to the ORF1 product of Paracoccus denitrificans and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase*. J. Biol. Chem. 265: 14220–14226
- Ostaszewska, M.; Juszczuk, I.M.; Kolodziejek, I. y Rychter, A.M. (2014). *Long-term sulphur starvation of Arabidopsis thaliana modifies mitochondrial ultrastructure and activity and changes tissue energy and redox status*. J. Plant Physiol. 171: 549-558.
- Oswald, C.; Krause-Buchholz, U. y Rödel, G. (2009). *Knockdown of human COX17 affects assembly and supramolecular organization of cytochrome c oxidase*. J. Mol. Biol. 389: 470–479.
- Page, T.; Griffiths, G. y Buchanan-Wollaston, V. (2001). *Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli*. Plant Physiol. 125: 718–727
- Palaniswamy, S.K.; James, S.; Sun, H.; Lamb, R.S.; Davuluri, R.V. y Grotewold, E. (2006). *AGRIS and AtRegNet: A platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks*. Plant Physiol. 140: 818-829.
- Palmer, C.S.; Osellame, L.D.; Stojanovski, D. y Ryan, M.T. (2011). *The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery*. Cell. Signal. 23: 1534-1545

- Palumma, P.; Kangur, L.; Voronova, A. y Sillard, R. (2004). *Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase*. *Biochem. J.* 382, 307–314.
- Pecina, P.; Houstková, H.; Hansíková, H.; Zeman, J. y Houstek, J. (2004). *Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly*. *Physiol. Res.* 53: 213-223.
- Peters, K.; Niessen, M.; Peterhänsel, C.; Späth, B.; Hölzle, A. y col. (2012). *Complex I-complex II ratio strongly differs in various organs of Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 79: 273–284
- Piattoni, C.V.; Guerrero, S.A. y Iglesias AA. (2013). *A Differential Redox Regulation of the Pathways Metabolizing Glyceraldehyde-3-Phosphate Tunes the Production of Reducing Power in the Cytosol of The Plant Cells*. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 8073-8092
- Pierrel, F.; Khalimonchuk, O.; Cobine, P.A.; Bestwick, M. y Winge D.R. (2008). *Coa2 is an assembly factor for yeast cytochromecoxidase biogenesis that facilitates the maturation of Cox1*. *Mol. Cell. Biol.* 28: 4927–4939
- Porra, R.J. (2002). *The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b*. *Photosynth. Res.* 73: 149–156
- Poyton, R.O. y McEwen, J.E. (1996). *Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes*. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 563-607.
- Radin, I.; Mansilla, N.; Rödel, G. y Steinebrunner, I. (2015). *The Arabidopsis COX11 Homolog is Essential for Cytochrome c Oxidase Activity*. *Front. Plant Sci.* 6: 1–17
- Ramirez-Aguilar, S.J.; Keuthe, M.; Rocha, M.; Fedyaev, V.V.; Kramp, K. y col. (2011). *The composition of plant mitochondrial supercomplexes changes with oxygen availability*. *J. Biol. Chem.* 286: 43045-43053.
- Rao, R.S.P.; Salvato, F.; Thal, B.; Eubel, H.; Thelen, J.J. y Møller I.M. (2017). *The proteome of higher plant mitochondria*. *Mitochondrion.* 33: 22-37.
- Rasmusson, A.G.; Soole, K.L. y Elthon, T.E. (2004). *Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria*. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 23-39.
- Rasmusson, A.G. y Wallström, S.V. (2010). *Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels*. *Biochem Soc Trans.* 38: 661-6.
- Rasmusson, A.G.; Fernie, A.R. y van Dongen, J.T. (2009). *Alternative oxidase: a*

