



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario

**“Estudio del metabolismo de compuestos  $C_4$  en plantas  $C_3$  modificando los niveles de las enzimas involucradas en diversos sistemas biológicos”**

Tesis para optar al título de  
**Doctora en Ciencias Biológicas**

**Lic. Mariana Beatriz Badia**

Directora: Dra. María Fabiana Drincovich  
Codirectora: Dra. Mariel C. Gerrard Wheeler

Rosario - Argentina  
2016

# **“Estudio del metabolismo de compuestos C<sub>4</sub> en plantas C<sub>3</sub> modificando los niveles de las enzimas involucradas en diversos sistemas biológicos”**

Mariana Beatriz Badia

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI-CONICET), dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril del 2011 y el 3 de febrero de 2016, bajo la dirección de la Dra. María Fabiana Drincovich y la codirección de la Dra. Mariel Claudia Gerrard Wheeler.



Mariana Beatriz Badia

DNI 32.125.570

*A Amelia, José y Nicolás*

## **Agradecimientos**

*Este espacio está dedicado a expresar mi sincero agradecimiento hacia todos los que de alguna forma han colaborado en la realización de esta Tesis.*

*Quiero agradecer a CONICET, ya que sin la beca doctoral otorgada este trabajo no hubiera sido posible, y a la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas por brindar una educación de calidad tanto para mi formación de grado como de posgrado.*

*A mis Directoras de Tesis, Fabiana y Mariel, por acompañarme y guiarme con paciencia y dedicación, y darme consejos y ayuda cuando lo necesité.*

*Al CEFODI y todos sus miembros, y en especial al Dr. Carlos Andreo, por permitirme formar parte de su grupo de Investigación.*

*A mis Tutoras de Tesis, las Dras. Claudia Spampinato y Mariana Martin, por su buena predisposición para evaluar año a año los avances de esta Tesis.*

*Al Dr. van Maris y su equipo, por el trabajo en colaboración realizado.*

*A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio Subsuelo, por estar siempre dispuestos a brindar ayuda y por generar un ambiente muy agradable para trabajar. Fue un placer recorrer este camino a su lado.*

*Muy especialmente a Lau, Evi, Clau, Cin, Agus, Sil, Juan, Mau, Adri, Pitu, Gino, Walter, Vale, Pablo, Cami, Nery, Ger, Tati, Flor y Romi, porque las charlas, reuniones, salidas y viajes que compartimos fueron una parte muy linda de esta etapa que no voy a olvidar.*

*A la familia y amigos que me han escuchado y alentado en los momentos difíciles. En especial, a Debo, Vicky, Mari, Axel, Vicky, Flor y Lucho.*

*A Jose, Héctor, Jesi, Fede y Beto por brindarme su cariño y estar siempre. A Eial, por sus sonrisas que iluminan.*

*A mi mamá y mi papá, quienes han hecho lo imposible para darme todo. A ellos, gracias por enseñarme el valor del esfuerzo, y por confiar en mis decisiones.*

*A Nico, por estar junto a mí en todo momento y hacer más felices mis días.*

## ***Publicaciones***

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral fueron dados a conocer en publicaciones y presentaciones a Congresos, como se detalla a continuación.

### *Publicaciones:*

**M. B. Badia**, C. L. Arias, M. A. Tronconi, V. G. Maurino, C. S. Andreo, M. F. Drincovich y M. C. Gerrard Wheeler (2015) Enhanced cytosolic NADP-ME2 activity in *A. thaliana* affects plant development, stress tolerance and specific diurnal and nocturnal cellular processes. *Plant Sci.* 240: 193-203.

### *Presentaciones a Congresos:*

XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de Funes, Argentina. Octubre de 2011. Póster. "Altered osmotic stress response in *Arabidopsis thaliana* lines with modified levels of malic enzyme" **M. B. Badia**, C. L. Arias, M. A. Tronconi, V. G. Maurino, C. S. Andreo, M. F. Drincovich y M. C. Gerrard Wheeler.

Workshop "Fronteras en Biociencias". Buenos Aires, Argentina. Abril de 2012. Póster. "First insights into the biological role of the major NADP-malic enzyme of *Arabidopsis thaliana*". **M. B. Badia**, C. L. Arias, M. A. Tronconi, V. G. Maurino, C. S. Andreo, M. F. Drincovich y M. C. Gerrard Wheeler.

XLVIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mendoza, Argentina. Octubre de 2012. Póster. "Gain of cytosolic NADP-ME activity impacts on primary metabolism and stress tolerance of *A. thaliana*". **M. B. Badia**, C. L. Arias, M. A. Tronconi, V. G. Maurino, C. S. Andreo, M. F. Drincovich y M. C. Gerrard Wheeler.

XII Congreso de la Asociación Panamericana de Bioquímica y Biología Molecular. Puerto Varas, Chile. Póster. Octubre de 2013. "Loss of function of NADP-malic enzyme 1 results in lower sensitivity to aluminum". **M. B. Badia**, M. C. Gerrard Wheeler, C. S. Andreo y M. F. Drincovich.

XV Congreso Latinoamericano y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mar del Plata, Argentina. Septiembre de 2014. Póster. "Estudio de plantas mutantes en el gen *em-nadp1* con incrementada tolerancia al estrés por aluminio". **M. B. Badia**, M. C. Gerrard Wheeler, C. S. Andreo y M. F. Drincovich.

L Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario, Argentina. Noviembre de 2014. Comunicación oral. "Evidence of *in vivo* pyruvate carboxylase activity for Arabidopsis NADP-malic enzyme". **M. B. Badia**, R. Mans, A. Lis, M. A. Tronconi, C. L. Arias, C. S. Andreo, M. F. Drincovich, A. van Maris y M. C. Gerrard Wheeler.

LI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del Plata, Argentina. Noviembre de 2015. Póster. "Study of the pyruvate carboxylase activity of NADP-malic enzyme in C<sub>3</sub> plants". **M. B. Badia**, C. L. Arias, C. S. Andreo, M. F. Drincovich y M. C. Gerrard Wheeler.

# Índice

<b>Índice .....</b>	<b>i</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>v</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>ix</b>
<b>1 Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ácidos orgánicos C <sub>4</sub> en la fisiología vegetal .....	1
1.2 Roles del malato en plantas.....	1
1.2.1 Rol del malato en la tolerancia a aluminio.....	5
1.3 Enzimas involucradas en el metabolismo del malato en plantas C <sub>3</sub> .....	10
1.4 Enzima málica .....	11
1.4.1 Generalidades.....	11
1.4.2 Funciones propuestas para las enzimas málicas vegetales: respuesta a estrés.....	12
1.4.3 Familia de isoformas EM-NAD(P) de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
1.5 Objetivos.....	19
1.5.1 Objetivo general .....	19
1.5.2 Objetivos específicos .....	19
<b>2 Materiales y métodos .....</b>	<b>20</b>
2.1 Cepas bacterianas y plásmidos .....	20
2.2 Cepas de levadura.....	21
2.3 Líneas vegetales .....	22
2.4 Condiciones de crecimiento vegetal y toma de muestras.....	24
2.5 Determinación de parámetros fenotípicos.....	25
2.6 Cuantificación de pigmentos .....	25
2.7 Medidas de fluorescencia de la clorofila .....	26
2.8 Medidas de intercambio gaseoso .....	26
2.9 Determinación del contenido de nucleótidos de piridina .....	27
2.10 Detección de peróxido de hidrógeno con diaminobencidina.....	28
2.11 Tinción con hematoxilina.....	28
2.12 Preparación de extractos proteicos de <i>Arabidopsis</i> .....	28
2.13 Ensayos de actividad enzimática .....	28

2.13.1	Actividad EM-NADP .....	29
2.13.2	Actividad EM-NAD .....	29
2.13.3	Actividad MDH-NAD .....	29
2.13.4	Actividad MDH-NADP .....	30
2.14	Cuantificación de proteínas .....	30
2.15	Electroforesis de proteínas .....	30
2.15.1	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes .....	30
2.15.2	Electroforesis en condiciones nativas .....	31
2.16	Localización de actividad EM-NADP <i>in situ</i> .....	31
2.17	Cuantificación de transcriptos .....	31
2.17.1	Extracción de ARN total .....	31
2.17.2	Transcripción reversa .....	32
2.17.3	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	32
2.18	Cuantificación de carbohidratos y ácidos orgánicos por métodos enzimáticos.....	34
2.19	Determinación de metabolitos por cromatografía gaseosa seguida de espectrometría de masas (GC-MS) .....	35
2.20	Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico .....	36
2.21	Extracción de ADN plasmídico .....	37
2.22	Digestión de plásmidos y purificación de fragmentos de ADN .....	37
2.23	Clonado de las isoformas EM-NAD(P) de <i>A. thaliana</i> en el vector p416GDP .....	38
2.23.1	Obtención de los ADNc .....	38
2.23.2	Subclonado en el vector p416GPD.....	40
2.24	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con ADN plasmídico .....	41
2.25	Preparación de extractos proteicos de <i>S. cerevisiae</i> .....	41
2.26	Ensayos de complementación de <i>S. cerevisiae</i> .....	42
2.26.1	Cultivo en placas .....	42
2.26.2	Cultivo en medio líquido .....	42
2.26.3	Cultivo en biorreactores.....	43
2.27	Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .....	43
2.27.1	Expresión y purificación de las proteínas de fusión.....	43
2.27.2	Digestión del extremo amino terminal de las proteínas de fusión.....	44
2.27.3	Purificación de EM-NADP luego de la digestión con enteroquinasa .....	45



2.28	Análisis estadístico.....	45
<b>3</b>	<b>Caracterización de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con niveles modificados de EM-NADP2 .....</b>	<b>46</b>
3.1	Estudio fisiológico y molecular de líneas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes de EM-NADP2 .....	46
3.1.1	Análisis de parámetros fenotípicos .....	47
3.1.2	Niveles de actividad y expresión de enzima málica .....	49
3.1.3	Niveles de actividad y expresión de la enzima MDH.....	52
3.1.4	Análisis del estado redox del reservorio de NAD(P).....	54
3.1.5	Análisis del perfil metabólico .....	56
3.1.6	Respuesta de las líneas ante condiciones de estrés osmótico.....	59
3.1.7	Perfil metabólico de plantas sometidas a estrés osmótico.....	60
3.1.8	Análisis del estado redox luego de la exposición a estrés.....	63
3.2	Análisis de plantas mutantes en el gen <i>em-nadp2</i> .....	64
3.3	Discusión .....	70
<b>4</b>	<b>Estudio de la respuesta de líneas de <i>A. thaliana</i> mutantes en EM-NADP a estrés por aluminio .....</b>	<b>75</b>
4.1	Análisis fenotípico de líneas mutantes en <i>em-nadp</i> ante condiciones de estrés por aluminio .....	77
4.2	Niveles de expresión de genes <i>em-nadp</i> .....	80
4.3	Determinación del contenido de malato en la línea <i>em-nadp1</i> .....	83
4.4	Niveles de expresión de genes relacionados a la tolerancia a Al .....	85
4.5	Detección <i>in situ</i> de Al y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en plántulas <i>em-nadp1</i> .....	87
4.6	Respuesta de las plantas <i>em-nadp1</i> ante la presencia de glutamato .....	88
4.7	Discusión .....	90
<b>5</b>	<b>Estudio del rol de la enzima málica en la síntesis de malato <i>in vivo</i> .....</b>	<b>96</b>
5.1	Elección de un sistema <i>in vivo</i> para evaluar la actividad de carboxilación de piruvato de EM-NAD(P) de <i>Arabidopsis</i> .....	97
5.2	Clonado de los ADNc de las diferentes EM-NAD(P) de <i>Arabidopsis</i> en el vector de expresión de levadura .....	100
5.3	Transformación de <i>S. cerevisiae</i> y medidas de actividad .....	102
5.4	Ensayos de complementación .....	103
5.4.1	Crecimiento en cultivos líquidos .....	103

5.4.2	Crecimiento en placas .....	104
5.4.3	Crecimiento en biorreactores.....	106
5.5	Medidas de actividad reversa de enzimas recombinantes.....	109
5.6	Medidas de actividad reversa en extractos vegetales.....	111
5.7	Discusión.....	113
<b>6</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>118</b>

## Abreviaturas

35SCaMV	Promotor del ARN 35S del virus del mosaico del coliflor
$\alpha$ -KG	$\alpha$ -cetogluturato
ABA	Ácido abscísico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ADN-T	ADN de transferencia
Al	Aluminio
ANOVA	Análisis de la varianza
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARS	Secuencias de replicación autónoma
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BD	Borde derecho del ADN-T
BI	Borde izquierdo del ADN-T
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CEN	Región centromérica
CoA	Coenzima A
Col-0	Columbia-0
CRPP	Ciclo reductivo de las pentosas fosfato
DAB	3,3-diaminobencidina
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DEPC	Dietilpirocarbonato

dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EC	Comité de enzimas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EK	Enteroquinasa
EM	Enzima málica
EM-NAD	Enzima málica NAD-dependiente
EM-NADP	Enzima málica NADP-dependiente
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GABA	$\gamma$ -aminobutirato
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
Glu	Glutamato
GOT	Transaminasa glutámico-oxalacética
GPD	G3P deshidrogenasa
GUS	$\beta$ -glucuronidasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPTG	Isopropil- $\beta$ -tiogalactopiranósido
$k_{cat}$	Constante catalítica
kDa	Kilodalton
$K_m$	Constante de Michaelis
LB	Luria Bertani
LED	Diodo emisor de luz
Man	Manitol
MDH	Malato deshidrogenasa
MDH-NAD	Malato deshidrogenasa dependiente de NAD

MDH-NADP	Malato deshidrogenasa dependiente de NADP
Me <sup>2+</sup>	Metal divalente
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
MP	Membrana plasmática
MS	Murashige - Skoog
NAD, NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido, formas oxidada y reducida, respectivamente
NADP, NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido 2'-fosfato, formas oxidada y reducida, respectivamente
NBT	Azul de nitrotetrazolio
n. d.	No detectado
NTA	Ácido nitrilo triacético
OAA	Oxaloacetato
P/V	Peso en volumen
pb	Pares de base
PBS	Fosfato buffer salino
pBSK	pBluescriptSK(-)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pdc	Piruvato descarboxilasa
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	PEP carboxilasa
PEPCK	PEP carboxiquinasa
PF	Peso fresco
PMS	Fenacina metosulfato
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PSII	Fotosistema II
Pyc	Piruvato carboxilasa

qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
RuBisCO	Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
$S_{0,5}$	Concentración de sustrato para la cual se obtiene la mitad de $V_{max}$
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SMC	Sitio de múltiple clonado
TBE	Tris borato EDTA
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TMG	Tris magnesio glicerol
Tricina	N-[2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil]glicina
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminoetano
U	Unidad internacional
UA	Unidad de absorbancia
UV	Ultravioleta
V/V	Volumen en volumen
$V_{máx}$	Velocidad máxima
wt	Salvaje
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
YPD	Levadura peptona dextrosa

## Resumen

El malato es un compuesto  $C_4$  que participa en procesos metabólicos claves para las plantas tales como fotosíntesis, respiración, regulación del pH celular, apertura estomática, nutrición y respuestas de defensa. Su importancia en la fisiología de plantas  $C_3$  hace necesario el estudio de las proteínas involucradas en su metabolismo. Entre ellas se encuentra la enzima málica (EM), que cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato y  $CO_2$ , con la concomitante reducción de NAD(P). En este trabajo se planteó como objetivo general estudiar el metabolismo del malato en plantas de *A. thaliana* utilizando líneas con potenciales cambios en la abundancia de este ácido  $C_4$  dadas por alteraciones en los niveles de enzima málica, en condiciones normales de crecimiento y ante diversas situaciones de estrés.

Plantas de *Arabidopsis* mutantes y sobreexpresantes en la isoforma EM-NADP2 mostraron alteraciones en los perfiles metabólicos y redox, los cuales reflejan una gran relevancia de esta enzima en la homeostasis vegetal. Estos cambios afectaron de manera diferencial a procesos celulares diurnos y nocturnos. A su vez, el aumento de la actividad de EM-NADP2 afectó el desarrollo de la planta y provocó una mayor sensibilidad a condiciones de estrés osmótico.

Además, una línea mutante en el gen que codifica para EM-NADP1 mostró una incrementada tolerancia a la exposición a aluminio, indicando que dicha enzima podría estar implicada en el mecanismo de respuesta a este tipo de estrés, regulando los niveles citosólicos de malato en raíces y/o afectando las vías de señalización involucradas.

Finalmente, se estudió la posible participación de las isoformas EM-NAD(P) de *A. thaliana* en la síntesis de malato *in vivo*. Experimentos de complementación utilizando cepas de levadura mutantes permitieron determinar que las isoformas EM-NADP1-3, todas ellas de localización citosólica, son capaces de asumir un rol anaplerótico en un contexto celular. La carboxilación de piruvato pudo ser medida en extractos vegetales, siendo EM-NADP2 la isoforma que más contribuye a esta actividad en hojas.

# Introducción





## **1 Introducción**

### **1.1 Ácidos orgánicos C<sub>4</sub> en la fisiología vegetal**

Los ácidos orgánicos tienen numerosas y diversas funciones indispensables para el desarrollo y supervivencia de las plantas. Sus niveles de acumulación y naturaleza química varían entre especies, estadios de desarrollo y tipos de órganos o tejidos (Sweetman y col., 2009). Dentro de la gran variedad de ácidos orgánicos que presentan los vegetales, los de cuatro carbonos (C<sub>4</sub>) como el ácido L-málico, han recibido gran atención debido a los múltiples roles que se le han asignado (Ferne y Martinoia, 2009; Maurino y Engqvist, 2015).

El ácido L-málico está presente en todas las células vegetales, acumulándose en altos niveles en las vacuolas (Gout y col., 1993). Presenta elevadas velocidades de intercambio entre los distintos compartimentos subcelulares y se han encontrado numerosas proteínas transportadoras de membrana capaces de traslocar este compuesto (Meyer y col., 2010; Maurino y Engqvist, 2015).

Cuando el pH del entorno es superior a 5, la especie predominante de este ácido C<sub>4</sub> es su base conjugada L-malato (de aquí en más, malato).

### **1.2 Roles del malato en plantas**

La mayoría de las funciones descriptas para el malato pueden ser reconocidas a partir de su estructura química (Figura 1.1). La presencia de un grupo hidroxilo en el carbono 2 hace de esta molécula un transportador de equivalentes de reducción entre

los distintos compartimentos subcelulares. La oxidación enzimática del malato genera NAD(P)H utilizado en reacciones biosintéticas en el citosol o plastidios, o en la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Además, el malato puede sufrir descarboxilación en el carbono 4 generando CO<sub>2</sub>, el cual puede ser re-fijado en otras rutas metabólicas.

El metabolismo de malato tiene un rol central en la fisiología vegetal. Siendo uno de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), está íntimamente asociado al metabolismo energético mitocondrial, así como al aporte de esqueletos carbonados para biosíntesis. Participa también en el ciclo del glioxilato, importante para la conversión de ácidos grasos en intermediarios gluconeogénicos durante la germinación.

El malato además cumple un rol especializado almacenando transitoriamente el carbono en la fijación de CO<sub>2</sub> en organismos con metabolismo fotosintético C<sub>4</sub> y metabolismo ácido de las Crasuláceas (CAM). Estos, a diferencia de las plantas C<sub>3</sub> que presentan un único tipo de célula fotosintética y fijan el CO<sub>2</sub> atmosférico directamente a través del ciclo reductivo de las pentosas fosfato (CRPP), concentran el CO<sub>2</sub> en el sitio de carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), disminuyendo su actividad oxigenasa y el proceso de fotorrespiración asociado, que consume energía y libera parte del CO<sub>2</sub> fijado. Esto es logrado por la acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) generando oxaloacetato (OAA) que luego es reducido a malato por la malato deshidrogenasa (MDH) en el citosol (Drincovich y col., 2011).

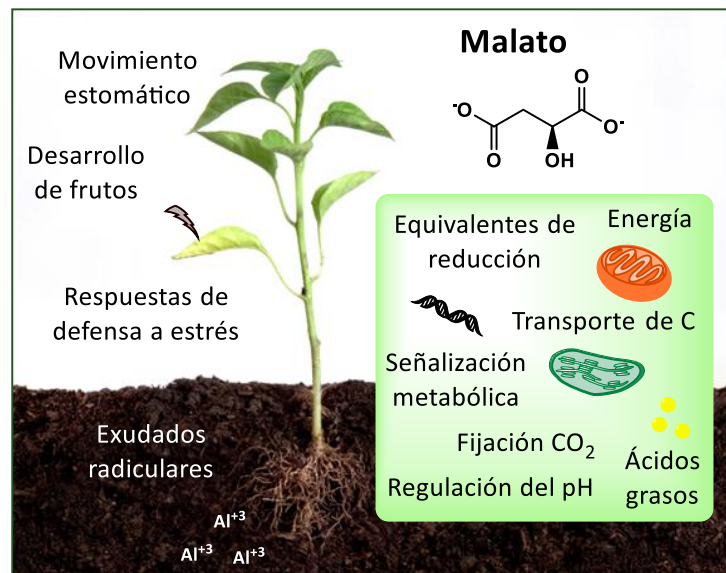
Las plantas C<sub>4</sub> particionan las reacciones fotosintéticas entre dos tipos de células. El carbono es fijado de forma preliminar en las células mesofílicas, y luego el malato (o el aspartato, aminoácido derivado por transaminación) es transportado a las células de la vaina vascular, en donde es descarboxilado y el CO<sub>2</sub> resultante es incorporado al CRPP. En las plantas CAM existe una separación temporal entre la fijación inicial y definitiva del carbono. El CO<sub>2</sub> atmosférico es asimilado en forma de malato por la PEPC y la MDH durante la noche, y es almacenado en las vacuolas. Durante el día, cuando el nivel de evaporación es alto, los estomas se cierran y el malato almacenado es descarboxilado para generar el CO<sub>2</sub> que finalmente es fijado mediante el CRPP (Drincovich y col., 2011).

La liberación de CO<sub>2</sub> a partir de los ácidos C<sub>4</sub> puede ocurrir mediante la acción de tres descarboxilasas: la enzima málica NADP dependiente (EM-NADP) en los cloroplastos, la enzima málica NAD dependiente (EM-NAD) en mitocondrias o la PEP carboxiquinasa (PEPCK) en el citosol. Estas enzimas especializadas no evolucionaron *de novo*, sino que fueron reclutadas de isoformas no fotosintéticas que se encuentran en todos los tipos de plantas (Maier y col., 2011).

Los azúcares solubles y el almidón son considerados los fotoasimilados característicos de las plantas C<sub>3</sub>. Sin embargo, estudios orientados a examinar el rol de ácidos C<sub>4</sub> en este tipo de plantas señalaron que constituyen una fracción significativa del carbono fijado, e incluso en varias especies sus niveles pueden superar al de los azúcares y el almidón. Tal es el caso de la especie dicotiledónea C<sub>3</sub> *Arabidopsis thaliana*, que acumula grandes cantidades de malato y fumarato en las hojas durante el día (Chia y col., 2000; Hurth y col., 2005; Fahnenstich y col., 2007). La concentración de estos ácidos mostró cambios durante el ciclo día-noche, alcanzando un valor máximo hacia el final del período de luz y disminuyendo durante el período de oscuridad (Fahnenstich y col., 2007; Zell y col., 2010). Estos compuestos podrían funcionar como formas de transporte de carbono fijado entre diferentes partes de la planta y proporcionar carbono orgánico rápidamente metabolizable para ser utilizado como fuente de energía y esqueletos carbonados bajo ciertas condiciones (Chia y col., 2000). Más aun, la tasa respiratoria hacia el final de la noche en plantas de *Arabidopsis* creciendo en condiciones de día corto indicó un cambio en el uso de sustratos respiratorios, de carbohidratos a ácidos orgánicos (Zell y col., 2010).

El rol de estos compuestos como importantes moléculas de almacenamiento de carbono quedó demostrado en un estudio de plantas de *A. thaliana* que presentaron una disminución significativa del contenido de malato y fumarato debida a la sobreexpresión de la EM-NADP fotosintética de maíz bajo el control del promotor constitutivo 35SCaMV (Fahnenstich y col., 2007). Estas plantas sufrieron senescencia acelerada cuando fueron mantenidas en oscuridad (Fahnenstich y col., 2007) o crecidas en fotoperíodos cortos (Zell y col., 2010). Esta senescencia pudo ser retrasada cuando se les suministró exógenamente glucosa, sacarosa o malato, sugiriendo que la falta de metabolitos carbonados era el factor por el que las líneas transgénicas presentaban dicho fenotipo.

La respiración del malato otorga a las plantas una gran flexibilidad metabólica dado que desacopla el funcionamiento del ciclo TCA de la glicólisis. Dentro de la mitocondria el malato puede ser oxidado a OAA por acción de la MDH, o a piruvato,  $\text{CO}_2$  y poder reductor a través de la EM-NAD, reabasteciendo esqueletos carbonados al ciclo TCA.



**Figura 1.1**

Roles propuestos para el malato en la bioquímica de las plantas.

La importancia del malato como sustrato respirable también se pone de manifiesto durante la maduración de frutos carnosos (Famiani y col., 2000; Sweetman y col., 2009). En este proceso se acumulan elevadas cantidades de malato y citrato en las vacuolas de las células del mesocarpio. La concentración de estos componentes determina en gran medida la acidez de los frutos, por lo que además juegan un rol significativo en las propiedades organolépticas de los mismos (Etienne y col., 2013).

En los órganos fotosintéticos, el proceso de apertura y cierre de los estomas es fundamental para la toma de  $\text{CO}_2$  y el control de la pérdida de agua ante condiciones ambientales variables. El malato, junto con otros factores como ácido abscísico (ABA), señales redox, flujos de  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , está involucrado en la regulación de la presión de turgor de las células de la guarda, mediando el movimiento estomático (Vavasseur y Raghavendra, 2005). Su participación en este proceso no se limita sólo a actuar como osmolito sino que además se ha demostrado que regula directamente la apertura de

un canal de  $\text{Cl}^-$  en la membrana de la vacuola, indispensable para la correcta apertura estomática (De Angeli y col., 2013).

Se ha sugerido que cambios en la abundancia de los ácidos carboxílicos son percibidos como señales que aportan información acerca del estado energético y nutricional de la planta. En este sentido, perturbaciones en las concentraciones celulares de malato y citrato tienen un significativo impacto en la abundancia de numerosos y diferentes transcritos nucleares, relacionados con el metabolismo primario, la fotosíntesis, el metabolismo de pared celular, la síntesis de proteínas y la respuesta a estrés biótico y abiótico. Esto indicaría que estos ácidos tendrían roles únicos como reguladores de la expresión génica en la integración de señales metabólicas (Finkemeier y col., 2013).

El malato es además un componente importante en los exudados radiculares teniendo una influencia significativa en la comunicación con microorganismos y en la nutrición y protección vegetal. Provee una fuente de carbono para comunidades microbianas del suelo, siendo el principal suministro de energía para los bacteroides durante la fijación simbiótica del nitrógeno (Meyer y col., 2010), y participa en la movilización de fosfato del suelo en especies que no forman micorriza (Ryan y col., 2001). Por otro lado, la inoculación de hojas de *Arabidopsis* con el patógeno *Pseudomonas syringae* induce la exudación de malato por las raíces, atrayendo microorganismos beneficiosos hacia su superficie y reduciendo la susceptibilidad de la planta al ataque por este patógeno (Rudrappa y col., 2008).

La importante participación del malato en la tolerancia a la toxicidad generada por aluminio en suelos ácidos ha sido objeto de numerosos estudios, como se resume en la siguiente sección.

### **1.2.1 Rol del malato en la tolerancia a aluminio**

El aluminio (Al) es el metal más abundante y el tercer elemento más común presente en la corteza terrestre. Cuando el pH del suelo es inferior a 5, es solubilizado a  $\text{Al}^{3+}$  y a otras especies que resultan tóxicas para las plantas, aun a concentraciones en el orden de micromolar (Kochian y col., 2005). Esto constituye un serio problema agrícola a nivel global ya que afecta el desarrollo y crecimiento vegetal reduciendo el

rendimiento de cultivos. El principal síntoma de la toxicidad por Al es la inhibición del crecimiento de las raíces, lo que trae aparejado efectos negativos en la adquisición de agua y nutrientes y posteriormente un aumento de la susceptibilidad a otros tipos de estrés.

El Al presenta una fuerte afinidad hacia compuestos dadores de oxígeno, por lo que es factible su unión a múltiples sitios blanco. El Al interacciona con la pared celular, la membrana plasmática, el citoesqueleto y el ADN, afectando a estos componentes celulares (Matsumoto, 2000). Las causas primarias de la inhibición de la elongación de la raíz generadas por Al aún no han sido completamente dilucidadas, incluso todavía está en discusión si el sitio primario de lesión es apoplástico o simplástico.

Se ha propuesto que el primer factor de toxicidad podría ser la disrupción del correcto funcionamiento de la pared celular (Horst y col., 2010; Yang y col., 2011) especialmente cuando el periodo de exposición es corto y la concentración de Al es baja. Recientemente, se ha demostrado que la fuerte unión de Al a las paredes celulares de la rizodermis y el cortex externo impide el desmantelamiento de la pared requerido para la expansión celular en la zona de elongación (Kopittke y col., 2015). Un efecto posterior, es la alteración de la biosíntesis y distribución de etileno y auxina. Aparentemente, el Al promueve la producción de etileno, que a su vez induce cambios en la síntesis y distribución de auxina (Sun y col., 2010; Yang y col., 2014; Kopittke y col., 2015). También se ha sugerido que la pérdida de la fluidez de la membrana plasmática y la inhibición del proceso de endocitosis están involucrados en la rápida inhibición del crecimiento de la raíz dentro de los dos primeros minutos de exposición a Al (Krtková y col., 2012).

Otro importante efecto fisiológico que provoca el Al es la inducción de estrés oxidativo, evidenciado por un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y peroxidación lipídica (Ezaki y col., 2000; Yamamoto y col., 2002). Sin embargo, se cree que el daño oxidativo no sería una causa primaria de la toxicidad, ya que la respuesta oxidativa se desencadena posteriormente a la inhibición del crecimiento de la raíz (Navascués y col., 2012).

Se conoce poco acerca de la vía de transducción de la señal que inicia la respuesta de la planta al estrés por Al. En un estudio de los sucesos que ocurren

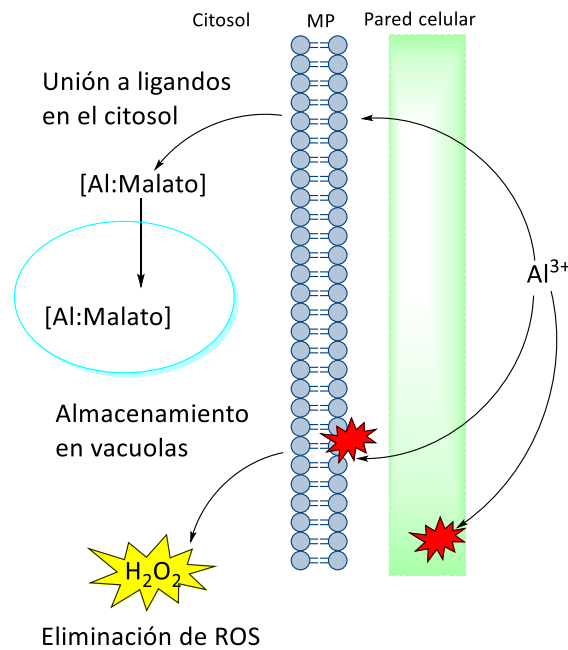
dentro de los primeros minutos de exposición a Al llevado a cabo en plantas de *A. thaliana*, se vio un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, despolimerización de los microtúbulos y despolarización de la membrana plasmática en células del ápice de la raíz. Estos fenómenos, al igual que la inhibición del crecimiento de la raíz, fueron también elicitados por glutamato, implicándose a este aminoácido en la señalización (Sivaguru y col., 2003; Rincón-Zachary y col., 2010).

Las estrategias que presentan las plantas para tolerar la presencia de Al en el medio se pueden clasificar en dos grupos: los mecanismos externos o apoplásticos, que facilitan la exclusión del Al del ápice de la raíz, y los que confieren la capacidad de tolerar el Al en el simplasto de la planta, conocidos como internos o simplásticos (Figura 1.2). Los ácidos orgánicos, fundamentalmente citrato, malato y oxalato, cumplen un rol fundamental en ambos tipos de mecanismos, ya que forman complejos estables con Al ya sea en la rizósfera o en el citosol (Ma y col., 2001).

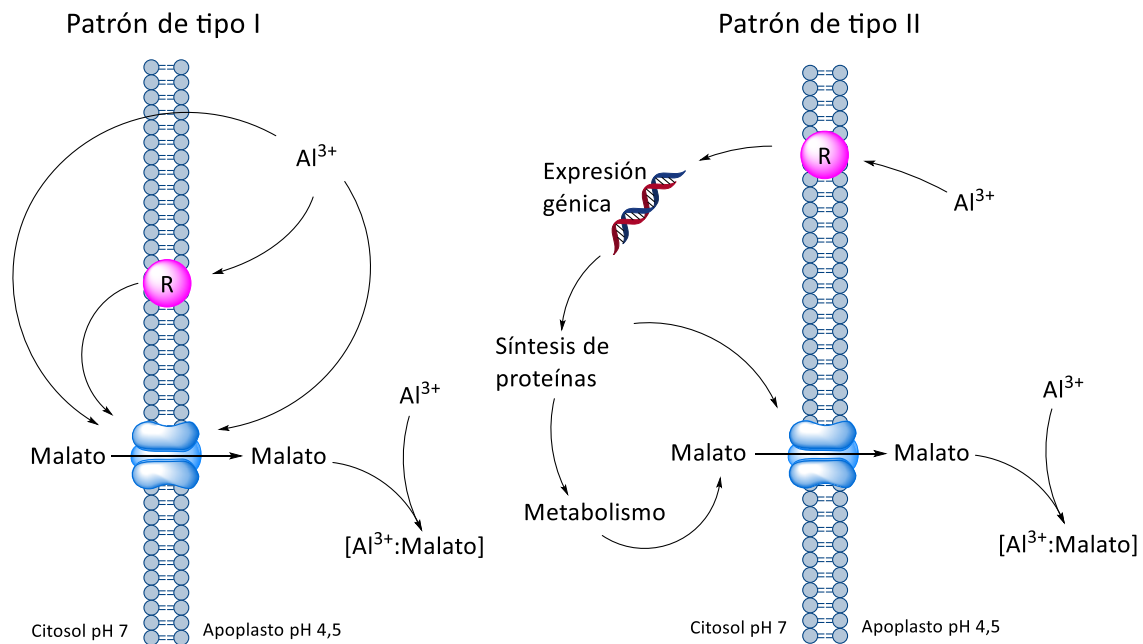
Las plantas son capaces de tolerar el Al internamente mediante la unión de estos ligandos a los cationes tóxicos en el citosol, y el transporte y almacenamiento de los complejos en vacuolas (Figura 1.2a). Algunas especies acumulan grandes cantidades de este metal en sus partes aéreas sin mostrar síntomas de toxicidad, gracias a la formación de complejos Al-citrato como en el caso de *Hydrangea*, o Al-oxalato, en *Fagopyrum esculentum* (Ma y col., 2001). El destino del Al en el interior de las raíces es de difícil estudio, por lo que estos mecanismos internos aún no han sido del todo dilucidados.

El mecanismo de tolerancia más estudiado y comprendido hasta el momento es el de la exclusión de Al por exudación de malato y citrato. Los genes candidatos de resistencia identificados hasta el momento codifican para transportadores iónicos involucrados en la liberación de estos compuestos hacia la rizósfera. Diferentes especies segregan distintos ácidos orgánicos para desintoxicar Al. Por ejemplo, trigo (*Triticum aestivum*), *A. thaliana* y colza (*Brassica napus*) exudan principalmente malato después de la exposición a Al (Delhaize y col., 1991; Hoekenga y col., 2003; Ligaba y col., 2006), mientras que poroto (*Phaseolus vulgaris*), maíz (*Zea mays*) y soja (*Glycine max*) liberan citrato en respuesta a estrés por Al. Por su parte, *F. esculentum*, además de detoxificar el Al internamente, utiliza la exudación de oxalato como mecanismo de detoxificación externa (Zheng y col., 1998).

a-



b-



**Figura 1.2**

Participación del malato en mecanismos internos y externos de tolerancia a Al. a- Tolerancia interna: unión de Al a malato en el citosol para formar complejos no tóxicos, almacenamiento de los complejos en vacuolas, reparación de daño en paredes y membranas celulares, eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS). MP, membrana plasmática. b- Modelos para la exudación de malato activada por Al. Patrón de tipo I: Al activa un canal iónico en la membrana plasmática por interacción directa, por interacción con un receptor (R) que inicia una cascada de señalización, o bien ingresa al citosol y activa el canal directamente o vía segundos mensajeros. Patrón de tipo II, Al interactúa con la célula posiblemente a través de una proteína receptora en la membrana plasmática, para activar la transcripción de genes involucrados en el metabolismo y transporte de los ácidos orgánicos.



El ápice de la raíz es la zona particularmente sensible a Al, por lo que sólo los cationes que se encuentran rodeando estas células necesitan ser detoxificados. Es por esto que la liberación de ácidos orgánicos es restringida a esa región ya que así se reduce el costo metabólico de este mecanismo de tolerancia a Al. La exudación debe ser continua, acompañando el crecimiento de la raíz a través del suelo.

Se pueden distinguir dos patrones de exudación de ácidos orgánicos en respuesta a Al (Figura 1.2b). El patrón de tipo I, caracterizado por una exudación inmediata ante la exposición a Al; y el patrón de tipo II, en donde la exudación ocurre luego de un periodo de tiempo (horas o incluso días). En el primer caso, se sugiere que un mecanismo preexistente es responsable de la rápida liberación, como la activación transportadores aniónicos constitutivamente expresados; mientras que en el segundo caso se requieren cambios a nivel de expresión de genes involucrados en el metabolismo y transporte de los ácidos orgánicos (Ma y col., 2001).

Numerosos genes que codifican transportadores responsables de la exudación de malato y citrato activada por Al han sido identificados. El primer gen de resistencia a Al identificado en plantas fue ALMT1 (*Al-activated malate transporter*) de trigo, que codifica para un transportador de malato activado por Al, expresado constitutiva y específicamente en el ápice de la raíz de variedades tolerantes a Al (Sasaki y col., 2004). Genes homólogos a ALMT1 han sido caracterizados en Arabidopsis (Hoekenga y col., 2006) y colza (Ligaba y col., 2006), aunque en cebada (*Hordeum vulgare*) y maíz demostraron no estar asociados a la tolerancia a Al (Piñeros y col., 2008; Gruber y col., 2011; Ligaba y col., 2012).

Por otra parte, la secreción de citrato activada por Al es llevada a cabo por transportadores del tipo MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*), identificados en cebada y sorgo (*Sorghum bicolor*) (Furukawa y col., 2007; Magalhaes y col., 2007) y posteriormente en Arabidopsis, maíz, centeno (*Secale cereale*), arroz y *Brassica oleracea* (Liu y col., 2009; Maron y col., 2010; Yokosho y col., 2010, 2011; Wu y col., 2014).

La mayoría de los trabajos publicados en la literatura han estado abocados al estudio de los transportadores de ácidos orgánicos, por lo que por el momento la influencia de su metabolismo y acumulación en las raíces sobre la tolerancia a Al no se conocen de forma suficiente.

### **1.3 Enzimas involucradas en el metabolismo del malato en plantas C<sub>3</sub>**

La relevancia de los ácidos orgánicos C<sub>4</sub> en la fisiología de plantas C<sub>3</sub> hace necesario el estudio de las proteínas involucradas en su metabolismo. Dentro de las enzimas que metabolizan malato podemos destacar: malato sintasa, fumarasa, MDH y enzima málica (EM).

La malato sintasa, enzima clave del ciclo del glioxilato, cataliza la conversión irreversible de acetyl-CoA y glioxilato a malato en peroxisomas. Es activa en cotiledones durante el crecimiento heterotrófico post-germinativo y luego se reprime cuando el metabolismo se vuelve autótrofo, aunque se ha visto inducida en tejidos en senescencia (Goto-Yamada y col., 2015).

La enzima fumarasa es una liasa que participa en el ciclo TCA catalizando la hidratación reversible de fumarato a malato en la mitocondria. En algunas especies se ha encontrado también una fumarasa de localización citosólica, que sería responsable de la gran acumulación de fumarato en este compartimento durante la asimilación de nitrato (Pracharoenwattana y col., 2010).

La enzima MDH-NAD(P) cataliza la conversión reversible de malato en oxaloacetato, acoplada a la reducción de NAD o NADP. En los tejidos vegetales existen múltiples isoformas, con diversas funciones fisiológicas y variada localización subcelular. Las isoformas NAD dependientes se encuentran en citosol, mitocondria, cloroplastos y peroxisomas. En cambio, MDH-NADP se localiza exclusivamente en cloroplastos. La actividad de estas enzimas depende no sólo de la relación sustratos/productos sino también del estado redox del reservorio de NAD(P), y puede variar incluso en un mismo tejido según las condiciones fisiológicas existentes. La función general que se le atribuye a estas enzimas es la de transportar equivalentes de reducción entre distintos compartimentos celulares (Scheibe, 2004).

La enzima málica (EM) cataliza la descarboxilación oxidativa de malato a piruvato en presencia de NADP (EM-NADP) o NAD (EM-NAD). Además de la participación de estas enzimas en la fotosíntesis C<sub>4</sub> y CAM, se han identificado numerosas isoformas no fotosintéticas en el citosol, plastidios y mitocondrias de todas las plantas. Junto con la MDH, la EM genera poder reductor, utilizado en rutas biosintéticas o en la generación de ATP. Además, proporciona piruvato que puede ser

metabolizado a acetil-CoA (precursor de múltiples vías biosintéticas y sustrato del TCA) y CO<sub>2</sub> que puede ser re-fijado en otras rutas. Por lo tanto, la EM se encuentra en un nodo metabólico clave, que interconecta vías en la que participan compuestos C<sub>4</sub> (malato), C<sub>3</sub>-C<sub>2</sub> (piruvato y acetil-CoA, respectivamente) y C<sub>1</sub> (CO<sub>2</sub>). Es por esto que, dentro de las enzimas implicadas en el metabolismo del malato, la EM es la familia de isoformas sobre la cual se ha realizado una importante caracterización en plantas C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>.

## **1.4 Enzima málica**

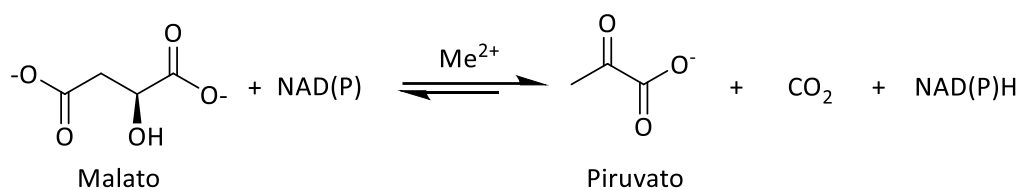
### **1.4.1 Generalidades**

La EM-NAD(P) está ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en bacterias, hongos, animales y plantas. Generalmente cada organismo presenta más de una isoforma con características cinéticas, regulatorias y estructurales particulares. Dado que los productos de la reacción están involucrados en diferentes procesos biológicos, la enzima está presente en un gran número de rutas metabólicas dependiendo del organismo, el tejido, y la localización subcelular en que se encuentre.

Como se mencionó previamente, la reacción llevada a cabo por esta enzima es la descarboxilación oxidativa de malato generando piruvato, CO<sub>2</sub> y la forma reducida del cofactor NAD o NADP (Figura 1.3). La catálisis de la reacción requiere de un metal divalente. En condiciones fisiológicas este requerimiento es suplido por Mg<sup>2+</sup> y/o Mn<sup>2+</sup>. Sin embargo, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup> también pueden ser utilizados aunque con cambios en la actividad enzimática (Drincovich y col., 1991). Los sustratos de la reacción son las formas libres (no complejadas con iones metálicos) del L-malato y el NAD(P), y la forma libre del metal divalente es el cofactor esencial (Iglesias y Andreo, 1990). La variación de energía libre estándar define a la reacción como reversible, y normalmente se asume que las concentraciones celulares de los sustratos y productos favorecerían la descarboxilación del malato.

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>) clasifica a las enzimas málicas en tres grupos. Esta división se basa en la preferencia por el dinucleótido, NAD o NADP, exhibida por

las isoformas y en la capacidad de catalizar una reacción secundaria: la descarboxilación del OAA. Dentro de las EM capaces de descarboxilar OAA (EM OAA-descarboxilantes), se encuentran las enzimas NADP-dependientes (EM-NADP, EC 1.1.1.40) y las NAD-dependientes (EM-NAD, EC 1.1.1.38) agrupando a las isoformas bacterianas y a la enzima mitocondrial de animales. Por otro lado, las EM incapaces de catalizar la descarboxilación del OAA son NAD-dependientes (EC 1.1.1.39, EM OAA-no descarboxilantes), grupo constituido únicamente por las isoformas localizadas en la matriz mitocondrial de plantas superiores.



**Figura 1.3**

Reacción catalizada por EM-NAD(P).  $\text{Me}^{2+}$ , metal divalente.

En las plantas, las EM-NADP se localizan en citosol y plastidios, formando homooligómeros, generalmente tetrámeros. Pueden ser clasificadas en cuatro grupos filogenéticos relacionados. Los grupos I y II comprenden a enzimas citosólicas y plastídicas de especies dicotiledóneas, respectivamente. El grupo III incluye isoformas de plantas monocotiledóneas, y el grupo IV está formado por EM-NADP citosólicas tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas. Las EM-NAD se encuentran en mitocondrias y se estructuran como heterodímeros formados por dos tipos de subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$ . Forman dos grupos filogenéticos, cada uno conteniendo las secuencias de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente (Drincovich y col., 2011).

