

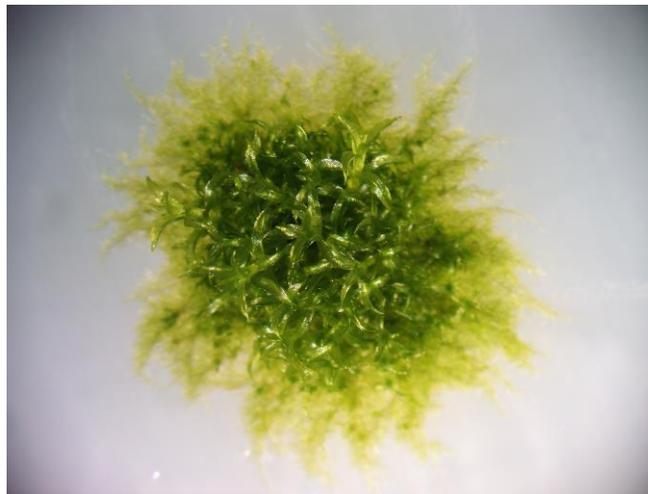


Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Ciencias Biológicas

Uso de *Physcomitrella patens* como herramienta para el estudio de la autofagia en plantas



Tesinista: Patricia Macarena Plaza Rojas

Firma:.....

Directora: Laura Lucia, Saavedra Borelli

Firma:.....

Codirector: Hernán Ramiro, Lascano

Firma:.....

Cátedra de Fisiología Vegetal

Año 2017



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Ciencias Biológicas

Uso de *Physcomitrella patens* como herramienta para el estudio de la autofagia en plantas

Tribunal examinador

Nacira Belén Muñoz

Firma:.....

Verónica Nolan

Firma:.....

Ana Pía Wiemer

Firma:.....

Calificación:.....

Fecha:.....

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 4 |
| Introducción | 5 |
| Hipótesis y objetivos..... | 10 |
| Materiales y métodos | 11 |
| Resultados | |
| Estudio <i>in silico</i> | 15 |
| Déficits nutricionales..... | 21 |
| Estrés oxidativo..... | 28 |
| Seguimiento del proceso autofágico..... | 30 |
| Obtención de una construcción mEGFP-PpATG8a..... | 32 |
| Discusión | 33 |
| Bibliografía | 38 |
| Agradecimientos | 42 |
| Anexo | 43 |

RESUMEN

Los organismos eucariotas han desarrollado mecanismos sofisticados para reciclar constituyentes intracelulares bajo condiciones de estrés biótico o abiótico. Uno de estos procesos incluye a la autofagia. Existen dos tipos de autofagia en plantas: 1) microautofagia, donde ocurre el secuestro de citoplasma por invaginación de la membrana de la vacuola/lisosoma y 2) macroautofagia, que involucra el secuestro de constituyentes citoplasmáticos, incluyendo mitocondrias, retículo endoplasmático y ribosomas, mediante la fusión e invaginación de formas de membranas aisladas, dando lugar a estructuras vesiculares de doble o multimembranas, conocidas como autofagosomas. La macroautofagia (de aquí en más la llamaremos autofagia) es la principal vía autofágica descrita en plantas. Estudios genómicos y de mutagénesis han permitido la identificación de varios genes de autofagia (ATG, Autophagy Genes), requeridos para la formación del autofagosoma y que se encuentran altamente conservados en levaduras, animales y plantas. Las dificultades que supone la obtención de plantas transgénicas completas y la baja disponibilidad de mutantes de soja (*Glycine Max*) que impiden el análisis de genómica funcional en tejidos verdes, plantea la necesidad de abordar el estudio de este proceso en otros organismos modelo como el musgo *Physcomitrella patens*, para posteriormente transferir estos conocimientos a plantas superiores de interés económico como *G. max*.

En este trabajo se abordó desde un punto de vista bioquímico-molecular, celular y fisiológico la función de genes clave relacionados a la autofagia bajo diferentes relaciones carbono/nitrógeno y condiciones de estrés oxidativo, generadores de senescencia, en el musgo *P. patens*. Se ha podido comprobar que por su alto grado de conservación genética en la respuesta frente a factores abióticos, bióticos y hormonales; su posición filogenética basal en la escala evolutiva, su alta frecuencia de recombinación homóloga, su simplicidad morfológica y manejo en el laboratorio, *Physcomitrella patens* es un organismo potencial para investigar el proceso de autofagia en plantas.