- defence against metabolic fluctuations?*. *Physiol. Plant.* 137: 371-382
- Rayirath, P.; Benkel, B.; Mark Hodges, D.; Allan-Wojtas, P.; Mackinnon, S. y col. (2009). *Lipophilic components of the brown seaweed, Ascophyllum nodosum, enhance freezing tolerance in Arabidopsis thaliana.* *Planta* 230: 135–147
- Rhoads, D.M.; Umbach, A.L.; Subbaiah, C.C. y Siedow, J.N. (2006). *Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling.* *Plant Physiol.* 141: 357-366
- Ribichich, K.F.; Tioni, M.F.; Chan, R.L. y Gonzalez, D.H. (2001). *Cell-type-specific expression of plant cytochrome c mRNA in developing flowers and roots.* *Plant Physiol.* 125: 1603-1610
- Rintamaki, E.; Lepisto, A. y Kangasjarvi, S. (2009). *Implication of chlorophyll biosynthesis on chloroplast-to-nucleus retrograde signaling.* *Plant Signal. Behav.* 4: 545-547.
- Robinson, N.J. y Winge, D.R. (2010). *Copper metallochaperones.* *Annu. Rev. Biochem.* 79: 537-562.
- Rurek, M. (2014). *Plant mitochondria under a variety of temperature stress conditions.* *Mitochondrion.* 19, Part B: 289-294
- Saiki, K.; Mogi, T. y Anraku, Y. (1992). *Heme O biosynthesis in Escherichia coli: the cyoE gene in the cytochrome bo operon encodes a protoheme IX farnesyltransferase.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1491–1497
- Saiki, K.; Mogi, T.; Ogura, K. y Ankaru, Y. (1993). *In vitro heme o synthesis by the cyoE gene product from Escherichia coli.* *J. Biol. Chem.* 268: 26041-26045
- Sandalio, L.M.; Rodríguez-Serrano, M. y Romero-Puertas, M.C. (2016). *Leaf epinasty and auxin: A biochemical and molecular overview.* *Plant Sci* 253: 187-193
- Schertl, P. y Braun, H.P. (2014). *Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria.* *Front Plant Sci* 5: 163.
- Schimo, S.; Wittig, I.; Pos, K.M. y Ludwig, B. (2017). *Cytochrome c Oxidase Biogenesis and Metallochaperone Interactions: Steps in the Assembly Pathway of a Bacterial Complex.* *PLoS One.* 12: e0170037
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E. y col. (2012). *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.* *Nat Methods.* 9, 676-82

- Schwacke, R.; Schneider, A.; van der Graaff, E.; Fischer, K.; Catoni, E. y col. (2003). *ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins*. *Plant Physiol.* 131: 16-26
- Schwarzländer, M.; y Finkemeier, I. (2013). *Mitochondrial Energy and Redox Signaling in Plants*. *Antioxid. Redox Signal.* 18: 2122-2144.
- Schwarzlander, M.; König, A.C.; Sweetlove, L.J. y Finkemeier, I. (2012). *The impact of impaired mitochondrial function on retrograde signalling: a meta-analysis of transcriptomic responses*. *J. Exp. Bot.* 63: 1735-1750.
- Schwarzländer, M.; Logan, D.C.; Johnston, I.G.; Jones, N.S.; Meyer, A.J. y col. (2012). *Pulsing of Membrane Potential in Individual Mitochondria: A Stress-Induced Mechanism to Regulate Respiratory Bioenergetics in Arabidopsis*. *Plant cell.* 24: 1188-201
- Seib, K.L.; Jennings, M.P. y McEwan, A.G. (2003). *A Sco homologue plays a role in defence against oxidative stress in pathogenic Neisseria*. *FEBS Lett.* 546: 411–415.
- Selinski, J.; Hartmann, A.; Kordes, A.; Deckers-Hebestreit, G.; Whelan, J. y Scheibe R. (2017). *Analysis of post-translational activation of alternative oxidase isoforms*. *Plant Physiol* 61: pp.00681.2017
- Sena, L.A. y Chandel, N.S. (2012). *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. *Mol Cell.* 48: 158-167.
- Senkler, J.; Senkler, M.; Eubel, H.; Hildebrandt, T.; Lengwenus, C. y col. (2017). *The mitochondrial complexome of Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 89: 1079–1092
- Senkler, M.; Braun, H-P. (2012). *Functional Annotation of 2D Protein Maps: The GelMap Portal*. *Front Plant Sci* 3: 87
- Shaikhali, J.; Heiber, I.; Seidel, T.; Stroher, E.; Hiltcher, H. y col. (2008). *The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes*. *BMC Plant Biol.* 8: 48
- Shaikhali, J.; Noren, L.; de Dios Barajas-Lopez, J.; Srivastava, V.; König, J. y col. (2012). *Redox-mediated mechanisms regulate DNA binding activity of the G-group of asic region leucine zipper (bZIP) transcription factors in Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 287: 27510-27525.