#### **1.4.2 Funciones propuestas para las enzimas málicas vegetales: respuesta a estrés**

Se asume que las EM-NAD cumplen un rol central en el manejo del flujo de carbono a través del TCA, y en la respiración de malato (Drincovich y col., 2011).

Numerosas EM-NADP han sido identificadas en plantas C<sub>3</sub>. Al igual que para las isoformas no fotosintéticas de especies C<sub>4</sub> y CAM, su rol biológico no ha sido del todo esclarecido.

Se ha sugerido que las isoformas plastídicas C<sub>3</sub> estarían involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos y aminoácidos en un amplio rango de tejidos, proporcionando esqueletos carbonados y poder reductor en la forma de piruvato y NADPH (Lai y col., 2002a; Shearer y col., 2004).

Las EM-NADP citosólicas han sido implicadas en la maduración de frutos climatéricos, proveyendo piruvato y NADPH durante la explosión respiratoria (Famiani y col., 2000). También se las ha vinculado en el balance del pH citosólico, controlando la síntesis y degradación de malato (Lai y col., 2002b; Hurth y col., 2005). Otro rol sugerido para las EM-NADP es en la bioquímica del movimiento de los estomas, contribuyendo al cierre de los mismos mediante la degradación diurna del malato acumulado en las células de la guarda (Laporte y col., 2002).

Por otro lado, se ha detectado en tabaco (*Nicotiana tabacum*), apio (*Apium graveolens*) y *A. thaliana*, una alta actividad EM-NAD(P) en células que rodean al xilema y al floema en tallos y pecíolos. En base a estos resultados y a experimentos de marcaje isotópico, se ha propuesto que el sistema vascular aportaría malato como fuente de CO<sub>2</sub> (vía EM) para la fotosíntesis en estas células, generando un ciclo tipo-C<sub>4</sub> en las especies C<sub>3</sub> del cual pudo haberse originado el ciclo operante en plantas C<sub>4</sub> (Hibberd y Quick, 2002; Brown y col., 2010).

Varios trabajos han aportado evidencias que involucran a la enzima en las respuestas de defensa de las plantas.

Se ha propuesto que las EM-NADP contribuirían al balance de las ROS que se generan durante diferentes condiciones de estrés, colaborando con la vía oxidativa de las pentosas fosfato en el aporte de NADPH requerido para la reducción del glutatión, para la síntesis de pigmentos antioxidantes y otros sistemas de protección y reparación (Casati y col., 1999).

En trigo, una isoforma plastídica se vio inducida en hojas incubadas con macerozima, celulasa y glutatión, efectores que causan lignificación (Casati y col., 1997; Maurino y col., 1997). La expresión de las isoformas de tabaco, también fue incrementada por el tratamiento con elicitores fúngicos, polietilenglicol (PEG),

infiltración y tratamiento con UV-B (Müller y col., 2008). Además, infecciones virales produjeron un aumento en la actividad EM-NADP, que se correlacionó con un incremento en la expresión de los transcritos de las isoformas citosólicas de esta especie (Doubnerová y Ryšlavá, 2011).

En *A. thaliana* se ha implicado a EM-NADP en la producción de ROS durante la respuesta de defensa basal temprana ante la infección de patógenos fúngicos hemibiotróficos (Voll y col., 2012). También se ha visto inducción de esta enzima en respuesta a estrés oxidativo de orígenes intra- y extracelular (Li y col., 2013).

Otros estudios mostraron una reprogramación del metabolismo vegetal de varias especies  $C_3$  durante el ataque de determinados hongos patógenos, observándose un aumento localizado de la actividad EM-NADP en las células adyacentes a los sitios de infección, junto con una fuerte producción de ROS (Parker y col., 2009).

Adicionalmente, se ha planteado que estas enzimas participarían de la respuesta ante condiciones de estrés por déficit de agua. La actividad EM-NADP sufrió un incremento en plantas de tabaco sometidas a sequía, que fue relacionado a un aumento en los niveles de ARNm y proteína de una isoforma cloroplástica. Los niveles de transcritos de la isoforma citosólica, por el contrario, se vieron disminuidos en las plantas estresadas (Doubnerová y col., 2014).

En arroz (*Oryza sativa*) se ha visto que la expresión de los cuatro genes de la familia EM-NADP (tres isoformas citosólicas y una plastídica) fue inducida cuando las plantas fueron sometidas a tratamientos con manitol, NaCl, PEG y ABA (Chi *et al.*, 2004). La sobreexpresión de uno de los genes EM-NADP de arroz en *A. thaliana*, le otorgó una incrementada tolerancia al estrés salino y osmótico. Las plantas transgénicas fueron capaces de crecer en NaCl o manitol, mientras que el crecimiento de la línea salvaje se vio severamente inhibido (Liu y col., 2007), aunque el rol específico que cumpliría la enzima en estas condiciones no ha sido elucidado.

Otro ejemplo de líneas vegetales con sobreexpresión de EM-NADP que presentaron fenotipos tolerantes a condiciones de estrés es el caso de plantas de tabaco expresando la EM-NADP fotosintética de maíz. La incrementada actividad de esta enzima se correlacionó con una disminución en la apertura de los estomas, causada por una reducción en la concentración de malato intracelular en las células de

la guarda. Tampoco se descarta la hipótesis de que un aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> en la hoja, como resultado de la actividad EM-NADP en las células mesofílicas, contribuiría a una menor apertura estomática. Estas plantas transgénicas mostraron una mayor supervivencia que la salvaje en condiciones de sequía (Laporte y col., 2002).

### **1.4.3 Familia de isoformas EM-NAD(P) de *Arabidopsis thaliana***

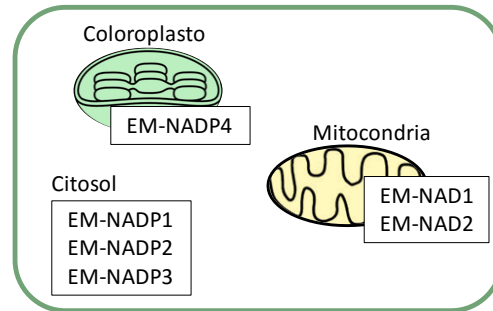
La familia EM-NAD(P) de la especie modelo *A. thaliana* está compuesta por 6 miembros, cuatro dependientes de NADP: EM-NADP1 (At2g19900), EM-NADP2 (At5g11675), EM-NADP3 (At5g25880) y EM-NADP4 (At1g79750); y dos dependientes de NAD: EM-NAD1 (At2g13560) y EM-NAD2 (At4g00570). Las isoformas EM-NADP1, 2 y 3 son citosólicas (Gerrard Wheeler y col., 2009), mientras que EM-NADP4 se localiza en plastidios (Gerrard Wheeler y col., 2005), y EM-NAD1 y 2 son mitocondriales (Tronconi y col., 2008)(Figura 1.4a).

Las isoformas EM-NADP comparten identidades de secuencia aminoacídica de entre 78 % y 91 %, mientras que las EM-NAD presentan un 63 % de identidad entre ellas (Gerrard Wheeler y col., 2005; Tronconi y col., 2008).

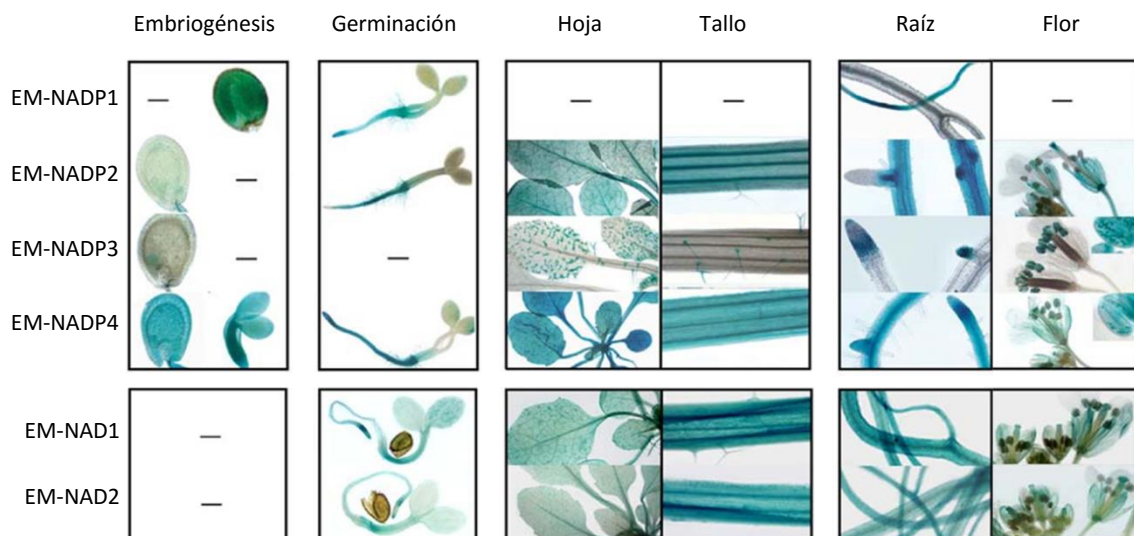
Estudios de fusión de los promotores de estas proteínas al gen reportero β-glucuronidasa (GUS) indicaron que EM-NAD1, EM-NAD2, EM-NADP2 y EM-NADP4 se expresan en todos los tejidos vegetativos y reproductivos a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta (Figura 1.4b). En cambio, la expresión de EM-NADP1 (en raíces secundarias de la planta adulta) y EM-NADP3 (en tricomas y polen) está restringida a señales célula-específicas o del desarrollo vegetal (Gerrard Wheeler y col., 2005; Tronconi y col., 2008).

En condiciones óptimas de crecimiento, plantas mutantes insercionales en cada uno de los genes EM-NAD(P) no mostraron cambios fenotípicos detectables visualmente en relación a la planta salvaje. Estos estudios además indicaron que EM-NADP2 es la isoforma que más contribuye a la actividad EM-NADP total en todos los órganos de la planta (Gerrard Wheeler y col., 2005) y que EM-NAD1 y EM-NAD2 pueden funcionar como hetero u homodímeros *in vivo* (Tronconi y col., 2008).

a-



b-

**Figura 1.4**

Familia EM-NAD(P) de *A. thaliana*. a- Localización subcelular de las isoformas. b- Patrón de expresión indicado por la actividad GUS conducida por los promotores de cada una de las isoformas, durante la embriogénesis (estadios globular y maduro), 4 días después de la germinación, y en hoja, tallo, raíz y flor de la planta madura (Maurino y col., 2009).

Aunque las isoformas EM-NAD(P) comparten un alto porcentaje de identidad de secuencia, la caracterización de las isoformas recombinantes purificadas mostró que presentan diferentes propiedades cinéticas, estructurales y regulatorias (Tabla 1.1).

Todas las isoformas EM-NADP fueron capaces de catalizar tanto la reacción directa (descarboxilación oxidativa de malato) como la reversa (carboxilación reductiva de piruvato). Las isoformas EM-NAD, por el contrario, sólo fueron activas en el sentido directo de la reacción (Gerrard Wheeler y col., 2008; Tronconi y col., 2010a).

EM-NAD1 y 2 recombinantes mostraron valores de  $k_{cat}$  y afinidades hacia los sustratos muy similares (Tabla 1.1; Tronconi y col., 2008). Sin embargo, presentaron un comportamiento diferencial cuando la actividad se ensayó en presencia de diversos



efectores metabólicos, indicando que podrían tener una diferente contribución al metabolismo mitocondrial *in vivo* (Tronconi y col., 2010b).

En el sentido de la descarboxilación, EM-NADP2 exhibió la mayor actividad específica y EM-NADP4 presentó el menor valor de  $K_m$  para el sustrato malato. Por otro lado, EM-NADP1 exhibió la menor eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$  malato) (Gerrard Wheeler y col., 2005).

**Tabla 1.1** Resumen de los parámetros cinéticos, estructurales y regulatorios de los miembros de la familia EM-NAD(P) de *A. thaliana*.

	EM-NADP1	EM-NADP2	EM-NADP3	EM-NADP4	EM-NAD1	EM-NAD2
<b>Descarboxilación oxidativa de malato</b>						
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	38,7 ± 3,5	324,1 ± 29,2	281,1 ± 24,1	151,3 ± 12,1	31,1 ± 1,7	44,1 ± 1,2
$S_{0,5}$ malato (mM)	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,4	0,083 ± 0,09	0,23 ± 0,02	3,0 ± 0,7	3,0 ± 0,2
<b>Carboxilación reductiva de piruvato</b>						
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	16,5 ± 0,8	75,0 ± 3,2	237,0 ± 11,1	284,1 ± 12,3	-	-
$S_{0,5}$ piruvato (mM)	16,9 ± 0,8	0,54 ± 0,02	4,9 ± 0,2	10,8 ± 2,3	-	-
<b>Relación reacción directa/reversa</b>						
$k_{cat}$ decarbox / $k_{cat}$ carbox	2,3	4,3	1,1	0,5	-	-
<b>Propiedades estructurales</b>						
<b>Masa molecular (kDa)</b>	65	65	65	65	63	58
<b>Estructura nativa</b>	Tetramero	Tetramero	Tetramero	Tetramero-dímero	Dímero	Dímero
<b>Regulación metabólica principal</b>						
<b>Activadores de la descarboxilación de malato</b>	Succinato	Succinato, Fumarato, Aspartato, CoA	-	-	Fumarato Succinato OAA	PEP, CoA Acetil-CoA Fructosa 1,6-BP
<b>Inhibidores de la descarboxilación de malato</b>	Fumarato, OAA, ATP, Acetil-CoA	OAA, ATP, Glucosa 6-P	Fumarato, OAA, ATP, Glucosa 6-P	Fumarato, OAA, ATP, Glucosa 6-P	-	Fumarato Succinato
<b>Activadores de la carboxilación de piruvato</b>	Succinato, Fumarato	Succinato, Fumarato	-	-	-	-
<b>Inhibidores de la carboxilación de piruvato</b>	Malato, Aspartato	Malato, Aspartato	Malato, Succinato, Fumarato	Malato, Succinato, Fumarato	-	-

(Gerrard Wheeler y col., 2005, 2008, 2009; Tronconi y col., 2008, 2010a, 2010b, 2012, 2015; Maurino y col., 2009; Arias y col., 2013).

La regulación por metabolitos también mostró resultados diferenciales para cada una de las proteínas EM-NADP de Arabidopsis. Tanto OAA como ATP actúan como fuertes inhibidores de la descarboxilación oxidativa en todas las isoformas. Los efectores acetil-CoA y CoA no modifican significativamente la actividad enzimática, excepto para EM-NADP1 que es inhibida por acetil-CoA y EM-NADP2 que es activada

por CoA. La actividad de EM-NADP2, la isoforma más regulada, fue además fuertemente estimulada por succinato, fumarato y aspartato. EM-NADP1 resultó también activada por altas concentraciones de succinato (Tabla 1.1).

Las cuatro isoformas EM-NADP recombinantes presentaron en el sentido reverso de la reacción altas velocidades y afinidades por el sustrato piruvato. Fue determinado también que malato, fumarato, succinato y aspartato regulan diferencialmente la actividad reversa de estas enzimas. Así, estos resultados sugirieron que podría ser factible que, no sólo la descarboxilación oxidativa de malato, sino también la carboxilación reductiva de piruvato ocurra *in vivo* en *A. thaliana*.

En este sentido se ha visto que para EM-NADP2 ambas actividades son reguladas de manera recíproca por fumarato a diferentes pH (Arias y col., 2013). Estos resultados reflejaron una fuerte preferencia de la reacción reversa sobre la directa a pH 7, mientras que la situación opuesta ocurre a pH 7,5. Así, esta regulación puede ser relevante *in vivo* y un cambio de pH, producto de fluctuaciones en las condiciones celulares, podría ser suficiente para alterar la dirección del flujo metabólico, llevando a la síntesis o degradación de compuestos C<sub>4</sub>.

La caracterización de varias versiones mutantes de estas isoformas permitió la identificación de residuos de aminoácidos y segmentos de la estructura primaria involucrados en la catálisis y la regulación por metabolitos. El residuo Arg115 de EM-NADP2 está implicado en la activación por fumarato, mientras que la región N-terminal es crítica para la catálisis de la reacción reversa (Gerrard Wheeler y col., 2008). Pequeños cambios en la estructura primaria de estas enzimas son responsables de las diferencias en sus propiedades, y probablemente llevaron a la generación de un set de enzimas con mecanismos únicos y más adecuados para cumplir funciones metabólicas específicas (Maurino y col., 2009). Esto, sumado a las diferencias observadas en cuanto a la localización subcelular y patrón de expresión, sugiere roles únicos, no redundantes para cada EM-NAD(P) en el metabolismo vegetal.

El creciente reconocimiento de la importancia de los ácidos orgánicos en el metabolismo de especies C<sub>3</sub> como *A. thaliana* hace necesario completar la caracterización de los roles de estas isoformas, más aún teniendo en cuenta las propiedades de reversibilidad encontradas en algunas de las proteínas recombinantes y que la reacción de carboxilación de piruvato de la EM nunca fue probada *in vivo*.

## **1.5 Objetivos**

Los objetivos planteados para el presente Trabajo de Tesis se describen a continuación.

### **1.5.1 Objetivo general**

El objetivo general de este proyecto es el análisis del metabolismo de compuestos C<sub>4</sub> en especies C<sub>3</sub>. Para ello, se estudiarán diversos sistemas biológicos con niveles modificados de enzimas involucradas en el metabolismo del malato.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

1. Análisis fenotípico y fisiológico de líneas de *A. thaliana* con niveles modificados de EM-NADP2, enzima responsable de la mayor actividad EM-NADP en todos los órganos de la planta.

2. Estudio del rol del malato y de enzimas implicadas en su metabolismo en la respuesta al estrés por aluminio, mediante el análisis de líneas de *A. thaliana* mutantes en los genes *em-nadp*.

3. Análisis de la actividad carboxilasa de las isoformas EM-NAD(P) de *A. thaliana* dentro de un contexto celular utilizando un sistema sencillo tal como *Saccharomyces cerevisiae*.



## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en las siguientes tablas:

**Tabla 2.1** Cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Fenotipo relevante
<i>E. coli</i> K-12 DH5 $\alpha$ <sup>a</sup>	<i>recA endA thi hsdR supE relA deoR lac</i> [ $\Phi$ 80, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]
<i>E. coli</i> K-12 BL21(DE3) <sup>b</sup>	<i>ompT hsdSMR gal dcm</i> [ $\lambda$ DE3]

<sup>a</sup>Gibco, <sup>b</sup>Novagen.

**Tabla 2.2** Plásmidos

Plásmido	Características relevantes
pET-32a, b y c(+) <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , 5.899-5.901 pb, <i>ori</i> f1, <i>lacI</i> , SMC, <i>ori</i> ColE1, expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor y de las señales de iniciación de la traducción del bacteriófago T7, fusión a tiorredoxina y cola de histidinas para aumentar la solubilidad de la proteína de interés y permitir su fácil purificación
pET-32c/EM-NADP1 <sup>b</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pET-32c(+>:: <i>EcoRV em-nadp1 XhoI</i>
pET-32a/EM-NADP2 <sup>b</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pET-32a(+>:: <i>BamHI em-nadp2 XhoI</i>
pET-32a/EM-NADP3 <sup>b</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pET-32a(+>:: <i>BamHI em-nadp3 XhoI</i>
pET-32b/EM-NADP4 <sup>b</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pET-32b(+>:: <i>Sall em-nadp4 XhoI</i>
pET-32a/EM-NADP2Del2 <sup>c</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pET-32a(+>:: <i>BamHI em-nadp2del2 XhoI</i>
pET-32a/EM-NADP2R115A <sup>c</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pET-32a(+>:: <i>BamHI em-nadp2r115a XhoI</i>
pET-32a/EM-NAD1 <sup>d</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pET-32a(+>:: <i>BamHI em-nad1 Sall</i>

Plásmido	Características relevantes
pET-32a/EM-NAD2 <sup>d</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pET-32a(+>:: <i>Bam</i> HI <i>em-nad2</i> <i>Sall</i>
pBluescriptSK(-) <sup>e</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , 3.000 pb, <i>ori</i> f1, <i>lacZ</i> (SMC), <i>ori</i> ColE1
pBSK/EM-NADP4 <sup>f</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pBluescriptSK(-):: <i>Eco</i> RV ATG <i>em-nadp4</i> <i>Xho</i> I
pBSK/EM-NADP2Del2 <sup>f</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pBluescriptSK(-):: <i>Bam</i> HI ATG <i>em-nadp2del2</i> <i>Xho</i> I
pBSK/EM-NAD1 <sup>f</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pBluescriptSK(-):: <i>Bam</i> HI ATG <i>em-nad1</i> <i>Sall</i>
pBSK/EM-NAD2 <sup>f</sup>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pBluescriptSK(-):: <i>Bam</i> HI ATG <i>em-nad2</i> <i>Sall</i>
p416GPD <sup>g</sup>	Vector centromérico de levadura, <i>URA3</i> , pGPD, tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>
p416GPD/EM-NADP1 <sup>f</sup>	<i>URA3</i> , p416GPD::pGPD- <i>em-nadp1</i> -tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>
p416GPD/EM-NADP2 <sup>f</sup>	<i>URA3</i> , p416GPD::pGPD- <i>em-nadp2</i> -tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>
p416GPD/EM-NADP3 <sup>f</sup>	<i>URA3</i> , p416GPD::pGPD- <i>em-nadp3</i> -tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>
p416GPD/EM-NADP4 <sup>f</sup>	<i>URA3</i> , p416GPD::pGPD- <i>em-nadp4</i> -tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>
p416GPD/EM-NADP2Del2 <sup>f</sup>	<i>URA3</i> , p416GPD::pGPD- <i>em-nadp2del2</i> -tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>
p416GPD/EM-NADP2R115A <sup>f</sup>	<i>URA3</i> , p416GPD::pGPD- <i>em-nadp2r115a</i> -tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>
p416GPD/EM-NAD1 <sup>f</sup>	<i>URA3</i> , p416GPD::pGPD- <i>em-nad1</i> -tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>
p416GPD/EM-NAD2 <sup>f</sup>	<i>URA3</i> , p416GPD::pGPD- <i>em-nad2</i> -tCYC1, <i>bla</i> <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Novagen, <sup>b</sup> Gerrard Wheeler y col., 2005, <sup>c</sup> Gerrard Wheeler y col., 2008, <sup>d</sup> Tronconi y col., 2008, <sup>e</sup> Stratagene, <sup>f</sup> este trabajo, <sup>g</sup> Mumberg y col., 1995. SMC: sitio de múltiple clonado. *bla*<sup>+</sup>, resistencia a ampicilina; *URA3*, orotidina 5' P decarboxilasa; pGPD, promotor del gen de la gliceraldehído-3P deshidrogenasa (*GPD*); tCYC1, terminador del gen citocromo 1 (*CYC1*).

## 2.2 Cepas de levadura

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo derivan de las cepas IMK157 e IMK299, ambas originadas de la familia CEN.PK (van Dijken y col., 2000). La cepa IMK157 presenta una disrupción en el gen *URA3*, así como deleciones en los genes que codifican para las dos isoformas de la piruvato carboxilasa, *Pyc1* y *Pyc2* (Zelle y col., 2010). Una deleción adicional en el gen *PDC2*, que codifica para un regulador positivo de la expresión de *PDC1* y *PDC5* (dos de las tres isoformas de la piruvato decarboxilasa), dio lugar a la cepa IMK299 (Zelle y col., 2011).

El listado de cepas se detalla en la Tabla 2.3.

**Tabla 2.3** Cepas de *S. cerevisiae*

Cepa	Fenotipo relevante
CEN.PK 113-7D <sup>a</sup>	<i>MATa</i> , Cepa de referencia
IMK157 <sup>b</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr ura3-52</i>

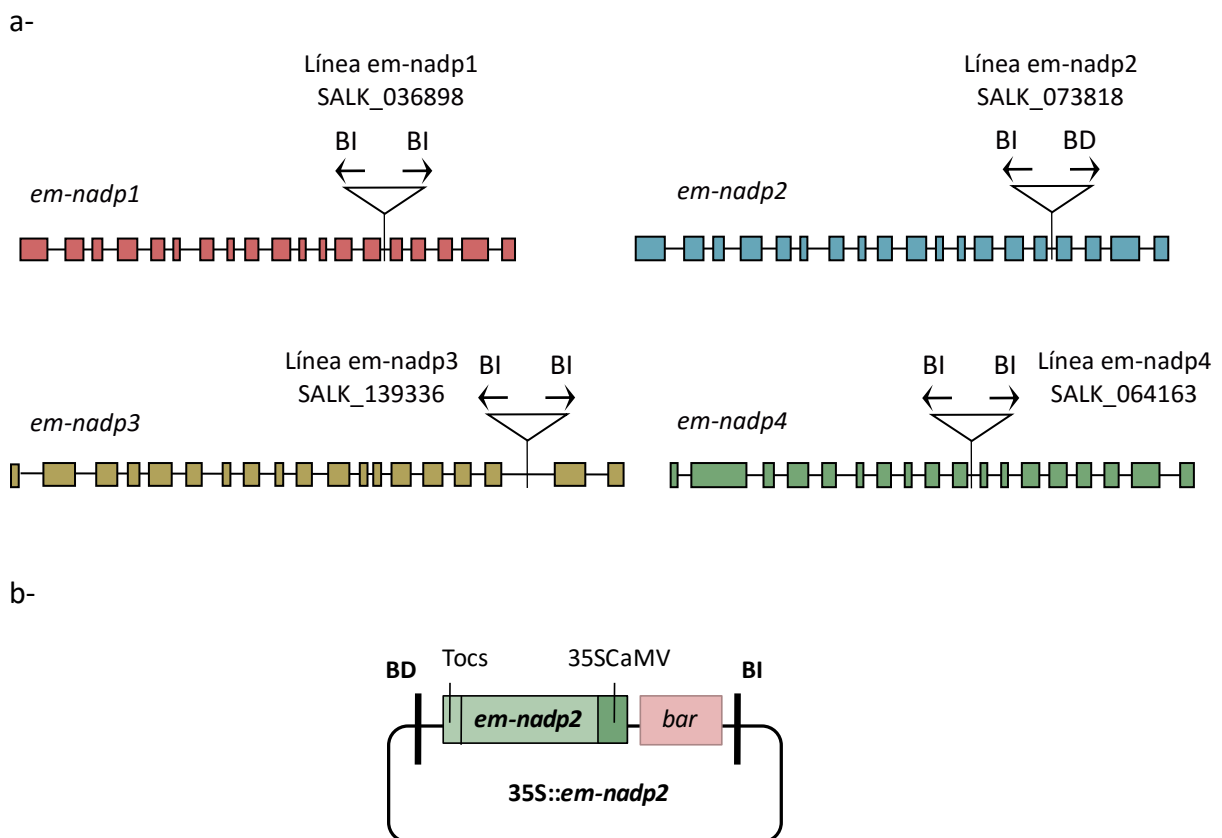
Cepa	Fenotipo relevante
IMK299 <sup>c</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i>
IMK157 + p416GPD <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr ura3-52</i> (p416GPD), vector vacío
IMK157 + p416GPD/EM-NADP2 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr ura3-52</i> (p416GPD/EM-NADP2)
IMK157 + p416GPD/EM-NADP2Del2 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr ura3-52</i> (p416GPD/EM-NADP2Del2)
IMK299 + p416GPD <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD), vector vacío
IMK299 + p416GPD/EM-NADP1 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD/EM-NADP1)
IMK299 + p416GPD/EM-NADP2 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD/EM-NADP2)
IMK299 + p416GPD/EM-NADP2Del2 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD/EM-NADP2Del2)
IMK299 + p416GPD/EM-NADP2R115A <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD/EM-NADP2R115A)
IMK299 + p416GPD/EM-NADP3 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD/EM-NADP3)
IMK299 + p416GPD/EM-NADP4 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD/EM-NADP4)
IMK299 + p416GPD/EM-NAD1 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD/EM-NAD1)
IMK299 + p416GPD/EM-NAD2 <sup>d</sup>	<i>MATa pyc1::kanMX pyc2::ILV2smr pdc2::loxP-hph-loxP ura3-52</i> (p416GPD/EM-NAD2)

<sup>a</sup> van Dijken y col., 2000, <sup>b</sup> Zelle y col., 2010, <sup>c</sup> Zelle y col., 2011, <sup>d</sup> este trabajo.

### 2.3 Líneas vegetales

Se utilizaron diferentes líneas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0): la línea wt o salvaje; líneas mutantes simples con inserciones de ADN-T en los genes que codifican para EM-NADP1, 2, 3 y 4 de esta especie, obtenidas del NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*, <http://www.arabidopsis.info/>) denominadas em-nadp1 (SALK\_036898), em-nadp2 (SALK\_073818), em-nadp3 (SALK\_139336) y em-nadp4 (SALK\_064163), respectivamente; líneas doble mutantes em-nadp1x2, em-nadp4x1, em-nadp4x2 y triple mutantes em-nadp1x2x4 y em-nadp2x3x4, obtenidas por cruzamiento de las respectivas líneas (Gerrard Wheeler y col., 2005); y 3 líneas que sobreexpresan constitutivamente la isoforma EM-NADP2, llamadas líneas EM4.20, EM7.11 y EM6.20 (Voll y col., 2012).

La posición del ADN-T en las líneas mutantes fue previamente verificada por amplificación y secuenciación de las regiones flanqueantes al sitio de cada inserción (Figura 2.1a). Las plantas homocigotas fueron identificadas de la población de semillas T3 provista, utilizando ADN genómico extraído de las mismas como molde para amplificar los alelos salvajes y mutados. Estas líneas no mostraron expresión detectable de los correspondientes genes *em-nadp* mutados cuando fueron analizadas por transcripción reversa (Gerrard Wheeler y col., 2005).



**Figura 2.1**

Líneas de *A. thaliana* utilizadas en este trabajo. a- Genes *em-nadp1*, *em-nadp2*, *em-nadp3*, y *em-nadp4* de *Arabidopsis* y localización de la inserción de ADN-T en las líneas *em-nadp1*, *em-nadp2*, *em-nadp3* y *em-nadp4*. Las líneas SALK fueron generadas por infiltración al vacío de plantas Col-0 con *Agrobacterium tumefaciens* transformada con el vector pROK2, el cual confiere resistencia a kanamicina (Alonso y col., 2003). Se muestran en recuadros los exones y como líneas finas los intrones. El triángulo indica la posición de la inserción de ADN-T. La orientación de las inserciones sugiere que todas, excepto la de *em-nadp2*, presentan una repetición doble invertida. b- Construcción utilizada para generar las líneas EM4.20, EM7.11 y EM6.20. El ADNc de *em-nadp2* se insertó en un vector binario pGreenII modificado (Hellens y col., 2000). Se utilizó el promotor del ARN 35S del virus del mosaico del coliflor (35SCaMV) y la región 3' del gen de la octopina sintetasa como señal terminadora (Tocs). BI: borde izquierdo del ADN-T. BD: borde derecho del ADN-T. *bar*: resistencia a glufosinato de amonio.



Las líneas transgénicas con sobreexpresión de EM-NADP2 fueron obtenidas por eventos independientes de transformación de plantas de *A. thaliana* con una construcción conteniendo el ADNc de *em-nadp2* bajo el control del promotor constitutivo 35SCaMV (Figura 2.1b). Las líneas corresponden a plantas transgénicas homocigotas T3, seleccionadas por su resistencia a glufosinato de amonio. La presencia del transgen fue previamente verificada por PCR.

#### **2.4 Condiciones de crecimiento vegetal y toma de muestras**

Las semillas de *A. thaliana* salvaje y demás líneas fueron sembradas en potes con tierra autoclavada y mantenidas por 3 días en oscuridad a 4 °C para sincronizar la germinación. Luego, fueron colocadas en una sala de cultivo bajo un régimen de 16:8 horas de luz:oscuridad a 24 °C con un flujo de luz de 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Alternativamente, las semillas fueron esterilizadas con una solución 0,5 % (V/V) Tritón X-100 y 50 % (V/V) etanol durante 3 minutos, lavadas con 95 % (V/V) etanol, secadas sobre papel de filtro y sembradas en placas de Petri conteniendo medio 1X MS pH 5,6 (Murashige y Skoog, 1962) con 0,6 % (P/V) Fitigel (Sigma-Aldrich). Las placas fueron almacenadas 3 días en oscuridad a 4 °C y luego colocadas en idénticas condiciones a las de las plantas crecidas en tierra.

Se recolectaron hojas de la roseta de plantas crecidas en tierra de 32 días a mitad del día o 30 minutos antes del fin del día (D) y 30 minutos antes del fin de la noche (N). Las muestras se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido y fueron mantenidas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Para los ensayos de estrés osmótico, plantas de 32 días fueron sometidas a riego con 100 mM NaCl, o 15 % (P/V) polietilenglicol (PEG) 6000, o agua destilada (plantas control), o mantenidas sin riego (sequía), durante 2 semanas. Alternativamente, fueron sembradas en placas con medio MS control, o suplementadas con 30, 50 y 100 mM NaCl, o 100 y 250 mM manitol para los ensayos de germinación.

Para los ensayos de estrés por aluminio, el crecimiento se llevó a cabo en placas con medio MS durante 7 días. Posteriormente, las plántulas fueron traspasadas en esterilidad a placas MS control o suplementado con 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  pH 4,5; o bien, a

medio líquido ¼X MS con o sin 100 µM AlCl<sub>3</sub> pH 4,5. Se tomaron muestras de hojas y raíces luego de 3, 24, 72 horas y de 12 días de tratamiento en placa, se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se mantuvieron a -80 °C hasta el momento de su utilización. Los exudados radiculares se recolectaron luego de 3 horas de tratamiento en medio líquido, se secaron al vacío y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

Para evaluar la respuesta a la presencia de glutamato, las líneas fueron sembradas en placas con medio MS. Luego de 7 días, las plántulas fueron trasplantadas en esterilidad a placas con MS control o suplementado con 5 mM glutamato.

## **2.5 Determinación de parámetros fenotípicos**

Los siguientes parámetros fenotípicos fueron evaluados en un set de *n* plantas (dónde *n* es el número de individuos que se indica en cada experimento), crecidas en simultáneo con una disposición al azar y rotadas frecuentemente.

Se midió el peso fresco de rosetas recién escindidas de plantas de 32 días crecidas en tierra. El tiempo de aparición del primordio floral se determinó por observación diaria de cada planta desde el momento de la germinación. Luego de 18 días de la aparición del primordio floral, se contó el número de silicuas presentes en cada planta. Se extrajeron dos silicuas (las más cercanas a la roseta) de dos ramas distintas, las cuales se abrieron con la ayuda de un bisturí para contabilizar el número de semillas presentes por silicua.

El porcentaje de germinación se determinó por conteo del número de semillas germinadas a las 48 horas posteriores a la colocación de las placas en condiciones óptimas de crecimiento. La longitud de las raíces primarias de plántulas creciendo en placas dispuestas verticalmente se midió a lo largo de un período de entre 7-12 días, con ayuda del software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

## **2.6 Cuantificación de pigmentos**

Hojas de las distintas líneas de *A. thaliana* fueron homogeneizadas en morteros y resuspendidas en 150 µL de 96 % (V/V) etanol por cada 50 mg de tejido. Después de una incubación de 1 hora en oscuridad, se centrifugó 5 minutos a 10000 x *g* y se realizó

una dilución 1:20 en 96 % (V/V) etanol de los extractos, para luego medir absorbancia (A) a 665, 649 y 480 nm en un espectrofotómetro Helios  $\beta$  (Unicam).

Las concentraciones de clorofila a ( $C_a$ ), clorofila b ( $C_b$ ), y carotenoides ( $C_t$ ) se obtuvieron según las siguientes ecuaciones (Wintermans y de Mots, 1965):

$$C_a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 12,19 \times A_{665} - 3,45 \times A_{649}$$

$$C_b \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 21,99 \times A_{649} - 5,32 \times A_{665}$$

$$C_t \text{ (}\mu\text{g/mL)} = \frac{1000 \times A_{480} - 2,14 \times C_a - 70,16 \times C_b}{220}$$

## 2.7 Medidas de fluorescencia de la clorofila

Las medidas de fluorescencia de la clorofila fueron realizadas con un fluorómetro acoplado a un sistema de excitación mediante pulsos de amplitud modulada (Qubit Systems Inc.). Previamente, las plantas fueron adaptadas a la oscuridad durante por lo menos 30 minutos. La fluorescencia mínima ( $F_0$ ) se midió bajo la luz LED, la cual es insuficiente para impulsar la fotosíntesis y no altera el estado de adaptación a la oscuridad, mientras que la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) se midió tras la aplicación de un pulso breve (0,8 s) de luz actínica saturante ( $5000 \mu\text{mol E/m}^2\text{s}$ ). El parámetro  $F_v/F_m$  se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

## 2.8 Medidas de intercambio gaseoso

La asimilación de  $\text{CO}_2$  de plantas de *A. thaliana* se calculó como la diferencia entre la concentración de  $\text{CO}_2$  en el gas entrante en la celda de medición y la saliente, en un Analizador de Gases Infrarrojo (IRGA, Qubit Systems Inc.). En la celda se colocaron hojas recién escindidas de la planta. El gas utilizado para generar el flujo de  $\text{CO}_2$  contenía entre 16-20  $\mu\text{M}$  de  $\text{CO}_2$  y 21 % (V/V)  $\text{O}_2$ , y las medidas se realizaron bajo un flujo de luz blanca de  $100 \mu\text{E/m}^2\text{s}$ .

## 2.9 Determinación del contenido de nucleótidos de piridina

La técnica utilizada para la determinación del contenido de nucleótidos de piridina se basa en la reducción de 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) mediada por fenacina metosulfato (PMS) en presencia de etanol y alcohol deshidrogenasa (ADH) para la determinación de NAD y NADH, o glucosa 6-P y glucosa 6-P deshidrogenasa (G6PDH) para la determinación de NADP y NADPH. El DCPIP es de color azul en su forma oxidada e incoloro cuando está reducido. Las formas reducidas y oxidadas de los nucleótidos de piridina se distinguen por su destrucción en medio ácido o básico, respectivamente (Queval y Noctor, 2007).

Hojas de *A. thaliana* salvaje fueron homogeneizadas en morteros con N<sub>2</sub> líquido y resuspendidas en una solución 0,2 N HCl para la extracción de NAD y NADP, o 0,2 M NaOH para la extracción de NADH y NADPH. El homogenado se centrifugó a 16000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se tomó una alícuota de 400 µL del sobrenadante, que fue hervida por 1 minuto y enfriada rápidamente. Los extractos ácidos se neutralizaron con 40 µL de 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 5,6 y 200 µL de 0,2 M NaOH (pH final entre 5-6). Por otra parte, a los extractos básicos se le adicionaron 400 µL de 0,2 N HCl (pH final entre 7-8).

Las determinaciones se realizaron a 30 °C en un espectrofotómetro Helios β (Unicam), siguiendo la disminución de la absorbancia a 600 nm causada por la reducción de DCPIP. El medio de ensayo (0,5 mL) para la determinación de NAD y NADH contenía 200 mM Tricina pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,12 mM DCPIP, 1 mM PMS, 3 U de ADH (Sigma) y 50 µL de extracto. La reacción se inició con el agregado de 15 µL de etanol absoluto. El medio de ensayo (0,5 mL) para la determinación de NADP y NADPH contenía 200 mM Tricina pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,12 mM DCPIP, 1 mM PMS, 2 mM glucosa 6-P y 50 µL extracto. La reacción se inició con el agregado de 2 U de G6PDH (Sigma). Los valores de absorbancia fueron corregidos usando los correspondientes ensayos blanco sin extracto y se construyeron curvas de calibración a partir de soluciones de NAD y NADP.

### **2.10 Detección de peróxido de hidrógeno con diaminobencidina**

Las plántulas fueron sumergidas en una solución 1 mg/mL de 3,3-diaminobencidina (DAB) durante 8 horas. Posteriormente, fueron desteñidas en 100 % (V/V) etanol por 3 horas y examinadas a la lupa. La presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causa la polimerización del DAB generando una coloración marrón (Thordal-Christensen y col., 1997).

### **2.11 Tinción con hematoxilina**

Para determinar la presencia de aluminio en raíces, las plántulas fueron sumergidas en una solución 0,2 % (P/V) hematoxilina y 0,02 % (P/V) KIO<sub>3</sub> por 30 minutos, lavadas con H<sub>2</sub>O destilada y observadas en la lupa. Este indicador une aluminio presente en los tejidos formando un complejo violeta (Polle y col., 1978).

### **2.12 Preparación de extractos proteicos de Arabidopsis**

Las hojas de la roseta de las líneas en estudio fueron homogeneizadas en morteros con N<sub>2</sub> líquido y resuspendidas en buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-mercaptoetanol, 10 % (V/V) glicerol, 0,5 % (V/V) Tritón X-100 y 1 % (V/V) cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich)). Se utilizó una relación buffer/peso fresco de 0,2 mL/100 mg. El homogenado se centrifugó a 12000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para medidas de actividad enzimática, concentración de proteínas o fue preparado para electroforesis (Secciones 2.13, 2.14 y 2.15, respectivamente).

### **2.13 Ensayos de actividad enzimática**

Se define una unidad (U) como la cantidad de enzima que cataliza la formación o consumo de 1 μmol de NAD(P)H por minuto en las condiciones especificadas ( $\xi_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **2.13.1 Actividad EM-NADP**

La actividad EM-NADP en el sentido de la descarboxilación oxidativa de malato (actividad *directa*) se determinó en un espectrofotómetro Helios  $\beta$  (Unicam) a 30 °C, siguiendo la producción de NADPH a 340 nm (Iglesias y Andreo, 1989). El medio de ensayo estándar contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM malato, 0,5 mM NADP y 10  $\mu$ L de extracto conteniendo la enzima, en un volumen final de 0,5 mL. La reacción se inició con el agregado de malato.

La actividad EM-NADP en el sentido de la carboxilación reductiva (actividad *reversa*) se determinó espectrofotométricamente a 30 °C, siguiendo el consumo de NADPH a 340 nm. El medio de ensayo estándar contenía 50 mM MOPS-KOH pH 7, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM piruvato, 30 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,2 mM NADPH y 0,5-10  $\mu$ L de enzima purificada o 20  $\mu$ L de extracto conteniendo la enzima en un volumen final de 0,5 mL. La reacción se inició con el agregado de piruvato.

Para el estudio de posibles activadores de la actividad EM-NADP en sentido reverso se ensayó el efecto de 7,5 mM fumarato o 7,5 mM succinato, utilizándose una concentración subsaturante de piruvato (0,5 mM).

### **2.13.2 Actividad EM-NAD**

La actividad EM-NAD se determinó espectrofotométricamente a 30 °C, siguiendo la producción de NADH a 340 nm. El medio de ensayo estándar contenía 50 mM MES-NaOH pH 6,6, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM malato, 2 mM NAD y 1 U MDH.

Una vez que la reacción catalizada por la MDH alcanzó el equilibrio, se agregaron 20  $\mu$ L de extracto en un volumen final de 0,5 mL. La adición de MDH asegura que el posterior aumento de la absorbancia se deba únicamente a la descarboxilación de malato por parte de EM-NAD (Tronconi y col., 2008).

### **2.13.3 Actividad MDH-NAD**

La actividad MDH-NAD se determinó espectrofotométricamente a 30 °C, siguiendo el consumo de NADH a 340 nm. El medio de ensayo estándar contenía

50 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,02 % (V/V) Tritón X-100, 2 mM OAA, 0,2 mM NADH y 0,5  $\mu$ L de extracto conteniendo la enzima en un volumen final de 0,5 mL.

#### **2.13.4 Actividad MDH-NADP**

La actividad MDH-NADP inicial se determinó espectrofotométricamente a 30 °C, siguiendo el consumo de NADPH a 340 nm. El medio de ensayo estándar contenía 25 mM Tricina-KOH pH 8,3, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM ditioneitol (DTT), 0,2 mM NADPH, 2 mM OAA y 10  $\mu$ L de extracto conteniendo la enzima en un volumen final de 0,5 mL. Además se midió la actividad total, luego de incubar 10  $\mu$ L del extracto proteico con 0,5  $\mu$ L de 2 M DTT.

#### **2.14 Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteína se determinó con el reactivo Protein Assay (Bio-Rad), utilizando proteína total de suero como testigo.

#### **2.15 Electroforesis de proteínas**

##### **2.15.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes**

Las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se llevaron a cabo utilizando la celda Mini-PROTEAN II de Bio-Rad y el sistema discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970).

Las concentraciones finales de acrilamida fueron 10 % (P/V) para el gel de separación y 5 % (P/V) para el de concentración. Las muestras diluidas 1:5 en buffer de siembra (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 % (V/V) glicerol, 2 % (P/V) SDS, 5 % (V/V) 2-mercaptoetanol y 0,1 % (P/V) azul de bromofenol) se calentaron a 100 °C durante 2 minutos. Los geles fueron analizados por tinción con azul de Coomassie.

### **2.15.2 Electroforesis en condiciones nativas**

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas se llevó a cabo utilizando la celda Mini-PROTEAN III de Bio-Rad. Las concentraciones de acrilamida de los geles de separación y de concentración utilizadas fueron 6 % (P/V) y 3 % (P/V), respectivamente. Las muestras fueron diluidas 1:5 en buffer de siembra (312,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 50 % (V/V) glicerol y 0,05 % (P/V) azul de bromofenol). Los geles fueron revelados por tinción con azul de Coomassie, o por actividad EM-NADP, para lo cual fueron incubados con una solución conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM malato, 0,5 mM NADP, 35 µg/mL azul de nitrotetrazolio (NBT) y 0,85 µg/mL PMS a 30 °C hasta el desarrollo de bandas de color púrpura.