- Sharma, P.; Jha, A.B.; Dubey, R.S. y Pessaraki, M. (2012). *Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions*. J. Bot. 2012, doi:10.1155/2012/217037.
- Sierla, M.; Rahikainen, M.; Salojarvi, J.; Kangasjarvi, J. y Kangasjarvi, S. (2013). *Apoplasmic and chloroplastic redox signaling networks in plant stress responses*. Antioxid. Redox Signal. 18: 2220-2239.
- Skirycz, A.; De Bodt, S.; Obata, T.; De Clercq, I.; Claeys, H. y col. (2010). *Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress*. Plant Physiol. 152: 226-244.
- Smith, C.; Barthet, M.; Melino, V.; Smith, P.; Day, D. y Soole K. (2011). *Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H Dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress*. Plant Cell Physiol 52: 1222–1237
- Smith, A.M.O.; Ratcliffe, R.G. y Sweetlove, L.J. (2004). *Activation and Function of Mitochondrial Uncoupling Protein in Plants*. J. Biol. Chem. 279: 51944-51952
- Soto, D.; Córdoba, J.P.; Villarreal, F.; Bartoli, C.; Schmitz, J. y col. (2015). *Functional characterization of mutants affected in the carbonic anhydrase domain of the respiratory complex I in Arabidopsis thaliana*. Plant J. 83: 831–844
- Soto, I.C.; Fontanesi, F.; Liu, J. y Barrientos, A. (2012). *Biogenesis and assembly of eukaryotic cytochrome c oxidase catalytic core*. Biochim Biophys Acta. 1817: 883–897
- Soubannier, V. y McBride, H.M. (2009). *Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades*. Biochim Biophys Acta 1793: 154-170.
- Stan, T.; Ahting, U.; Dembowski, M.; Künkele, K.-P.; Nussberger, S.; y col. (2000). *Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria*. EMBO J. 19: 4895-4902.
- Staneloni, R.J.; Rodriguez-Batiller, M.J. y Casal, J.J. (2008). *Abscisic acid, high-light, and oxidative stress down-regulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation*. Mol Plant 1: 75-83.
- Steinebrunner, I.; Gey, U.; Andres, M.; Garcia, L. y Gonzalez, D.H. (2014). *Divergent*

- functions of the Arabidopsis mitochondrial SCO proteins: HCC1 is essential for COX activity while HCC2 is involved in the UV-B stress response.* Front Plant Sci. 5:87.
- Steinebrunner, I.; Landschreiber, M.; Krause-Buchholz, U.; Teichmann, J. y Rödel G. (2011). *HCC1, the Arabidopsis homologue of the yeast mitochondrial copper chaperone SCO1, is essential for embryonic development.* J. Exp. Bot. 62: 319–330
- Stuart, R.A. (2008). *Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria.* J. Bioenerg. Biomembr. 40: 411-417.
- Su, C.H.; McStay, G.P. y Tzagoloff, A. (2014). *The Cox3p assembly module of yeast cytochrome oxidase.* Mol. Biol. Cell. 25: 965–976.
- Sunderhaus, S.; Dudkina, N.V.; Jansch, L.; Klodmann, J.; Heinemeyer, J.; y col. (2006). *Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants.* J. Biol. Chem. 281: 6482-6488.
- Svensson-Ek, M.; Abramson, J.; Larsson, G.; Tornroth, S.; Brzezinski, P. y Iwata, S. (2002). *The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from Rhodobacter sphaeroides.* J. Mol. Biol. 321: 329-339.
- Sweetlove, L.J.; Beard, K.F.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A.R. y Ratcliffe, R.G. (2010). *Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle.* Trends plant sci. 15: 462-470.
- Szabados, L. y Savoure, A. (2010). *Proline: a multifunctional amino acid.* Trends plant sci. 15: 89-97.
- Szarka, A., Banhegyi, G. y Asard, H. (2013). *The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration.* Antioxid. Redox Signal. 19: 1036-1044
- Takahashi, Y.; Kako, K.; Kashiwabara, S.; Takehara, A.; Inada, Y. y col. (2002). *Mammalian copper chaperone Cox17p has an essential role in activation of cytochrome C oxidase and embryonic development.* Mol. Cell. Biol. 22: 7614-7621.
- Taylor, N.L.; Heazlewood, J.L. y Millar, A.H. (2011). *The Arabidopsis thaliana 2-D gel mitochondrial proteome: Refining the value of reference maps for assessing*