### **2.16 Localización de actividad EM-NADP *in situ***

Para los ensayos de tinción por actividad EM-NADP *in situ*, las plantas fueron fijadas con 2 % (P/V) paraformaldehído y 1 mM DTT en buffer PBS (0,1 % (P/V) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,03 % (P/V) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0,9 % (P/V) NaCl, pH 7) durante 1 hora a 4 °C y lavadas con agua durante toda la noche a 4 °C (Sergeeva y col., 2004). El ensayo de actividad EM-NADP se realizó a 30 °C sumergiendo las plantas en la solución utilizada para el revelado de los geles nativos (Sección 2.15.2) durante 90 minutos. Posteriormente, fueron decoloradas por incubación en 96 % (V/V) etanol a 50 °C durante 1 hora.

### **2.17 Cuantificación de transcriptos**

#### **2.17.1 Extracción de ARN total**

Para la preparación de ARN total de hojas o de raíces de *A. thaliana* se homogeneizaron 50-100 mg de muestra en 1 mL de reactivo TRIzol (Invitrogen) seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,2 mL de cloroformo, se agitó vigorosamente y se repitió la incubación. Posteriormente se centrifugó a 12000 x *g* por 10 minutos a 4 °C para permitir la separación de fases. La fase acuosa se transfirió a un tubo con 0,5 mL de isopropanol y se precipitó el ARN



presente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. El pellet se lavó con 1 mL de 75 % (V/V) etanol, se secó al aire y se resuspendió en agua tratada con 0,1 % (V/V) dietilpicrocarbonato (DEPC). La calidad del ARN purificado se evaluó por electroforesis en geles de 1 % (P/V) agarosa, sembrando en paralelo ADN  $\lambda$  0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L cortado con *EcoRI/HindIII* (Promega) como marcador de tamaño molecular. Las muestras fueron tratadas con ADNasa RQ1, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Promega) y se realizaron controles de PCR para asegurar que los ARN se encontraban libres de contaminación con ADN. La concentración y pureza de la preparación se evaluó mediante medidas de absorbancia a 260 y 280 nm.

### **2.17.2 Transcripción reversa**

Para la síntesis de ADNc, 2  $\mu$ g de ARN total fueron incubados con 2  $\mu$ g de oligo (dT)<sub>15</sub> (Biodynamics) durante 5 minutos a 65 °C, y posteriormente 5 minutos en hielo. A continuación, se adicionó buffer 1X (suministrado por el proveedor de la retrotranscriptasa), 10 mM DTT y 0,5 mM mezcla de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs). Luego de una incubación de 2 minutos a 38 °C, se adicionaron 200 U de Transcriptasa Reversa SuperScript II (Invitrogen) (volumen final 20  $\mu$ L). La reacción se llevó a cabo durante 50 minutos a 42 °C. Finalmente, se inactivó la enzima con un tratamiento de 5 minutos a 72 °C.

### **2.17.3 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)**

La expresión relativa de genes fue determinada mediante qRT-PCR en un termociclador Mx3000P (Stratagene), usando el colorante SYBR Green I (Invitrogen) como reportero fluorescente. Cada tubo de reacción contenía en un volumen final de 20  $\mu$ L: 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M de cada cebador, 0,75 % (V/V) SYBR Green I y 0,02 U/ $\mu$ L Taq Platinum (Invitrogen). Los parámetros de programación utilizados fueron: 94 °C por 2 minutos para la desnaturalización inicial, 46 ciclos a 95 °C por 10 s, 56 °C por 15 s y 72 °C por 20 s para la amplificación de los productos, y 10

minutos a 72 °C para la elongación final. Las curvas de desnaturalización para cada producto se determinaron midiendo fluorescencia al aumentar la temperatura desde 65 °C a 98 °C. La secuencia de los cebadores utilizados se detalla en la Tabla 2.4.

Distintas diluciones de los ADNc obtenidos (Sección 2.17.2) se utilizaron como molde para la reacción. La especificidad de la amplificación se confirmó analizando las curvas de desnaturalización y mediante análisis de los productos en geles 2 % (P/V) agarosa (algunos de los cebadores fueron diseñados de manera que den productos de tamaños diferentes si la amplificación ocurrió a partir de ADN genómico) utilizando 100 pb (EmbioTec) como marcador de peso molecular.

El gen de referencia utilizado fue *poliubiquitina10* (At4g05320), que exhibe un patrón de expresión estable en las condiciones analizadas en este trabajo (Czechowski y col., 2005). La expresión relativa fue calculada mediante una versión modificada del método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que tiene en cuenta las diferencias entre las eficiencias de amplificación del gen de interés y del gen de referencia (Pfaffl, 2001). El cálculo de las eficiencias se realizó según Liu y Saint, 2002, y la propagación de errores se llevó a cabo de acuerdo a Hellemans y col., 2007.

**Tabla 2.4** Secuencia de los oligonucleótidos cebadores utilizados para qRT-PCR.

Gen	Cebador	Secuencia (5' - 3')
<i>em-nadp1</i> (At1g19900)	EM-NADP1directo	CAAGGCAATAAAAACCGACTG
	EM-NADP1reverso	GGCTTCCACTAGCAAAAATG
<i>em-nadp2</i> (At5g11670)	EM-NADP2directo	ACGATGGCAAAACCTACTTG
	EM-NADP2reverso	ATTGGCGTAATGCTCTTCTG
<i>em-nadp4</i> (At1g79750)	EM-NADP4directo	CTTTCGAACCCAATTCTCA
	EM-NADP4reverso	CATTATTAGCCCGAGTCCAA
<i>em-nad1</i> (At2g13560)	EM-NAD1directo	GCACGAATGTTGGGAAATAC
	EM-NAD1reverso	AAACCAAGAAGCACATCAGG
<i>em-nad2</i> (At4g00570)	EM-NAD2directo	GGCATCCTTTACCCTTCAAT
	EM-NAD2reverso	ACCACATGTTGCGTGTAATG
<i>mdh-nad1 cit</i> (At1g04410)	MDH1directo	AATTGCACAAACCCATTATC
	MDH1reverso	TGATGAGTATTGTCCCTGGTC
<i>mdh-nad1 mt</i> (At1g53240)	MDH2directo	CCTCCTTCATCGGGTTGTAT
	MDH2reverso	GGAACCAACCCACACTTATG
<i>mdh-nad1 px</i> (At2g22780)	MDH3directo	AACCACTTTGTTCTTAGATAC
	MDH3reverso	AGGTATGAGGTATCCCGAAT

Gen	Cebador	Secuencia (5' - 3')
<i>mdh-nad2 mt</i> (At3g15020)	MDH4directo	CTCCATTTCTGCTCTTGAGG
	MDH4reverso	GCCCAAATAATGCAACTCAC
<i>mdh-nad pt</i> (At3g47520)	MDH5directo	TCAGACCTTCAGGGATTGAC
	MDH5reverso	ACAACACGAAAATGTCTCGC
<i>mdh-nad2 px</i> (At5g09660)	MDH6directo	TGGTCTGGAGAAAGCAAAG
	MDH6reverso	AGAAGCAGAGGAGACATAGGC
<i>mdh-nad2 cit</i> (At5g43330)	MDH7directo	GACCATTGTTCAAGGTTT
	MDH7reverso	CATGGGCACATTAGGAAAAC
<i>mdh-nad3 cit</i> (At5g56720)	MDH8directo	TGGGTTTCTATGGGTGTTTG
	MDH8reverso	CTTCTTTCAGCTAGCTCTCGTGC
<i>mdh-nadp pt</i> (At5g58330)	MDH9directo	AGTCGGAAGCGGAAGTGTG
	MDH9reverso	TAACAACCCGGAAGAGAATG
<i>almt1</i> (At1g08430)	ALMT1directo	CTCATTGATGACGACTGTCTCC
	ALMT1reverso	AATCTATTGGCATGGCACGA
<i>mate</i> (At1g51340)	MATEdirecto	ACTTCCGTTTGTGGCAGG
	MATereverso	GAATCCAACGGCTGCTCTAA
<i>als1</i> (At5g39040)	ALS1directo	TCTCAGGAGGACAGAAGCAA
	ALS1reverso	ACCGTTCTCCCGCCATTA
<i>als3</i> (At2g37330)	ALS3directo	CATTGGCACTAGGAGCAACG
	ALS3reverso	CCCCGCCATTATCATAcca
<i>stop1</i> (At1g34370)	STOP1directo	ACACAGCCTGGAATGACTGA
	STOP1reverso	CAACATTCTGGGCGAGAAA
<i>poliubiquitina 10</i> (At4g05320)	UBQdirecto	AAGCAGCTTGAGGATGGAC
	UBQreverso	AGATAACAGGAACGGAAACATAGT

*cit*, *mt*, *px* y *pt* indican la localización confirmada experimentalmente o predicha de las isoformas: citosol, mitocondria, peroxisoma y plastidio, respectivamente.

## 2.18 Cuantificación de carbohidratos y ácidos orgánicos por métodos enzimáticos

Para la extracción de metabolitos, las muestras de raíces u hojas se homogeneizaron en un mortero con N<sub>2</sub> líquido y se resuspendieron en 1,4 mL de metanol. Los extractos se incubaron a continuación durante 15 minutos a 70 °C. Después de la adición de 0,75 mL de cloroformo, se incubaron durante 5 minutos a 37 °C, se diluyeron con 1,5 mL de agua destilada y centrifugaron a 2200 x g durante 15

minutos. La fase polar se dividió en alícuotas que fueron secadas al vacío y resuspendidas en agua al momento de realizar las medidas.

El contenido de glucosa, fructosa, sacarosa, malato, fumarato y piruvato se determinó mediante ensayos enzimáticos de punto final (Bergmeyer, 1976; Stitt y col., 1989). Estos métodos se basan en la cuantificación fotométrica de NADH generado, por ejemplo, en el caso de la determinación de los azúcares, por la G6PDH. En pasos sucesivos se agregan al medio de medida distintas enzimas que convierten los azúcares en glucosa-6P: hexoquinasa, hexosa isomerasa e invertasa. De esta manera, luego de cada agregado la cantidad de NADH formado es proporcional a la cantidad del azúcar convertido en glucosa-6P en ese paso. De manera similar, para la determinación de malato y fumarato se mide la producción de NADH luego de añadir las enzimas MDH y fumarasa a un medio conteniendo GOT y glutamato (para consumir el OAA generado), mientras que en el caso de piruvato se sigue el consumo de NADH por parte de la enzima lactato deshidrogenasa.

Para la determinación de almidón, el material insoluble en metanol se homogeneizó en 0,2 N KOH, se ajustó a pH 5,5 con ácido acético 1 N y se incubó durante toda la noche con 3,5 U  $\alpha$ -amilasa y 2,5 U amiloglucosidasa a 25 °C. La digestión se incubó 5 minutos a 95 °C y se centrifugó a 16000 x *g* durante 10 minutos. El contenido de glucosa del sobrenadante resultante se determinó como se describe anteriormente. Para la construcción de las curvas de calibración se utilizaron soluciones estándar de cada metabolito analizado.

### ***2.19 Determinación de metabolitos por cromatografía gaseosa seguida de espectrometría de masas (GC-MS)***

Los metabolitos polares fueron extraídos como se describe en la Sección 2.18, con el agregado de 15  $\mu$ g de ribitol. Las muestras fueron derivatizadas por metoxiaminación utilizando una solución 20 mg/mL de hidrocloreuro de metoxiamina disuelto en piridina, y luego tratadas con N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida. Una alícuota de cada muestra derivatizada y trimetilsililada fue inyectada a 230 °C, con helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min, en el sistema GC-MS Shimadzu QP 2010 plus equipado con una columna VF-5 ms de 30 m x 0,25 mm (Varian). El

programa de temperaturas utilizado para la adquisición de los cromatogramas fue el siguiente: 5 minutos a 70 °C, seguidos de una rampa de 5 °C por minuto hasta 350 °C, y manteniendo dicha temperatura por 5 minutos. El equipo ioniza la muestra mediante impacto electrónico (70 eV). Los espectros se adquirieron en el rango de 50-600 m/z.

Los cromatogramas y espectros de masa fueron evaluados utilizando el software AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>). La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masa obtenidos con aquellos disponibles en la base de datos Golm (*Golm Metabolome Database*, <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>). Las señales fueron normalizadas al estándar interno ribitol permitiendo realizar una cuantificación relativa de los metabolitos. Al menos tres replicas biológicas de cada muestra fueron corridas por duplicado.

## **2.20 Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico**

Para la transformación de bacterias *E. coli* se siguió la técnica de electroporación. Para ello, se prepararon bacterias competentes inoculando 1 L de medio LB (1 % (P/V) triptona, 0,5 % (P/V) extracto de levaduras y 0,5 % (P/V) NaCl) con un cultivo fresco de la correspondiente cepa de *E. coli*. Las células se crecieron a 37 °C con agitación continua hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0,5-0,8 UA. El cultivo se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 4000 x g por 15 minutos a 4 °C. El pellet conteniendo las células se lavó 2 veces con 1 L de agua fría y luego con 20 mL de 10 % (V/V) glicerol frío. El pellet obtenido en el último lavado se resuspendió en 3 mL de 10 % (V/V) glicerol frío. La concentración de células fue de 1-3x10<sup>6</sup> células/mL.

Para la electroporación se colocaron 40 µL de la suspensión celular obtenida y 1 µL de plásmido o 5 µL de mezcla de ligación en un tubo Eppendorf. La mezcla se incubó en hielo durante 1 minuto y se transfirió a una cubeta de electroporación. Se utilizó el electroporador Gene Pulser (Bio-Rad). Las condiciones para la electroporación fueron 25 µF, 2,5 kV y 200 Ω. Luego de la descarga, se agregó a la cubeta 1 mL de medio SOC (2 % (P/V) triptona, 0,5 % (P/V) extracto de levaduras, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> y 20 mM glucosa). La suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf y se agitó a 37 °C durante 1 hora. Luego de este período, las células se

sembraron en placas de Petri con medio LB agar (LB y 1,5 % (P/V) agar) conteniendo los antibióticos y reactivos adecuados según el caso.

### **2.21 Extracción de ADN plasmídico**

La preparación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando columnas QIAprep (Qiagen). Se crecieron células de *E. coli* transformadas con el plásmido a purificar en 3 mL de medio LB en presencia del agente de selección durante toda la noche a 37 °C y con agitación. Este cultivo se centrifugó a 2000 x *g* por 3 minutos. El pellet se resuspendió en 100 µL de una solución fría de 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 50 mM glucosa y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregaron 200 µL de una solución recién preparada de 0,2 N NaOH y 1 % (P/V) SDS y se mezcló por inversión. Posteriormente, se agregaron 150 µL de 5 M acetato de potasio pH 4,8, se agitó vigorosamente, se incubó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 12000 x *g* por 5 minutos. El sobrenadante se mezcló con 300 µL de 6 M KI y 10 µL de 3 M acetato de potasio pH 5,5 y se colocó en la columna QIAprep, se centrifugó durante 1 minuto a 12000 x *g* y se descartó el eluido. El ADN adsorbido a la membrana de sílica se lavó con 750 µL de 80 % (V/V) etanol. Por último, se adicionaron 100 µL de H<sub>2</sub>O destilada, se dejó reposar 3 minutos y se centrifugó 1 minuto a 12000 x *g* para recolectar el ADN plasmídico en un tubo Eppendorf.

### **2.22 Digestión de plásmidos y purificación de fragmentos de ADN**

Los plásmidos fueron digeridos siguiendo las instrucciones del proveedor de las enzimas de restricción utilizadas (Promega, Fermentas). Luego, las mezclas de digestión se diluyeron 1:6 con buffer de siembra (30 % (V/V) glicerol, 0,25 % (P/V) xilencianol y 0,25 % (P/V) azul de bromofenol) y se corrieron en geles de 1 % (P/V) agarosa de bajo punto de fusión preparados con buffer TBE (89 mM Tris-borato pH 8 y 2 mM EDTA) y 0,003 % (V/V) SYBR Safe (Invitrogen).

Los fragmentos se recuperaron del gel cortando la banda correspondiente, y se purificaron utilizando el kit de purificación de ADN Illustra GFX (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del proveedor.

La calidad y concentración de los fragmentos purificados se evaluó por electroforesis en geles de 1 % (P/V) agarosa, sembrando en paralelo 0,5 µg/µL ADN λ cortado con *EcoRI/HindIII* (Promega) como marcador de tamaño molecular.

## **2.23 Clonado de las isoformas EM-NAD(P) de *A. thaliana* en el vector p416GDP**

### **2.23.1 Obtención de los ADNc**

Los ADNc codificando las proteínas maduras EM-NAD(P) fueron obtenidos a partir de construcciones disponibles en nuestro laboratorio (Tabla 2.2), siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación.

Para generar los insertos EM-NADP2Del2, EM-NADP4, EM-NAD1 y EM-NAD2 fue necesario realizar un paso previo de amplificación por PCR para incorporar el codón ATG. Para ello se utilizó la ADN Polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo Fisher Scientific). Las reacciones se desarrollaron en un volumen final de 50 µL conteniendo 0,2 mM mezcla de dNTPs, 0,5 µM oligonucleótidos cebadores específicos para el fragmento de interés, buffer de amplificación 1X (que aporta 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, suministrado por el proveedor de la enzima), 10 ng de ADN molde y 0,5 U de Phusion ADN Polimerasa.

Los plásmidos pET-32a/EM-NADP2Del2, pET-32b/EM-NADP4, pET-32a/EM-NAD1 y pET-32a/EM-NAD2 fueron utilizados como molde para las amplificaciones, y los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron:

EM-NADP2Del2ATG/*Bam*HI: 5' GGATCCATGGTCGCTAGTGGCTACACATT 3'

EM-NADP2/*Xho*I: 5' CTCGAGTTAACGGTAGTTTCTGTACAC 3'

EM-NADP4ATG/*Eco*RV: 5' GATATCATGAAATCCACCGTATCTGGTGG 3'

EM-NADP4/*Xho*I: 5' CTCGAGCTTATCCTCAGCGGTAG 3'

EM-NAD1ATG/*Bam*HI: 5' GGATCCATGCCACCATCGTTCATAAA 3'

EM-NAD1/*Sal*I: 5' GTCGACTTAGTCATCCTTGTAGAC 3'

EM-NAD2ATG/*Bam*HI: 5' GGATCCATGTGCATCGTCCACAAGCGT 3'

EM-NAD2/*Sal*I: 5' GTCGACCTATTTCTCGTGAAC 3'

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems), comenzando con una etapa de desnaturalización inicial de 45 s a 98 °C seguida de 30 ciclos compuestos por tres etapas: 10 s a 98 °C, 30 s a 63 °C y 30 s a 72 °C. Por último, se realizó una etapa de 10 minutos a 72 °C para la elongación final. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de 1 % (P/V) agarosa, sembrando en paralelo ADN  $\lambda$  0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  cortado con *EcoRI/HindIII* (Promega).

Los productos de amplificación obtenidos fueron purificados utilizando el kit Illustra GFX (GE Healthcare) e introducidos en el vector pBluescriptSK(-) mediante un protocolo de restricción-ligación para el clonado de fragmentos con extremos romos. Las mezclas de ligación se desarrollaron en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  conteniendo buffer de ligación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima), 1 U de T4 ADN Ligasa (Promega), 3 U de *EcoRV* (Promega) y los fragmentos de ADN purificados en una relación molar vector:inserto de 1:6 (con 0,1  $\mu\text{g}$  de vector). Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 16 °C. Luego, se transformaron bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  utilizando la técnica de electroporación (Sección 2.20) y se sembraron en placas de Petri con medio LB agar conteniendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicilina como agente de selección, 100  $\mu\text{M}$  IPTG y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  X-Gal. Las bacterias transformantes que poseían el vector ligado con el inserto se evidenciaron como colonias blancas. Para confirmar que las colonias transformantes poseían el vector ligado con el inserto, se extrajo ADN plasmídico de las mismas (Sección 2.21). Los plásmidos fueron digeridos usando distintas enzimas de restricción y se analizaron los tamaños moleculares de los fragmentos generados por electroforesis en geles de 1 % (P/V) agarosa, sembrando en paralelo ADN  $\lambda$  0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  cortado con *EcoRI/HindIII* (Promega).

Una variante utilizada para el análisis de bacterias transformantes fue la de PCR de colonias. En este caso, las reacciones se desarrollaron en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM mezcla de dNTPs, 1  $\mu\text{M}$  oligonucleótidos cebadores específicos para el fragmento de interés, buffer de amplificación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima) y 1,25 U de *Taq* ADN Polimerasa (Promega). Se colocó directamente cada colonia bacteriana a analizar dentro del tubo de reacción y se llevó a cabo la amplificación en el termociclador Gene Amp PCR System 2400, comenzando con una etapa de 3 minutos a 94 °C seguida de 30 ciclos compuestos por tres etapas: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C y 2 minutos a 72 °C.



Por último, se realizó una etapa de 5 minutos a 72 °C. Los productos se analizaron por electroforesis en geles de 1 % (P/V) agarosa, sembrando en paralelo ADN  $\lambda$  0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  cortado con *EcoRI/HindIII* (Promega).

Las construcciones fueron secuenciadas utilizando los cebadores T7 *promoter* (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') y T3 (5' ATTAACCCTCACTAAAG 3') (Promega), por el servicio Macrogen Korea mediante el método *Big Dye TM terminator* con el secuenciador 3730XL DNA Analyser.

### 2.23.2 Subclonado en el vector p416GPD

Posteriormente, se digirieron los plásmidos obtenidos con los pares de enzimas de restricción que se indican a continuación: pBSK/EM-NADP4 con *EcoRV* y *XhoI*, pBSK/EM-NADP2Del2 con *BamHI* y *XhoI*, y pBSK/EM-NAD1 y pBSK/EM-NAD2 con *BamHI* y *Sall*.

Por otro lado, para obtener el inserto EM-NADP1, se digirió el vector pET-32c/EM-NADP1 con las enzimas *EcoRV* y *XhoI*, mientras que para EM-NADP2, EM-NADP2R115A, y EM-NADP3 se digirieron los vectores pET-32a/EM-NADP2, pET-32a/EM-NADP2R115A y pET-32a/EM-NADP3, respectivamente, con *BamHI* y *XhoI*.

Las digestiones y la purificación de los fragmentos de interés se realizaron tal cual se detalla en la Sección 2.22.

El vector p416GDP fue digerido con los pares de enzimas de restricción correspondientes de acuerdo a los sitios que presentaba cada inserto y también purificado. Las mezclas de ligación se desarrollaron en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  conteniendo buffer de ligación 1X (suministrado por el proveedor de la enzima), 3 U de T4 ADN Ligasa (Promega) y los fragmentos de ADN purificados en una relación molar vector:inserto de 1:3 (con 0,1  $\mu\text{g}$  de vector purificado). Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 16 °C. Posteriormente, se realizó la transformación de bacterias *E.coli* DH5 $\alpha$  por electroporación, la selección de las colonias transformantes, en placas con medio LB agar conteniendo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ampicilina y la identificación de los clones que poseían el vector ligado con el inserto por PCR de colonia, o análisis de patrones de restricción de los ADN plasmídicos purificados, como se describió previamente.

### **2.24 Transformación de *S. cerevisiae* con ADN plasmídico**

La transformación de levaduras se realizó de acuerdo al método que utiliza acetato de litio, ADN transportador simple hebra y PEG (Gietz y Woods, 2002). Un cultivo de *S. cerevisiae* crecido durante toda la noche en medio YPD (1 % (P/V) extracto de levadura, 2 % (P/V) peptona y 2 % (P/V) glucosa) con agitación continua a 30 °C, se utilizó para inocular 100 mL del mismo medio. Después de haber alcanzado una densidad celular de  $2 \times 10^7$  células/mL, las células fueron recolectadas por centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos, lavadas con 25 mL de agua destilada estéril y resuspendidas en 100 mM acetato de litio en un volumen final conteniendo  $2 \times 10^9$  células/mL. El ADN transportador simple hebra fue preparado por ebullición de 1 mL de ADN de esperma de salmón durante 5 minutos y enfriado rápidamente. Para la transformación, se peletearon 50 µL de la suspensión celular obtenida en un tubo Eppendorf y se añadió consecutivamente: 240 µL 50 % (P/V) PEG 3500, 36 µL 1 M acetato de litio, 50 µg ADN transportador simple hebra, 0,1 µg plásmido y H<sub>2</sub>O destilada estéril para un volumen final de 350 µL. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 30 °C, seguido de un choque térmico de 42 °C durante 30 minutos. Las células se sembraron en placas con medio sintético sin uracilo (0,3 % (P/V) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 % (P/V) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,66 % (P/V) L-aspartato, 2 % (P/V) glucosa, elementos traza y vitaminas (Verduyn y col., 1992)) y se incubaron durante 2 días a 30 °C. Las transformaciones se verificaron adicionalmente a través de PCR de colonia.

### **2.25 Preparación de extractos proteicos de *S. cerevisiae***

Las muestras para la preparación de los extractos proteicos fueron tomadas de cultivos en crecimiento exponencial. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos a 4 °C, lavadas con H<sub>2</sub>O destilada, resuspendidas en 10 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA pH 7,5 y almacenadas a -20 °C. Cada muestra, conteniendo aproximadamente 60 mg de biomasa, fue lavada y resuspendida en 10 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 mM DTT en un volumen final de 4 mL. Los extractos fueron sometidos a pulsos de ultrasonido en sonicador MSE en presencia de perlas de vidrio (0,4-0,6 mm de diámetro) durante 2 minutos. Posteriormente, se realizó una

centrifugación a 10000 x *g* durante 20 minutos a 4 °C para obtener los extractos libres de células, que se utilizaron para determinación de concentración de proteínas y ensayos de actividad enzimática.

## **2.26 Ensayos de complementación de *S. cerevisiae***

### **2.26.1 Cultivo en placas**

Las cepas fueron pre-cultivadas en erlenmeyers con medio sintético conteniendo 0,3 % (P/V)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 % (P/V)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , vitaminas, elementos traza, 0,66 % (P/V) L-aspartato, y 2 % (P/V) glucosa (Verduyn y col., 1992). Las células en crecimiento exponencial fueron lavadas con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril y estriadas en placas de Petri. El medio sólido se preparó adicionando 2 % (P/V) agar al medio sintético y 0,5 % (P/V)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en reemplazo de aspartato como fuente de nitrógeno. Además se suplementó el medio con 0,042 % (P/V) Tween 80 (Merck) y 1 % (P/V) ergosterol (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol para permitir el crecimiento bajo condiciones anaeróbicas (Verduyn y col., 1990). Las placas se incubaron por 20 días a 30 °C en condiciones aeróbicas, y anaeróbicas bajo distintas concentraciones de  $\text{CO}_2$ : 0 % (V/V)  $\text{CO}_2$  en frascos bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , 6 % (V/V)  $\text{CO}_2$  en cámara y 10 % (V/V)  $\text{CO}_2$  en frascos con una sobrepresión de 0,2 bar.

### **2.26.2 Cultivo en medio líquido**

Las cepas pre-cultivadas en medio sintético fueron utilizadas para inocular erlenmeyers conteniendo el mismo medio con 0,5 % (P/V)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en reemplazo de aspartato, 0,042 % (P/V) Tween 80 y 1 % (P/V) ergosterol disuelto en etanol. Los cultivos fueron mantenidos en un agitador orbital a 150 rpm en una cámara anaeróbica con una atmósfera compuesta de 5 % (V/V)  $\text{H}_2$ , 6 % (V/V)  $\text{CO}_2$  y 89 % (V/V)  $\text{N}_2$  a 30 °C. El crecimiento fue monitoreado por medidas de la densidad óptica (absorbancia a 660 nm) de muestras tomadas en condiciones de esterilidad a intervalos regulares de tiempo.

### **2.26.3 Cultivo en biorreactores**

El estudio de crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* en cultivos anaeróbicos discontinuos se llevó a cabo en biorreactores de laboratorio (Applikon, grupo de trabajo del Dr. van Maris, laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad de Delft, Holanda) de 1 L de volumen. Las cepas fueron pre-cultivadas en erlenmeyers con medio sintético, lavadas y utilizadas para la inoculación de los cultivos en biorreactores. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 30 °C durante aproximadamente 200 horas en medio sintético con 0,5 % (P/V)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno. Además se añadieron al medio 0,075 % (P/V) Antifoam C (Sigma-Aldrich) para evitar la excesiva formación de espuma, 0,042 % (P/V) Tween 80 y 1 % (P/V) ergosterol disuelto en etanol. El pH se ajustó a 5 y se mantuvo constante por agregado de 2 M KOH. Las condiciones anaeróbicas fueron mantenidas por burbujeo con nitrógeno y 10 % (V/V) de  $\text{CO}_2$  a un flujo de gas de 250 mL/min. La velocidad de agitación se mantuvo constante a 800 rpm.

Se tomaron muestras de los cultivos en condiciones de esterilidad a distintos tiempos para calcular los parámetros de crecimiento, a partir de medidas de la densidad óptica a 660 nm, biomasa y concentración de metabolitos extracelulares.

La biomasa se cuantificó filtrando 10 mL de cultivo en membranas (0,45  $\mu\text{m}$ ) y determinando el peso seco de los filtros.

Para el análisis de los metabolitos, los sobrenadantes se separaron de las células por centrifugación a 10000 x *g* durante 5 minutos a 4 °C. Las concentraciones extracelulares de acetato, etanol, glucosa, glicerol, lactato, piruvato y succinato se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 x 100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) acoplada al detector de longitud de onda variable 1260 Infinity (Agilent).

## **2.27 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli***

### **2.27.1 Expresión y purificación de las proteínas de fusión**

Para la expresión y purificación de las proteínas EM-NADP2 y EM-NADP2Del2, cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los vectores pET-32a/EM-NADP2 y

pET-32a/EM-NADP2Del2 (Tabla 2.2) fueron crecidas en 200 mL de medio LB conteniendo 100 µg/mL ampicilina a 30 °C con agitación hasta que la absorbancia a 600 nm fue de 0,5-1 UA. La expresión se indujo con el agregado de 0,5 % (P/V) lactosa y se continuó la incubación durante toda la noche a 15 °C. Los cultivos inducidos fueron centrifugados a 10000 x *g* durante 10 minutos a 4 °C y las células fueron resuspendidas en 20 mL de una solución conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M NaCl, 0,01 % (V/V) Tritón X-100 y 1 mM PMSF. Este buffer posee elevada fuerza iónica (0,25 M NaCl), un inhibidor de proteasas (PMSF) y un detergente no iónico (Tritón X-100) para favorecer la estabilidad de las proteínas en solución durante la preparación de los extractos celulares.

Luego de 3 pulsos de ultrasonido de 10 s en sonicador MSE, se centrifugó 10 minutos a 14000 x *g* a 4 °C y se separó el sobrenadante (fracción soluble) del pellet (fracción insoluble). La fracción soluble obtenida se sembró en una columna con 5 mL de resina Niquel-NTA (Qiagen) diseñada para la purificación de proteínas de fusión con una secuencia de polihistidinas. La columna fue previamente lavada con 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada, cargada con 25 mL de 50 mM NiSO<sub>4</sub> y equilibrada con 15 mL de buffer de unión (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl y 5 mM imidazol). Luego de la siembra, la columna se lavó con 50 mL de buffer de unión y 30 mL de buffer de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl y 49 mM imidazol). La proteína unida a la resina se eluyó con 15 mL de una solución conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl y 200 mM imidazol. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. El eluido se concentró en Centricom YM-30 (Amicon) con un corte de 30 kDa centrifugando a 4 °C a 2000 x *g*. Luego, se realizaron dos cambios de buffer agregando 10 volúmenes de buffer TMG (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % (V/V) glicerol) en cada cambio. Por último, las proteínas purificadas concentradas fueron almacenadas a -80 °C.

Se tomaron alícuotas de cada uno de los pasos de la purificación y se analizaron por SDS-PAGE (Sección 2.15.1)

### **2.27.2 Digestión del extremo amino terminal de las proteínas de fusión**

Las proteínas de fusión fueron tratadas con la proteasa enteroquinasa de Invitrogen (EKMax, subunidad catalítica expresada de manera recombinante) para

remover el extremo amino terminal codificado por el vector. Se utilizaron 20 U de proteasa para la digestión de 400  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante, en un medio conteniendo 1 mM PMSF, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  y llevado a un volumen final de 3 mL con buffer TMG. Esta solución se incubó durante 4 horas a 15 °C. Las digestiones fueron analizadas por SDS-PAGE (Sección 2.15.1).

### **2.27.3 Purificación de EM-NADP luego de la digestión con enteroquinasa**

Luego de la digestión, las proteínas se sembraron en una columna con 2 mL de resina AffiGel Blue (Bio-Rad), la cual une enzimas que utilizan nucleótidos. La columna fue previamente lavada con 20 mL de agua y equilibrada con 10 mL de buffer TMG conteniendo 50 mM NaCl. Luego de la siembra, la columna se lavó con 12 mL de buffer TMG conteniendo 50 mM NaCl y la proteína unida a la resina se eluyó con 10 mL de buffer TMG conteniendo 0,5 M NaCl. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. El eluido se concentró en Centricom YM-30 (Amicon) con un corte de 30 kDa centrifugando a 4 °C a 2000 x *g*. Luego, se realizaron dos cambios de buffer agregando 10 volúmenes de buffer TMG en cada cambio. Por último, las proteínas concentradas fueron alicuotadas y almacenadas a -80 °C.

### **2.28 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante t-test o ANOVA de un factor y el test de Bonferroni ( $\alpha= 0,05$ ) (programa SigmaPlot v.11).



### **3 Caracterización de plantas de *Arabidopsis thaliana* con niveles modificados de EM-NADP2**

En este Capítulo se presenta una caracterización de plantas de *A. thaliana* con niveles modificados de EM-NADP2, la isoforma responsable de la mayor parte de la actividad EM-NADP en tejidos maduros de esta planta (Gerrard Wheeler y col., 2005). Se llevó a cabo un estudio fenotípico de estas líneas vegetales en condiciones normales de crecimiento y se realizó un análisis comparativo que incluyó determinación de niveles de expresión de genes, perfiles de actividad enzimática, estado redox de los nucleótidos de piridina y contenido de metabolitos. Además se realizó un estudio de la respuesta de estas plantas ante condiciones de estrés hídrico, y una posterior caracterización metabólica y redox de las plantas estresadas.

#### **3.1 Estudio fisiológico y molecular de líneas de *A. thaliana* sobreexpresantes de EM-NADP2**

En esta parte del trabajo se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 salvaje (wt) y tres líneas transgénicas obtenidas por eventos independientes de transformación de plantas Col-0 con una construcción conteniendo el ADNc de *em-nadp2* bajo el control del promotor constitutivo 35SCaMV (Sección 2.3, Figura 2.1b). Las líneas sobreexpresantes de EM-NADP2 analizadas, denominadas EM4.20, EM7.11 y EM6.20, corresponden a plantas transgénicas homocigotas T3 seleccionadas por su resistencia a glufosinato de amonio. La presencia del transgen fue previamente verificada por PCR.



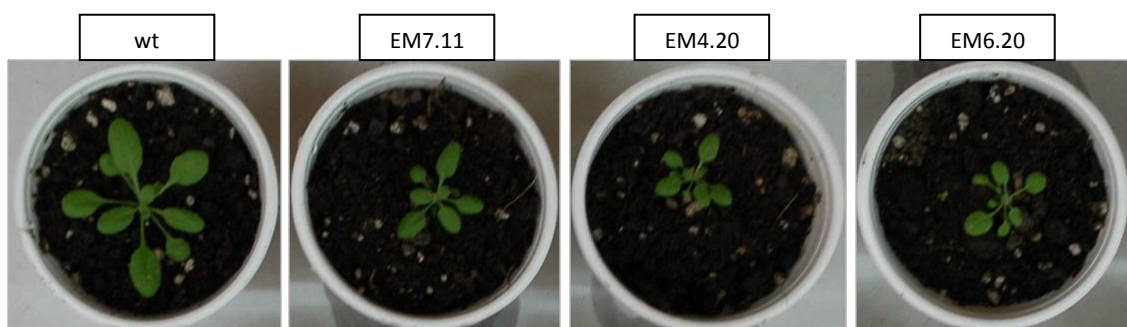
### 3.1.1 Análisis de parámetros fenotípicos

Las líneas vegetales fueron crecidas en condiciones estándar (16 horas de luz, flujo de  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), al igual que la planta salvaje, utilizada como control. En estas condiciones, las plantas sobreexpresantes resultaron más pequeñas (Figura 3.1).

Se realizó una evaluación de varios parámetros fenotípicos, así como un análisis cuantitativo del contenido de pigmentos en hojas de la roseta (Secciones 2.5 y 2.6).

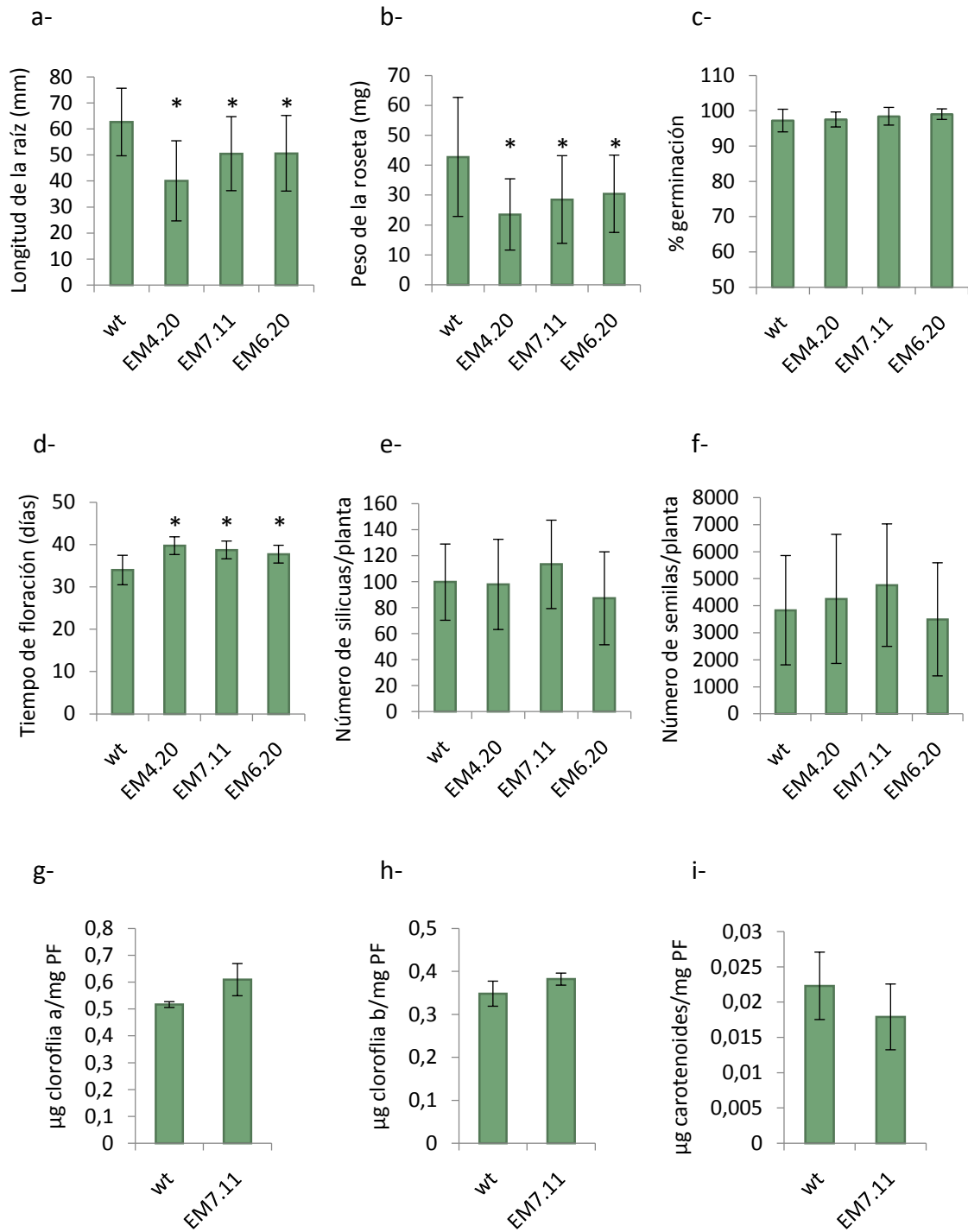
Las plantas EM4.20, EM7.11 y EM6.20 mostraron una disminución significativa en la longitud de la raíz y en el peso de la roseta, así como un retraso en el tiempo de aparición del primordio floral con respecto a la planta salvaje (Figura 3.2a, b y d). Los restantes parámetros fenotípicos analizados, como la tasa de germinación y el número de silicuas y semillas por planta, no revelaron diferencias significativas entre las líneas sobreexpresantes y wt (Figura 3.2c, e y f). Adicionalmente, el contenido de clorofilas y carotenoides determinado en la línea EM7.11, fue similar al obtenido para la planta salvaje (Figura 3.2g-i).

A continuación, se analizó la eficiencia máxima del fotosistema II (PSII),  $F_v/F_m$ , la cual es una medida de la eficiencia máxima de la conversión de la energía absorbida por las antenas del PSII en energía química (reducción de la quinona), y la tasa de asimilación de  $\text{CO}_2$ . Estos parámetros fotosintéticos resultaron significativamente menores en las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2 (Figura 3.2j y k). El contenido de almidón, por el contrario, fue mayor en estas plantas con respecto a la planta salvaje (Figura 3.2l).



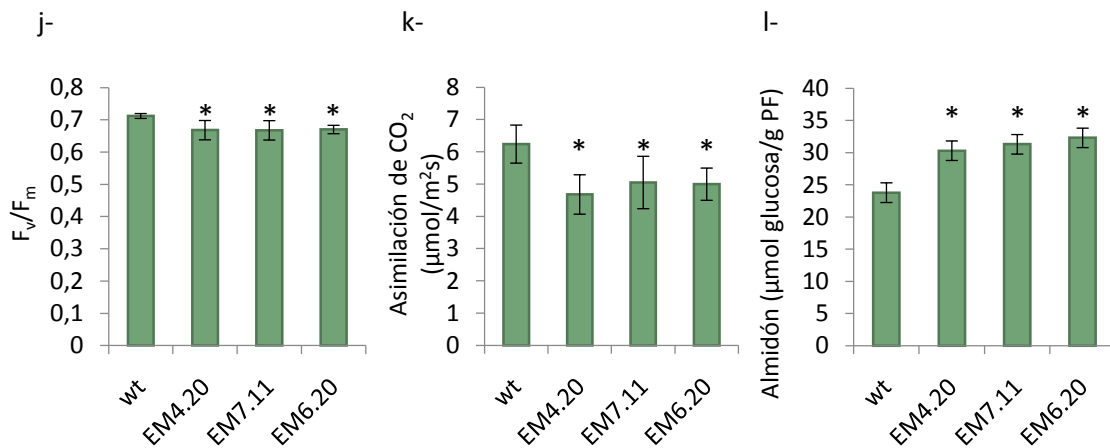
**Figura 3.1**

Ejemplares típicos de 21 días de las distintas líneas de Arabidopsis en estudio, crecidas en condiciones estándar.



**Figura 3.2**

Parámetros fenotípicos, contenido de pigmentos y parámetros fotosintéticos determinados para las distintas líneas. a- Longitud de la raíz primaria de plantas de 7 días. b- Peso fresco de la roseta de plantas de 32 días. c- Porcentaje de semillas germinadas. d- Tiempo de aparición del primordio floral. e- Número de silicuas por planta luego de 18 días de la aparición del primordio floral. f- Número de semillas por planta. g- Contenido de clorofila a. h- Contenido de clorofila b. i- Contenido de carotenoides. (Continúa en la página siguiente)



**Figura 3.2** (continuación)

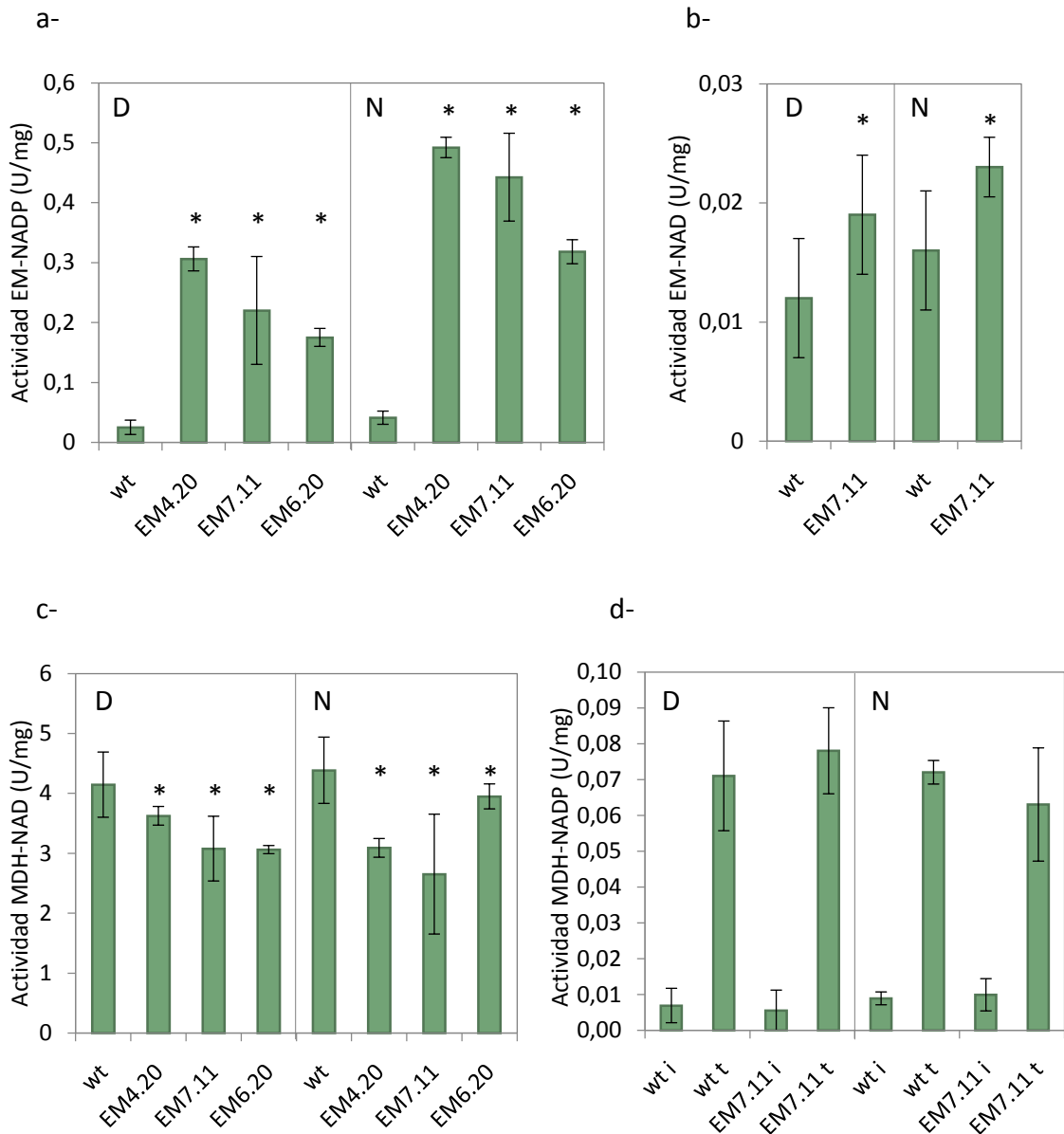
j-  $F_v/F_m$  en plantas de 32 días. k- Asimilación de  $CO_2$  de plantas de 36 días. l- Glucosa hidrolizada a partir de almidón en muestras de plantas de 32 días recolectadas 30 minutos antes del final del día. PF, peso fresco. Se muestra el valor promedio de cada parámetro, determinado para n individuos (a-, e- y f-: n=16; b- y d-: n=24; c-: n=3 placas para cada línea conteniendo 100 semillas cada una; g-, h-, i-, j-, k-: n=6; l-: n=3) y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a la planta wt ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2 Niveles de actividad y expresión de enzima málica

Se examinaron los niveles de actividad EM-NADP en extractos de hoja de muestras tomadas en dos momentos del ciclo luz/oscuridad: 30 minutos antes del final del día y 30 minutos antes del final de la noche (Figura 3.3a).

Las líneas EM4.20, EM7.11, y EM6.20 mostraron una actividad incrementada 12, 9 y 7 veces, respectivamente, y en promedio, con respecto a la planta salvaje. El aumento en la actividad de estas líneas fue dependiente del momento de la toma de las muestras, siendo mayor hacia el fin del periodo nocturno.

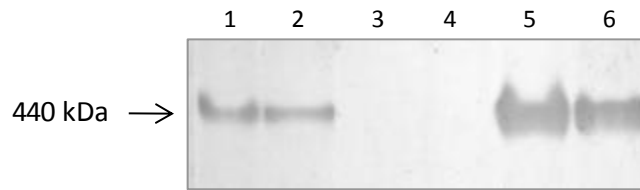
Adicionalmente, extractos preparados a partir de muestras de plantas wt y EM7.11 tomadas como se describió anteriormente, fueron sembrados en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas revelado por actividad EM-NADP (Figura 3.4). Se observó una banda de 440 kDa que correspondería a EM-NADP2 (endógena y sobreexpresada), dado que EM-NADP4, la otra isoforma usualmente presente en hojas, aparece como dos bandas de 260 y 130 kDa (Gerrard Wheeler y col., 2005). En concordancia con lo observado en las medidas de actividad, se observó un aumento en la intensidad de la banda correspondiente a las muestras de la línea transgénica tomadas de noche.



**Figura 3.3**

Niveles de actividad en extractos crudos de hojas de la roseta de plantas de 32 días. a- Actividad EM-NADP. b- Actividad EM-NAD. c- Actividad MDH-NAD. d- Actividad MDH-NADP. Las muestras fueron tomadas 30 minutos antes del final del día (D) y 30 minutos antes del final de la noche (N). i= actividad inicial, t= actividad total luego de la incubación con 100 mM DTT. Se muestra el valor promedio de 3-6 preparaciones independientes y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a la planta wt en el mismo momento del día ( $p < 0,05$ ).

Así, las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2 mostraron un incremento en la actividad EM-NADP total y la proteína sintetizada a partir del transgen presentó una conformación nativa similar a la de la enzima endógena.



**Figura 3.4**

Gel nativo 6 % (P/V) acrilamida revelado por actividad EM-NADP. Calle 1: wt fin de la noche, 2: wt fin del día, 3: línea mutante *em-nadp2* fin de la noche, 4: línea mutante *em-nadp2* fin del día, 5: línea EM7.11 fin de la noche, 6: línea EM7.11 fin del día. En todas las calles se sembró una cantidad de extracto correspondiente a 50 µg de proteína total.

A su vez fueron analizados los niveles de transcritos de las isoformas constitutivas de la familia EM-NAD(P) de *Arabidopsis*, en las plantas sobreexpresantes.

Se determinaron los valores de expresión relativa de los genes *em-nadp2*, *em-nadp4*, *em-nad1* y *em-nad2* en la línea EM7.11 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), utilizando como molde ADNc de hojas de la roseta recolectadas 30 minutos antes del final del día y 30 minutos antes del final de la noche, y el gen *poliubiquitina10* como normalizador (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Expresión relativa de los genes *em-nad(p)* y *mdh-nad(p)* en la línea EM7.11

Gen	Fin del día	Fin de la noche
<b><i>em-nadp2</i></b>	<b>22 ± 3</b>	<b>27 ± 1</b>
<i>em-nadp4</i>	1,1 ± 0,5	<b>0,2 ± 0,1</b>
<b><i>em-nad1</i></b>	<b>2,2 ± 0,1</b>	<b>0,06 ± 0,01</b>
<i>em-nad2</i>	1,0 ± 0,4	<b>0,3 ± 0,1</b>
<i>mdh-nad1 cit</i>	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2
<i>mdh-nad2 cit</i>	0,8 ± 0,1	<b>0,52 ± 0,05</b>
<i>mdh-nad3 cit</i>	0,7 ± 0,2	<b>0,29 ± 0,05</b>
<i>mdh-nad1 mt</i>	1,1 ± 0,2	0,76 ± 0,04
<i>mdh-nad2 mt</i>	1,1 ± 0,2	0,72 ± 0,04
<i>mdh-nad1 px</i>	1,3 ± 0,2	<b>0,32 ± 0,02</b>
<i>mdh-nad2 px</i>	0,88 ± 0,01	<b>0,6 ± 0,1</b>
<i>mdh-nad pt</i>	1,30 ± 0,03	<b>0,6 ± 0,2</b>
<b><i>mdh-nadp pt</i></b>	1,0 ± 0,1	<b>0,64 ± 0,02</b>

Se muestra para cada gen el valor promedio y desviación estándar de la expresión relativa EM7.11/wt de al menos dos experimentos independientes. *cit*, *mt*, *px* y *pt* indican la localización confirmada experimentalmente o predicha de las isoformas: citosol, mitocondria, peroxisoma y plastidio, respectivamente. Los cambios significativos en la expresión ( $p < 0,05$ ) con respecto a wt se indican en negrita.

La línea EM7.11 presentó un aumento de 24 veces, en promedio, en la expresión del transcripto *em-nadp2* (Tabla 3.1). Cabe destacar que no hubo variaciones significativas en los niveles de dicho transcripto en la línea salvaje, ni en la línea sobreexpresante EM7.11 al comparar los niveles día *versus* noche en cada línea. Estos resultados sugieren que el incremento nocturno de la actividad EM-NADP (Figura 3.3a) podría deberse a un control traduccional o post-traduccional operante sobre la enzima.

También ocurrieron variaciones a nivel transcripcional en los restantes genes de la familia analizados, al aumentar los niveles del gen *em-nadp2*. Hacia el fin de la noche, se observó una disminución significativa en los niveles de *em-nadp4*, *em-nad1* y *em-nad2* en la línea sobreexpresante, con respecto a la planta salvaje. Al final del día, los transcriptos de *em-nad2* y de *em-nadp4* se mantuvieron invariables con respecto a la planta wt, mientras que los niveles de *em-nad1* resultaron aumentados (Tabla 3.1).

Los perfiles de actividad EM-NAD mostraron un incremento en la línea EM7.11 con respecto a la planta salvaje, tanto en extractos de plantas recolectadas al final del día como al fin de la noche (Figura 3.3b).

El mayor nivel de expresión del gen *em-nad1* podría explicar, en parte, la mayor actividad EM-NAD total medida en las plantas sobreexpresantes hacia el final del día (Figura 3.3b), además de que la actividad de EM-NAD podría estar siendo regulada de manera traduccional o post-traduccional (Tronconi y col., 2008, 2010b). Sin embargo, no se puede descartar que el aumento de actividad EM-NAD en las plantas sobreexpresantes se deba en realidad a la actividad EM-NAD de la isoforma EM-NADP2, dado que en ensayos realizados con la enzima recombinante purificada se determinó que puede también utilizar NAD como cofactor, aunque con menor afinidad que NADP (Gerrard Wheeler y col., 2008).

### **3.1.3 Niveles de actividad y expresión de la enzima MDH**

Posteriormente se realizó un análisis sobre otra enzima relacionada al metabolismo del malato: la malato deshidrogenasa (MDH-NAD(P)). Ésta cataliza la conversión de malato a OAA, acoplada a la reducción de NAD o NADP.

El genoma de *A. thaliana* posee 8 genes que codifican para isoformas MDH-NAD y uno para MDH-NADP. Estas proteínas presentan variada localización subcelular y funciones fisiológicas. Dentro de las NAD-dependientes, MDH-NAD1px y MDH-NAD2px, se localizan en peroxisomas (Pracharoenwattana y col., 2007; Eubel y col., 2008). Tres isoformas no presentan péptido señal por lo que se asume que son citosólicas (MDH-NAD1cit, MDH-NAD2cit y MDH-NAD3cit), mientras que MDH-NAD1mt y MDH-NAD2mt, poseen secuencias señal mitocondriales putativas y fueron las únicas identificadas en extractos de mitocondrias purificados (Tomaz y col., 2010). Por último, MDH-NADpt se encuentra en cloroplastos, al igual que MDH-NADP (Berkemeyer y col., 1998; Hebbelmann y col., 2012; Beeler y col., 2014).

Para analizar si cambios en los niveles de EM-NADP2 modificaban los niveles de actividad malato deshidrogenasa, se determinó la actividad MDH-NAD y MDH-NADP en extractos crudos de hoja de muestras de las distintas líneas tomadas hacia el final del día y de la noche.

La actividad MDH-NAD total en los extractos de las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2 resultó significativamente menor que la correspondiente a la planta wt, en ambos momentos del día analizados (Figura 3.3c). La actividad MDH-NADP fue similar entre ambos tipos de planta, antes y después de la incubación de los extractos con 100 mM DTT (Figura 3.3d).

Con el fin de determinar si ocurrían cambios en la expresión de las isoformas a nivel transcripcional, se diseñaron cebadores específicos para cada una de ellas y se cuantificaron los transcritos mediante qRT-PCR utilizando como molde ADNc de hoja de la roseta. El análisis de la expresión de dichos genes en la línea EM7.11, relativa a la planta salvaje, reveló una reducción en los niveles de los transcritos de *mdh-nad2 cit*, *mdh-nad3 cit*, *mdh-nad1 px*, *mdh-nad2 px*, *mdh-nad pt* y *mdh-nadp pt* al final de la noche (Tabla 3.1). La disminución de la actividad MDH-NAD total (Figura 3.3c) podría ser consecuencia de esta menor expresión de algunos de los genes *mdh-nad* observada. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de estos transcritos hacia el fin del día. Nuevamente, es posible que estén operando mecanismos de regulación traduccional o post-traduccional que expliquen las diferencias entre los resultados de qRT-PCR y los ensayos de actividad.

Así, los cambios en los niveles de EM-NADP2 llevaron a una alteración en la expresión y actividad de otras enzimas que metabolizan malato en el mismo compartimento celular, el citosol, e incluso en otras organelas.

### **3.1.4 Análisis del estado redox del reservorio de NAD(P)**

Dado que la reacción catalizada por EM-NADP2 involucra la interconversión entre NADP y NADPH, se analizó el estado redox de los nucleótidos de piridina en las líneas sobreexpresantes de EM-NADP2. La determinación se llevó a cabo mediante un método enzimático que utiliza la enzima ADH y etanol para la medida de NAD y NADH, y G6PDH y glucosa 6-P para medir NADP y NADPH. La reducción de DCPIP mediada por PMS es detectada por la disminución de la absorbancia a 600 nm y resulta proporcional al contenido de nucleótidos de piridina presente en el extracto. Las formas reducidas y oxidadas de las coenzimas se distinguen por su eliminación selectiva en medio ácido y básico, respectivamente (Sección 2.9). Los resultados se presentan como la relación entre la forma oxidada y la reducida tanto para NADP como para NAD (Figura 3.5).

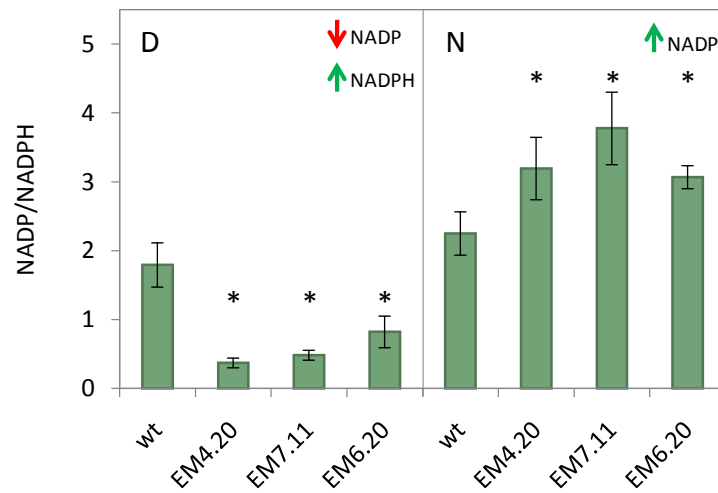
La relación NADP/NADPH resultó menor en las líneas sobreexpresantes con respecto a la planta salvaje al final del día, mientras que fue mayor al final de la noche (Figura 3.5a). Estas diferencias se debieron a una disminución del contenido de NADP diurno, y a un aumento de NADP nocturno en las plantas sobreexpresantes.

Un patrón similar, dependiente del momento del día, se obtuvo para la relación NAD/NADH (Figura 3.5b). Hacia el final del día, las líneas sobreexpresantes presentaron menores niveles de NAD y mayores de NADH con respecto a wt. Por el contrario, exhibieron un incremento de NAD, y una disminución de su forma reducida, NADH, hacia el final de la noche.

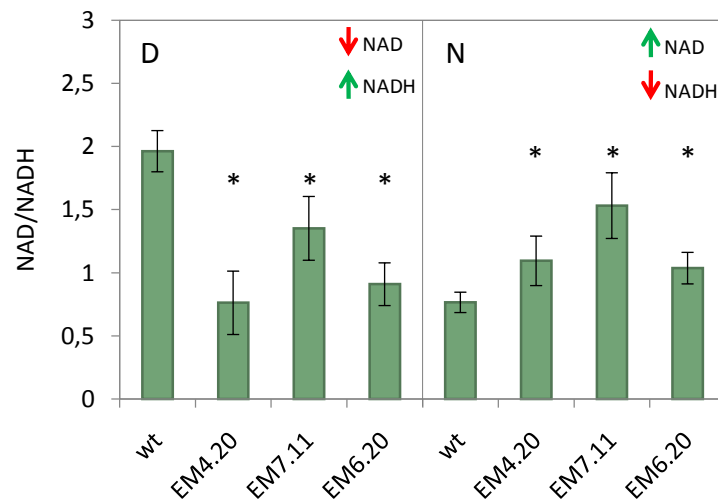
Además del potencial de EM-NADP2 de generar cambios en el estado de oxidoreducción de los nucleótidos de piridina, es también posible que estén ocurriendo perturbaciones en los procesos de síntesis y degradación de los mismos debido a los cambios en los niveles de esta enzima.



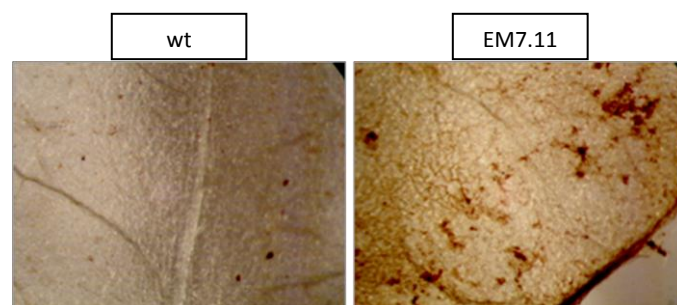
a-



b-



c-

**Figura 3.5**

Relación entre las formas oxidadas y reducidas de los nucleótidos de piridina. a- Relación NADP/NADPH. b- Relación NAD/NADH. Las determinaciones se realizaron en hojas de la roseta de plantas wt, EM4.20, EM7.11 y EM6.20 recolectadas 30 minutos antes del final del día (D), y de la noche (N). Las flechas representan las variaciones que ocurrieron en las líneas sobreexpresantes con respecto a wt. Se muestra el valor promedio de 6 preparaciones independientes y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a la planta salvaje en el mismo momento del día ( $p < 0,05$ ). c- Tinción DAB en hojas de plantas wt y EM7.11 recolectadas a la mitad del día. Aumento: 6x.

Adicionalmente, hojas de las plantas sobreexpresantes mostraron una mayor tinción DAB (Sección 2.10), indicando niveles elevados de  $H_2O_2$  (Figura 3.5c), lo cual podría estar asociado al desbalance redox observado.

### **3.1.5 Análisis del perfil metabólico**

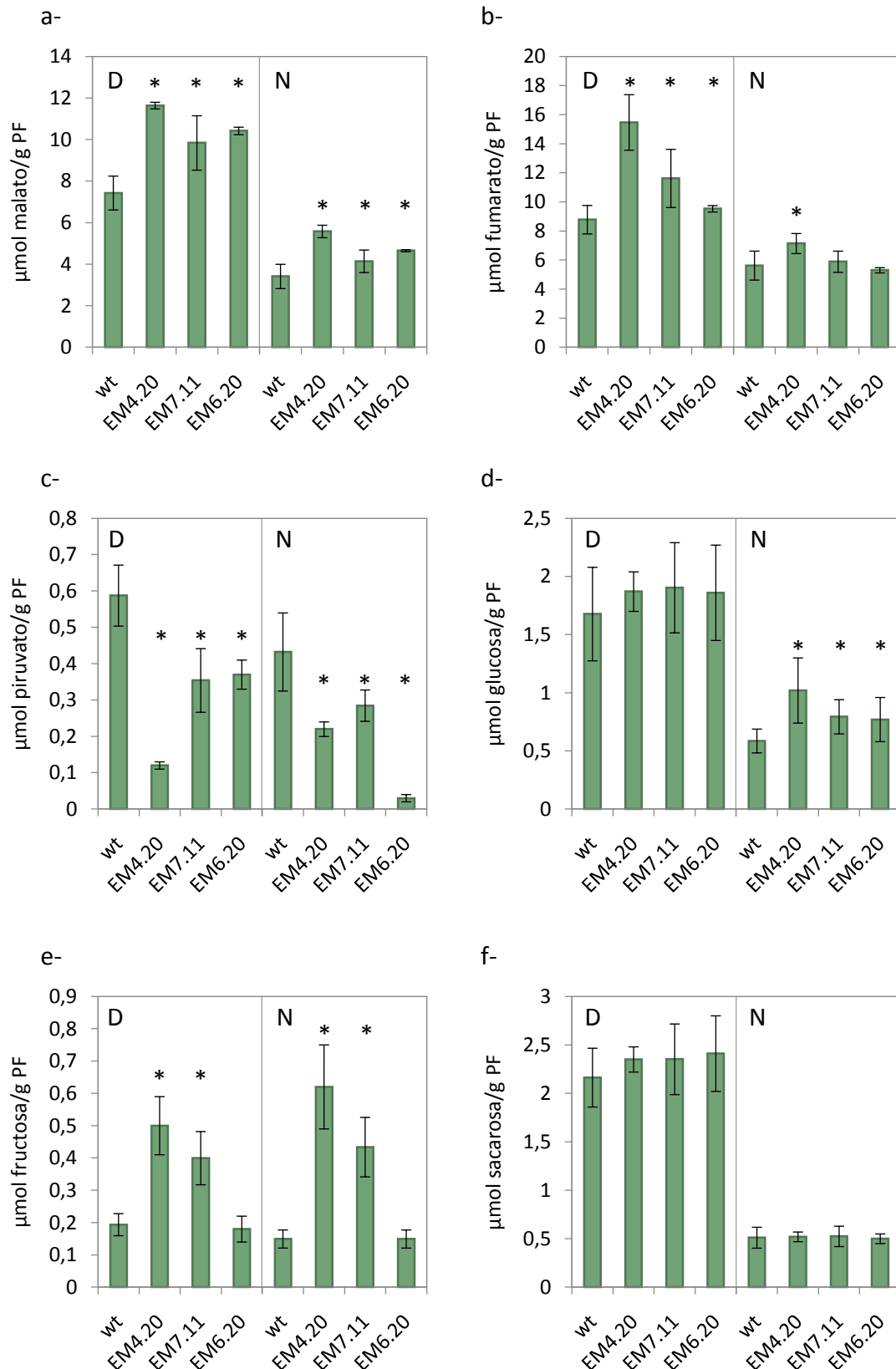
Para continuar con la caracterización de las líneas sobreexpresantes de EM-NADP2, se propuso analizar los niveles de algunos metabolitos primarios importantes del metabolismo celular en distintos momentos del ciclo día-noche.

En primer lugar se midió el contenido de algunos ácidos orgánicos y azúcares en las líneas EM7.11, EM6.20, EM4.20 y wt. Se analizaron los niveles de malato, fumarato, glucosa, fructosa y sacarosa en extractos de hojas recolectadas al final del día y al final de la noche. El método empleado para medir estos compuestos consistió en la extracción y separación de los metabolitos polares de la muestra, seguido de la determinación de los mismos mediante ensayos enzimáticos de punto final con cuantificación fotométrica de NADH (Sección 2.18).

Como se puede observar en la Figura 3.6, las líneas genéticamente modificadas presentaron un mayor contenido de malato y fumarato, especialmente hacia el final del día, con respecto a la planta salvaje. Los niveles de los azúcares glucosa y fructosa también aumentaron, particularmente hacia el final de la noche, mientras que la sacarosa se mantuvo invariable entre ambos genotipos. Por su parte, el nivel de piruvato, el producto de la reacción directa de EM-NADP2, disminuyó en las líneas transgénicas con respecto a la planta salvaje, en los dos momentos del día analizados.

Con el objetivo de obtener mayor información acerca del estado metabólico de estas plantas, se realizó un análisis de cromatografía gaseosa seguida de espectrometría de masas (GC-MS) de muestras de las plantas wt y EM7.11.

Se observaron cambios en los niveles relativos de varios metabolitos en esta línea con respecto a la planta salvaje (Tabla 3.2). Algunos incrementaron sus niveles en la línea transgénica independientemente del momento del día analizado, como oxalato, maleato, gliceraldehído 3-fosfato (G3P) y maltosa. Otros como succinato y citrato aumentaron sólo al final del día, mientras que lactato, varios aminoácidos, urea, galactinol y trehalosa lo hicieron exclusivamente al fin de la noche.



**Figura 3.6**

Niveles de ácidos orgánicos y azúcares en hojas de la roseta recolectadas 30 minutos antes del final del día (D) y 30 minutos antes del final la noche (N). Se muestra el valor promedio de 6-10 preparaciones independientes y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a wt en el mismo momento del día ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.2** Contenido relativo de metabolitos en la línea EM7.11 con respecto a wt

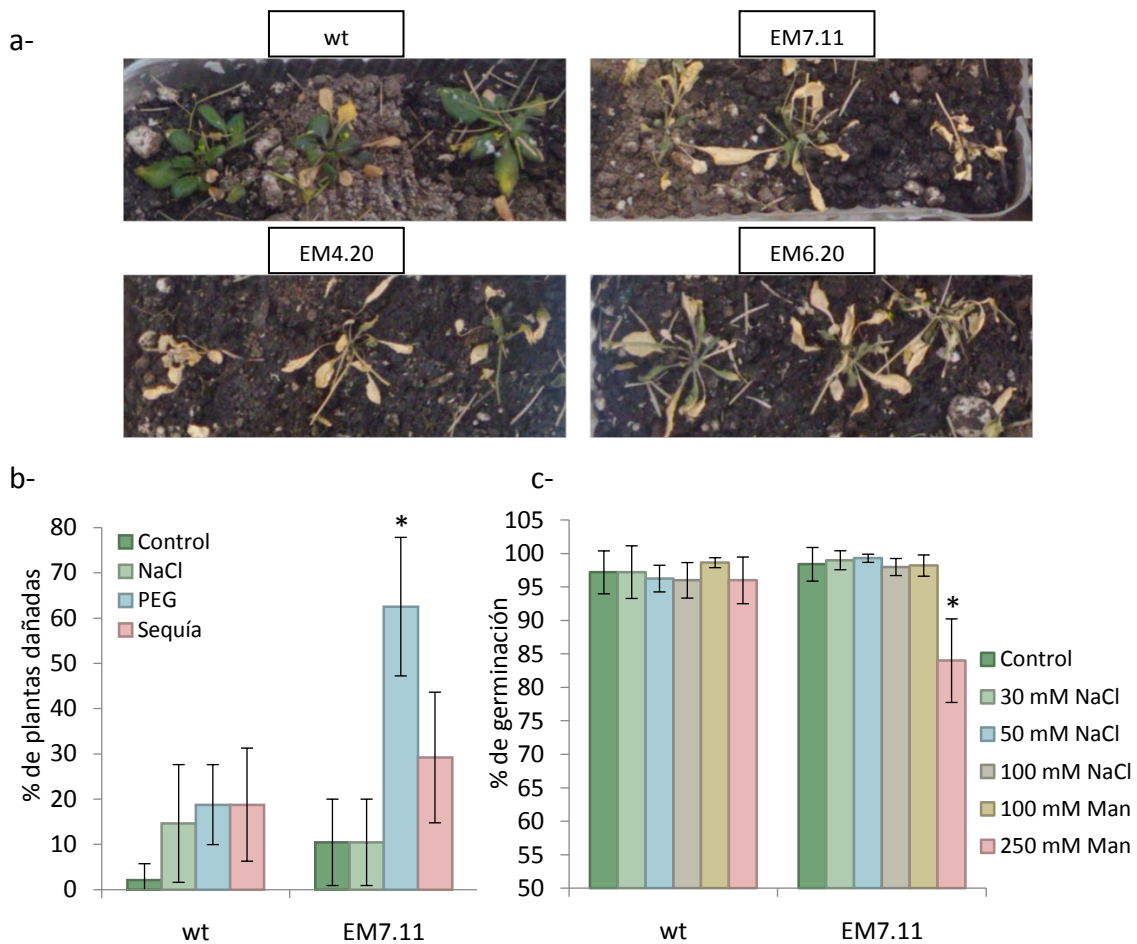
Metabolito	Fin del día	Fin de la noche
Alanina	0,8 ± 0,1	<b>1,6 ± 0,1</b>
Citrato	<b>3,0 ± 0,8</b>	0,7 ± 0,3
Fosfato	0,8 ± 0,3	<b>0,2 ± 0,1</b>
G3P	<b>5,4 ± 2,5</b>	<b>2,6 ± 0,5</b>
GABA	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Galactinol	1,3 ± 0,1	<b>3,0 ± 1,3</b>
Galactitol	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,3
Galactosa	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Glutamato	0,6 ± 0,1	1,4 ± 0,2
Glicerato	0,9 ± 0,4	1,0 ± 0,1
Glicerol	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,3
Glicina	0,8 ± 0,4	<b>2,0 ± 0,4</b>
Lactato	1,1 ± 0,5	<b>2,8 ± 0,4</b>
Maleato	<b>1,6 ± 0,3</b>	<b>1,6 ± 0,6</b>
Maltosa	<b>6,2 ± 2,6</b>	<b>2,4 ± 0,7</b>
Myo-inositol	1,0 ± 0,4	0,9 ± 0,4
Oxalato	<b>3,2 ± 0,8</b>	<b>2,1 ± 0,6</b>
Serina	0,6 ± 0,1	<b>1,5 ± 0,4</b>
Succinato	<b>1,9 ± 0,7</b>	<b>0,5 ± 0,2</b>
Treonina	0,6 ± 0,1	<b>1,7 ± 0,7</b>
Trehalosa	<b>0,4 ± 0,1</b>	<b>2,7 ± 0,3</b>
Urea	1,2 ± 0,1	<b>2,1 ± 0,4</b>
Valina	0,6 ± 0,3	<b>2,5 ± 1,0</b>

Los metabolitos fueron determinados por GC-MS en muestras de hojas de la roseta recolectadas 30 minutos antes del final del día y 30 minutos antes del final la noche. Se muestran los valores promedio de la relación de cada metabolito en la línea EM7.11/wt y su desviación estándar. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los cambios significativos ( $p < 0,05$ ) se indican en negrita.

Los resultados indicaron que la ganancia de actividad EM-NADP genera un impacto en el metabolismo primario de Arabidopsis. Estos cambios no sólo incluyeron modificaciones en los niveles de ácidos orgánicos, sino también en azúcares y compuestos nitrogenados. Más aun, la repercusión de la sobreexpresión de EM-NADP2 fue dependiente del momento del día analizado, afectando procesos celulares diurnos y nocturnos de manera diferencial.

### 3.1.6 Respuesta de las líneas ante condiciones de estrés osmótico

Como fue comentado en la Introducción, se ha visto que líneas de Arabidopsis sobreexpresando una EM-NADP citosólica de arroz presentaron una incrementada tolerancia a estrés salino y osmótico. En base a estos antecedentes, las plantas de Arabidopsis en estudio que sobreexpresan EM-NADP2 fueron sometidas a diferentes tratamientos de estrés que modifican el potencial de agua a fin de evaluar su respuesta a estas situaciones. Así, ejemplares de 32 días crecidos en condiciones estándar fueron regados con 100 mM NaCl, 15 % (P/V) PEG 6000, o mantenidos sin riego.



**Figura 3.7**

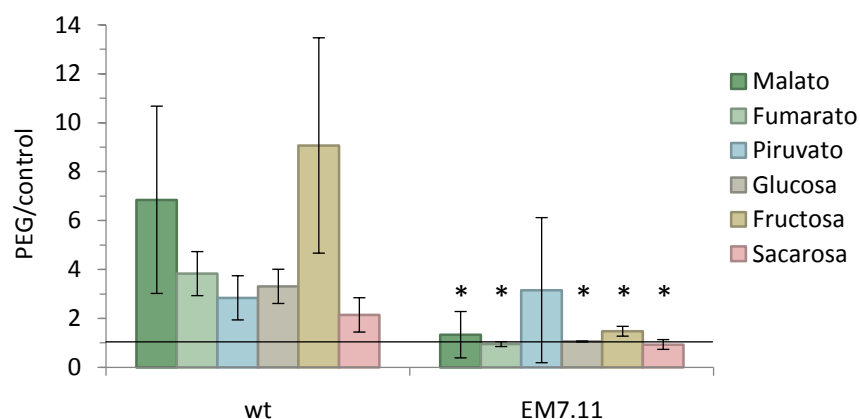
a- Ejemplares típicos de las plantas en estudio luego de 14 días de riego con 15 % (P/V) PEG 6000. b- Porcentaje de plantas dañadas luego de un tratamiento por 14 días con 100 mM NaCl, 15 % (P/V) PEG 6000, o sequía. La extensión del daño fue determinada de acuerdo a la apariencia de la roseta mediante inspección visual. Se consideró que una planta estaba dañada si presentaba clorosis en más del 75 % de sus hojas. La línea sobre las barras representa la desviación estándar de 4 experimentos independientes, realizados con 16 plantas por línea cada uno. c- Porcentaje de germinación. Se indica la desviación estándar de 3 placas para cada condición y para cada línea, con 100 semillas por línea cada una. Man, manitol.

Luego de 14 días de riego con PEG, las plantas con sobreexpresión del gen *em-nadp2* sufrieron un daño mayor que las wt (Figura 3.7a). Este comportamiento diferencial no fue observado para las condiciones de estrés salino (100 mM NaCl) y sequía analizadas (Figura 3.7b). Adicionalmente, la exposición a 250 mM manitol redujo significativamente la tasa de germinación de la línea EM7.11 (Figura 3.7c).

### 3.1.7 Perfil metabólico de plantas sometidas a estrés osmótico

Dado que las plantas con sobreexpresión de EM-NADP2 mostraron una incrementada susceptibilidad al tratamiento con PEG, se decidió analizar el perfil metabólico de estas plantas sometidas a estrés.

Se determinó el contenido de ácidos orgánicos y azúcares por métodos enzimáticos en muestras control y tratadas, recolectadas a la mitad del día. Los cambios en los niveles de metabolitos que ocasionó el tratamiento con PEG resultaron diferentes comparando las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2 *versus* las wt (Figura 3.8). Se observó un aumento de malato, fumarato, piruvato, glucosa, fructosa y sacarosa en la planta salvaje en respuesta al tratamiento. Este resultado concuerda con varios trabajos que han reportado que la deficiencia de agua incrementa la concentración de carbono en las hojas (Muller y col., 2011). Sin embargo este incremento no fue observado en las plantas transgénicas en estudio (Figura 3.8).



**Figura 3.8**

Contenido de metabolitos en hojas de la roseta de plantas tratadas con PEG 6000 15 % (P/V) por 48 horas relativo a plantas regadas con agua (control). La línea horizontal representa el punto en donde no hay diferencia entre tratamiento y control (PEG/control=1). Se muestra la relación entre los valores promedio determinados en 6-10 preparaciones de muestras tratadas y control y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a wt ( $p < 0,05$ ).

El análisis de las muestras por GC-MS reveló diferencias adicionales entre el metabolismo de la planta salvaje y la línea sobreexpresante en respuesta a PEG. En la Tabla 3.3 se muestra el contenido de metabolitos luego del tratamiento con PEG relativo a los niveles en plantas de la misma línea regadas con agua (control).

Se observó un aumento inducido por el tratamiento con PEG en el contenido de ácidos orgánicos, aminoácidos, varios azúcares y azúcares-alcoholes en la planta salvaje. Los cambios más prominentes ocurrieron en alanina, valina,  $\gamma$ -aminobutirato (GABA), melibiosa y rafinosa (Tabla 3.3). Sin embargo, esta acumulación no pudo ser sostenida en la línea sobreexpresante, probablemente debido a un defecto en la síntesis o una aumentada degradación de estos componentes, lo cual puede estar relacionado al estado metabólico alterado observado en estas plantas aún en condiciones normales (Tabla 3.2).

La función de varios de los metabolitos mencionados es proteger y estabilizar a macromoléculas y estructuras biológicas ante la desecación, y si se acumulan en altos niveles, disminuir el potencial osmótico de la célula permitiendo que continúe la absorción de agua y se mantenga la turgencia de la planta (Lehmann y col., 2010). Por ejemplo, la rafinosa y el galactinol pertenecen a una familia de oligosacáridos que actúan como osmoprotectores y además son capaces de eliminar las especies reactivas del oxígeno generadas por el estrés (Nishizawa y col., 2008). Dichos compuestos se encontraron en muy bajos niveles en la línea sobreexpresante tratada. El aminoácido prolina, que se acumula en grandes cantidades en respuesta al déficit hídrico (Verslues y Sharma, 2010), fue detectado sólo en las plantas wt tratadas con PEG, no así en la línea EM7.11 (Tabla 3.3).

Cabe aclarar que a pesar de que esta línea presentara mayor contenido de algunos de los metabolitos en condiciones control, los niveles obtenidos luego del tratamiento fueron inferiores a los de la planta wt.

Así, los menores niveles alcanzados de estos componentes probablemente sea un factor clave en la incapacidad de las plantas sobreexpresantes de sobrellevar las condiciones de estrés osmótico.

**Tabla 3.3** Contenido relativo de metabolitos

Metabolito	wt (PEG/control)	EM7.11 (PEG/control)
Alanina	9,7 ± 1,5	1,8 ± 0,1
Aspartato	2,6 ± 0,5	2,1 ± 0,4
Citrato	2,6 ± 0,4	8,3 ± 2,4
Fosfato	3,2 ± 0,8	2,8 ± 0,5
G3P	1,8 ± 0,2	4,4 ± 0,5
GABA	5,6 ± 2,3	2,7 ± 0,7
Galactinol	2,9 ± 0,3	0,4 ± 0,1
Galactitol	3,1 ± 0,8	0,5 ± 0,2
Galactosa	3,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Glutamato	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2
Glicerato	3,0 ± 0,9	1,4 ± 0,3
Glicerol	2,1 ± 0,8	3,4 ± 0,2
Glicina	4,2 ± 1,3	1,8 ± 0,2
Glicolato	3,9 ± 1,6	0,7 ± 0,3
Homocisteína	2,1 ± 0,6	1,6 ± 0,3
Lactato	1,7 ± 0,8	1,2 ± 0,4
Maleato	2,0 ± 0,3	1,7 ± 0,6
Malonato	2,7 ± 0,6	1,7 ± 0,2
Maltosa	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,5
Melibiosa	10,0 ± 3,0	0,1 ± 0,1
Myo-inositol	2,9 ± 0,2	0,6 ± 0,3
Oxalato	0,9 ± 0,4	2,7 ± 0,6
Pinitol	2,3 ± 0,9	3,9 ± 0,2
Prolina	(0,44 ± 0,03)	n. d.
Rafinosa	5,8 ± 2,7	0,2 ± 0,1
Serina	2,1 ± 0,2	0,5 ± 0,2
Shikimato	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,2
Succinato	3,6 ± 1,5	1,3 ± 0,2
Treonina	2,4 ± 0,8	0,6 ± 0,2
Trehalosa	0,7 ± 0,3	2,0 ± 0,8
Urea	1,8 ± 0,9	3,4 ± 0,3
Valina	9,0 ± 2,2	0,8 ± 1,0

Los metabolitos fueron determinados por GC-MS en muestras hojas de la roseta de plantas wt y EM7.11 tratadas con PEG 6000 15 % (P/V) por 48 h y control, recolectadas a la mitad del día. Se muestran los valores promedio de cada metabolito en estrés relativo a la condición control (PEG/control) para cada línea, y la desviación estándar. Para el aminoácido prolina, se indica el valor relativo al estándar interno ribitol en la muestra tratada con PEG. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los cambios significativos ( $p < 0,05$ ) con respecto al control se muestran en negrita. n. d., no detectado.

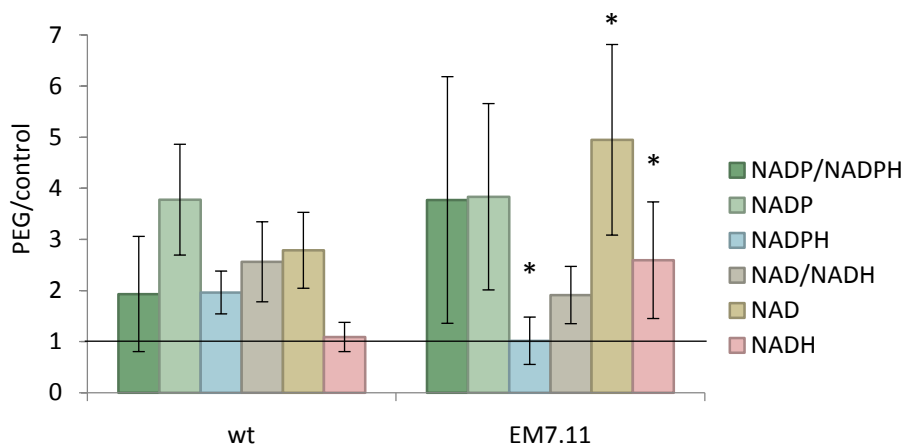


### 3.1.8 Análisis del estado redox luego de la exposición a estrés

Por otro lado, se analizó el estado redox de NADP y NAD en la línea EM7.11 y la planta salvaje, en condiciones control y luego del tratamiento con PEG (Figura 3.9).

Se observó que el contenido de NADP, NADPH y NAD aumentó en la planta wt luego del tratamiento, mientras que NADP, NAD y NADH incrementaron sus niveles en las líneas transgénicas (Figura 3.9).

Generalmente, las plantas sometidas a estrés tienen una mayor demanda de NADPH, el cual es requerido para procesos de detoxificación y señalización (Foyer y Noctor, 2009). El hecho de que los niveles de NADPH no se vieron aumentados en la línea sobreexpresante de EM-NADP2 en respuesta al tratamiento con PEG sugiere que estas plantas no son capaces de mantener y controlar la provisión de este compuesto que es crítico para la supervivencia celular y la respuesta en estas condiciones.



**Figura 3.9**

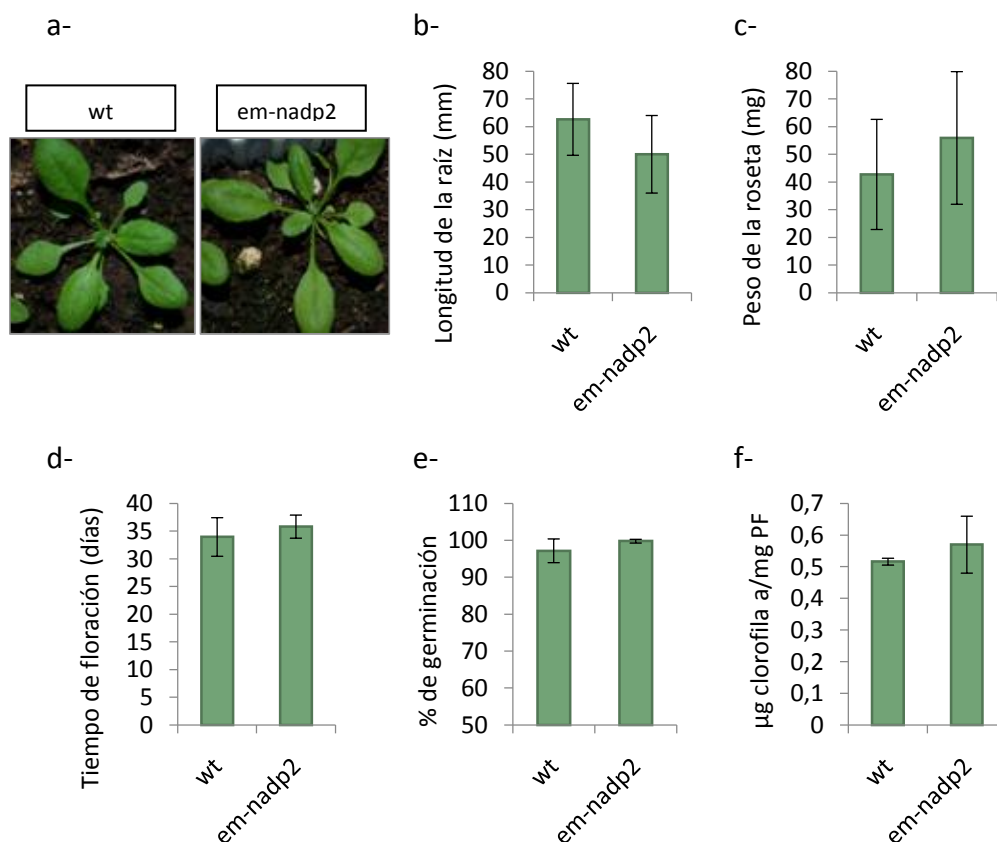
Contenido de nucleótidos de piridina en las plantas tratadas con PEG 6000 15 % (P/V) por 48 horas relativo a las plantas regadas con agua (control). La línea horizontal representa el punto en donde no hay diferencia entre tratamiento y control (PEG/control=1). Se muestra la relación entre los valores promedio determinados en 6-10 preparaciones de muestras tratadas y control y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a wt ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Análisis de plantas mutantes en el gen *em-nadp2*

Con el objetivo de analizar posibles disturbios provocados ahora por la ausencia de EM-NADP2, y en orden de realizar un análisis que contraste con el llevado a cabo con las líneas sobreexpresantes de EM-NADP2, se realizó la caracterización de plantas mutantes en esta isoforma.

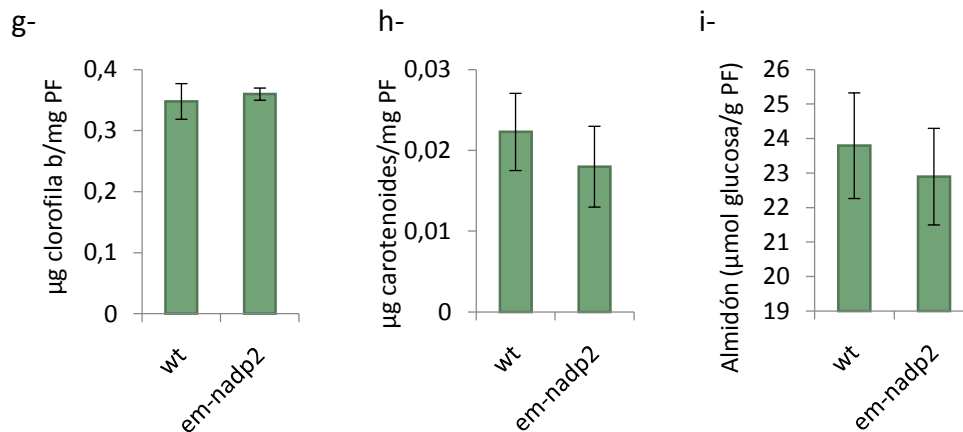
Se utilizó una línea de *A. thaliana* Col-0 mutante homocigota por inserción de ADN-T en el gen *em-nadp2* (SALK\_073818) obtenida del banco de mutantes NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*, <http://www.arabidopsis.info/>), y denominada línea *em-nadp2* (Sección 2.3).