- protein abundance, contaminants and post-translational modifications*. Proteomics 11: 1720-1733
- Taylor, N.L.; Howell, K.A.; Heazlewood, J.L.; Tan, T.Y.; Narsai, R. y col. (2010). *Analysis of the rice mitochondrial carrier family reveals anaerobic accumulation of a basic amino acid carrier involved in arginine metabolism during seed germination*. Plant Physiol. 154: 691-704.
- Terziyska, N.; Grumbt, B.; Bien, M.; Neupert, W.; Herrmann, J.M. y Hell, K. (2007). *The sulfhydryl oxidase Erv1 is a substrate of the Mia40-dependent protein translocation pathway*. FEBS Lett. 581: 1098-1102.
- Thöny-Meyer, L. 2003. *A Heme Chaperone for cytochrome c biosynthesis*. Biochemistry. 42: 13099-13105
- Truscott, K.N.; Wiedemann, N.; Rehling, P.; Müller, H.; Meisinger, C. y col. (2002). *Mitochondrial Import of the ADP/ATP Carrier: the Essential TIM Complex of the Intermembrane Space Is Required for Precursor Release from the TOM Complex*. Mol. Cell. Biol. 22: 7780-7789.
- Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H. y col. (1995). *Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å*. Science. 269: 1069-1074.
- Twell, O.; Yamaguchi, J.; Wing, R.A.; Ushiba, J. y McCormick, S. (1991). *Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements*. Genes Dev. 5: 496-507.
- Uberti-Manassero, N.G.; Lucero, L.E.; Viola, I.L.; Vegetti, A.C. y Gonzalez, D.H. (2012). *The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins*. J. Exp. Bot. 63: 809-823.
- Uberti-Manassero, N.G.; Viola, I.; Welchen, E. y Gonzalez, D.H. (2013). *TCP transcription factors: architectures of plant form*. Biomol Concepts 4: 111-27.
- Umbach, A.L. y Siedow, J.N. (2000). *The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi Pichia stipitis and Neurospora crassa are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme*. Arch Biochem Biophys. 378: 234-245.

- Umbach, A.L.; Fiorani, F. y Siedow, J.N. (2005). *Characterization of transformed Arabidopsis with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue*. Plant Physiol. 139: 1806-1820.
- Umbach, A.L.; Ng, V.S. y Siedow, J.N. (2006). *Regulation of plant alternative oxidase activity: A tale of two cysteines*. Biochim Biophys Acta. 1757: 135-142.
- Unseld, M.; Marienfeld, J.R.; Brandt, P. y Brennicke, A. (1997). *The mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana contains 57 genes in 366,924 nucleotides*. Nat Genet. 15: 57–61
- Valnot, I.; von Kleist-Retzow, J.C.; Barrientos, A.; Gorbatyuk, M.; Taanman, J.W. y col. (2000). *A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene COX10 causes cytochrome c oxidase deficiency*. Hum. Mol. Genet. 9: 1245–1249.
- Van Aken, O. y Whelan, J. (2012). *Comparison of transcriptional changes to chloroplast and mitochondrial perturbations reveals common and specific responses in Arabidopsis*. Front Plant Sci 3: 281.
- Van Aken, O.; Giraud, E.; Clifton, R. y Whelan, J. (2009a). *Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses*. Physiol. Plant. 137: 354-361.
- Van Aken, O.; Whelan, J. y Van Breusegem, F. (2010). *Prohibitins: mitochondrial partners in development and stress response*. Trends plant sci. 15: 275-282.
- Van Aken, O.; Zhang, B.; Carrie, C.; Uggalla, V.; Paynter, E. y col. (2009b). *Defining the mitochondrial stress response in Arabidopsis thaliana*. Mol Plant. 2: 1310-1324.
- Van Aken, O.; Zhang, B.; Law, S.; Narsai, R. y Whelan, J. (2013). *AtWRKY40 and AtWRKY63 Modulate the Expression of Stress-Responsive Nuclear Genes Encoding Mitochondrial and Chloroplast Proteins*. Plant Physiol. 162: 254-271.
- van der Graaff, E.; Schwacke, R.; Schneider, A.; Desimone, M.; Flugge, U.I. y Kunze R. (2006). *Transcription analysis of Arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence*. Plant Physiol. 141: 776–92.
- van der Laan, M.; Hutu, D.P. y Rehling, P. (2010). *On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase*. Biochim Biophys Acta 1803: 732-739.