La línea *em-nadp2* no mostró alteraciones visibles en el desarrollo bajo condiciones normales de crecimiento (Figura 3.10a), ni diferencias significativas en los parámetros fenotípicos analizados, con respecto a la planta salvaje (Figura 3.10b-e). El contenido de clorofilas y carotenoides así como la acumulación de almidón, se mantuvieron sin modificaciones significativas con respecto a wt (Figura 3.10f-i).



**Figura 3.10**

(Continúa en la página siguiente)

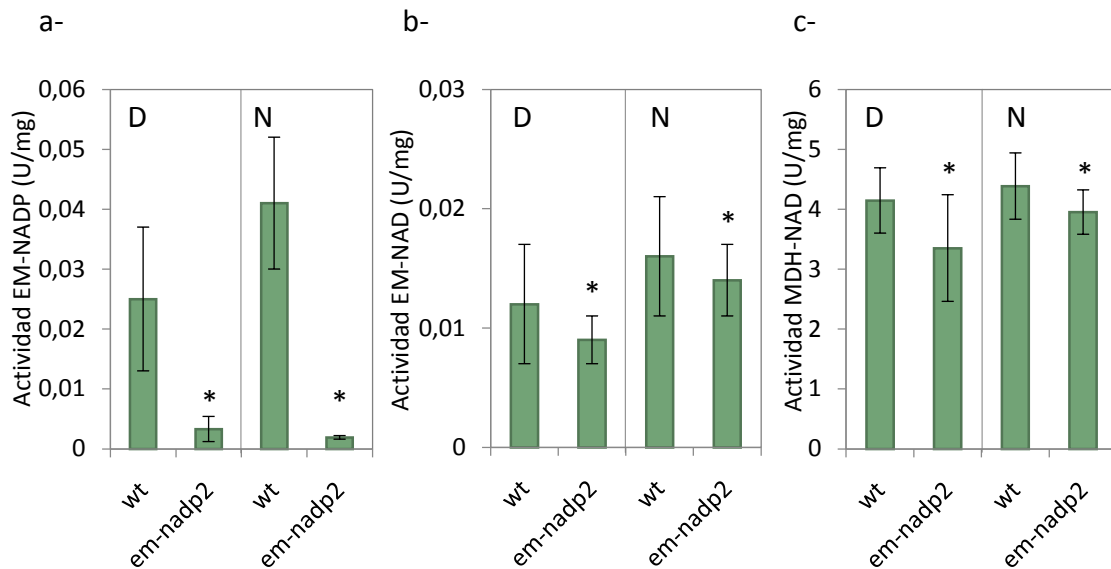


**Figura 3.10** (continuación)

Parámetros fenotípicos, contenido de pigmentos y almidón determinados para la línea *em-nadp2* y *wt* crecidas en condiciones estándar. a- Ejemplares típicos de 21 días de la línea *em-nadp2* y *wt*. b- Longitud de la raíz primaria de plantas de 7 días. c- Peso fresco de la roseta de plantas de 32 días. d- Tiempo de aparición del primordio floral. e- Porcentaje de semillas germinadas. f- Contenido de clorofila a. g- Contenido de clorofila b. h- Contenido de carotenoides. i- Glucosa hidrolizada a partir de almidón en muestras de plantas de 32 días recolectadas 30 minutos antes del final del día. PF, peso fresco. Se muestra el valor promedio de cada parámetro, determinado para *n* individuos (b-: *n*=16; c- y d-: *n*=24; e-: *n*=3 placas para cada línea conteniendo 100 semillas cada una; f-, g- y h-: *n*=6; i-: *n*=3) y la desviación estándar.

La mutante *em-nadp2* no mostró expresión detectable del gen *em-nadp2* por qRT-PCR (Tabla 3.4). Esta línea mutante presentó una disminución de 14 veces en la actividad EM-NADP total en hojas, en promedio, con respecto a la planta salvaje (Figura 3.11a). No se observaron bandas a 440 kDa en un gel nativo revelado por actividad EM-NADP cuando se sembraron extractos proteicos de muestras recolectadas al final del día y al fin de la noche (Figura 3.4). EM-NADP4 podría ser responsable de la baja actividad málica remanente, ya que es la otra isoforma EM-NADP de *Arabidopsis* presente en hojas, aunque el nivel de su transcripto se vio disminuido, sobre todo al final de la noche (Tabla 3.4).

Los niveles de actividad EM-NAD fueron significativamente menores en la línea mutante con respecto a la planta salvaje, tanto al final del día como de la noche (Figura 3.11b). Esta disminución puede relacionarse a la expresión reprimida de los genes *em-nad*, sobre todo al final de la noche (Tabla 3.4), aunque también puede deberse a la ausencia de EM-NADP2, la cual presenta actividad con NAD como cofactor (Gerrard Wheeler y col., 2008).



**Figura 3.11**

a- Actividad EM-NADP. b- Actividad EM-NAD. c- Actividad MDH-NAD. Las medidas se realizaron en extractos crudos de hojas de la roseta de plantas de 32 días de muestras tomadas 30 minutos antes del final del día (D) y 30 minutos antes del final de la noche (N). Se muestra el valor promedio de 3-6 preparaciones independientes y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a la planta wt en el mismo momento del día ( $p < 0,05$ ).

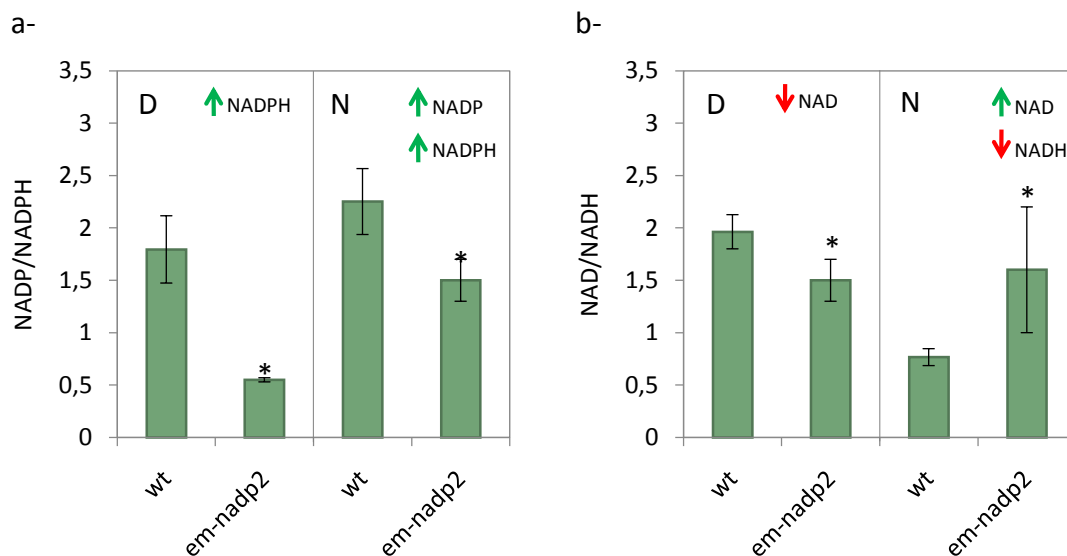
**Tabla 3.4** Expresión de los genes *em-nad(p)* y *mdh-nad(p)* en la línea *em-nadp2* relativa a wt

Gen	Fin del día	Fin de la noche
<i>em-nadp2</i>	n. d.	n. d.
<i>em-nadp4</i>	0,71 ± 0,01	<b>0,5 ± 0,2</b>
<i>em-nad1</i>	<b>0,38 ± 0,07</b>	<b>0,6 ± 0,2</b>
<i>em-nad2</i>	1,0 ± 0,4	<b>0,53 ± 0,09</b>
<i>mdh-nad1 cit</i>	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,2
<i>mdh-nad2 cit</i>	0,8 ± 0,1	0,78 ± 0,01
<i>mdh-nad3 cit</i>	1,0 ± 0,2	0,77 ± 0,03
<i>mdh-nad1 mt</i>	1,1 ± 0,5	0,9 ± 0,1
<i>mdh-nad2 mt</i>	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,2
<i>mdh-nad1 px</i>	0,97 ± 0,05	0,8 ± 0,2
<i>mdh-nad2 px</i>	0,76 ± 0,02	0,7 ± 0,2
<i>mdh-nad pt</i>	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,2
<i>mdh-nadp pt</i>	0,87 ± 0,02	0,8 ± 0,1

*cit*, *mt*, *px* y *pt* indican la localización confirmada experimentalmente o predicha de las isoformas: citosol, mitocondria, peroxisoma y plastidio, respectivamente. Se muestra para cada gen el valor promedio y desviación estándar de la expresión relativa *em-nadp2/wt* de al menos dos experimentos independientes. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) se indican en negrita. n. d, no detectado.

La línea mutante presentó además menores niveles de actividad MDH-NAD con respecto a la planta salvaje en ambos momentos del día analizados (Figura 3.11c). En este caso, la expresión de los genes *mdh* se mantuvo invariable en la línea *em-nadp2* (Tabla 3.4), por lo que posibles regulaciones traduccionales y/o post-traduccionales operando sobre alguna o varias de las isoformas podrían ser responsables de la disminución en dicha actividad.

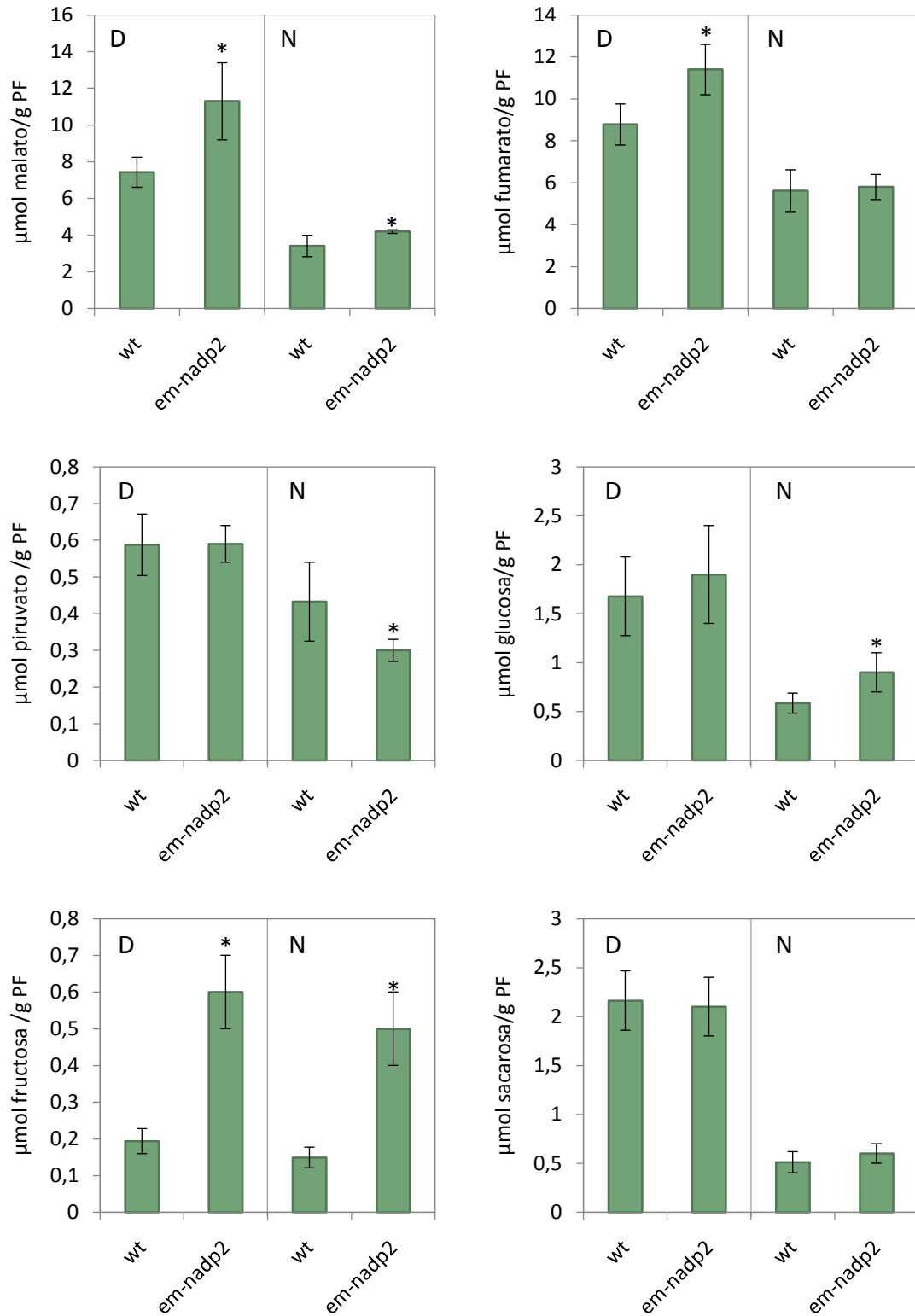
El análisis del perfil de nucleótidos de piridina reveló modificaciones en el estado de oxido-reducción de los mismos en la línea *em-nadp2*. La relación NADP/NADPH fue menor en la planta mutante con respecto a la salvaje, dado por un incremento en la forma reducida (Figura 3.12a). Los cambios en la relación NAD/NADH fueron dependientes del momento del día, observándose una disminución hacia el fin del período diurno, y un aumento al final del nocturno (Figura 3.12b).



**Figura 3.12**

Relación entre las formas oxidadas y reducidas de los nucleótidos de piridina. a- Relación NADP/NADPH. b- Relación NAD/NADH. Las determinaciones se realizaron en hojas de la roseta de plantas wt y *em-nadp2* recolectadas 30 minutos antes del final del día (D), y de la noche (N). Las flechas representan las variaciones que ocurrieron en la línea *em-nadp2* con respecto a wt. Se muestra el valor promedio de al menos 6 preparaciones independientes y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a la planta salvaje en el mismo momento del día ( $p < 0,05$ ).

Continuando con el análisis metabólico, se determinó el contenido de malato, fumarato, glucosa, fructosa y sacarosa en extractos de hojas recolectadas al final del día y al final de la noche, mediante ensayos enzimáticos (Figura 3.13).

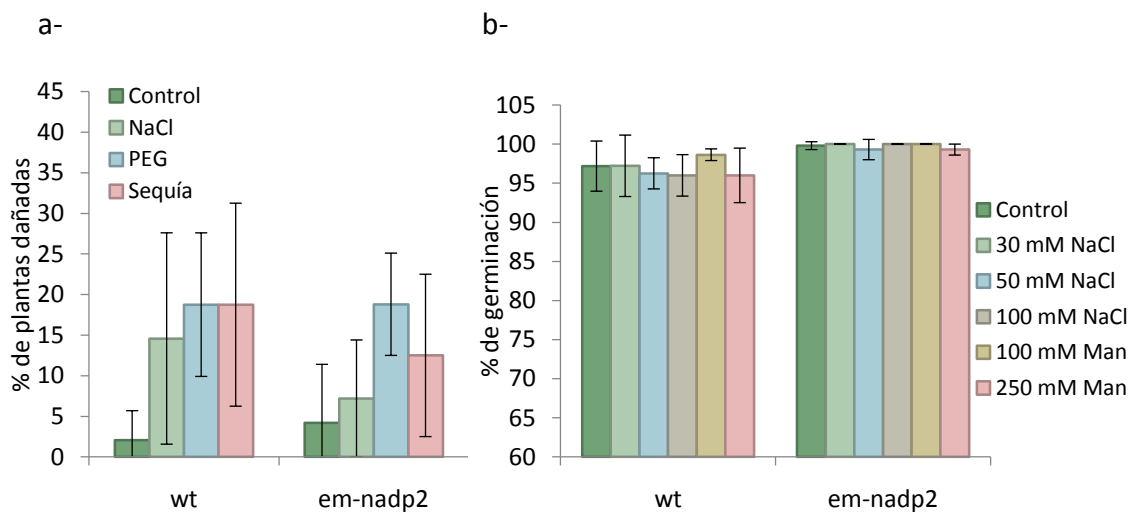


**Figura 3.13**

Niveles de ácidos orgánicos y azúcares en hojas de la roseta recolectadas 30 minutos antes del final del día (D) y 30 minutos antes del final la noche (N). Se muestra el valor promedio de 6-10 preparaciones independientes y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa con respecto a wt en el mismo momento del día ( $p < 0,05$ ).

La línea mutante presentó un mayor contenido de malato y fumarato, y niveles disminuidos de piruvato, con respecto a la planta salvaje. Los azúcares glucosa y fructosa también aumentaron, particularmente hacia el final de la noche (Figura 3.13).

Adicionalmente, se evaluó la respuesta de la línea mutante ante condiciones de estrés hídrico. Estas plantas presentaron un comportamiento similar a la planta salvaje cuando fueron sometidas a riegos con NaCl y PEG o mantenidas sin irrigación (Figura 3.14a). Asimismo, el porcentaje de semillas germinadas en presencia de diferentes concentraciones de NaCl y manitol no mostró diferencias significativas con respecto a la línea wt (Figura 3.14b). Estos resultados contrastan con los obtenidos para las líneas sobreexpresantes de EM-NADP2, que presentaron una incrementada sensibilidad a estrés osmótico (Figura 3.7).



**Figura 3.14**

a- Porcentaje de plantas dañadas luego de un tratamiento con 100 mM NaCl, 15 % (P/V) PEG 6000, o sequía durante 14 días. La extensión del daño fue determinada de igual manera que para las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2. La línea sobre las barras representa la desviación estándar de 4 experimentos independientes, realizados con 16 plantas por línea cada uno. c- Porcentaje de germinación. Se indica la desviación estándar de 3 placas para cada condición y para cada línea, con 100 semillas por línea cada una. Man, manitol.

### 3.3 Discusión

La proteína EM-NADP2 de *Arabidopsis* ha sido involucrada en el metabolismo de azúcares en el tejido vascular (Brown y col., 2010) y en el estallido oxidativo inicial gatillado por la infección de un hongo patógeno hemibiotrófico (Voll y col., 2012). En este trabajo, se continuó la investigación de su función fisiológica mediante la caracterización de líneas vegetales que presentan niveles modificados de esta enzima.

Las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2 exhibieron diferencias fenotípicas con respecto a la línea wt, como la disminución del peso de la roseta y de la longitud de la raíz, un retraso en el tiempo de floración y una aumentada sensibilidad a PEG y manitol (Figura 3.1, Figura 3.2, Figura 3.7). Por el contrario, la línea mutante en esta enzima mostró un fenotipo similar a la planta salvaje tanto en condiciones normales como en las situaciones de estrés hídrico analizadas (Figura 3.10, Figura 3.14).

En rasgos generales, tanto las plantas con ganancia como con pérdida de función en EM-NADP2 presentaron una disminución de la expresión de otras isoformas EM y MDH (Tabla 3.1, Tabla 3.4). Los niveles de actividad EM-NAD sufrieron cambios opuestos en ambas líneas (Figura 3.3b, Figura 3.11b), lo cual podría deberse a la capacidad de EM-NADP2 de catalizar la reacción utilizando NAD como cofactor. Las modificaciones observadas en el estado redox de los nucleótidos de piridina resultaron similares en ambas líneas, con características opuestas dependiendo del momento del día analizado (Figura 3.5, Figura 3.12). Además, tanto las plantas sobreexpresantes como las mutantes exhibieron un estado metabólico alterado respecto a la planta salvaje, aunque llamativamente estos cambios fueron similares entre ellas, sobre todo en los niveles de malato y piruvato (Figura 3.6, Figura 3.13).

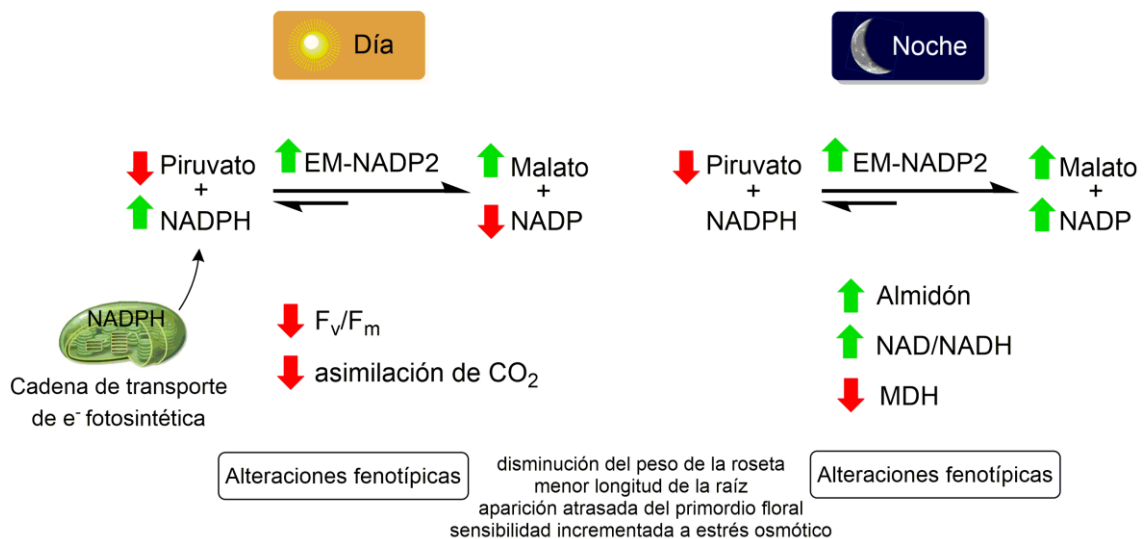
Así, los cambios en los niveles de actividad EM-NADP producidos a nivel de toda la planta tuvieron profundas consecuencias en el metabolismo primario de *Arabidopsis*, lo cual refleja la relevancia de la enzima y sus productos en la homeostasis vegetal.

No resulta sencillo realizar una correlación entre las relaciones NAD(P)/NAD(P)H, los niveles de ácidos orgánicos y los valores de actividad o transcripto de EM-NADP y MDH, debido a la reversibilidad de las reacciones que catalizan estas enzimas, sumado a que no son las únicas que generan o consumen



estos compuestos. De todas maneras, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo postulamos un modelo del estado metabólico alterado observado en las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2 durante el día y la noche (Figura 3.15)

La isoforma EM-NADP2 está involucrada en la interconversión de malato a piruvato, con propiedades reversibles únicas entre otras EM-NADP caracterizadas (Gerrard Wheeler y col., 2008; Arias y col., 2013; Saigo y col., 2013). En este sentido, las plantas transgénicas que sobreexpresan EM-NADP2 con un promotor constitutivo mostraron una relación malato/piruvato alterada. Estas líneas presentaron niveles aumentados de malato y disminuidos de piruvato con respecto a la planta salvaje, tanto al final del día como de la noche (Figura 3.6). Esto sugiere que EM-NADP2 podría estar catalizando preferencialmente la carboxilación de piruvato por sobre la descarboxilación de malato *in vivo* en estas plantas (Figura 3.15).



**Figura 3.15**

Modelo propuesto mostrando las alteraciones en el metabolismo diurno y nocturno de las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2 y el rol que podría tener la enzima en dichas alteraciones. De acuerdo a los resultados metabólicos obtenidos, EM-NADP2 estaría catalizando la reacción en el sentido de la síntesis de malato a partir de piruvato. Sin embargo, durante el día, el nivel de NADPH/NADP resulta aumentado debido al proceso fotosintético operante, que provoca la reducción de NADP, aumentando el contenido de NADPH, el cual no puede ser disipado por los niveles aumentados de malato en el citosol generados por EM-NADP2. Las principales alteraciones fenotípicas de las líneas transgénicas se indican en la parte inferior. Las flechas de color indican niveles aumentados (verde) o disminuidos (rojo) con respecto a wt.

Además de modificar los niveles de malato y piruvato, la reacción catalizada por EM-NADP interconvierte NADP con NADPH. En las plantas sobreexpresantes la relación NADP/NADPH se vio diferencialmente alterada dependiendo del momento del día (Figura 3.5). Durante la noche, la relación NADP/NADPH se vio incrementada, resultado que concuerda con la hipótesis de un incremento de la actividad EM-NADP en el sentido de la carboxilación de piruvato. Este estado alterado durante la noche, que además incluye un aumento en la relación NAD/NADH, podría ser responsable de la disminución de los niveles de transcripto y de actividad de las restantes enzimas involucradas en el metabolismo de malato analizadas (Tabla 3.1, Figura 3.3).

El aumento de los niveles de glucosa, fructosa y almidón en las plantas transgénicas (Figura 3.6d y e, Figura 3.2i) podría deberse a una degradación alterada de los mismos, lo cual puede estar relacionado a las características fenotípicas anómalas que presentaron estas líneas (Tiessen y col., 2002; Centeno y col., 2011).

A pesar de que durante el día los niveles de malato/piruvato sugieren un incremento de la actividad de carboxilación de piruvato de EM-NADP2 en las plantas sobreexpresantes, no ocurre lo mismo con la relación NADP/NADPH (Figura 3.5). Considerando que el NADPH es producido durante el día por el proceso fotosintético, es posible que procesos de disipación de NADPH, como la válvula de malato (Hebbelmann y col., 2012), se vean afectados por el incremento en la actividad EM-NADP2, llevando a mayores niveles de NADPH en estas líneas con respecto a la planta salvaje. Así, podría postularse que el aumento de malato en el citosol generado por el aumento de la actividad EM-NADP2 en este compartimiento, podría impedir la salida de poder reductor del cloroplasto bajo la forma de malato, lo cual es utilizado como válvula disipatoria, aumentando el nivel de NADPH en cloroplastos y provocando fotoinhibición. Esto puede relacionarse además con los bajos valores de  $F_v/F_m$  y de asimilación de  $CO_2$  obtenidos para las plantas transgénicas (Figura 3.2j-l).

Los resultados del análisis comparativo del estado metabólico de estas plantas sometidas a un tratamiento con PEG, indicaron que las líneas sobreexpresantes de EM-NADP2 presentan alteraciones en varios metabolitos y en el estado redox de NAD(P) (Figura 3.8, Tabla 3.3, Figura 3.9). Este desbalance podría llevar a una menor capacidad de las plantas transgénicas de sintetizar solutos compatibles y/o de cubrir la alta demanda de poder reductor, ambos requeridos para procesos de detoxificación y

señalización en respuesta a estrés, constituyendo la causa de la mayor sensibilidad observada. Cabe destacar que el fenotipo de susceptibilidad a PEG y manitol de las plantas con sobreexpresión de EM-NADP2 no se repitió ante otros factores que inducen estrés osmótico tales como NaCl y sequía (Figura 3.7). Este comportamiento podría estar relacionado a las diferentes condiciones de severidad aplicadas y/o a diferencias específicas en las respuestas.

Las líneas sobreexpresantes de EM-NADP2 mostraron un patrón metabólico diferente al obtenido en plantas expresando la isoforma EM-NADP fotosintética de maíz en Arabidopsis. Estas presentaron niveles disminuidos de malato y fumarato, lo cual provocó una senescencia acelerada en oscuridad y un fenotipo verde pálido en plantas creciendo en días cortos (Fahnenstich y col., 2007; Zell y col., 2010). Adicionalmente, las plantas sobreexpresantes de EM-NADP2 presentaron un comportamiento opuesto al presentado por plantas de Arabidopsis sobreexpresando una isoforma EM-NADP citosólica de arroz frente a condiciones de estrés osmótico (Liu y col., 2007). Estas observaciones contrastantes pueden ser atribuidas a la reversibilidad de la reacción catalizada por EM-NADP2. A diferencia de las EM-NADP de maíz y arroz mencionadas, que demostraron ser enzimas básicamente descarboxilantes de malato (Saigo y col., 2013), la isoforma EM-NADP2 recombinante de Arabidopsis exhibió una alta capacidad catalítica para la reacción de carboxilación reductiva de piruvato (Gerrard Wheeler y col., 2008), siendo esta actividad regulada por varios metabolitos y pH (Arias y col., 2013). Así, estos resultados soportan la hipótesis de que ambas direcciones de la reacción pueden tener lugar *in vivo*, siendo afectadas por una regulación fina, coordinada en respuesta al estado metabólico de la célula y a cambios ambientales. Este aspecto particular de las isoformas de enzima mállica será desarrollado en más detalle en el Capítulo 5 de esta Tesis.

Por otro lado, en cuanto a las líneas con pérdida de función en EM-NADP2, los resultados obtenidos indican que estas plantas, a pesar de presentar algunas alteraciones metabólicas (Figura 3.11, Tabla 3.4, Figura 3.12, Figura 3.13), las mismas no producen un fenotipo aparente según las mediciones y condiciones que utilizamos en esta Tesis (Figura 3.10, Figura 3.14). Este hecho, está sin duda relacionado con la plasticidad metabólica que presentan las plantas, y con la posibilidad de realizar compensaciones en los flujos metabólicos, gracias a diversos procesos, como vías

metabólicas alternativas utilizando enzimas e incluso compartimientos subcelulares diferentes.

Finalmente, los resultados presentados en este capítulo indican que los niveles de metabolitos *in planta*, junto con sus correspondientes flujos metabólicos, son resultado de la integración de diversas transformaciones bioquímicas y procesos de regulación que operan simultáneamente *in vivo*, y que no pueden predecirse de manera sencilla a partir de la modificación de una enzima en particular. Así, mientras que los cambios en los niveles de transcriptos, o en los niveles de algunas proteínas, por lo general se relacionan a uno o varios genes responsables, los cambios en los flujos metabólicos y, en particular, los cambios en los niveles de metabolitos, no necesariamente siguen una lógica lineal y son a menudo el resultado de interacciones complejas de varios circuitos metabólicos operando simultáneamente y, además, de manera compartimentalizada, lo que genera otro nivel de complejidad mayor aún.

Esta complejidad, puesta de manifiesto en este trabajo con respecto a los cambios metabólicos y fenotípicos generados al modificar los niveles de una isoforma particular de la enzima málica (EM-NADP2) en *Arabidopsis*, proporciona nuevas claves para la modificación de enzimas en bioingeniería de plantas y una nueva visión de los mecanismos moleculares que sustentan el metabolismo de los ácidos orgánicos en las células vegetales.



## **4 Estudio de la respuesta de líneas de *A. thaliana* mutantes en EM-NADP a estrés por aluminio**

La toxicidad por aluminio (Al) afecta al desarrollo vegetal causando inhibición en el crecimiento de las raíces. Como se comentó en la introducción, los ácidos orgánicos juegan un rol fundamental en la tolerancia a este estrés, ya que son capaces de formar complejos estables con Al. Participan en la detoxificación interna de Al, mediante el secuestro de estos complejos en vacuolas, así como en un mecanismo de exclusión que requiere su exudación a la rizósfera para impedir el ingreso del Al a las raíces y su unión a los componentes celulares (Sección 1.2.1).

*A. thaliana* es una especie poco tolerante a concentraciones tóxicas de Al, pero es un buen modelo para el estudio de los mecanismos moleculares asociados a este estrés. Uno de las estrategias de tolerancia a Al más importantes en esta planta es la liberación a la rizósfera de malato y en menor medida de citrato (Hoekenga y col., 2006; Liu y col., 2009). Se ha demostrado que esta exudación concuerda con un patrón de tipo II, es decir, no ocurre inmediatamente después de la exposición a Al, sino luego de un periodo de tiempo (Figura 1.2b), y es mediada de manera independiente por dos transportadores de ácidos dicarboxílicos: ALMT1 y MATE (Hoekenga y col., 2006; Liu y col., 2009). La expresión de estos genes es inducida en presencia de Al, siendo activada por STOP1 (*sensitive to proton rhizotoxicity 1*), un factor de transcripción con dedos de zinc crítico para la tolerancia a pH ácido (Iuchi y col., 2007; Liu y col., 2009). STOP1 además regula positivamente la expresión de ALS3 (*aluminum sensitive 3*), identificado a partir de una colección de mutantes de *A. thaliana* hipersensibles a aluminio. Este gen codifica para un transportador de tipo ABC (*ATP-binding cassette-*

*like*) de membrana plasmática que se expresa principalmente en los hidátodos de las hojas, el floema, y el córtex de la raíz luego de la exposición a Al. Se postula que su función es redistribuir el Al acumulado, lejos de tejidos sensibles y así proteger la raíz en crecimiento de sus efectos tóxicos (Larsen y col., 2005; Sawaki y col., 2009). Otro de los genes identificados mediante esta estrategia fue ALS1 (*aluminum sensitive 1*), que codifica un dominio de membrana de un transportador ABC de tonoplasto. Éste se expresa en vasculatura, hidátodos y ápice de la raíz y no es inducible por Al. Se ha propuesto que estaría implicado en el secuestro de Al en la vacuola luego de formar complejo con los ácidos orgánicos en el citosol (Larsen y col., 2007).

A pesar de que existen numerosas publicaciones en la literatura acerca de la importancia de los ácidos orgánicos en la tolerancia a este estrés, la mayoría de ellas están enfocadas al estudio de su transporte a la rizósfera. Esto se fundamenta en la idea de que es la presencia de proteínas transportadoras de ácidos orgánicos en la membrana plasmática, más que la síntesis de los mismos, el factor limitante en la exudación de estos compuestos. Por ejemplo, la expresión heteróloga del gen ALMT de trigo en cebada le confirió a estas plantas un nivel de resistencia a Al comparable al de las variedades tolerantes de trigo, gracias a que le otorgó la capacidad de exudar malato (Delhaize y col., 2004). Líneas transgénicas de *A. thaliana* expresando MATE de sorgo (Magalhaes y col., 2007) y MATE1 de maíz (Maron y col., 2010) lograron una incrementada liberación de citrato y un aumento de la tolerancia a Al. Por su parte, la sobreexpresión de ALMT1 endógeno en *Arabidopsis* llevó a una incrementada exudación de malato, aunque en este caso el aumento de la tolerancia a Al en estas líneas no fue significativo (Kobayashi y col., 2013).

Así, no existe demasiada información acerca de los cambios metabólicos asociados a la respuesta a Al. El contenido de ácidos orgánicos en las raíces depende de su síntesis y degradación, así como de la tasa de exudación, y su consumo para otras funciones metabólicas. Una exudación continua de estos compuestos, como la que ocurre ante la exposición a Al, manteniendo los niveles constantes en las raíces, requeriría un aumento en su síntesis y/o disminución de su degradación. Por ejemplo, variedades resistentes de trigo exudan entre 5 y 10 veces más malato que las sensibles aunque los genotipos no difieren en sus niveles internos, indicando que el reservorio de malato debe estar siendo continuamente reabastecido (Delhaize y col., 1993).

En algunos casos se ha demostrado la contribución de las enzimas implicadas en el metabolismo de los ácidos orgánicos en la acumulación de los mismos en respuesta a Al. Por ejemplo, la exudación sostenida de citrato en una variedad tolerante de poroto fue asociada a una mayor actividad PEPC y citrato sintasa (Rangel y col., 2010). De forma similar, se observó un aumento en la actividad MDH y citrato sintasa, y una disminución de la actividad aconitasa en soja ante el tratamiento con Al (Xu y col., 2010).

Otros estudios además han revelado una relación entre la enzima málica y el estrés por Al. Estudios de proteómica diferencial en la especie leguminosa *Stylosanthes guianensis* revelaron cambios en una EM-NADP citosólica en respuesta al tratamiento con Al. En la variedad resistente, se observó un aumento de esta proteína y niveles incrementados de malato en raíces, por lo que fue postulado que esta isoforma funcionaría en la síntesis de dicho ácido orgánico y estaría asociada a un mecanismo de tolerancia interno (Sun y col., 2014). En raíces de arroz, en cambio, se vio una disminución en los niveles de proteína de una enzima málica luego de 3 días de tratamiento con Al (Fukuda y col., 2007). Mediante estudios de mapeo por asociación y ligamiento en maíz, se detectaron varios genes asociados a la tolerancia a Al, entre ellos una enzima málica de localización citosólica, aunque su función en este proceso no fue esclarecida (Krill y col., 2010).

En este Capítulo se presenta un estudio de la posible contribución de las EM-NADP en raíces de *A. thaliana* en el metabolismo del malato, su acumulación y exudación, y por consiguiente en el mecanismo de tolerancia a Al.

#### **4.1 Análisis fenotípico de líneas mutantes en *em-nadp* ante condiciones de estrés por aluminio**

En esta parte del trabajo se utilizaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 mutantes homocigotas por inserción de ADN-T en los genes *em-nadp1*, *em-nadp2* y *em-nadp4*, obtenidas del banco de mutantes NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*, <http://www.arabidopsis.info/>), denominadas línea *em-nadp1* (SALK\_036898), *em-nadp2* (SALK\_073818) y *em-nadp4* (SALK\_064163), respectivamente. Además, se incluyeron las dobles mutantes *em-nadp4x1* y *em-nadp4x2*, y la triple mutante



em-nadp2x3x4, generadas por cruza de las respectivas líneas mutantes simples. Estas líneas no mostraron expresión detectable de los correspondientes transcritos y no presentaron cambios fenotípicos detectables a simple vista con respecto a la planta salvaje, cuando se crecieron en condiciones óptimas (Gerrard Wheeler y col., 2005).

Las isoformas EM-NADP1, 2 y 4 se expresan en raíces por lo que sus mutantes pueden presentar potenciales alteraciones en el metabolismo del malato en este órgano. En primer lugar, las líneas en estudio fueron analizadas para determinar si presentaban diferente susceptibilidad al estrés por Al con respecto a la planta salvaje.

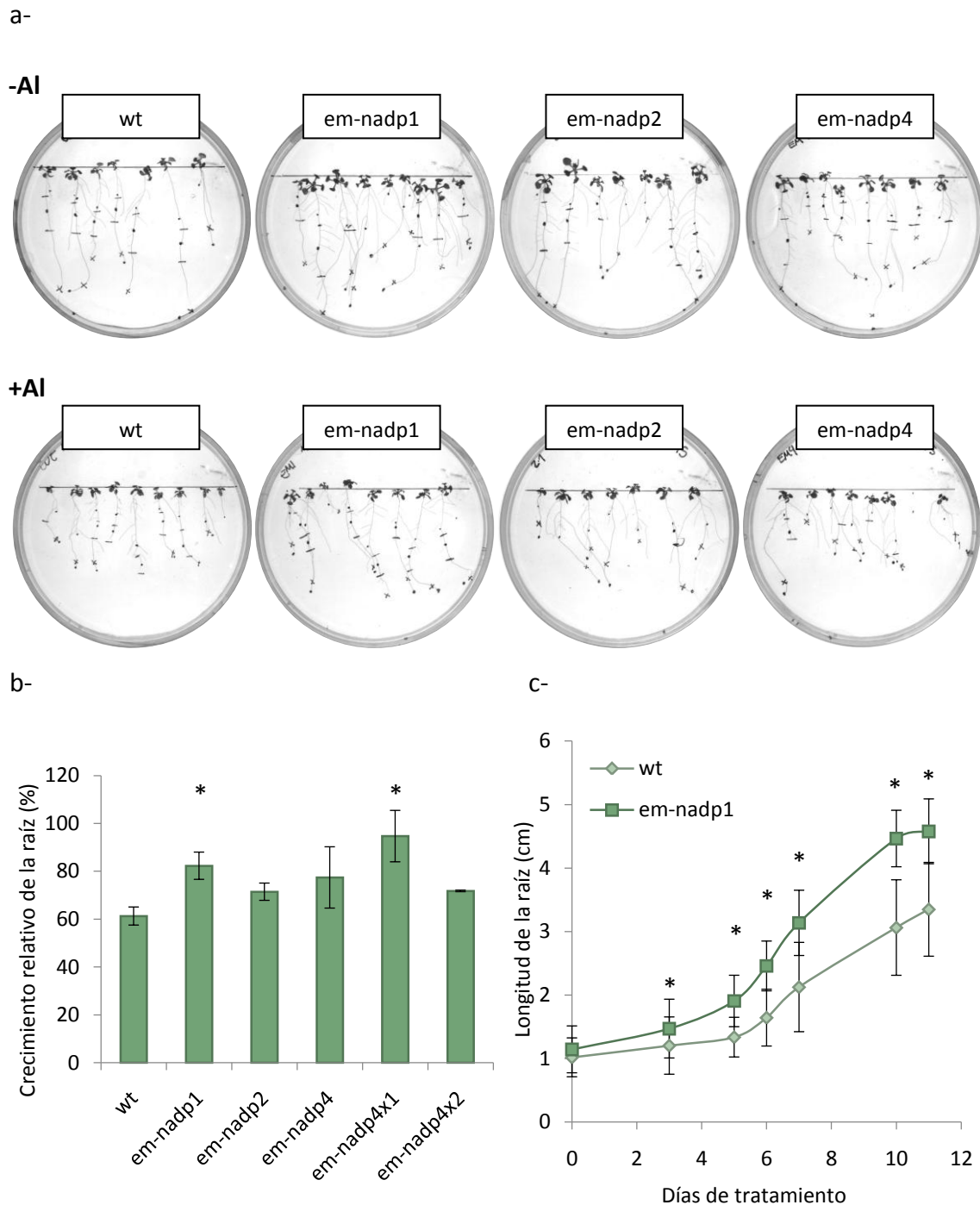
Para ello, se midió la longitud de las raíces de plántulas wt, em-nadp1, em-nadp2, em-nadp4 y dobles mutantes em-nadp4x1 y em-nadp4x2, en condiciones control y en presencia de Al. Las líneas fueron germinadas y crecidas por 7 días en medio MS, y luego fueron traspasadas a placas MS control (sin Al) y suplementadas con 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Sección 2.4).

Los resultados se presentan en la Figura 4.1. En condiciones control, no se observaron diferencias en el crecimiento de la raíz primaria entre los distintos genotipos. Sin embargo, en presencia de Al, las mutantes em-nadp1 y em-nadp4x1 presentaron un mayor crecimiento relativo de la raíz con respecto a la planta salvaje. Cabe aclarar que el aumento en este parámetro fue el mismo para ambas líneas, es decir, no existió un efecto sinérgico en la doble mutante.

Los controles realizados en placas con MS ajustado a pH 4,5 no mostraron diferencias significativas en el crecimiento de la raíz con respecto a los controles mostrados en la Figura 4.1 para todas las líneas, indicando que el efecto fenotípico observado se debe a la presencia de Al en el medio.

En la Figura 4.1c se muestra la longitud promedio de las raíces de las líneas em-nadp1 y wt en función de los días de exposición al estrés. La mutante em-nadp1 alcanzó longitudes significativamente mayores que la planta wt a partir de las 72 horas de tratamiento y en todos los puntos medidos posteriormente.

Estos resultados indicarían una mayor tolerancia a la presencia del metal asociada específicamente a la ausencia de EM-NADP1.

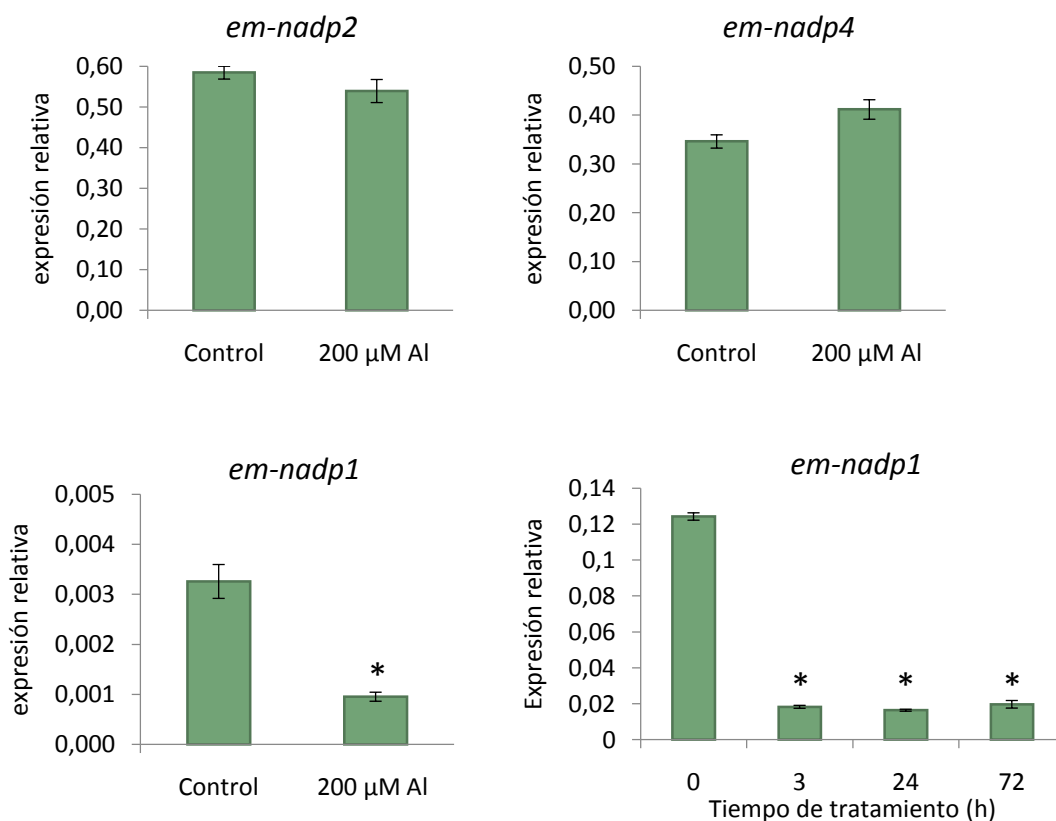


**Figura 4.1**

a- Crecimiento de las raíces de plantas wt, em-nadp1, 2 y 4 en placas MS control (-Al) y suplementadas con 200  $\mu$ M  $\text{AlCl}_3$  (+Al) a los 10 días post-trasplante. b- Tolerancia a Al expresada como % de crecimiento relativo de la raíz (longitud en presencia de Al/longitud en ausencia de Al \* 100) a los 7 días post-trasplante. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de este parámetro, determinado en tres experimentos diferentes donde se midieron las longitudes de las raíces de entre 7-16 plantas en cada uno. c- Longitud de la raíz de plantas wt y em-nadp1 en presencia de 200  $\mu$ M  $\text{AlCl}_3$ . El día 0 corresponde al momento del trasplante. Las barras de error representan desviación estándar (n=14). Se muestra un resultado típico, de tres experimentos diferentes. (\*) indica diferencia significativa con respecto a wt (p<0,05).