- van Dongen, J.T.; Gupta, K.J.; Ramirez-Aguilar, S.J.; Araujo, W.L.; Nunes-Nesi, A. y Fernie, A.R. (2011). *Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways*. J Plant Physiol. 168: 1434-1443.
- Vanderauwera, S.; Vandenbroucke, K.; Inze, A.; van de Cotte, B.; Muhlenbock, P. y col. (2012). *AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 109: 20113- 20118.
- Vanlerberghe, G.C.; Robson, C.A. y Yip, J.Y. (2002). *Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death*. Plant Physiol. 129: 1829–1842
- Vanlerberghe, G.C. (2013). *Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants*. Int. J. Mol. Sci. 14: 6805-6847.
- Vanlerberghe, G.C. y McLntosh, L. (1996). *Signals Regulating the Expression of the Nuclear Gene Encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria*. Plant Physiol. 111: 589-595.
- Vanlerberghe, G.C.; Cvetkovska, M. y Wang, J. (2009). *Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase?* Physiol. Plant. 137: 392-406
- Vercesi, A.E.; Borecky, J.; Maia Ide, G.; Arruda, P.; Cuccovia, I.M. y Chaimovich, H. (2006). *Plant uncoupling mitochondrial proteins*. Annu Rev Plant Biol. 57: 383-404
- Vercesi, A.E.; Martins, I.S.; Silva, M.A.P.; Leite, H.M.F.; Cuccovia, I.M. y Chaimovich, H. (1995). *PUMPing plants*. Nature. 375: 24-24
- Vestergaard, C.L.; Flyvbjerg, H. y Moller, I.M. (2012). *Intracellular signaling by diffusion: can waves of hydrogen peroxide transmit intracellular information in plant cells?* Front Plant Sci 3: 295
- Vicente-Carbajosa, J.; Moose, S.P.; Parsons, R.L. y Schmidt, R.J. (1997). *A maize zinc-finger protein binds the prolamins box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S