## 4.2 Niveles de expresión de genes *em-nadp*

Continuando con este estudio se decidió evaluar si ocurrían cambios en la expresión de las isoformas EM-NADP presentes en raíz luego de un tratamiento con Al. Plantas de *A. thaliana* wt fueron germinadas y crecidas por 7 días en placas con medio MS, y luego traspasadas a placas MS control (sin Al) o suplementadas con 200  $\mu$ M  $AlCl_3$ . Luego de 12 días post-trasplante se recolectaron muestras de raíces control y tratadas, se realizó la extracción de ARN y posterior síntesis de los ADNc y se cuantificaron los transcritos *em-nadp1*, *em-nadp2* y *em-nadp4* mediante qRT-PCR (Figura 4.2).



**Figura 4.2**

Expresión de los genes *em-nadp1*, 2 y 4 en un *pool* de raíces de plantas wt de 19 días control y tratadas con 200  $\mu$ M  $AlCl_3$  durante 12 días. También se muestra la acumulación del transcrito *em-nadp1* en raíces de plantas wt de 7-10 días en condiciones control y luego de 3, 24 y 72 h de tratamiento con 200  $\mu$ M  $AlCl_3$ . En todos los casos se indican los valores de expresión relativa respecto al gen normalizador (*poliubiquitina 10*). Las determinaciones se realizaron por triplicado. (\*) indica diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

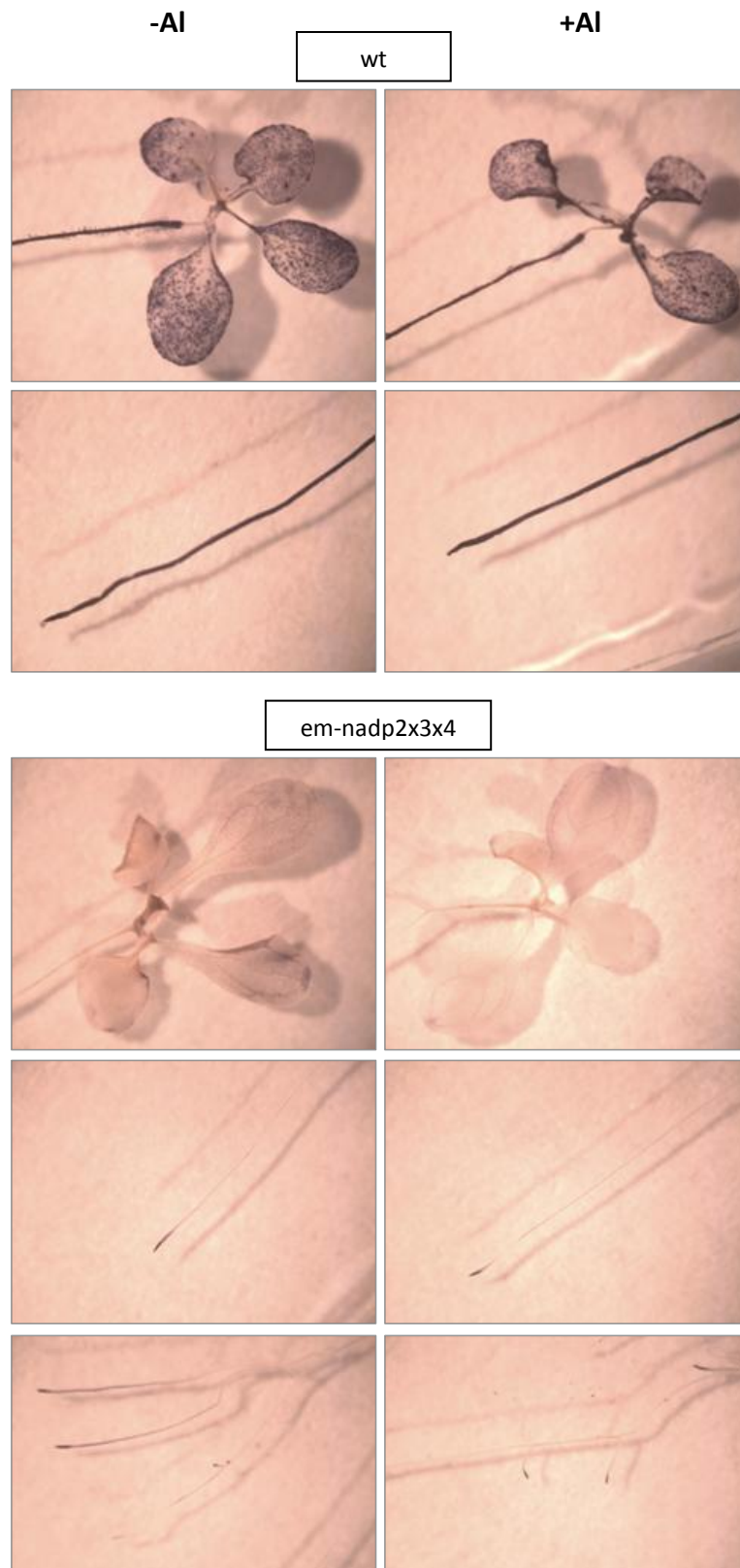
Los niveles de *em-nadp2* y *em-nadp4* no se vieron afectados por el tratamiento, mientras que se observó una disminución en la expresión de *em-nadp1* luego de la exposición a Al (Figura 4.2).

Además, se decidió analizar la expresión de *em-nadp1* luego de períodos cortos de exposición al estrés. Nuevamente se observó una disminución de la expresión de este gen, luego de 3, 24 y 72 horas de tratamiento con 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (Figura 4.2). Estos resultados revelaron además que *em-nadp1* presenta mayores niveles de expresión en estadios tempranos de crecimiento, tanto con como sin tratamiento.

Con el fin de identificar cambios en la actividad de EM-NADP1 en respuesta a Al, se decidió analizar la actividad EM-NADP mediante tinción *in situ* (Sección 2.16), de plantas wt y triples mutantes *em-nadp2x3x4*. Se utilizó esta línea ya que, de todas las isoformas EM-NADP de raíz, sólo expresa *em-nadp1*. Por lo tanto, la actividad observada en este entorno mutante se debe exclusivamente a EM-NADP1.

Las plantas fueron crecidas en placas MS control durante 7 días y luego traspasadas a medio  $\frac{1}{4}\text{X}$  MS con y sin 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Se utilizó una menor concentración de Al que en los ensayos anteriores, ya que la actividad efectiva del ion es mayor en medio líquido en comparación a la del medio agar utilizado para el crecimiento en placas. Las plántulas fueron recolectadas luego de 6 horas, fijadas e incubadas en la solución de tinción conteniendo malato,  $\text{Mg}^{2+}$ , NADP, NBT y PMS a 30 °C, durante 90 minutos y finalmente decoloradas en etanol.

La planta salvaje mostró una intensa tinción por actividad EM-NADP en hojas y en raíces, tanto en presencia como en ausencia de Al (Figura 4.3). La línea *em-nadp2x3x4* no presentó tinción por actividad EM-NADP en hojas. Sí se observó tinción de actividad EM-NADP en raíces, particularmente en el cilindro central y en el ápice de las raíces primarias y secundarias, tanto en la condición control, como en las plantas tratadas con Al. Mediante esta técnica, no pudo observarse a simple vista diferencias de tinción entre plantas tratadas y no tratadas.



**Figura 4.3**

Detección de actividad EM-NADP *in situ* en plantas de 7 días wt y em-nadp2x3x4 luego de 6 horas en ¼X MS control (-Al) y suplementado con 100 µM AlCl<sub>3</sub> (+Al). Aumento 2X.

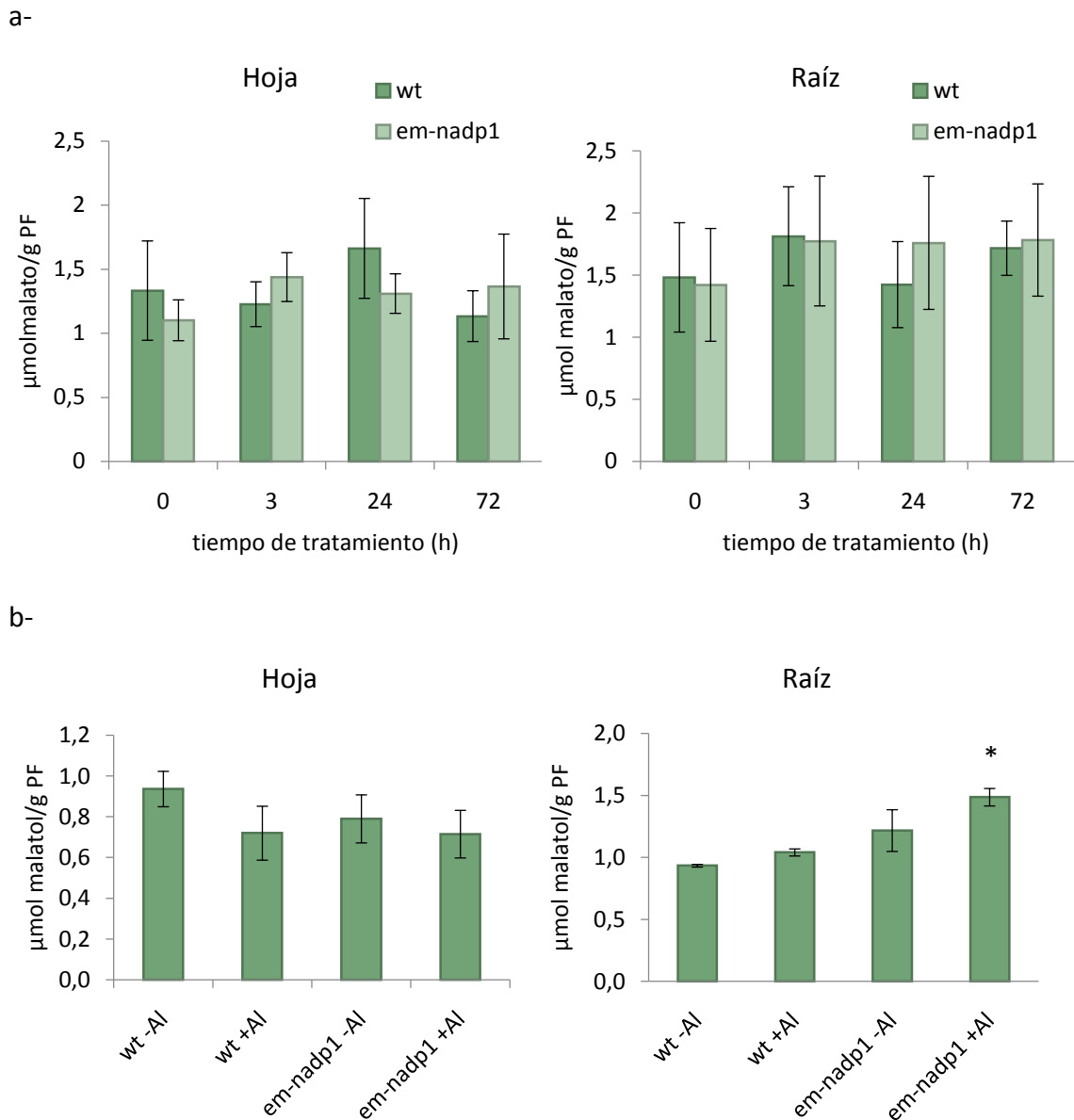
### **4.3 Determinación del contenido de malato en la línea em-nadp1**

Dado que las plantas mutantes en EM-NADP1 presentaron un fenotipo de tolerancia ante el tratamiento con Al, se decidió analizar si la ausencia de esta enzima producía cambios en los niveles de malato en estas plantas. Para ello, se realizaron medidas del contenido de este ácido orgánico tanto en raíces como en hojas de plántulas de las líneas em-nadp1 y wt, germinadas y crecidas en medio MS control por 7 días y luego transferidas a nuevas placas MS control o suplementadas con 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Se recolectaron muestras de hojas y raíces luego de 3, 24 y 72 horas, así como después de 12 días de tratamiento. Se extrajeron los metabolitos solubles y se determinó malato mediante ensayo enzimático (Sección 2.18).

Los resultados se muestran en la Figura 4.4. No se observaron diferencias significativas en el contenido de malato entre la línea em-nadp1 y la wt en condiciones control. Ninguno de los tiempos de tratamiento con Al analizados produjo modificaciones en la cantidad de malato en hojas. Tampoco resultaron significativos los cambios en los niveles medidos en raíces luego de una exposición corta a Al (3, 24 y 72 horas de tratamiento). Sin embargo, se observó un aumento significativo de malato en la planta mutante con respecto a la salvaje cuando estas fueron sometidas al tratamiento con Al durante un periodo prolongado (12 días).

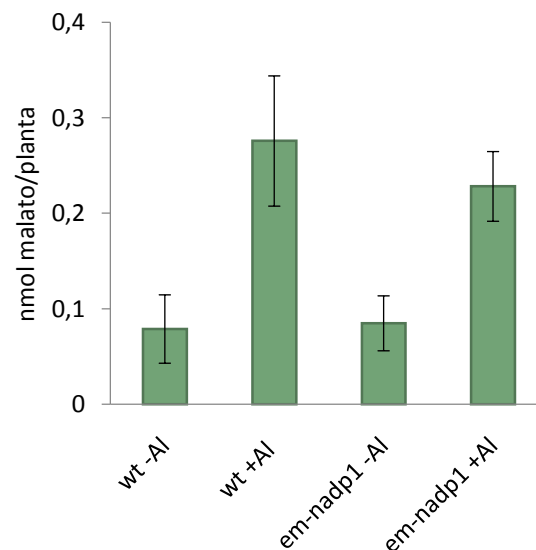
Posteriormente se decidió analizar si estas plantas son capaces de exudar una mayor cantidad de malato a la rizósfera. Las líneas wt y em-nadp1 fueron germinadas y crecidas en placas con medio MS control por 7 días, y luego fueron traspasadas a  $\frac{1}{4}\text{X}$  MS líquido con y sin 100  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Se recogieron los exudados después de 3 horas y se determinó malato por el método enzimático mencionado.

El tratamiento con Al aumentó el nivel de malato presente en los exudados, tanto de las plantas em-nadp1 como de las wt. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre el malato exudado por ambas líneas en condiciones control ni en presencia de Al (Figura 4.5).



**Figura 4.4**

Contenido de malato interno en un *pool* de hojas o raíces de plantas wt y em-nadp1. a- Malato medido a tiempo 0, 3, 24 y 72 h de tratamiento en placas con 200 μM AlCl<sub>3</sub>. b- Malato medido en condiciones control (-Al) y en presencia de 200 μM AlCl<sub>3</sub> (+Al) a los 12 días post-trasplante. Se muestra el valor promedio de 3 preparaciones independientes y la desviación estándar. (\*) indica diferencia significativa (p<0,05) respecto al control.



**Figura 4.5**

Contenido de malato en los exudados de plantas wt y em-nadp1 de 7 días luego de un tratamiento de 3 horas en medio  $\frac{1}{4}$ X MS control (-Al) o suplementado con  $100 \mu\text{M AlCl}_3$  (+Al). Se muestra el valor promedio y la desviación estándar de 3 muestras independientes conteniendo los exudados de 18 plantas para cada línea y por cada condición.

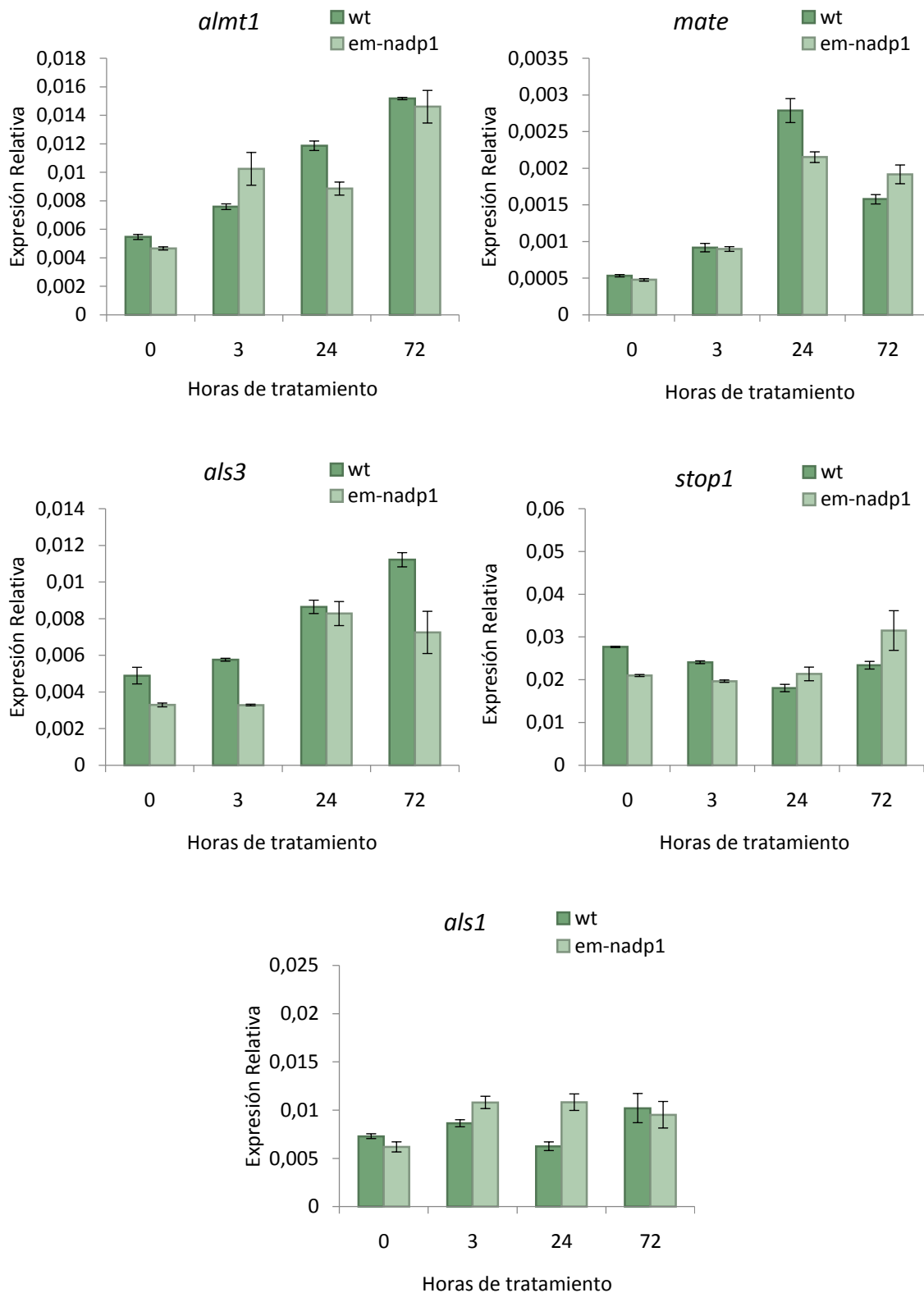
#### 4.4 Niveles de expresión de genes relacionados a la tolerancia a Al

Para evaluar el posible efecto de la pérdida de *em-nadp1* sobre la expresión de genes de resistencia a Al, se realizó un estudio de los niveles de transcritos de varios genes involucrados en la tolerancia a este estrés en muestras de raíces wt y em-nadp1 a 0, 3, 24 y 72 horas de tratamiento con  $200 \mu\text{M AlCl}_3$ .

Se evaluó la expresión del transportador de malato activado por aluminio ALMT1, y de citrato MATE, el factor de transcripción STOP1, y los transportadores ALS3 y ALS1, por qRT-PCR (Figura 4.6).

Los niveles de transcritos de *stop1* y *als1* se mantuvieron constantes independientemente del tratamiento con Al tanto en wt como en la línea em-nadp1. Los transcritos de *almt1*, *mate* y *als3* aumentaron sus niveles en las muestras tratadas, tal cual ha sido reportado (Delhaize y col., 2012), pero no se encontraron diferencias significativas en su expresión entre las líneas wt y em-nadp1.



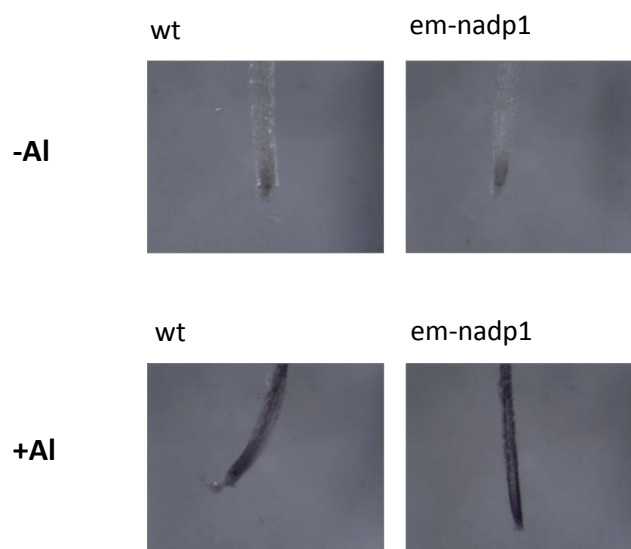
**Figura 4.6**

Expresión de genes relacionados a la tolerancia al estrés por aluminio en un *pool* de raíces de plantas wt de 7 días, luego de 0, 3, 24 y 72 hs de tratamiento con 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . Valores de expresión relativa al gen normalizador (*poliubiquitina 10*). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 4.5 Detección *in situ* de Al y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plántulas *em-nadp1*

Un método ampliamente utilizado para evaluar tolerancia a Al es la tinción con hematoxilina. Este indicador une Al presente en los tejidos formando un complejo violeta (Polle y col., 1978). Para analizar la presencia de Al en raíces, plantas de las líneas *em-nadp1* y *wt* fueron germinadas y crecidas en placas con medio MS control por 7 días, y luego fueron traspasadas a ¼X MS líquido con y sin 100 µM AlCl<sub>3</sub>. Luego de 3 horas, las plántulas fueron sumergidas en la solución de tinción con hematoxilina por 30 minutos, lavadas con H<sub>2</sub>O destilada y fotografiadas en la lupa (Sección 2.11).

En la Figura 4.7 se puede observar que ambas líneas presentan una tinción semejante luego del tratamiento, indicando que la línea *em-nadp1* acumularía similares niveles de Al que la planta *wt*.



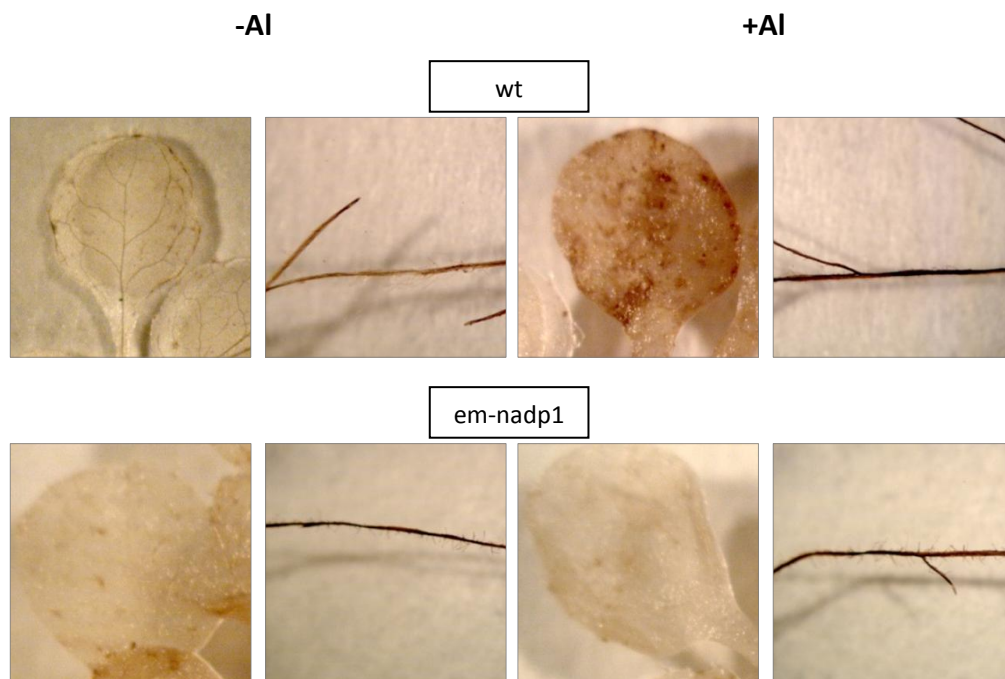
**Figura 4.7**

Tinción con hematoxilina de plantas *wt* y *em-nadp1* luego de un tratamiento de 3 horas en medio ¼X MS control (-Al) o con 100 µM AlCl<sub>3</sub> (+Al). Aumento: 12x.

Por otro lado, se decidió investigar si la tolerancia presentada por la planta mutante podía deberse a alteraciones en la generación de ROS.

Para ello se determinó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas *wt* y *em-nadp1* tratadas y control mediante tinción DAB (Sección 2.10). Se observó precipitado marrón, indicativo de la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en hojas y raíces de la planta salvaje en

presencia de Al. La línea mutante, por el contrario, presentó menores niveles de tinción después del tratamiento (Figura 4.8).



**Figura 4.8**

Tinción DAB de plantas wt y em-nadp1 germinadas y crecidas en medio MS control por 7 días y luego traspasadas a nuevas placas MS control (-Al) y suplementadas con 200  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  (+Al) por 12 días. Aumento: 2x.

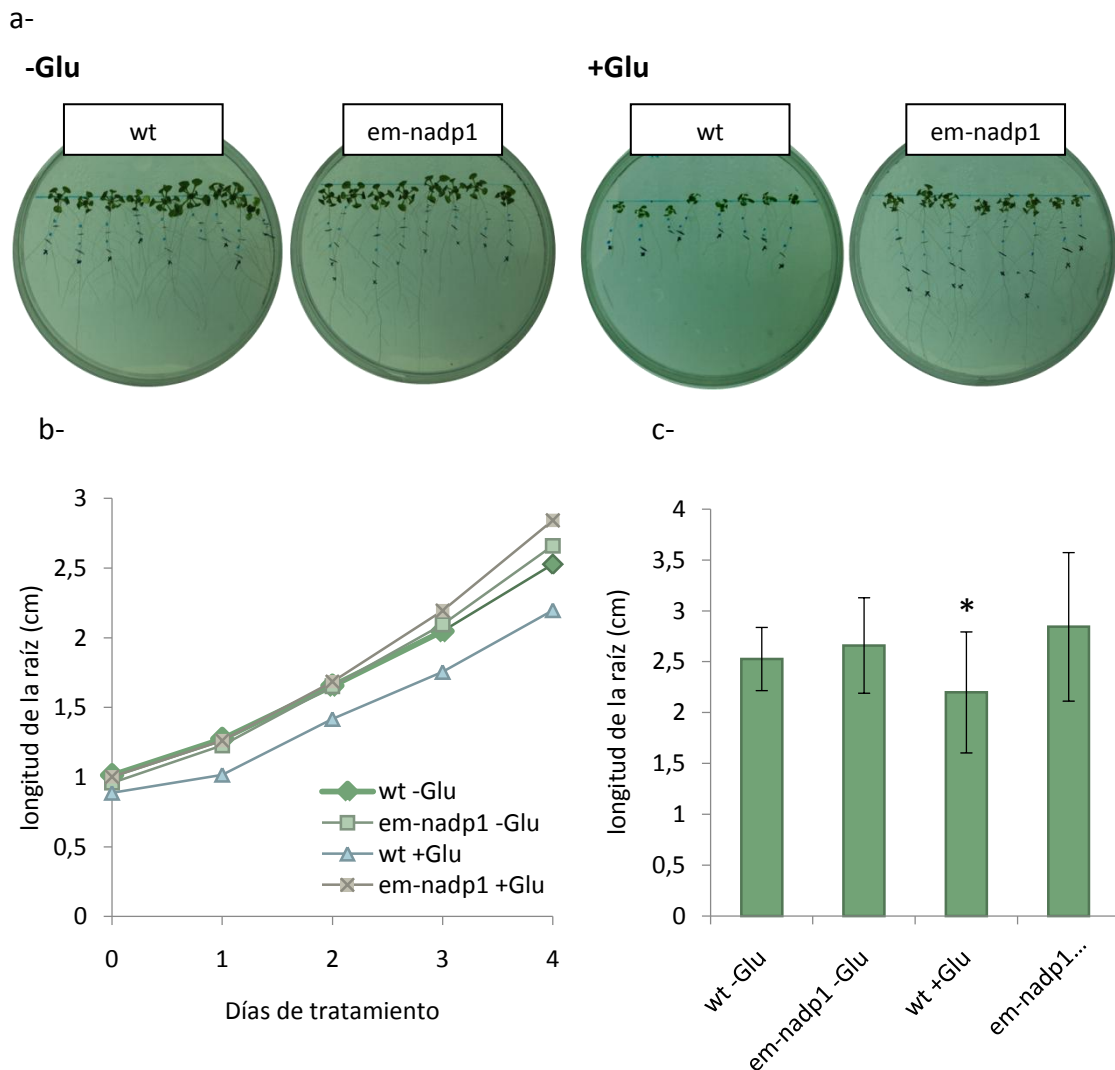
#### **4.6 Respuesta de las plantas em-nadp1 ante la presencia de glutamato**

Se ha reportado que el glutamato actúa como una importante molécula señal modulando el crecimiento de la raíz (Walch-liu y col., 2006; Forde y col., 2013), y se lo ha propuesto como un posible intermediario en la vía de transducción de la señal de Al (Sivaguru y col., 2003). Por esto, se resolvió evaluar la respuesta de la línea em-nadp1 a la presencia de este aminoácido en el medio.

Las líneas fueron germinadas y crecidas por 7 días en medio MS, y fueron traspasadas a placas MS control (-Glu) o suplementadas con 5 mM glutamato (+Glu) (Sección 2.4) para la determinación de la longitud de la raíz primaria durante 4 días.

Los resultados se muestran en la Figura 4.9. Tal como está reportado, se observó una inhibición en el crecimiento de la raíz primaria en la planta salvaje en

respuesta al glutamato. Sin embargo, la línea em-nadp1 no se vio afectada, alcanzando longitudes similares a las de la condición control.



**Figura 4.9**

a- Crecimiento de las raíces de wt y em-nadp1 en placas control (-Glu) y con 5 mM glutamato (+Glu) luego de 14 días post-trasplante. b- Crecimiento de la raíces en función de los días de tratamiento. El día 0 corresponde al momento del trasplante. c- Longitud de la raíz alcanzada luego de 4 días de tratamiento. Se muestra un resultado típico, de tres experimentos diferentes. Las barras de error representan desviación estándar (n=20). (\*) indica diferencia significativa con respecto a la condición control ( $p < 0,05$ ).

## 4.7 Discusión

En este trabajo se propuso estudiar la contribución de las EM-NADP presentes en raíces de *Arabidopsis thaliana* en el mecanismo de tolerancia a Al.

Una línea mutante insercional en el gen que codifica para la enzima málica NADP-dependiente 1 de *Arabidopsis*, EM-NADP1, mostró una incrementada tolerancia al estrés por aluminio con respecto a la planta salvaje, evidenciada como un mayor porcentaje de crecimiento de la raíz en presencia de concentraciones tóxicas de este metal (Figura 4.1). El análisis de PCR cuantitativa en tiempo real realizado demostró que, de los genes *em-nadp* expresados en raíces de la planta salvaje, *em-nadp1* fue el que respondió de manera diferencial ante el tratamiento con Al ensayado. Los niveles de transcripto disminuyeron significativamente luego de 3 horas de exposición al estrés, manteniéndose reprimida su expresión incluso después de un tratamiento prolongado (Figura 4.2).

Cabe destacar que el fenotipo de tolerancia no fue observado en mutantes en *em-nadp2* y *4*. EM-NADP1 presenta particularidades que la diferencian de las restantes isoformas EM-NADP. Los genes *em-nadp2* y *4* se expresan en todos los órganos de la planta, mientras que *em-nadp1* se encuentra en embriones y raíces de plantas jóvenes, mostrando una fuerte expresión en la zona del ápice, y en raíces secundarias de individuos adultos (Gerrard Wheeler y col., 2005). Pertenece a grupo filogenético particular, conformado por EM-NADP citosólicas tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas, y con metabolismo C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM (Sección 1.4.1; Alvarez y col., 2013). Es probable que las isoformas pertenecientes a este grupo heterogéneo estén conservadas funcionalmente entre especies. En este grupo también se encuentra ZmEM-NADPCyt3, la isoforma de maíz asociada a estrés por Al en un trabajo previo (Krill y col., 2010), que se mencionó al inicio de este Capítulo. La expresión de este gen presenta un patrón similar a EM-NADP1, y es modulada por varias condiciones de estrés (Detarsio y col., 2008). Otra característica de EM-NADP1 es su baja actividad específica, determinada en ensayos llevados a cabo con la proteína recombinante purificada (Gerrard Wheeler y col., 2008).

Está reportado que *Arabidopsis* responde a la exposición a Al aumentando la exudación de malato con respecto al control luego de 2-4 horas de tratamiento

(Kobayashi y col., 2007), aunque los cambios en el contenido de malato en la raíz no se han investigado.

En este trabajo, se determinó que la línea *em-nadp1* no es capaz de exudar más malato que la planta salvaje en respuesta a Al (Figura 4.4). El análisis del contenido de malato en raíces de la planta mutante tampoco reveló diferencias con respecto a la planta salvaje a tiempos cortos de tratamiento. Sólo luego de una prolongada exposición a Al (12 días), se pudo detectar un aumento significativo de malato en las raíces de *em-nadp1* con respecto a *wt* (Figura 4.5). Considerando que estas medidas fueron realizadas en extractos de la raíz completa, es posible que se esté perdiendo información acerca de cambios localizados en el contenido de malato. Es altamente probable que estos cambios estén restringidos al ápice de la raíz, sitio blanco del Al, con el objetivo de minimizar la pérdida de carbono.

El análisis de la expresión de varios genes relacionados a la tolerancia a Al llevado a cabo no reveló diferencias entre la línea mutante *em-nadp1* y la planta salvaje a nivel de transcripto (Figura 4.4). Sin embargo, se ha visto que algunas de estas proteínas están reguladas a nivel post-traducciona. En el caso de ALMT1, estudios llevados a cabo con inhibidores de quinasas y fosfatasa demostraron que eventos de fosforilación reversible son necesarios para la regulación de su actividad (Kobayashi y col., 2007). Por su parte, la expresión de STOP1 es estable ante tratamiento con Al, por lo que se ha sugerido que en su activación también estarían involucrados mecanismos de regulación post-traducciona (Iuchi y col., 2007).

El contenido de Al, como lo indicó la tinción de las raíces con hematoxilina, fue similar en ambas líneas luego del tratamiento aplicado (Figura 4.7), por lo que no se podría atribuir la mayor tolerancia de *em-nadp1* a la exclusión de Al. Esto concuerda con el hecho de que no se observó una mayor exudación de malato en la línea mutante, al menos en las condiciones ensayadas.

Adicionalmente, se evaluó la posibilidad de que la incrementada tolerancia a Al exhibida por la línea *em-nadp1* se deba a perturbaciones en la vía de señalización del estrés.

La planta mutante presentó menor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que la salvaje luego del tratamiento (Figura 4.7). Esto podría deberse a alteraciones en la generación de ROS como respuesta a la exposición a Al en esta línea, resultando en una menor inducción

de estrés oxidativo. En este sentido, se ha demostrado que la sobreexpresión de genes como glutatión transferasa, peroxidasa, entre otros, incrementaron la resistencia a Al (Ezaki y col., 2000), indicando que un aumento de la capacidad antioxidante de la planta puede mejorar su tolerancia al estrés por Al.

Se ha visto que la aplicación exógena de glutamato al ápice la raíz de plántulas de *A. thaliana* es capaz de provocar los mismos efectos que el Al en los primeros minutos de exposición, aunque más rápidamente. En primer lugar ocurre un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, seguido de una despolimerización de los microtúbulos y despolarización de la membrana plasmática, y finalmente la inhibición en el crecimiento de la raíz primaria (Sivaguru y col., 2003).

El estudio de algunos de los genes pertenecientes a la familia de receptores de glutamato en *Arabidopsis* (GLR, por *glutamate receptor-like*), homólogos a los receptores de glutamato ionotrópicos de mamíferos, ha demostrado que varios son capaces de actuar como canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo un importante rol del glutamato como molécula señal en plantas (Forde, 2014).

Se ha propuesto que la señalización de Al en el ápice de la raíz sería iniciada por un eflujo de glutamato (o un ligando similar) mediado por un canal iónico modulado por Al, y por la posterior unión de este ligando a un receptor de glutamato, que desencadena los eventos corriente abajo (Sivaguru y col., 2003).

En este trabajo, la aplicación exógena de glutamato no elicó la respuesta de inhibición del crecimiento de la raíz en la línea *em-nadp1* (Figura 4.9). Un estudio exhaustivo del efecto del glutamato y de otras moléculas involucradas en la transducción de la señal en la línea mutante en EM-NADP1 será necesario para dilucidar una posible relación entre esta enzima y la vía de señalización del estrés.

No se puede descartar que EM-NADP1 afecte señales requeridas por la planta para la inhibición del crecimiento de la raíz, lo cual esté posiblemente vinculado a la particular localización de esta isoforma en el ápice de la raíz.

En la Figura 4.10 se muestra una representación esquemática de la abundancia y distribución del transcripto *em-nadp1* en distintos tipos celulares de la raíz obtenida utilizando la herramienta de visualización eFP (*electronic Fluorescent Pictograph*, <http://bar.utoronto.ca/>, Winter y col., 2007).

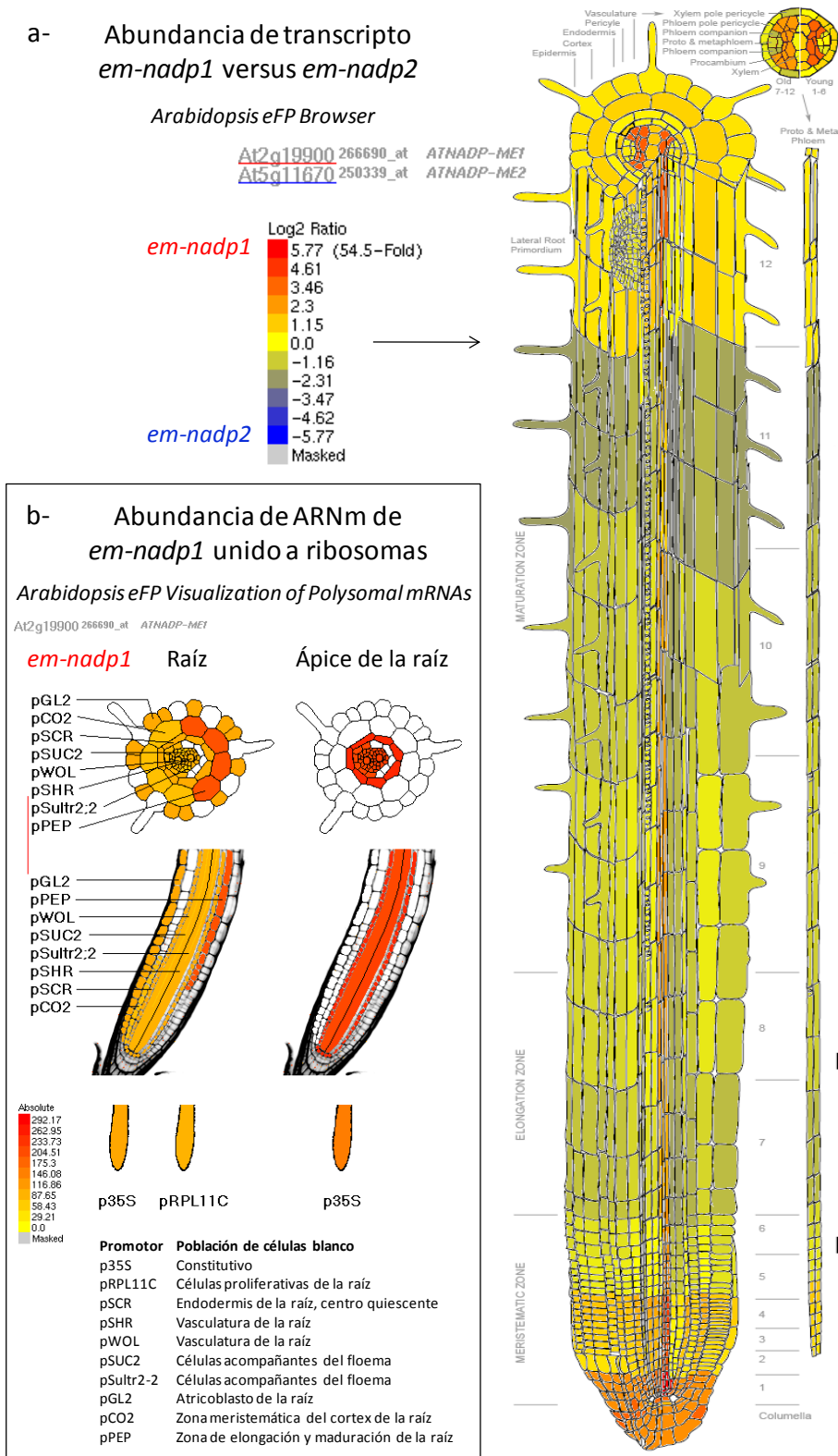


Figura 4.10

a- Comparación de los niveles de transcritpo *em-nadp1* (rojo) y *em-nadp2* (azul) a partir de datos de expresión de diferentes zonas de la raíz de plántulas de 5-7 días (Brady y col., 2007).  
b- Abundancia de ARNm de *em-nadp1* asociado a ribosomas en raíz completa y ápice, de plántulas de 7 días. Los ribosomas fueron aislados por inmunoprecipitación de una proteína ribosomal marcada, cuya expresión fue dirigida por promotores específicos de diferentes poblaciones de células de la raíz (Mustroph y col., 2009).



Al realizar un análisis comparativo de la abundancia del transcripto *em-nadp1* con respecto a *em-nadp2* (Figura 4.10a) se puede observar que existen regiones de la raíz en donde se distingue un mayor nivel relativo de *em-nadp1*, particularmente en la zona del ápice. Esto podría explicar el hecho de que, a pesar de que la expresión de *em-nadp2* es mayor que la de *em-nadp1*, la línea mutante *em-nadp2* no presentó una respuesta diferente a la de la planta salvaje ante el estrés por Al, apoyando la noción de que estos genes no serían funcionalmente redundantes. Adicionalmente, una representación de la cantidad de ARNm de *em-nadp1* asociado a ribosomas en poblaciones celulares específicas (<http://efp.ucr.edu/>, Mustroph y col., 2009) indica una mayor traducción de dicho mensajero en la zona apical de la raíz (Figura 4.10b).

En resumen, considerando los estudios realizados en esta parte de la Tesis, podemos postular al menos dos posibles escenarios en cuanto al rol de EM-NADP1 en raíces de *Arabidopsis* en respuesta al tratamiento con Al y la inhibición del crecimiento de la raíz. En uno de ellos, EM-NADP1 estaría involucrada en la vía de señalización que lleva a la inhibición del crecimiento de la raíz en respuesta a Al. Sin embargo, EM-NADP1 tendría un rol negativo en esta vía, dado que su nivel de expresión disminuye drásticamente por el tratamiento (Figura 4.2). Así, la disminución de *em-nadp1* sería un paso necesario en esta vía de señalización; o, alternativamente, la actividad de EM-NADP1 en etapas iniciales del tratamiento por Al, estaría involucrada en el inicio de la señalización. En contraste, la ausencia completa de EM-NADP1 (mutante en EM-NADP1) provoca que no se desencadene la vía de señalización que lleva a la inhibición del crecimiento mediada tanto por Al como por glutamato (Figura 4.1, Figura 4.9). En esta vía de señalización, la generación de ROS podría jugar un rol clave. Existe la posibilidad de que EM-NADP1 participe en la generación inicial de ROS que lleve a la disminución del crecimiento, dado que la ausencia de EM-NADP1 disminuye la generación de estas moléculas señales (Figura 4.8). Alternativamente, tampoco podemos descartar que la ausencia de EM-NADP1 pueda generar aumentos intracelulares de malato, indetectables en tiempos cortos de tratamiento por las medidas realizadas (Figura 4.4a), pero sí detectables luego de 12 días de tratamiento (Figura 4.4b). Así, podría estar operando un mecanismo de detoxificación interna, y EM-NADP1 podría estar involucrada en la regulación de los niveles citosólicos de este ácido orgánico en raíces, en tipos celulares particulares.