A. 94: 7685–7690

- Vickers, C.E.; Gershenzon, J.; Lerdau, M. y Loreto, F. (2009). *A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress*. Nat. Chem. Biol. 5: 283-91
- Viola, I.L.; Guttlein, L.N. y Gonzalez, D.H. (2013). *Redox modulation of plant developmental regulators from the class I TCP transcription factor family*. Plant Physiol. 162: 1434-1447
- Vishwakarma, A.; Tetali, S.D.; Selinski, J.; Scheibe, R. y Padmasree K. (2015). *Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in Arabidopsis thaliana*. Ann. Bot. 116: 555–569
- Vogtle, F.N.; Wortelkamp, S.; Zahedi, R.P.; Becker, D.; Leidhold, C. y col. (2009). *Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability*. Cell 139: 428-439
- Voronova, A.; Kazantseva, J.; Tuuling, M.; Sokolova, N.; Sillard, R. y Palumaa, P. (2007). *Cox17, a copper chaperone for cytochrome c oxidase: expression, purification, and formation of mixed disulphide adducts with thiol reagents*. Prot. Exp. Purif. 53: 138–144.
- Waadt, R.; Schlücking, K.; Schroeder, J.I. y Kudla, J. (2014). *Protein fragment bimolecular fluorescence complementation analyses for the in vivo study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations*. Methods Mol. Biol. 1062: 629–658
- Wallstrom, S.V.; Florez-Sarasa, I.; Araujo, W.L.; Aidemark, M.; Fernandez-Fernandez, M. y col. (2014a). *Suppression of the external mitochondrial NADPH dehydrogenase, NDB1, in Arabidopsis thaliana affects central metabolism and vegetative growth*. Mol. Plant. 7: 356-368.
- Wallstrom, S.V.; Florez-Sarasa, I.; Araujo, W.L.; Escobar, M.A.; Geisler, D.A. y col. (2014b). *Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis thaliana modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport*. Plant Cell Physiol. 55: 881-896.
- Wang, J.Y.; Sarker, A.H.; Cooper, P.K. y Volkert, M.R. (2004). *The Single Strand DNA*

- Binding Activity of Human PC4 Prevents Mutagenesis and Killing by Oxidative DNA Damage.* Mol. Cell. Biol. 24: 6084-6093.
- Wang, Z.; Wang, Y. y Hegg, E.L. (2009). *Regulation of the heme A biosynthetic pathway differential regulation of heme A synthase and heme O synthase in Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. 284: 839–847.
- Wang, Y.; Carrie, C.; Giraud, E.; Elhafez, D.; Narsai, R. y col. (2012). *Dual location of the mitochondrial preprotein transporters B14.7 and Tim23-2 in complex I and the TIM17:23 complex in Arabidopsis links mitochondrial activity and biogenesis.* Plant cell. 24: 2675-2695.
- Welchen, E. y Gonzalez, D.H. (2005). *Differential expression of the Arabidopsis cytochrome c genes Cytc-1 and Cytc-2 Evidence for the involvement of TCP domain protein-binding elements in anther- and meristem-specific expression of the Cytc-1 gene.* Plant Physiol. 139, 88-100.
- Welchen, E. y Gonzalez, D.H. (2006). *Overrepresentation of elements recognized by TCP-domain transcription factors in the upstream regions of nuclear genes encoding components of the mitochondrial oxidative phosphorylation machinery.* Plant Physiol. 141: 540-545.
- Welchen, E.; Chan, R.L. y Gonzalez, D.H. (2004). *The promoter of the Arabidopsis nuclear gene COX5b-1, encoding subunit 5b of the mitochondrial cytochrome c oxidase, directs tissue-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements.* J. Exp. Bot. 55: 1997-2004.
- Welchen, E.; Hildebrandt, T.M.; Lewejohann, D.; Gonzalez, D.H. y Braun, H.P. (2012). *Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III.* Biochim Biophys Acta. 1817: 990-1001.
- Welchen, E. y Chan, R.L. y Gonzalez, D.H. (2002). *Metabolic regulation of genes encoding cytochrome c and cytochrome c oxidase subunit Vb in Arabidopsis.* Plant Cell Environ. 25: 1605-1615.
- Welchen, E.; Garcia, L.; Mansilla, N. y Gonzalez, D.H. (2014). *Coordination of plant mitochondrial biogenesis: keeping pace with cellular requirements.* Front Plant Sci 4: 551.