Cualquiera sea el mecanismo involucrado, lo que queda claro es que el rol de EM-NADP1 en raíz puesto de manifiesto en esta parte de esta Tesis, depende de su particular localización en determinados tipos celulares de la raíz de Arabidopsis.

Finalmente, la modificación de los niveles de enzimas del metabolismo de ácidos orgánicos, en este trabajo, la enzima málica, puede constituir una efectiva estrategia para modular la tolerancia a la toxicidad por Al en plantas, conduciendo a mejoras en la fisiología celular en respuesta a este estrés y llevando a incrementos en la productividad.



## **5 Estudio del rol de la enzima málica en la síntesis de malato *in vivo***

La EM-NAD(P), como ya se comentó en la introducción de esta Tesis, es una enzima ampliamente distribuida, con una función bien conocida en la fotosíntesis de plantas C<sub>4</sub> y CAM. Sin embargo en estos organismos, al igual que en especies C<sub>3</sub>, se presenta como familias génicas compuestas por varias isoformas, cuyos roles biológicos aun no han sido completamente esclarecidos. La primera caracterización del set completo de EM de una especie C<sub>3</sub>, *A. thaliana*, fue llevada a cabo en nuestro laboratorio (Gerrard Wheeler y col., 2005; Tronconi y col., 2008; Maurino y col., 2009), demostrando propiedades diferenciales que indicarían funciones no redundantes para cada una de ellas.

Un estudio exhaustivo de las propiedades cinéticas de las isoformas EM-NAD(P) de esta planta modelo obtenidas de manera recombinante mostró comportamientos diferentes en relación a la reversibilidad de la reacción. La reacción llamada *reversa*, es decir la carboxilación reductiva de piruvato, fue catalizada por las isoformas EM-NADP de *Arabidopsis* con altas velocidades máximas. En este sentido, EM-NADP2 fue la que presentó la mayor eficiencia catalítica de la familia (Gerrard Wheeler y col., 2008). Por su parte, las EM-NAD no exhibieron actividad *in vitro* para dicha reacción, soportando la hipótesis de que actúan sólo en la oxidación de malato en la mitocondria (Tronconi y col., 2010a). Por otro lado, las EM-NADP fotosintéticas de plantas C<sub>4</sub> como maíz y sorgo, tampoco fueron capaces de catalizar la reacción *reversa in vitro*.

Teniendo en cuenta la elevada cantidad de piruvato encontrada en las plantas (Fahnenstich y col., 2007) y los valores relativamente altos de afinidad de las EM-NADP

obtenidos para este sustrato, es factible que la reacción reversa tenga lugar en las células vegetales. Más aún, los resultados obtenidos durante el estudio de líneas sobreexpresantes de EM-NADP2, presentado en el Capítulo 3 de esta Tesis, acuerdan con un modelo, basado en los niveles medidos de sustratos y productos de la reacción, en el cual esta enzima podría estar catalizando preferentemente la carboxilación reductiva de piruvato en dichas plantas (Figura 3.15).

En base a estos antecedentes nos planteamos encontrar nuevas evidencias que permitan determinar si esta actividad reversa podría tener lugar *in vivo*.

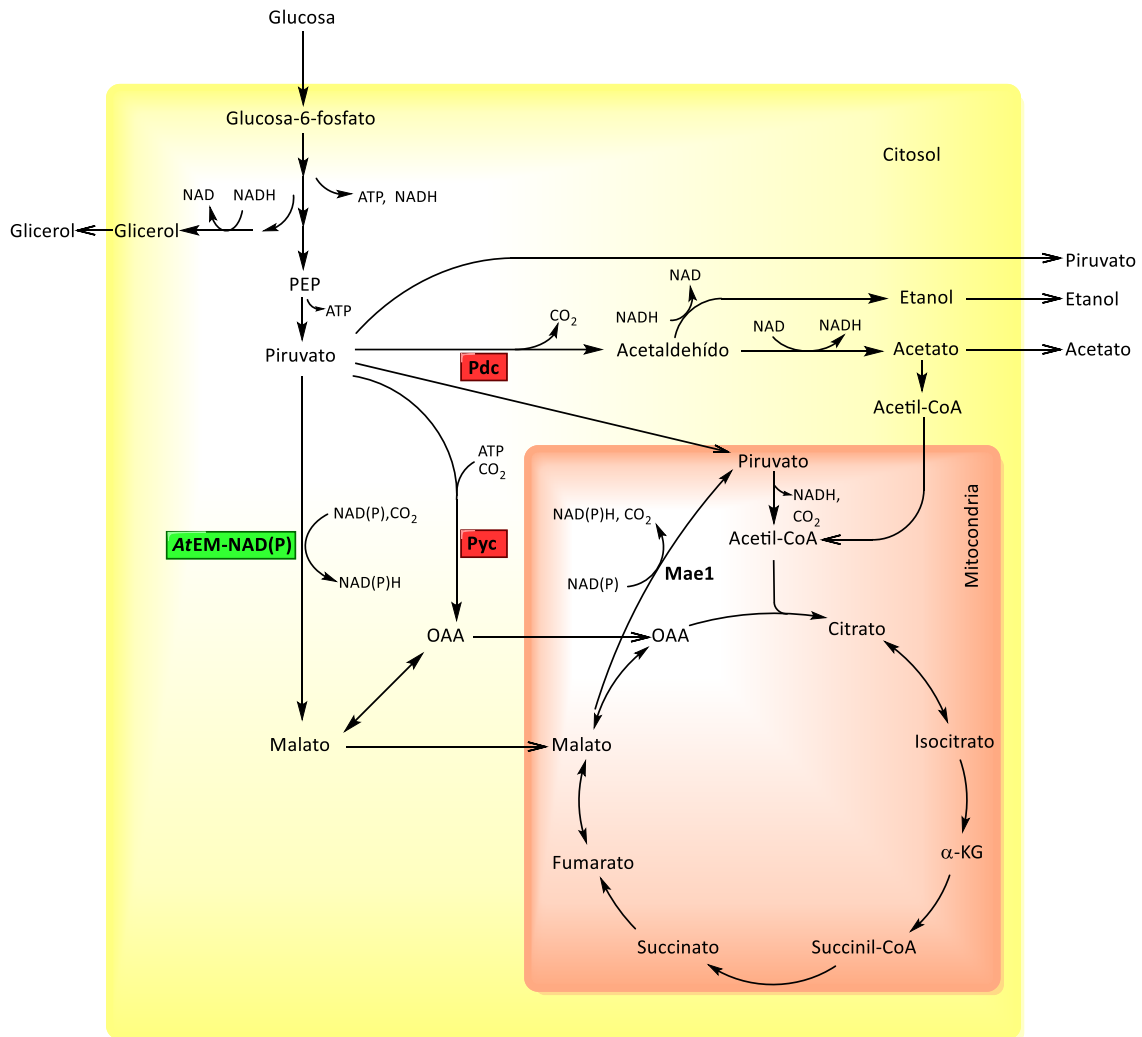
### **5.1 Elección de un sistema *in vivo* para evaluar la actividad de carboxilación de piruvato de EM-NAD(P) de *Arabidopsis***

Para determinar si las isoformas EM-NAD(P) de *A. thaliana* podrían participar en la síntesis de malato *in vivo*, se planteó realizar un estudio de complementación en un organismo sencillo como *Saccharomyces cerevisiae*.

*S. cerevisiae* es una levadura facultativa que posee un metabolismo flexible afectado por los nutrientes disponibles y la accesibilidad al O<sub>2</sub>. Respira utilizando O<sub>2</sub> como aceptor de electrones o lleva a cabo fermentación alcohólica bajo condiciones anaeróbicas, elaborando etanol, CO<sub>2</sub> y glicerol como principales productos (van Dijken y Scheffers, 1986).

En la Figura 5.1 se esquematiza el metabolismo de *S. cerevisiae* creciendo en anaerobiosis y utilizando glucosa como fuente de carbono. Por cada molécula de glucosa convertida en etanol, dos moléculas de ATP son generadas, proveyendo energía para el crecimiento. El NADH generado en la glicólisis es re-oxidado mediante la formación de glicerol y etanol. El ciclo TCA cumple la función de proveer compuestos C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> tales como OAA y  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG), precursores de reacciones biosintéticas. El consumo constante de estos intermediarios para la formación de biomasa requiere de reacciones anapleróticas para su reposición. En estas condiciones, el ciclo del glioxilato se encuentra reprimido, por lo que esta función es llevada a cabo por la enzima piruvato carboxilasa (Pyc). En este organismo existen dos isoformas, Pyc1 y Pyc2, que convierten piruvato a OAA a expensas de una molécula de ATP y CO<sub>2</sub> (Stucka y col., 1991). Otra posible vía anaplerótica podría ser la reacción de PEP a OAA

catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), sin embargo en *S. cerevisiae* ésta actúa como enzima descarboxilante cumpliendo su función en la gluconeogénesis. Además, su expresión y actividad se encuentran reprimidas en presencia de glucosa (Zelle y col., 2010).



**Figura 5.1**

Esquema del metabolismo central del carbono de *S. cerevisiae*, focalizado en el piruvato, el ciclo TCA y posibles rutas anapleróticas. Las modificaciones introducidas en las cepas utilizadas se muestran recuadradas: en verde, expresión heteróloga de los genes *em-nad(p)* de *A. thaliana*; en rojo, delección de los genes *PYC1* y *PYC2*, y disminución de la actividad Pdc por delección del activador transcripcional *PDC2*.

Así, cepas de *S. cerevisiae* que carecen de ambas isoformas Pyc (Pyc) son incapaces de crecer en medios con glucosa como única fuente de carbono, debido a la imposibilidad de sintetizar compuestos de cuatro átomos de carbono (Stucka y col.,

1991; de Jong-Gubbels y col., 1998). Estas cepas mutantes constituyen un sistema que nos permite ensayar en un contexto celular el posible rol anaplerótico de las isoformas EM-NAD(P) de *A. thaliana* mediante experimentos de complementación.

Este sistema fue utilizado previamente por el grupo de investigación del Dr. van Maris de la Universidad de Delft, Holanda, con el objetivo de obtener cepas de *S. cerevisiae* capaces de producir ácidos dicarboxílicos C<sub>4</sub> con altos rendimientos. En los últimos años, la producción biotecnológica de succinato, malato y fumarato ha ganado interés por la utilización de estos compuestos en la industria alimenticia y como sustitutos de derivados del petróleo (Werpy y Petersen, 2004). Aunque *S. cerevisiae* no es un productor natural de ácidos orgánicos, el hecho de que es un organismo inocuo, su robustez, tolerancia a bajos pH, requerimientos nutricionales simples y la posibilidad de aplicar estrategias de ingeniería metabólica, lo convierte en un excelente candidato para la producción de estos compuestos (Abbott y col., 2009).

*S. cerevisiae* presenta una única EM-NAD(P), Mae1, localizada en mitocondrias. La incapacidad de la cepa Pyc<sup>-</sup> de crecer en ausencia de ácidos C<sub>4</sub> da la pauta de que esta enzima no es capaz de suplir el rol anaplerótico de la Pyc. En uno de los estudios llevados a cabo por el grupo de trabajo del Dr. van Maris se investigó la posibilidad de que la EM pudiera funcionar como enzima carboxilante. Para ello, se realizó una sobreexpresión de una de las enzimas málicas de *E. coli* (ScfA) en la cepa Pyc<sup>-</sup>. Esta enzima no logró actuar en la carboxilación de piruvato ya que las cepas transformadas fueron incapaces de crecer en glucosa, aún en condiciones termodinámicamente favorables para esta reacción (Zelle y col., 2011).

En un trabajo en colaboración con el grupo de investigación del Dr. van Maris, planteamos analizar si los distintos miembros de la familia EM-NAD(P) de *A. thaliana* son capaces de rescatar la auxotrofía C<sub>4</sub> de cepas Pyc<sup>-</sup>, en condiciones normales y termodinámicamente favorables para la carboxilación de piruvato. En este sentido, se decidió realizar los experimentos de complementación con distintas presiones de CO<sub>2</sub> y utilizando además una cepa que presenta altos niveles intracelulares de piruvato. Las cepas elegidas fueron IMK157 (*pyc1,2Δ*) y IMK299 (*pyc1,2Δ pdc2Δ*). Ambas presentan una disrupción en el locus *URA3* y deleciones en los genes que codifican para Pyc. Además, IMK299 posee una deleción en *PDC2*, un activador transcripcional de la piruvato descarboxilasa (Pdc) que cataliza la conversión de piruvato en acetaldehído.

Esta delección ocasiona una disminución de 3-4 veces en la actividad Pdc, lo cual genera niveles aumentados de piruvato (Zelle y col., 2011).

Se resolvió estudiar la capacidad anaplerótica de las isoformas EM-NADP1-4 y EM-NAD1 y 2 de *Arabidopsis*. Adicionalmente, se decidió incluir en el análisis a EM-NADP2Del2, una versión N-terminal truncada de EM-NADP2 con muy baja capacidad de carboxilar piruvato *in vitro* y EM-NADP2R115A, una mutante puntual sin regulación por fumarato de esta reacción (Gerrard Wheeler y col., 2008).

## **5.2 Clonado de los ADNc de las diferentes EM-NAD(P) de *Arabidopsis* en el vector de expresión de levadura**

Para la expresión heteróloga de las EM-NAD(P) de *Arabidopsis* en levadura se utilizó el vector centromérico p416GDP (Mumberg y col., 1995). El mismo presenta un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección de resistencia a ampicilina, por lo que permite la replicación y selección en células de *E. coli*. En *S. cerevisiae*, se replica como un cromosoma independiente gracias a que posee una región centromérica (CEN) y secuencias de replicación autónoma (ARS), encontrándose típicamente como única copia. El marcador de selección en levaduras es *URA3*, que permite la síntesis de uracilo en cepas auxótrofas para pirimidinas. La expresión de las proteínas es dirigida por el promotor fuerte y constitutivo de la gliceraldehído-3P deshidrogenasa de levadura, pGPD.

Los ADNc codificando las proteínas maduras EM-NADP1-4, EM-NAD1 y 2, EM-NADP2Del2 y EM-NADPR115A fueron obtenidos a partir de construcciones disponibles en nuestro laboratorio realizadas en vectores de la serie pET-32(+), donde habían sido clonados sin la secuencia señal (Tabla 2.2), y subclonados en p416GDP como se describe a continuación.

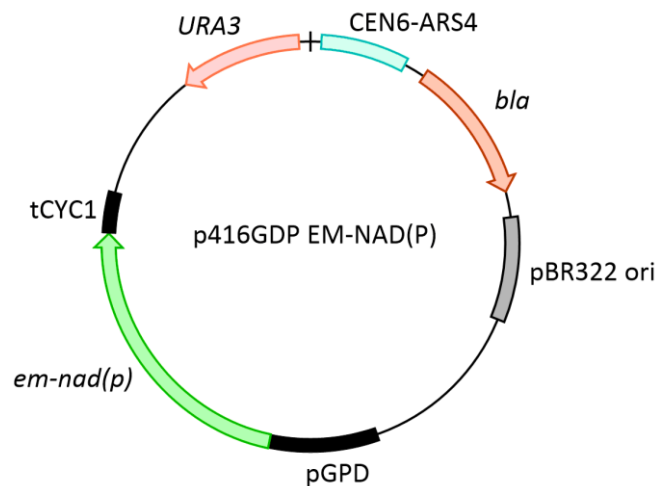
Para obtener los insertos EM-NADP2Del2, EM-NADP4, EM-NAD1 y EM-NAD2 fue necesario un paso previo de amplificación por PCR con cebadores que incorporen el codón ATG en el extremo 5', corriente abajo de un sitio de restricción (*Bam*HI en el caso de EM-NADP2Del2, EM-NAD1 y EM-NAD2, y *Eco*RV para EM-NADP4) (Sección 2.23). Los cuatro productos, amplificados utilizando una polimerasa de alta fidelidad, fueron purificados y ligados al vector pBluescriptSK(-) (pBSK) mediante un protocolo



que combina una restricción con una enzima que deja extremos romos y la unión al vector en un único paso. Este vector posee el sitio de múltiple clonado dentro de la secuencia que codifica para el péptido  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Así, luego de la transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  con la mezcla de ligación, éstas se sembraron sobre un medio conteniendo IPTG, X-Gal y ampicilina. Las bacterias transformantes que poseían el vector ligado con el inserto crecieron formando colonias blancas. La correcta incorporación de los insertos fue chequeada por PCR de colonia y por extracción de ADN plasmídico seguido de un análisis del tamaño molecular de los fragmentos generados por corte con enzimas de restricción. Además, las construcciones fueron secuenciadas para descartar la presencia de mutaciones que pudieran haberse generado durante la amplificación.

Los vectores conteniendo los ADNc de las isoformas EM-NAD(P) fueron digeridos con los pares de enzimas de restricción correspondientes. Para pET-32c/EM-NADP1 y pBSK/EM-NADP4 se utilizaron *EcoRV* y *XhoI*. En el caso de pET-32a/EM-NADP2, pBSK/EM-NADP2Del2, pET-32a/EM-NADP2R115A y pET-32a/EM-NADP3, la digestión se realizó con *BamHI* y *XhoI*; mientras que para pBSK/EM-NAD1 y pBSK/EM-NAD2 se usaron *BamHI* y *Sall*. Los productos de digestión se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y los insertos liberados fueron purificados y ligados a p416GDP tratado con *SmaI* y *XhoI*, *BamHI* y *XhoI* o *BamHI* y *Sall*, respectivamente. Las distintas mezclas de ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , que fueron seleccionadas en placas de Petri con medio LB agar conteniendo ampicilina. Las colonias transformantes conteniendo los insertos correspondientes se identificaron por PCR en colonia y extrayendo el ADN plasmídico y analizando el mismo por el tamaño molecular de los fragmentos generados por restricción. La utilización para el clonado de dos enzimas de restricción con sitios de corte no compatibles, asegura que la ligación del fragmento sea en la orientación correcta para su expresión.

De esta manera fueron generados p416GPD/EM-NADP1, p416GPD/EM-NADP2, p416GPD/EM-NADP2Del2, p416GPD/EM-NADP2R115A, p416GPD/EM-NADP3, p416GPD/EM-NADP4, p416GPD/EM-NAD1 y p416GPD/EM-NAD2 (Figura 5.2).



**Figura 5.2**

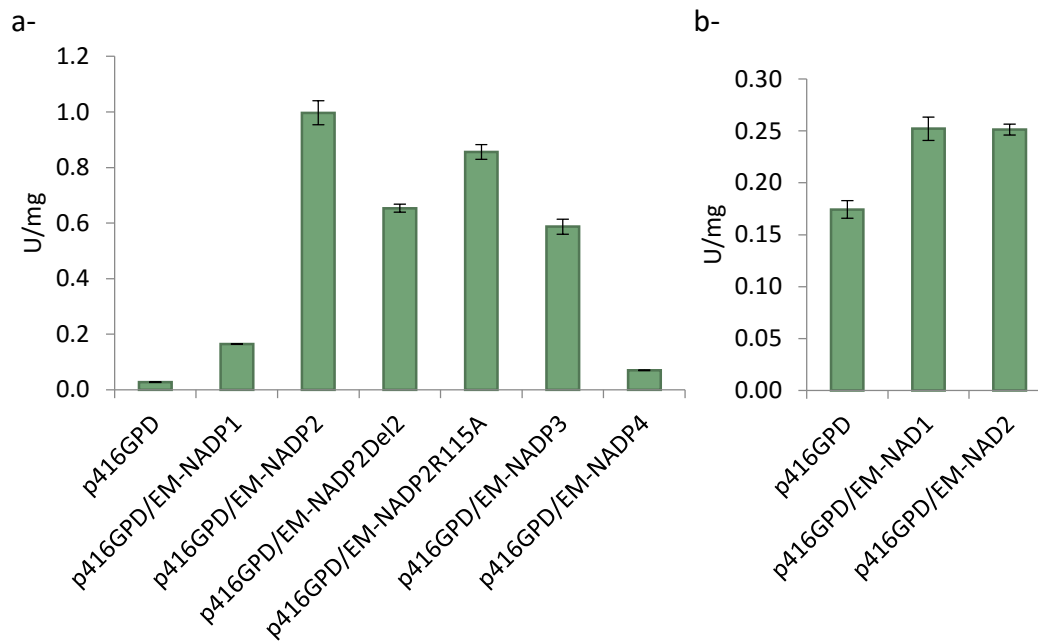
Características relevantes de los plásmidos p416GDP/EM-NAD(P) utilizados para los estudios de complementación. CEN6-ARS4, secuencias centroméricas y de replicación autónoma; *bla*, resistencia a ampicilina (marcador de selección en bacteria); pBR322 ori, origen de replicación bacteriano; pGPD, promotor del gen *GPD*; tCYC1, terminador del gen *CYC1* (citocromo 1); *URA3*, orotidina 5' P descarboxilasa (marcador de selección en levadura).

### 5.3 Transformación de *S. cerevisiae* y medidas de actividad

Los vectores p416GDP/EM-NAD(P) generados (Figura 5.2) fueron utilizados para transformar las cepas IMK157 (*pyc1,2Δ*) e IMK299 (*pyc1,2Δ pdc2Δ*) de *S. cerevisiae* (Tabla 2.3). Se seleccionaron los clones que crecieron en placas sin uracilo y se comprobó la presencia de los plásmidos conteniendo los ADNc de cada EM-NAD(P) mediante PCR en colonia.

Posteriormente se realizaron medidas de actividad EM-NADP y EM-NAD en extractos crudos de las cepas transformadas para confirmar la correcta expresión y funcionalidad de las isoformas en *S. cerevisiae*.

En la Figura 5.3 se muestran los valores de actividad, medidos en el sentido de la descarboxilación de malato, de extractos de las cepas obtenidas por transformación de IMK299 con cada una de las construcciones expresando las distintas isoformas EM-NAD(P) de *Arabidopsis*. Todas mostraron valores de actividad mayores que la cepa transformada con el vector vacío, indicando que las proteínas vegetales se expresaron correctamente en *S. cerevisiae* sin la necesidad de realizar una optimización de codones, y que el plegamiento fue funcional.



**Figura 5.3**

a- Actividad EM-NADP. b- Actividad EM-NAD. Las medidas se realizaron en extractos de la cepa IMK299 de *S. cerevisiae* transformada con cada una de las construcciones en estudio, incluyendo el vector vacío. Las cepas fueron crecidas en condiciones aeróbicas en medio líquido sintético suplementado con glucosa y aspartato. Las muestras fueron tomadas en la fase de crecimiento exponencial. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 determinaciones independientes.

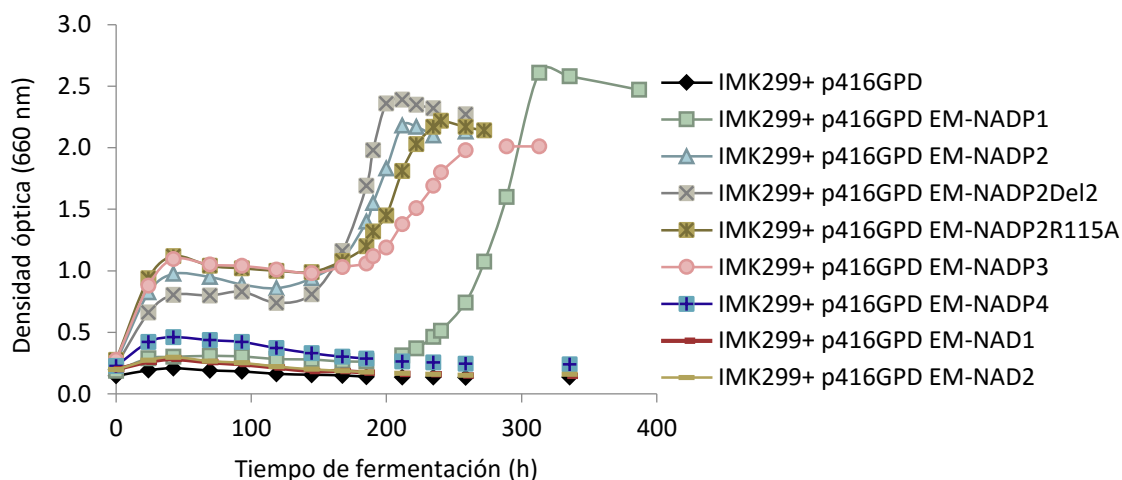
## 5.4 Ensayos de complementación

### 5.4.1 Crecimiento en cultivos líquidos

Un primer estudio de la capacidad de las isoformas EM-NAD(P) de *Arabidopsis* de complementar el fenotipo  $Pyc^-$  se realizó con la cepa IMK299 transformada con cada una de las construcciones en estudio. El crecimiento se evaluó en medio sintético líquido suplementado con glucosa y sulfato de amonio, en condiciones anaeróbicas bajo 6 %  $CO_2$ . Como se muestra en la Figura 5.4, los cultivos correspondientes a las cepas transformadas con las isoformas EM-NADP1, EM-NADP2, EM-NADP2Del2, EM-NADP2R115A y EM-NADP3 mostraron crecimiento. Por el contrario, no se observó complementación en aquellas transformadas con EM-NADP4, EM-NAD1, EM-NAD2, o con el vector vacío.

Los valores de velocidad de crecimiento máxima,  $\mu_{max}$ , determinados a partir de los cultivos en fase de crecimiento exponencial, se indican en la Tabla 5.1. El

crecimiento se monitoreó además para la cepa de referencia CEN.PK113-7D durante aproximadamente 75 horas, obteniéndose un valor de  $\mu_{\max}$  de  $0,344 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 5.4**

Crecimiento en cultivos líquidos en condiciones anaeróbicas bajo 6 % CO<sub>2</sub> monitoreado durante 400 horas. Se muestra un resultado típico del experimento, realizado por duplicado.

**Tabla 5.1** Velocidades de crecimiento específicas máximas de las cepas en estudio.

Cepa	$\mu_{\max} \text{ (h}^{-1}\text{)}$
IMK299 + p416GPD	-
IMK299 + p416GPD/EM-NADP1	$0,022 \pm 0,001$
IMK299 + p416GPD/EM-NADP2	$0,016 \pm 0,001$
IMK299 + p416GPD/EM-NADP2Del2	$0,018 \pm 0,001$
IMK299 + p416GPD/EM-NADP2R115A	$0,010 \pm 0,004$
IMK299 + p416GPD/EM-NADP3	$0,011 \pm 0,002$
IMK299 + p416GPD/EM-NADP4	-
IMK299 + p416GPD/EM-NAD1	-
IMK299 + p416GPD/EM-NAD2	-

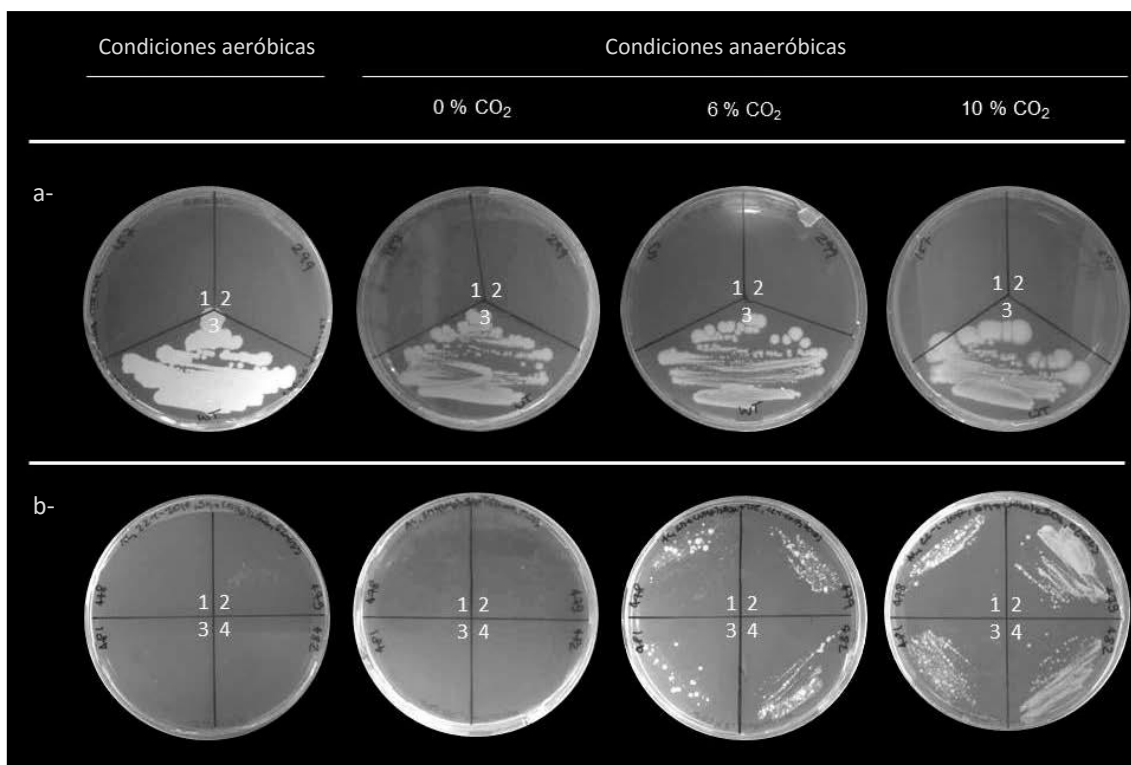
Las cepas fueron crecidas en medio sintético líquido con glucosa y sulfato de amonio, bajo condiciones anaeróbicas y 6 % CO<sub>2</sub>.

### 5.4.2 Crecimiento en placas

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de la capacidad de complementación de las isoformas EM-NADP2 y EM-NADP2Del2 en placas con medio

sólido sintético con glucosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Se analizaron varias condiciones de crecimiento, como la presencia o ausencia de O<sub>2</sub>, diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub>, y la utilización de dos cepas con diferentes niveles de piruvato (Figura 5.5).

Se utilizó la cepa de referencia CEN.PK113-7D como control positivo, y las cepas IMK157 e IMK299 sin transformar como controles negativos (Figura 5.5a). Exceptuando el control positivo, ninguna de las cepas creció en las placas sometidas a condiciones aeróbicas ni anaeróbicas en ausencia de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, bajo 6 % y 10 % CO<sub>2</sub> se observó crecimiento de las cepas expresando EM-NADP2 y EM-NADP2Del2 (Figura 5.5b). No se observaron diferencias en la complementación entre isoformas, aunque sí se detectaron variaciones en el crecimiento en relación al genotipo de cepa utilizado (IMK157 o IMK299) y a la concentración de CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.5**

Cepas de *S. cerevisiae* crecidas en placas con medio sólido sintético suplementadas con glucosa y sulfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno. a- Cepas control: IMK157 (a1), IMK299 (a2) y CEN.PK113-7D (cepa de referencia) (a3). b- Cepas transformadas: IMK157 + p416GPD/EM-NADP2 (b1), IMK299 + p416GPD/EM-NADP2 (b2), IMK157 + p416GPD/EM-NADP2Del2 (b3) y IMK299 + p416GPD/EM-NADP2Del2 (b4). Las placas fueron incubadas por 20 días a 30 °C, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas con 0, 6 y 10 % CO<sub>2</sub>.

Se puede observar que el crecimiento de las cepas complementadas con EM-NADP2 y EM-NADP2Del2 fue mayor cuanto más elevada fue la concentración de CO<sub>2</sub> presente. Además, si comparamos entre las cepas IMK157 e IMK299, se observó una mejor complementación de las isoformas EM-NADP2 y EM-NADP2Del2 en el entorno genético de la cepa IMK299, que posee niveles aumentados de piruvato. Esto demuestra una dependencia del crecimiento con la disponibilidad de los sustratos piruvato y CO<sub>2</sub> para la reacción de carboxilación.

### 5.4.3 Crecimiento en biorreactores

Con el objetivo de realizar una caracterización más profunda de la fisiología de las cepas complementadas, se prosiguió a realizar fermentaciones en biorreactores. Este experimento permite el monitoreo y estricto control de las condiciones de cultivo, y la determinación de los parámetros de crecimiento de manera altamente reproducible. En esta parte del trabajo se analizaron únicamente las cepas IMK157 e IMK299 transformadas con p416GPD/EM-NADP2. El crecimiento se llevó a cabo en condiciones anaeróbicas y 10 % CO<sub>2</sub>.

Las fermentaciones se realizaron en *batch*, proveyendo un exceso de la fuente de carbono, en este caso glucosa, y de los nutrientes requeridos al inicio del experimento. Posteriormente, sólo se realizó el suministro constante de un flujo de N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> y la adición de base al medio para mantener constante el pH.

Las variaciones en la densidad óptica (DO), la formación de biomasa, el pH y las concentraciones de glucosa, etanol, glicerol y ácidos orgánicos presentes en los sobrenadantes fueron monitoreados durante el transcurso de la fermentación, tomando muestras a intervalos regulares de tiempo (Sección 2.26.3).

La glucosa es convertida a biomasa, y a etanol y glicerol como principales productos bajo condiciones anaeróbicas. Los rendimientos y las velocidades de formación específicas de los mismos fueron calculados para cada cepa (Tabla 5.2). Al estar los cultivos bajo constante burbujeo de CO<sub>2</sub>, no fue posible determinar la tasa de generación de este producto de la fermentación, dado que las diferencias en los flujos de entrada y de salida fueron muy pequeñas.

En la Figura 5.6 se presentan los perfiles de crecimiento de las cepas IMK157 (a) e IMK299 (b) expresando EM-NADP2. Luego de una fase de latencia de aproximadamente 10 horas, las células entraron en la fase exponencial de crecimiento, evidenciada por un consumo constante de glucosa. La velocidad de crecimiento máxima fue mayor para la cepa IMK299 + p416GDP/EM-NADP2 que para IMK157 transformada con la misma construcción (Tabla 5.2). Lo mismo ocurrió para la tasa de consumo de glucosa, y de producción de etanol y glicerol. Esto indica una mejor capacidad anaplerótica de EM-NADP2 en la cepa con actividad Pdc reducida.

**Tabla 5.2** Parámetros de crecimiento en biorreactores

	<b>Cepa IMK157 + p416GPD/EM-NADP2</b>	<b>Cepa IMK299 + p416GPD/EM-NADP2</b>
$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,015 $\pm$ 0,001	0,037 $\pm$ 0,002
$q_S$ (Glucosa) ( $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	1,414	3,651
$q_P$ (Etanol) ( $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	1,431	2,423
$q_P$ (Glicerol) ( $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,373	1,120
$Y_{X/S}$ (Biomasa) ( $\text{g mmol}^{-1}$ )	0,010	0,010
$Y_{P/S}$ (Etanol) ( $\text{mmol mmol}^{-1}$ )	1,114	1,007
$Y_{P/S}$ (Glicerol) ( $\text{mmol mmol}^{-1}$ )	0,244	0,372
$Y_{P/S}$ (Piruvato) ( $\text{mmol mmol}^{-1}$ )	0,012	0,078
$Y_{P/S}$ (Acetato) ( $\text{mmol mmol}^{-1}$ )	0,053	0,049

Las cepas fueron crecidas en medio sintético líquido con glucosa, sulfato de amonio y 10 %  $\text{CO}_2$ .  $q_S$ , velocidad específica de consumo de sustrato;  $q_P$ , velocidad específica de formación de producto;  $Y_{X/S}$ , rendimiento de biomasa;  $Y_{P/S}$ , rendimiento de productos.

Succinato, piruvato y lactato se acumularon en más cantidad en los sobrenadantes de la cepa IMK299 + p416GDP/EM-NADP2, con respecto a IMK157 (Figura 5.6a y b). La diferencia más pronunciada se dio en el contenido de piruvato, indicando que la disminución de la actividad Pdc provoca un aumento en la excreción de dicho compuesto.

El agotamiento de la glucosa marcó el comienzo de la fase estacionaria, y a partir de este punto las concentraciones de glicerol y etanol se mantuvieron constantes hasta el final de la fermentación en las dos cepas.

La cepa IMK299 sin transformar también fue inoculada a modo de control negativo y monitoreada en iguales condiciones que las cepas en estudio (Figura 5.6c).

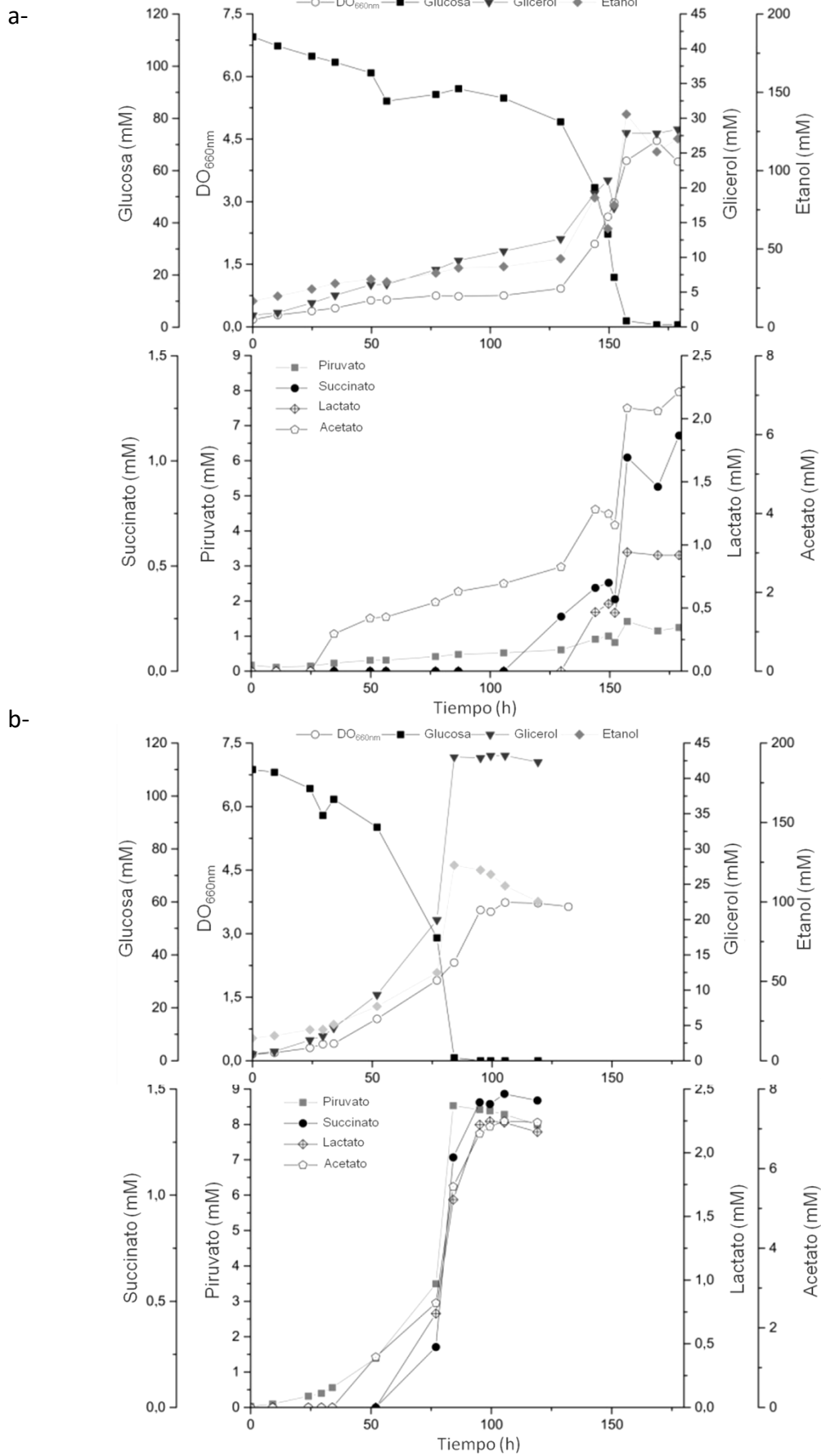
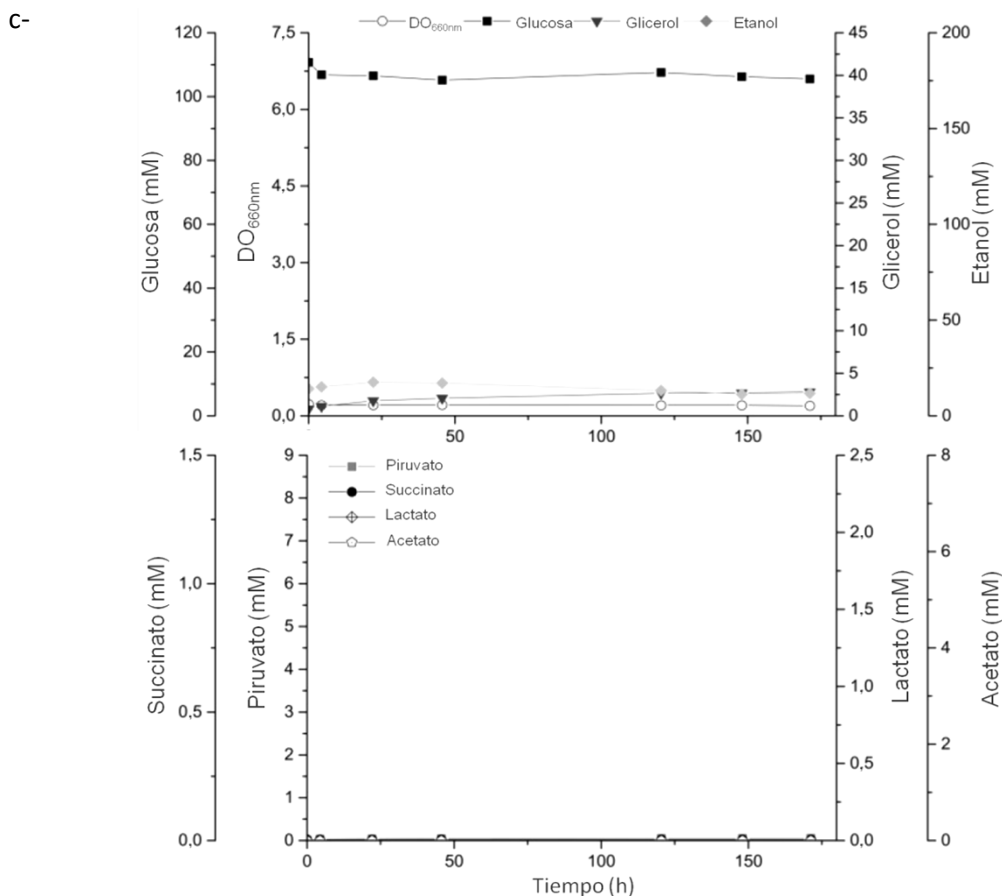


Figura 5.6

(Continúa en la página siguiente)





**Figura 5.6** (Continuación)

Perfiles de crecimiento en biorreactores de las cepas en estudio. a- IMK157 + p416GPD/EM-NADP2. b- IMK299 + p416GPD/EM-NADP2. c- IMK299.

### 5.5 Medidas de actividad reversa de enzimas recombinantes

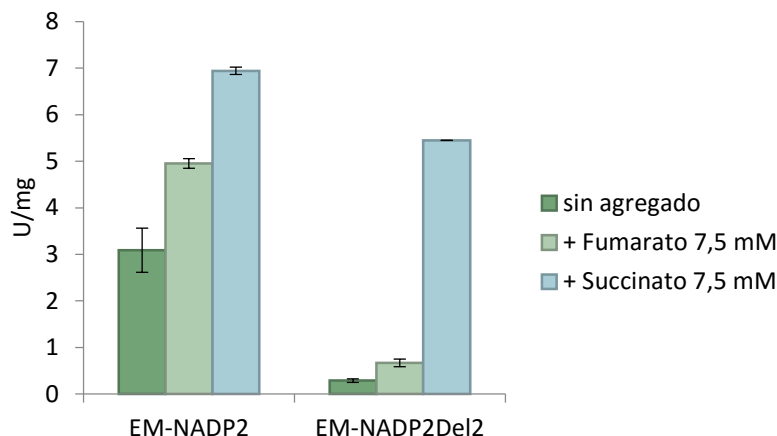
Está reportado que la actividad de carboxilación de piruvato medida *in vitro* de las isoformas EM-NADP recombinantes purificadas es modulada alostéricamente por varios metabolitos (Gerrard Wheeler y col., 2008). Dado que la isoforma EM-NADP2Del2, que presentaba muy baja actividad reversa *in vitro*, fue capaz de complementar el fenotipo Pyc<sup>-</sup> en los ensayos realizados, decidimos investigar si fumarato y succinato, dos activadores de EM-NADP2 en el sentido reverso de la reacción, podían además activar a esta isoforma delecionada.

Para ello, se realizó la expresión de manera recombinante y posterior purificación de EM-NADP2 y EM-NADP2Del2 siguiendo el mismo protocolo puesto a punto previamente en nuestro laboratorio (Gerrard Wheeler y col., 2005) que se describe brevemente a continuación. Se utilizaron cepas de *E. coli* BL21(DE3), las

cuales contienen una copia del gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, transformadas con los vectores de expresión pET-32a/EM-NADP2 y pET-32a/EM-NADP2Del2. La inducción de la expresión se realizó por agregado de 0,5 % (P/V) lactosa a un cultivo de estas bacterias, según se indica en la Sección 2.27. Los vectores de la serie pET-32(+) codifican una secuencia de 6 residuos consecutivos de histidina, que se une a cationes divalentes permitiendo la purificación de las proteínas de fusión en una matriz de afinidad. Así, las proteínas EM-NADP2 y EM-NADP2Del2 fueron purificadas sembrando el extracto en una columna de Ni-NTA. El rendimiento fue de 1-3 mg de proteína pura por cada 100 mL de cultivo bacteriano. Posteriormente, las proteínas de fusión fueron digeridas con Enteroquinasa con el objetivo de remover la porción codificada por el vector, y sembradas en una columna de afinidad para eliminar la proteasa y el péptido de fusión amino terminal. La integridad y pureza de las preparaciones fue verificada por SDS-PAGE (Sección 2.15).

Una vez obtenidas las proteínas recombinantes purificadas se realizaron medidas de actividad EM-NADP en el sentido de la carboxilación de piruvato (Sección 2.13).

La actividad reversa medida para EM-NADP2Del2 fue menor al 10 % de la observada para EM-NADP2 en ausencia de activadores (Figura 5.7). Tal como se esperaba, se observó un aumento de la actividad de EM-NADP2 en presencia de fumarato y succinato. Interesantemente, la isoforma EM-NADP2Del2 también sufrió activación por estos metabolitos, alcanzando valores de actividad cercanos a los de EM-NADP2, especialmente en presencia de succinato. Estos resultados indican que la isoforma deletada conserva la capacidad de catalizar la reacción reversa en presencia de activadores, lo cual podría explicar la complementación observada *in vivo* utilizando *S. cerevisiae* en esta Tesis (Figura 5.4, Figura 5.5).



**Figura 5.7**

Actividad reversa de las isoformas recombinantes purificadas EM-NADP2 y EM-NADP2Del2. Se determinaron las velocidades iniciales a concentraciones subsaturantes de piruvato en ausencia y presencia de fumarato y succinato 7,5 mM. Los ensayos fueron realizados por triplicado y las líneas sobre las barras representan la desviación estándar entre las mediciones.

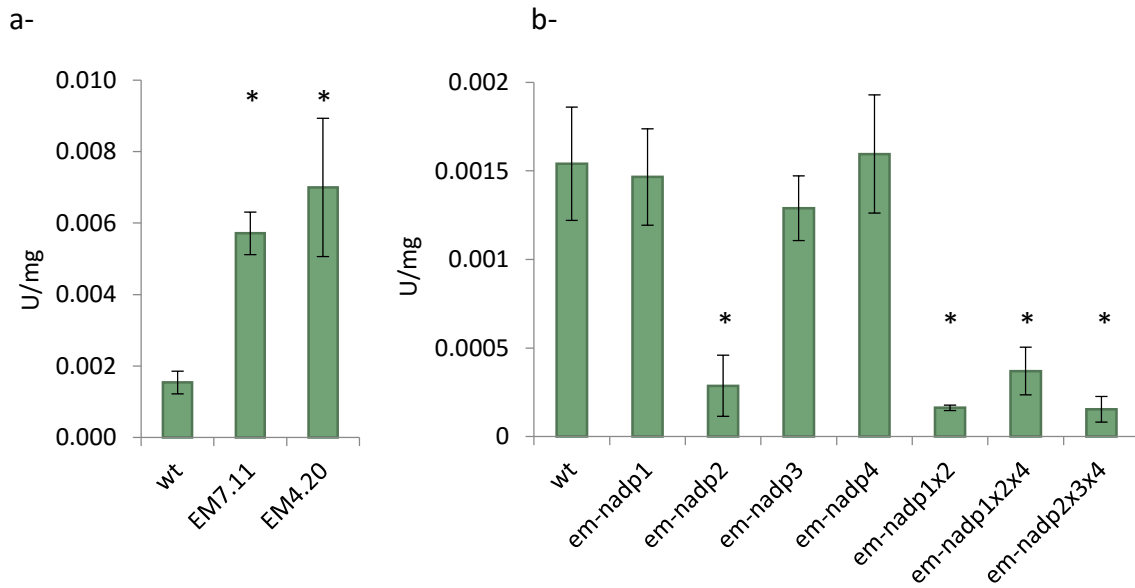
## 5.6 Medidas de actividad reversa en extractos vegetales

Posteriormente se decidió analizar la actividad EM-NADP reversa en extractos crudos de hojas de plantas de *A. thaliana*.

Fue posible determinar actividad reversa en los extractos correspondientes a plantas wt y sobreexpresantes de EM-NADP2 (Figura 5.8a). Además, la actividad medida se relacionó con los niveles de EM-NADP2 presente en cada línea, siendo significativamente mayor para las plantas EM.7.11 y EM4.20.

A su vez, se determinó la actividad reversa en extractos de hojas de plantas mutantes homocigotas en cada uno de los genes que codifican para las diferentes EM-NADP de *A. thaliana*, *em-nadp1*, *em-nadp2*, *em-nadp3* y *em-nadp4*, y de las doble y triple mutantes *em-nadp1x2*, *em-nadp1x2x4* y *em-nadp2x3x4* con el objetivo de evaluar la contribución de cada una de las isoformas a la actividad reversa total.

Los resultados señalaron que sólo en aquellas líneas mutantes que carecen del gen *em-nadp2* se observó una disminución significativa de la actividad de carboxilación de piruvato con respecto a la planta salvaje (Figura 5.8b). Esto indica una correlación entre los niveles de actividad y de EM-NADP2, lo cual demuestra que dicha isoforma es la que más contribuye a la actividad EM-NADP reversa total medida en hojas de *Arabidopsis*.

**Figura 5.8**

Medidas de actividad EM-NADP reversa en extractos de hoja de la roseta de plantas a- wt y sobreexpresantes de EM-NADP2 (EM7.11 y EM4.20) y b- wt y mutantes simples, dobles y triples en los genes que codifican para EM-NADP. Las muestras fueron recolectadas en la mitad del día. (\*) indica diferencia significativa con respecto a wt ( $p < 0,05$ ). Se muestra el promedio y la desviación estándar de las medidas realizadas en 3 preparaciones independientes.

## 5.7 Discusión

Este estudio demostró que la expresión heteróloga de algunas isoformas EM de Arabidopsis en *S. cerevisiae* permitió el crecimiento de cepas Pyc<sup>-</sup> en glucosa como única fuente de carbono. Las isoformas EM-NADP1, EM-NADP2, EM-NADP2Del2, EM-NADP2R115A y EM-NADP3 fueron capaces de complementar la auxotrofia C<sub>4</sub> de estas mutantes y así, asumir un rol anaplerótico en este sistema *in vivo* (Figura 5.4, Tabla 5.1).

La capacidad de estas enzimas de rescatar de la auxotrofia C<sub>4</sub> a las cepas Pyc<sup>-</sup> fue dependiente de la provisión de los sustratos de la reacción. En este sentido, la presencia de altas concentraciones de CO<sub>2</sub> fue necesaria para el crecimiento de las cepas. Se observó un crecimiento moderado de colonias de las cepas transformadas con EM-NADP2 y EM-NADP2Del2 en placas bajo 6 % CO<sub>2</sub>, que fue mayor al elevar el nivel de CO<sub>2</sub> a 10 % (Figura 5.5). A su vez, la complementación de dichas enzimas fue mejor en la cepa Pyc<sup>-</sup> que presenta una delección en *PDC2*, sugiriendo que niveles aumentados de piruvato también tienen un efecto positivo en el crecimiento.

Las fermentaciones llevadas a cabo en biorreactores permitieron una caracterización más completa de la capacidad anaplerótica de EM-NADP2 en los dos entornos genéticos diferentes utilizados (Tabla 5.2, Figura 5.6). Estos experimentos confirmaron la dependencia de la velocidad de crecimiento de las cepas transformadas con la presencia de niveles elevados de piruvato.

A pesar de que EM-NADP4 presentaba buenas propiedades para la catálisis de la reacción reversa *in vitro* (Tabla 1.1), no fue capaz de rescatar la auxotrofia C<sub>4</sub> de Pyc<sup>-</sup> en las condiciones ensayadas (Figura 5.4, Tabla 5.1). Varios trabajos han indicado que las isoformas EM-NADP plastídicas, como EM-NADP4, estarían involucradas en funciones anabólicas, proveyendo piruvato y NADPH para la síntesis de aminoácidos y ácidos grasos, actuando como descarboxilasas (Ei-shora y Rees, 1991; Lai y col., 2002a). Sin embargo, dada la baja actividad EM-NADP obtenida en los extractos de la cepa transformada con esta isoforma (Figura 5.3a), no se puede descartar que la ausencia de complementación se deba a alguna incompatibilidad en la expresión o plegado de esta proteína en levadura.

La isoforma EM-NADP2R115A presenta una mutación puntual que reemplaza el residuo de arginina en la posición 115, por uno de alanina. Este cambio no altera sustancialmente los parámetros cinéticos de la enzima, pero la deja sin la capacidad de ser regulada por fumarato (Gerrard Wheeler y col., 2008). Los resultados indicaron que esta modificación en las propiedades regulatorias con respecto a la isoforma parental EM-NADP2, no afectó la capacidad de complementar el sistema  $Pyc^-$  (Figura 5.4, Tabla 5.1).

Contrario a lo esperado, la expresión de EM-NADP2Del2, la versión N-terminal truncada de EM-NADP2, permitió el crecimiento de *S. cerevisiae*  $Pyc^-$  en glucosa (Figura 5.4, Tabla 5.1, Figura 5.5). Esta isoforma presentó una muy baja actividad reversa en ensayos realizados con la enzima recombinante purificada (Figura 5.7). Sin embargo, quedó demostrado que esta reacción es factible y que los ensayos *in vitro* pueden no reflejar lo que ocurre en un contexto celular, remarcando la importancia de llevar a cabo estudios *in vivo*. La regulación positiva de la actividad enzimática en el sentido reverso de EM-NADP2Del2 por metabolitos como fumarato y succinato (Figura 5.7) podría ser una de las causas de la complementación observada en las células de levadura.

Las isoformas NAD-dependientes no fueron capaces de complementar el fenotipo de las cepas  $Pyc^-$  (Figura 5.4), en concordancia con su incapacidad de catalizar la carboxilación de piruvato *in vitro*. En ensayos previos se ha verificado que estas enzimas no presentan actividad reversa, incluso ante el agregado de activadores de dicha reacción (Tronconi y col., 2010a).

Cabe destacar que las cepas  $Pyc^-$  sobreexpresando la enzima SfcA de *E. coli* en idénticas condiciones a las utilizadas en este trabajo no mostraron crecimiento (Zelle y col., 2011). Esto revela la existencia de diferencias en propiedades intrínsecas entre dicha enzima y las EM-NADP de Arabidopsis que hace a estas últimas más adecuadas para satisfacer un rol anaplerótico. La caracterización de SfcA obtenida de manera recombinante indicó que esta enzima es capaz de catalizar la reacción de carboxilación de piruvato *in vitro*, aunque la catálisis de la reacción directa (descarboxilación de malato) fue 28 veces más rápida (Bologna y col., 2007).

A pesar de que las tasas de crecimiento obtenidas resultaron bajas, las cepas de *S. cerevisiae* expresando EM-NADP de Arabidopsis generadas tienen potencial para ser

utilizadas en la producción biotecnológica de ácidos dicarboxílicos  $C_4$  a partir de glucosa. En relación a esto, la EM presenta una ventaja como enzima anaplerótica con respecto a la Pyc: no requiere ATP para la carboxilación. Esto elimina la necesidad de respirar parte de la glucosa para cubrir los requerimientos energéticos de la célula. Sería necesario aumentar el flujo anaplerótico a través de EM en estas cepas para reducir la producción de etanol. Una estrategia para lograrlo, además de realizar un empuje termodinámico aumentando la disponibilidad de sustratos, sería la obtención y utilización de enzimas con capacidad catalítica mejorada en el sentido reverso.

En plantas, EM-NADP podría estar involucrada no sólo en la descarboxilación de malato, sino también en su síntesis en tejidos o situaciones metabólicas particulares. Se ha propuesto que los niveles de fumarato y el pH citosólico podrían dirigir el flujo metabólico a través de EM-NADP2, llevando a la síntesis o consumo de ácidos  $C_4$  de acuerdo al contexto fisiológico (Arias y col., 2013). Asimismo, fue posible medir actividad de carboxilación de piruvato en extractos de hoja de *A. thaliana* salvaje. Los niveles de dicha actividad se vieron significativamente aumentados en plantas sobreexpresantes y disminuidos en mutantes de EM-NADP2 (Figura 5.8). Al igual que lo que ocurre para la actividad directa, se pudo determinar que esta isoforma es la que más contribuye a la actividad EM-NADP reversa total medida en hojas de *Arabidopsis*.

La reversibilidad de la reacción de EM-NADP podría permitir la participación de esta enzima en el transporte de equivalentes de reducción entre distintos compartimientos celulares, junto a la acción de otras enzimas como MDH (Hebbelmann y col., 2012). Adicionalmente, la actividad carboxilasa de EM-NADP podría contribuir a la síntesis de ácidos orgánicos  $C_4$ , que se acumulan en grandes cantidades en las plantas y que, como fue descrito en la Introducción, están involucrados en procesos esenciales como la respiración, biosíntesis de proteínas y lípidos, transporte de carbono y energía hacia tejidos sumidero, entre otros. Estas enzimas podrían además participar en la reasimilación del  $CO_2$  producido durante la fotorrespiración en plantas  $C_3$ , incrementando la eficiencia del proceso fotosintético. El estudio de mecanismos de concentración de carbono que aumenten la disponibilidad de  $CO_2$  en las inmediaciones de la RuBisCO constituye un área de particular interés por su impacto en la productividad de los cultivos y por lo tanto, en la producción de alimentos y energía (Bar-Even y col., 2010).

Finalmente, este trabajo constituye un punto de partida para continuar con el estudio de esta actividad en las células vegetales, sus implicancias fisiológicas y su importancia en la producción de biomasa.



6

*Conclusiones*



## 6 Conclusiones

Las conclusiones principales de este trabajo de Tesis son las siguientes:

1. La modificación de los niveles de la isoforma EM-NADP2 de *A. thaliana* tuvo un impacto significativo sobre diversos procesos celulares, demostrando la influencia de la actividad de enzima málica sobre los niveles de compuestos C<sub>4</sub> y redox, y su relevancia en el metabolismo y homeostasis vegetal.
2. El análisis de plantas mutantes en la isoforma EM-NADP1 reveló la participación de esta enzima en la respuesta a estrés por aluminio, pudiendo estar involucrada en los procesos de señalización y/o en el control del metabolismo del malato, ambas posibilidades vinculadas a su particular localización en raíces.
3. Se demostró que las enzimas málicas NADP-dependientes de localización citosólica son capaces de catalizar la reacción de carboxilación de malato en un contexto celular, siendo la isoforma EM-NADP2 la que más contribuye a esta actividad en hojas de *A. thaliana*.



*Referencias*

## Referencias

- Abbott, D. A.; Zelle, R. M.; Pronk, J. T.; y van Maris, A. J. A. (2009) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges. *FEMS Yeast Res.* 9: 1123-36.
- Alonso, J. M.; Stepanova, A. N.; Leisse, T. J.; Kim, C. J.; Chen, H.; Shinn, P.; Stevenson, D. K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; Gadriab, C.; Heller, C.; Jeske, A.; Koesema, E.; Meyers, C. C.; Parker, H.; Prednis, L.; Ansari, Y.; Choy, N.; Deen, H.; Geralt, M.; Hazari, N.; Hom, E.; Karnes, M.; Mulholland, C.; Ndubaku, R.; Schmidt, I.; Guzman, P.; Aguilar-Henonin, L.; Schmid, M.; Weigel, D.; Carter, D. E.; Marchand, T.; Risseuw, E.; Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W. L.; Berry, C. C.; y Ecker, J. R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-7.
- Alvarez, C. E.; Saigo, M.; Margarit, E.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2013) Kinetics and functional diversity among the five members of the NADP-malic enzyme family from *Zea mays*, a C<sub>4</sub> species. *Photosynth. Res.* 115: 65-80.
- De Angeli, A.; Zhang, J.; Meyer, S.; y Martinoia, E. (2013) AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 4: 1804.
- Arias, C. L.; Andreo, C. S.; Drincovich, M. F.; y Gerrard Wheeler, M. C. (2013) Fumarate and cytosolic pH as modulators of the synthesis or consumption of C<sub>4</sub> organic acids through NADP-malic enzyme in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 81: 297-307.
- Bar-Even, A.; Noor, E.; Lewis, N. E.; y Milo, R. (2010) Design and analysis of synthetic

- carbon fixation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 8889-8894.
- Beeler, S.; Liu, H.-C.; Stadler, M.; Schreier, T.; Eicke, S.; Lue, W.-L.; Truernit, E.; Zeeman, S. C.; Chen, J.; y Kötting, O. (2014) Plastidial NAD-dependent malate dehydrogenase is critical for embryo development and heterotrophic metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 164: 1175-90.
- Bergmeyer, H. U. (1976) *Methods of enzymatic analysis*. Segunda ed., Academic Press Inc., New York and London.
- Berkemeyer, M.; Scheibe, R.; y Ocheretina, O. (1998) A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L. *J. Biol. Chem.* 273: 27927-33.
- Bologna, F. P.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2007) *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure. *J. Bacteriol.* 189: 5937-46.
- Brady, S. M.; Orlando, D. A.; Lee, J.-Y.; Wang, J. Y.; Koch, J.; Dinneny, J. R.; Mace, D.; Ohler, U.; y Benfey, P. N. (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* 318: 801-806.
- Brown, N. J.; Palmer, B. G.; Stanley, S.; Hajaji, H.; Janacek, S. H.; Astley, H. M.; Parsley, K.; Kajala, K.; Quick, W. P.; Trenkamp, S.; Fernie, A. R.; Maurino, V. G.; y Hibberd, J. M. (2010) C<sub>4</sub> acid decarboxylases required for C<sub>4</sub> photosynthesis are active in the mid-vein of the C<sub>3</sub> species *Arabidopsis thaliana*, and are important in sugar and amino acid metabolism. *Plant J.* 61: 122-133.
- Casati, P.; Drincovich, M. F.; Edwards, G. E.; y Andreo, C. S. (1999) Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynth. Res.* 61: 99-105.
- Casati, P.; Spampinato, C. P.; y Andreo, C. S. (1997) Characteristics and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant Cell Physiol.* 38: 928-934.
- Centeno, D. C.; Osorio, S.; Nunes-Nesi, A.; Bertolo, A. L. F.; Carneiro, R. T.; Araújo, W. L.; Steinhauser, M.; Michalska, J.; Rohrmann, J.; Geigenberger, P.; Oliver, S. N.; Stitt, M.; Carrari, F.; Rose, J. K. C.; y Fernie, A. R. (2011) Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *Plant Cell* 23: 162-84.
- Chia, D. W.; Yoder, T. J.; Reiter, W. D.; y Gibson, S. I. (2000) Fumaric acid: an overlooked form of fixed carbon in *Arabidopsis* and other plant species. *Planta*

- 211: 743-751.
- 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.
- Delhaize, E.; Craig, S.; Beaton, C. D.; Bennet, R.; Jagdish, V. C.; y Randall, P. I. (1991) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). 685-693.
- Delhaize, E.; Ma, J. F.; y Ryan, P. R. (2012) Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends Plant Sci.* 17: 341-8.
- Delhaize, E.; Ryan, P. R.; Hebb, D. M.; Yamamoto, Y.; Sasaki, T.; y Matsumoto, H. (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 15249-15254.
- Delhaize, E.; Ryan, P. R.; y Randall, P. J. (1993) Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. *Plant Physiol.* 103: 695-702.
- Detarsio, E.; Maurino, V. G.; Alvarez, C. E.; Müller, G. L.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2008) Maize cytosolic NADP-malic enzyme (ZmCytNADP-ME): a phylogenetically distant isoform specifically expressed in embryo and emerging roots. *Plant Mol. Biol.* 68: 355-67.
- van Dijken, J.; Bauer, J.; Brambilla, L.; Duboc, P.; Francois, J.; Gancedo, C.; Giuseppin, M. L.; Heijnen, J.; Hoare, M.; Lange, H.; Madden, E.; Niederberger, P.; Nielsen, J.; Parrou, J.; Petit, T.; Porro, D.; Reuss, M.; van Riel, N.; Rizzi, M.; Steensma, H.; Verrips, C.; Vindeløv, J.; y Pronk, J. (2000) An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 706-714.
- van Dijken, J. P. y Scheffers, W. A. (1986) Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 32: 199-224.
- Doubnerová, V.; Miedzińska, L.; Dobrá, J.; Vankova, R.; y Ryšlavá, H. (2014) Phosphoenolpyruvate carboxylase, NADP-malic enzyme, and pyruvate, phosphate dikinase are involved in the acclimation of *Nicotiana tabacum* L. to drought stress. *J. Plant Physiol.* 171: 19-25.
- Doubnerová, V. y Ryšlavá, H. (2011) What can enzymes of C<sub>4</sub> photosynthesis do for C<sub>3</sub> plants under stress? *Plant Sci.* 180: 575-583.

- Drincovich, M. F.; Iglesias, A. A.; y Andreo, C. S. (1991) Interaction of divalent metal ions with the NADP<sup>+</sup>-malic enzyme from maize leaves. *Physiol. Plant* 81: 462-466.
- Drincovich, M. F.; Lara, M. V.; Andreo, C. S.; y Maurino, V. G. (2011) C<sub>4</sub> decarboxylases: different solutions for the same biochemical problem, the provision of CO<sub>2</sub> to Rubisco in the bundle sheath cells. En C<sub>4</sub> photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms, Springer Netherlands, Heidelberg, 277-300.
- Ei-shora, H. M. y Rees, T. (1991) Planta intracellular location of NADP<sup>+</sup>-linked malic enzyme in C<sub>3</sub> plants. 362-367.
- Etienne, A.; Génard, M.; Lobit, P.; Mbeguié-A-Mbéguié, D.; y Bugaud, C. (2013) What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *J. Exp. Bot.* 64: 1451-1469.
- Eubel, H.; Meyer, E. H.; Taylor, N. L.; Bussell, J. D.; O'Toole, N.; Heazlewood, J. L.; Castleden, I.; Small, I. D.; Smith, S. M.; y Millar, A. H. (2008) Novel proteins, putative membrane transporters, and an integrated metabolic network are revealed by quantitative proteomic analysis of Arabidopsis cell culture peroxisomes. *Plant Physiol.* 148: 1809-29.
- Ezaki, B.; Gardner, R. C.; Ezaki, Y.; y Matsumoto, H. (2000) Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* 122: 657-65.
- Fahnenstich, H.; Saigo, M.; Niessen, M.; Zanon, M. I.; Andreo, C. S.; Fernie, A. R.; Drincovich, M. F.; Flügge, U.-I.; y Maurino, V. G. (2007) Alteration of organic acid metabolism in Arabidopsis overexpressing the maize C<sub>4</sub> NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness. *Plant Physiol.* 145: 640-652.
- Famiani, F.; Walker, R. P.; Técsi, L.; Chen, Z. H.; Proietti, P.; y Leegood, R. C. (2000) An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development of grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *J. Exp. Bot.* 51: 675-83.
- Fernie, A. R. y Martinoia, E. (2009) Malate. Jack of all trades or master of a few? *Phytochemistry* 70: 828-32.
- Finkemeier, I.; König, A.; Heard, W.; Nunes-Nesi, A.; Pham, P. A.; Leister, D.; Fernie, A. R.; y Sweetlove, L. J. (2013) Transcriptomic analysis of the role of carboxylic acids in metabolite signaling in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.* 162: 239-53.

- Forde, B. G. (2014) Glutamate signalling in roots. *J. Exp. Bot.* 65: 779-787.
- Forde, B. G.; Cutler, S. R.; Zaman, N.; y Krysan, P. J. (2013) Glutamate signalling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in Arabidopsis root architecture. *Plant J.* 75: 1-10.
- Foyer, C. H. y Noctor, G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signal.* 11: 861-905.
- Fukuda, T.; Saito, A.; Wasaki, J.; Shinano, T.; y Osaki, M. (2007) Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Sci.* 172: 1157-1165.
- Furukawa, J.; Yamaji, N.; Wang, H.; Mitani, N.; Murata, Y.; Sato, K.; Katsuhara, M.; Takeda, K.; y Ma, J. F. (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.* 48: 1081-1091.
- Gerrard Wheeler, M. C.; Arias, C. L.; Maurino, V. G.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2009) Identification of domains involved in the allosteric regulation of cytosolic *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzymes. *FEBS J.* 276: 5665-5677.
- Gerrard Wheeler, M. C.; Arias, C. L.; Tronconi, M. A.; Maurino, V. G.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2008) *Arabidopsis thaliana* NADP-malic enzyme isoforms: High degree of identity but clearly distinct properties. *Plant Mol. Biol.* 67: 231-242.
- Gerrard Wheeler, M. C.; Tronconi, M. A.; Drincovich, M. F.; Andreo, C. S.; Flügge, U.-I.; y Maurino, V. G. (2005) A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139: 39-51.
- Gietz, R. D. y Woods, R. A. (2002) Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. *Methods Enzymol.* 350: 87-96.
- Goto-Yamada, S.; Mano, S.; Yamada, K.; Oikawa, K.; Hosokawa, Y.; Hara-Nishimura, I.; y Nishimura, M. (2015) Dynamics of the light-dependent transition of plant peroxisomes. *Plant Cell Physiol.* 56: 1264-71.
- Gout, E.; Bligny, R.; Pascal, N.; y Douce, R. (1993) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance studies of malate and citrate synthesis and compartmentation in higher plant cells. *J Biol. Chem.* 268: 3986-3992.
- Gruber, B. D.; Delhaize, E.; Richardson, A. E.; Roessner, U.; James, R. A.; Howitt, S. M.; y Ryan, P. R. (2011) Characterisation of HvALMT1 function in transgenic barley



- plants. *Funct. Plant Biol.* 38: 163.
- Hebbelmann, I.; Selinski, J.; Wehmeyer, C.; Goss, T.; Voss, I.; Mulo, P.; Kangasjärvi, S.; Aro, E.-M.; Oelze, M.-L.; Dietz, K.-J.; Nunes-Nesi, A.; Do, P. T.; Fernie, A. R.; Talla, S. K.; Raghavendra, A. S.; Linke, V.; y Scheibe, R. (2012) Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. *J. Exp. Bot.* 63: 1445-59.
- Hellemans, J.; Mortier, G.; De Paepe, A.; Speleman, F.; y Vandesompele, J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
- Hellens, R.; Mullineaux, P.; y Klee, H. (2000) Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5: 446-51.
- Hibberd, J. M. y Quick, W. P. (2002) Characteristics of C<sub>4</sub> photosynthesis in stems and petioles of C<sub>3</sub> flowering plants. *Nature* 415: 451-454.
- Hoekenga, O. A.; Maron, L. G.; Pineros, M. A.; Cancado, G. M. A.; Shaff, J.; Kobayashi, Y.; Ryan, P. R.; Dong, B.; Delhaize, E.; Sasaki, T.; Matsumoto, H.; Yamamoto, Y.; Koyama, H.; y Kochian, L. V (2006) *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 9738-9743.
- Hoekenga, O. A.; Vision, T. J.; Shaff, J. E.; Monforte, A. J.; Lee, G. P.; Howell, S. H.; y Kochian, L. V (2003) Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x Columbia) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol.* 132: 936-48.
- Horst, W. J.; Wang, Y.; y Eticha, D. (2010) The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. *Ann. Bot.* 106: 185-197.
- Hurth, M. A.; Suh, S. J.; Kretschmar, T.; Geis, T.; Bregante, M.; Gambale, F.; Martinoia, E.; y Neuhaus, H. E. (2005) Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiol.* 137: 901-910.
- Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1990) NADP-dependent malate dehydrogenase (decarboxylating) from sugar cane leaves. Kinetic properties of different oligomeric structures. *Eur. J. Biochem.* 192: 729-733.

- Iglesias, A. A. y Andreo, C. S. (1989) Purification of NADP-malic enzyme and phosphoenolpyruvate carboxylase from sugar cane leaves. *Plant Cell Physiol.* 30: 399-405.
- Iuchi, S.; Koyama, H.; Iuchi, A.; Kobayashi, Y.; Kitabayashi, S.; Kobayashi, Y.; Ikka, T.; Hirayama, T.; Shinozaki, K.; y Kobayashi, M. (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 9900-9905.
- de Jong-Gubbels, P.; Bauer, J.; Niederberger, P.; Stückrath, I.; Kötter, P.; van Dijken, J. P.; y Pronk, J. T. (1998) Physiological characterisation of a pyruvate-carboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant in batch and chemostat cultures. *Antonie Van Leeuwenhoek* 74: 253-263.
- Kobayashi, Y.; Hoekenga, O. A.; Itoh, H.; Nakashima, M.; Saito, S.; Shaff, J. E.; Maron, L. G.; Pineros, M. A.; Kochian, L. V.; y Koyama, H. (2007) Characterization of *AtALMT1* expression in aluminum-inducible malate release and its role for rhizotoxic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 145: 843-52.
- Kobayashi, Y.; Lakshmanan, V.; Kobayashi, Y.; Asai, M.; Iuchi, S.; Kobayashi, M.; Bais, H. P.; y Koyama, H. (2013) Overexpression of *AtALMT1* in the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia results in enhanced Al-activated malate excretion and beneficial bacterium recruitment. *Plant Signal. Behav.* 8: 255652-4.
- Kochian, L. V.; Piñeros, M. A.; y Hoekenga, O. A. (2005) The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274: 175-195.
- Kopittke, P. M.; Moore, K. L.; Lombi, E.; Gianoncelli, A.; Ferguson, B. J.; Blamey, F. P. C.; Menzies, N. W.; Nicholson, T. M.; McKenna, B. A.; Wang, P.; Gresshoff, P. M.; Kourousias, G.; Webb, R. I.; Green, K.; y Tollenaere, A. (2015) Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. *Plant Physiol.* 167: 1402-11.
- Krill, A. M.; Kirst, M.; Kochian, L. V.; Buckler, E. S.; y Hoekenga, O. a (2010) Association and linkage analysis of aluminum tolerance genes in maize. *PLoS One* 5: 99581-11.
- Krtková, J.; Havelková, L.; Křepelová, A.; Fišer, R.; Vosolsobě, S.; Novotná, Z.; Martinec, J.; y Schwarzerová, K. (2012) Loss of membrane fluidity and endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 60: 88-97.

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lai, L. B.; Wang, L.; y Nelson, T. M. (2002a) Distinct but conserved functions for two chloroplastic NADP-malic enzyme isoforms in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Physiol.* 128: 125-139.
- Lai, L. B.; Tausta, S. L.; y Nelson, T. M. (2002b) Differential regulation of transcripts encoding cytosolic NADP-malic enzyme in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> *Flaveria* species. *Plant Physiol.* 128: 140-149.
- Laporte, M. M.; Shen, B.; y Tarczynski, M. C. (2002) Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *J. Exp. Bot.* 53: 699-705.
- Larsen, P. B.; Cancel, J.; Rounds, M.; y Ochoa, V. (2007) *Arabidopsis ALS1* encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta* 225: 1447-58.
- Larsen, P. B.; Geisler, M. J. B.; Jones, C. A.; Williams, K. M.; y Cancel, J. D. (2005) *ALS3* encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* 41: 353-63.
- Lehmann, S.; Gumy, C.; Blatter, E.; Boeffel, S.; Fricke, W.; y Rentsch, D. (2010) In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *J. Exp. Bot.* 62: 787-796.
- Li, S.; Mhamdi, A.; Clement, C.; Jolivet, Y.; y Noctor, G. (2013) Analysis of knockout mutants suggests that *Arabidopsis* NADP-MALIC ENZYME2 does not play an essential role in responses to oxidative stress of intracellular or extracellular origin. *J. Exp. Bot.* 64: 3605-3614.
- Ligaba, A.; Katsuhara, M.; Ryan, P. R.; Shibasaka, M.; y Matsumoto, H. (2006) The BnALMT1 and BnALMT2 genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells. *Plant Physiol.* 142: 1294-1303.
- Ligaba, A.; Maron, L.; Shaff, J.; Kochian, L.; y Piñeros, M. (2012) Maize ZmALMT2 is a root anion transporter that mediates constitutive root malate efflux. *Plant. Cell Environ.* 35: 1185-200.
- Liu, J.; Magalhaes, J. V.; Shaff, J.; y Kochian, L. V (2009) Aluminum-activated citrate and

- malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *Plant J.* 57: 389-99.
- Liu, S.; Cheng, Y.; Zhang, X.; Guan, Q.; Nishiuchi, S.; Hase, K.; y Takano, T. (2007) Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa*. L) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in Arabidopsis confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* 64: 49-58.
- Liu, W. y Saint, D. a. (2002) Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 347-353.
- Ma, J.; Ryan, P.; y Delhaize, E. (2001) Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci.* 6: 273-278.
- Magalhaes, J. V.; Liu, J.; Guimarães, C. T.; Lana, U. G. P.; Alves, V. M. C.; Wang, Y.-H.; Schaffert, R. E.; Hoekenga, O. A.; Piñeros, M. A.; Shaff, J. E.; Klein, P. E.; Carneiro, N. P.; Coelho, C. M.; Trick, H. N.; y Kochian, L. V (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat. Genet.* 39: 1156-61.
- Maier, A.; Zell, M. B.; y Maurino, V. G. (2011) Malate decarboxylases: evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub> photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 62: 3061-9.
- Maron, L. G.; Piñeros, M. A.; Guimarães, C. T.; Magalhaes, J. V.; Pleiman, J. K.; Mao, C.; Shaff, J.; Belicuas, S. N. J.; y Kochian, L. V (2010) Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. *Plant J.* 61: 728-40.
- Matsumoto, H. (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 200: 1-46.
- Maurino, V. G.; Drincovich, M. F.; Casati, P.; Andreo, C. S.; Edwards, G. E.; Ku, M. S. B.; Gupta, S. K.; y Franceschi, V. R. (1997) NADP-malic enzyme: immunolocalization in different tissues of the C<sub>4</sub> plant maize and the C<sub>3</sub> plant wheat. *J. Exp. Bot.* 48: 799-811.
- Maurino, V. G. y Engqvist, M. K. M. (2015) 2-Hydroxy acids in plant metabolism. *The Arabidopsis Book* 13: 01821-31.
- Maurino, V. G.; Gerrard Wheeler, M. C.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2009)

- Redundancy is sometimes seen only by the uncritical: Does Arabidopsis need six malic enzyme isoforms? *Plant Sci.* 176: 715-721.
- Meyer, S.; De Angeli, A.; Fernie, A. R.; y Martinoia, E. (2010) Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends Plant Sci.* 15: 40-47.
- Muller, B.; Pantin, F.; Genard, M.; Turc, O.; Freixes, S.; Piques, M.; y Gibon, Y. (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J. Exp. Bot.* 62: 1715-1729.
- Müller, G. L.; Drincovich, M. F.; Andreo, C. S.; y Lara, M. V. (2008) *Nicotiana tabacum* NADP-malic enzyme: cloning, characterization and analysis of biological role. *Plant cell Physiol.* 49: 469-480.
- Mumberg, D.; Müller, R.; y Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156: 119-22.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Mustroph, A.; Zanetti, M. E.; Jang, C. J. H.; Holtan, H. E.; Repetti, P. P.; Galbraith, D. W.; Girke, T.; y Bailey-Serres, J. (2009) Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 18843-18848.
- Navascués, J.; Pérez-Rontomé, C.; Sánchez, D. H.; Staudinger, C.; Wienkoop, S.; Rellán-Álvarez, R.; y Becana, M. (2012) Oxidative stress is a consequence, not a cause, of aluminum toxicity in the forage legume *Lotus corniculatus*. *New Phytol.* 193: 625-636.
- Nishizawa, A.; Yabuta, Y.; y Shigeoka, S. (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147: 1251-63.
- Parker, D.; Beckmann, M.; Zubair, H.; Enot, D. P.; Caracuel-Rios, Z.; Overy, D. P.; Snowdon, S.; Talbot, N. J.; y Draper, J. (2009) Metabolomic analysis reveals a common pattern of metabolic re-programming during invasion of three host plant species by *Magnaporthe grisea*. *Plant J.* 59: 723-37.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.

- Piñeros, M. A.; Cançado, G. M. A.; Maron, L. G.; Lyi, S. M.; Menossi, M.; y Kochian, L. V (2008) Not all ALMT1-type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: the case of ZmALMT1 - an anion-selective transporter. *Plant J.* 53: 352-67.
- Polle, E.; Konzak, C. F.; y Kattrick, J. A. (1978) Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Sci.* 18: 823.
- Pracharoenwattana, I.; Cornah, J. E.; y Smith, S. M. (2007) Arabidopsis peroxisomal malate dehydrogenase functions in beta-oxidation but not in the glyoxylate cycle. *Plant J.* 50: 381-90.
- Pracharoenwattana, I.; Zhou, W.; Keech, O.; Francisco, P. B.; Udomchalothorn, T.; Tschoep, H.; Stitt, M.; Gibon, Y.; y Smith, S. M. (2010) Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *Plant J.* 62: 785-95.
- Queval, G. y Noctor, G. (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Anal. Biochem.* 363: 58-69.
- Rangel, A. F.; Rao, I. M.; Braun, H. P.; y Horst, W. J. (2010) Aluminum resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) involves induction and maintenance of citrate exudation from root apices. *Physiol. Plant.* 138: 176-190.
- Rincón-Zachary, M.; Teaster, N. D.; Sparks, J. A.; Valster, A. H.; Motes, C. M.; y Blancaflor, E. B. (2010) Fluorescence resonance energy transfer-sensitized emission of yellow cameleon 3.60 reveals root zone-specific calcium signatures in Arabidopsis in response to aluminum and other trivalent cations. *Plant Physiol.* 152: 1442-58.
- Rudrappa, T.; Czymmek, K. J.; Paré, P. W.; y Bais, H. P. (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 148: 1547-1556.
- Ryan, P. P. R.; Delhaize, E.; y Jones, D. L. (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 526-560.
- Saigo, M.; Alvarez, C. E.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2013) Plastidial NADP-malic enzymes from grasses: Unraveling the way to the C<sub>4</sub> specific isoforms. *Plant Physiol. Biochem.* 63: 39-48.

- Sasaki, T.; Yamamoto, Y.; Ezaki, B.; Katsuhara, M.; Ahn, S. J.; Ryan, P. R.; Delhaize, E.; y Matsumoto, H. (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* 37: 645-653.
- Sawaki, Y.; Iuchi, S.; Kobayashi, Y.; Ikka, T.; Sakurai, N.; Fujita, M.; Shinozaki, K.; Shibata, D.; Kobayashi, M.; y Koyama, H. (2009) STOP1 regulates multiple genes that protect Arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.* 150: 281-294.
- Scheibe, R. (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.* 120: 21-26.
- Sergeeva, L. I.; Vonk, J.; Keurentjes, J. J. B.; van der Plas, L. H. W.; Koornneef, M.; y Vreugdenhil, D. (2004) Histochemical analysis reveals organ-specific quantitative trait loci for enzyme activities in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 237-45.
- Shearer, H. L.; Turpin, D. H.; y Dennis, D. T. (2004) Characterization of NADP-dependent malic enzyme from developing castor oil seed endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 429: 134-144.
- Sivaguru, M.; Pike, S.; Gassmann, W.; y Baskin, T. I. (2003) Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiol.* 44: 667-75.
- Stitt, M.; Lilley, R. M.; Gerhardt, R.; y Heldt, H. W. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol.* 174: 518-552.
- Stucka, R.; Dequin, S.; Salmon, J. M.; y Gancedo, C. (1991) DNA sequences in chromosomes II and VII code for pyruvate carboxylase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of pyruvate carboxylase-deficient strains. *Mol. Gen. Genet.* 229: 307-315.
- Sun, L.; Liang, C.; Chen, Z.; Liu, P.; Tian, J.; Liu, G.; y Liao, H. (2014) Superior aluminium (Al) tolerance of *Stylosanthes* is achieved mainly by malate synthesis through an Al-enhanced malic enzyme, SgME1. *New Phytol.* 202: 209-219.
- Sun, P.; Tian, Q.-Y.; Chen, J.; y Zhang, W.-H. (2010) Aluminium-induced inhibition of root elongation in Arabidopsis is mediated by ethylene and auxin. *J. Exp. Bot.* 61: 347-56.

- Sweetman, C.; Deluc, L. G.; Cramer, G. R.; Ford, C. M.; y Soole, K. L. (2009) Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* 70: 1329-44.
- Thordal-Christensen, H.; Zhang, Z.; Wei, Y.; y Collinge, D. B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* 11: 1187-1194.
- Tiessen, A.; Hendriks, J. H. M.; Stitt, M.; Branscheid, A.; Gibon, Y.; Farré, E. M.; y Geigenberger, P. (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* 14: 2191-2213.
- Tomaz, T.; Bagard, M.; Pracharoenwattana, I.; Lindén, P.; Lee, C. P.; Carroll, A. J.; Ströher, E.; Smith, S. M.; Gardeström, P.; y Millar, A. H. (2010) Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154: 1143-57.
- Tronconi, M. A.; Gerrard Wheeler, M. C.; Drincovich, M. F.; y Andreo, C. S. (2012) Differential fumarate binding to *Arabidopsis* NAD<sup>+</sup>-malic enzymes 1 and -2 produces an opposite activity modulation. *Biochimie* 94: 1421-30.
- Tronconi, M. A.; Fahnenstich, H.; Gerrard Wheeler, M. C.; Andreo, C. S.; Flügge, U.-I.; Drincovich, M. F.; y Maurino, V. G. (2008) *Arabidopsis* NAD-malic enzyme functions as a homodimer and heterodimer and has a major impact on nocturnal metabolism. *Plant Physiol.* 146: 1540-1552.
- Tronconi, M. A.; Gerrard Wheeler, M. C.; Martinatto, A.; Zubimendi, J. P.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2015) Allosteric substrate inhibition of *Arabidopsis* NAD-dependent malic enzyme 1 is released by fumarate. *Phytochemistry* 111: 37-47.
- Tronconi, M. A.; Gerrard Wheeler, M. C.; Maurino, V. G.; Drincovich, M. F.; y Andreo, C. S. (2010a) NAD-malic enzymes of *Arabidopsis thaliana* display distinct kinetic mechanisms that support differences in physiological control. *Biochem. J.* 430: 295-303.
- Tronconi, M. A.; Maurino, V. G.; Andreo, C. S.; y Drincovich, M. F. (2010b) Three different and tissue-specific NAD-malic enzymes generated by alternative subunit association in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 285: 11870-9.



- Vavasseur, A. y Raghavendra, A. S. (2005) Guard cell metabolism and CO<sub>2</sub> sensing. *New Phytol.* 165: 665-82.
- Verduyn, C.; Postma, E.; Scheffers, W. a.; y Van Dijken, J. P. (1992) Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: A continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8: 501-517.
- Verduyn, C.; Postma, E.; Scheffers, W. A.; y van Dijken, J. P. (1990) Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *J. Gen. Microbiol.* 136: 395-403.
- Verslues, P. E. y Sharma, S. (2010) Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book* 8: e0140.
- Voll, L. M.; Zell, M. B.; Engelsdorf, T.; Saur, A.; Gerrard Wheeler, M. C.; Drincovich, M. F.; Weber, A. P. M.; y Maurino, V. G. (2012) Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. *New Phytol.* 195: 189-202.
- Walch-liu, P.; Liu, L.; Remans, T.; Tester, M.; y Forde, B. G. (2006) Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47: 1045-57.
- Werpy, T. y Petersen, G. (2004) Top value added chemicals from biomass I. Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. *U. S. Department of Energy*. Washington, DC.
- Winter, D.; Vinegar, B.; Nahal, H.; Ammar, R.; Wilson, G. V; y Provart, N. J. (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2: e718.
- Wintermans, J. F. y de Mots, A. (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim. Biophys. Acta* 109: 448-453.
- Wu, X.; Li, R.; Shi, J.; Wang, J.; Sun, Q.; Zhang, H.; Xing, Y.; Qi, Y.; Zhang, N.; y Guo, Y. D. (2014) *Brassica oleracea* MATE encodes a citrate transporter and enhances aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 55: 1426-1436.
- Xu, M.; You, J.; Hou, N.; Zhang, H.; Chen, G.; y Yang, Z. (2010) Mitochondrial enzymes and citrate transporter contribute to the aluminium-induced citrate secretion from soybean (*Glycine max*) roots. *Funct. Plant Biol.* 37: 285-295.

- Yamamoto, Y.; Kobayashi, Y.; Devi, S. R.; Rikiishi, S.; y Matsumoto, H. (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol.* 128: 63-72.
- Yang, J. L.; Zhu, X. F.; Peng, Y. X.; Zheng, C.; Li, G. X.; Liu, Y.; Shi, Y. Z.; y Zheng, S. J. (2011) Cell wall hemicellulose contributes significantly to aluminum adsorption and root growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155: 1885-1892.
- Yang, Z.-B.; Geng, X.; He, C.; Zhang, F.; Wang, R.; Horst, W. J.; y Ding, Z. (2014) TAA1-regulated local auxin biosynthesis in the root-apex transition zone mediates the aluminum-induced inhibition of root growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 26: 2889-2904.
- Yokosho, K.; Yamaji, N.; y Ma, J. F. (2011) An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.* 68: 1061-1069.
- Yokosho, K.; Yamaji, N.; y Ma, J. F. (2010) Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. *Funct. Plant Biol.* 37: 296-303.
- Zell, M. B.; Fahnenstich, H.; Maier, A.; Saigo, M.; Voznesenskaya, E. V; Edwards, G. E.; Andreo, C.; Schleifenbaum, F.; Zell, C.; Drincovich, M. F.; y Maurino, V. G. (2010) Analysis of Arabidopsis with highly reduced levels of malate and fumarate sheds light on the role of these organic acids as storage carbon molecules. *Plant Physiol.* 152: 1251-1262.
- Zelle, R. M.; Harrison, J. C.; Pronk, J. T.; y van Maris, A. J. a. (2011) Anaplerotic role for cytosolic malic enzyme in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 732-738.
- Zelle, R. M.; Trueheart, J.; Harrison, J. C.; Pronk, J. T.; y van Maris, A. J. a (2010) Phosphoenolpyruvate carboxykinase as the sole anaplerotic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5383-5389.
- Zheng, S. J.; Ma, J. F.; y Matsumoto, H. (1998) High aluminum resistance in buckwheat. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol.* 117: 745-751.