- Welchen, E.; Viola, I.L.; Kim, H.J.; Prendes, L.P.; Comelli, R.N. y col. (2009). *A segment containing a G-box and an ACGT motif confers differential expression characteristics and responses to the Arabidopsis Cyt c-2 gene, encoding an isoform of cytochrome c*. J. Exp. Bot. 60: 829-845.
- Werhahn, W. y Braun, H.P. (2002). *Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from Arabidopsis thaliana by three-dimensional gel electrophoresis*. Electrophoresis 23: 640-646.
- Willems, P.; Mhamdi, A.; Simon, S.; Storme, V.; Kerchev, P.I. y col. (2016). *The ROS Wheel: refining ROS transcriptional footprints in Arabidopsis*. Plant Physiol 171: 1720–1733.
- Williams, J.C.; Sue, C.; Banting, G.S.; Yang, H.; Glerum, D.M. y col. (2005). *Crystal structure of human SCO1: implications for redox signaling by a mitochondrial cytochrome c oxidase ‘assembly’ protein*. J. Biol. Chem. 280: 15202–15211.
- Wintz, H.; y Vulpe, C. (2002). *Plant copper chaperones*. Biochem. Soc. Trans. 30: 732–735.
- Wittig, I.; Braun, H.P. y Schägger, H. (2006). *Blue-native PAGE*. Nat Protoc. 1: 418–428.
- Wittig, I.; Carrozzo, R.; Santorelli, F.M. y Schägger H. (2007). *Functional assays in high resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines*. Electrophoresis. 28: 3811–3820.
- Wu, C.; Washida, H.; Onodera, Y.; Harada, K. y Takaiwa F. (2000). *Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACAA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression*. Plant J. 23: 415–421.
- Xiang, D.; Venglat, P.; Tibiche, C.; Yang, H.; Risseuw, E. y col. (2011). *Genome wide analysis reveals gene expression and metabolic network dynamics during embryo development in Arabidopsis*. Plant Physiol. 156: 346-56.
- Xu, L.; Carrie, C.; Law, S.R.; Murcha, M.W. y Whelan, J. (2013). *Acquisition, conservation, and loss of dual-targeted proteins in land plants*. Plant Physiol. 161: 644-662
- Yamamoto, H.; Fukui, K.; Takahashi, H.; Kitamura, S.; Shiota, T. y col. (2009). *Roles*

- of Tom70 in import of presequence-containing mitochondrial proteins.* J. Biol. Chem. 284: 31635-31646.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., Pilon, M., 2007. *Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis.* J. Biol. Chem. 282: 16369–16378.
- Ye, H.; Liu, S.; Tang, B.; Chen, J.; Xie, Z. y col. (2017) *RD26 mediates crosstalk between drought and brassinosteroid signalling pathways.* Nat. Commun. 8: 14573
- Yoshida, K. y Noguchi, K. (2011). *Interaction Between Chloroplasts and Mitochondria: Activity, Function, and Regulation of the Mitochondrial Respiratory System during Photosynthesis.* En: Plant Mitochondria (Eds.: Kempken, F.). Springer New York, p. 383-409.
- Yoshinaga, K.; Arimura, S.; Niwa, Y.; Tsutsumi, N.; Uchimiya, H. y Kawai-Yamada, M. (2005). *Mitochondrial behaviour in the early stages of ROS stress leading to cell death in Arabidopsis thaliana.* Annals of botany 96: 337-342.
- Zerbes, R.M.; van der Klei, I.J.; Veenhuis, M., Pfanner, N.; van der Laan, M. y Bohnert, M. (2012). *Mitofilin complexes: conserved organizers of mitochondrial membrane architecture.* Biol. Chem. 393: 1247-1261.
- Zhang, B.; Van Aken, O.; Thatcher, L.; De Clercq, I.; Duncan, O.; y col. (2014). *The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in Arabidopsis thaliana.* Plant J. 80: 709–727
- Zhang X.; Ivanova A.; Vandepoele, K.; Radomiljac, J.D.; Van de Velde, J.; y col. (2017). *The transcription factor MYB29 is a regulator of ALTERNATIVE OXIDASE 1.* Plant Physiol. 173:1824-1843.
- Zhu, Q.; Dugardeyn, J.; Zhang C.; Mühlenbock, P.; Eastmond, P.J. y col. (2014). *The Arabidopsis thaliana RNA editing factor SLO2, which affects the mitochondrial electron transport chain, participates in multiple stress and hormone responses.* Mol. Plant. 7: 290–310.
- Zottini, M.; Barizza, E.; Bastianelli, F.; Carimi, F. y Lo Schiavo, F. (2006). *Growth and senescence of Medicago truncatula cultured cells are associated with characteristic mitochondrial morphology.* New Phytol 172: 239-247