INTRODUCCIÓN

La autofagia es una de las principales vías de degradación de proteínas y componentes celulares, y representa un mecanismo fundamental de mantenimiento de la homeostasis celular en organismos eucariotas. El secuestro, traslado y degradación de componentes celulares superfluos o dañados ocurren por autofagia, y es además la única vía descrita hasta el momento para la degradación de organelas enteras (Levine 2005). Existen tres tipos distintos de autofagia, los cuales difieren en mecanismos, funciones fisiológicas y especificidad cargo: 1) autofagia mediada por chaperonas, las cuales reconocen una secuencia específica de aminoácidos y llevan a cabo la translocación directa de proteínas a través de la membrana de la vacuola/lisosoma vía un receptor (Massey et al. 2004), 2) microautofagia, donde ocurre el secuestro de citoplasma por invaginación de la membrana de la vacuola/lisosoma (Wang and Klionsky 2003) y 3) macroautofagia, que involucra el secuestro de constituyentes citoplasmáticos, incluyendo mitocondrias, retículo endoplasmático y ribosomas, mediante la fusión e invaginación de formas de membranas aisladas, dando lugar a estructuras vesiculares de doble o multimembranas, conocidas como autofagosomas (Avin-Wittenberg et al. 2012) (Fig 1).

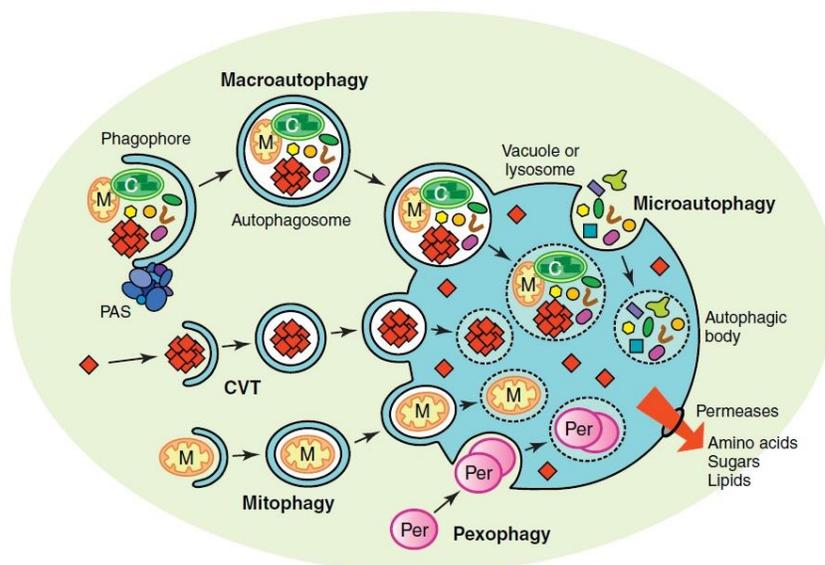


Figura 1. Esquema representativo de los distintos tipos de autofagia conocidos hasta el momento.

La macroautofagia (de aquí en más la llamaremos autofagia) es la principal vía autofágica descrita en plantas. Estudios genómicos y de mutagénesis han permitido la

identificación de varios genes de autofagia (ATG, Autophagy Genes), requeridos para la formación del autofagosoma y que se encuentran altamente conservados en levaduras, animales y plantas (Kim et al. 2012). El proceso autofágico puede ser ordenado en los siguientes grupos funcionales:

i) Eventos tempranos que involucran una cascada donde TOR1 (Target of Rapamycin) quinasa inhibe el proceso. Esta proteína juega un rol fundamental por ser un regulador negativo de la autofagia; en condiciones normales hiperfosforila a ATG13 impidiendo la formación del complejo ATG1/ATG13. Bajo condiciones deficientes en nutrientes, TOR1 es inhibida dando lugar a la activación de autofagia.

ii) El complejo PI3K(Vps34)/ATG6(Beclin1)/ATG14/Vps15. Principalmente la interacción de PI3K clase III y ATG6 es un paso esencial para el reclutamiento de otras proteínas ATG hacia la membrana precursora del autofagosoma. Se presume que este complejo decora el pre-autofagosoma con fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P). No se conoce bien la función de PI3P pero se cree que le estaría confiriendo la identidad de autofagosoma, así dicha estructura sería reconocida por la vacuola.

iii) En la formación del autofagosoma, ATG8 permite la expansión de la membrana del mismo. ATG8 se encuentra en dos formas: ATG8 lipidado con fosfatidil-etanolamina (ATG8-PE) ubicado en la membrana del autofagosoma (autofagia activa), y sin fosfatidil-etanolamina (ATG8), su forma citoplásmica (autofagia inactiva). Para que se realice la conjugación de ATG8 con PE, ATG8 es previamente procesado por la proteasa ATG4 que expone un residuo de glicina. El ATG8 maduro es activado por una enzima dependiente de ATP, ATG7, ésta se une a ATG8 y luego por transesterificación dona esta unión a ATG3. Finalmente se produce la unión de ATG8 con PE mediante el complejo ligasa ATG6/ATG5/ATG12.

iv) Por último el autofagosoma es transportado hacia la vacuola donde se fusiona con el tonoplasto. La membrana externa del autofagosoma se incluye en el tonoplasto y la vesícula resultante se descarga en el interior de la organela como un cuerpo autofágico. Este último libera su contenido para su degradación y la posterior generación de materiales para su reutilización (Fig 2).

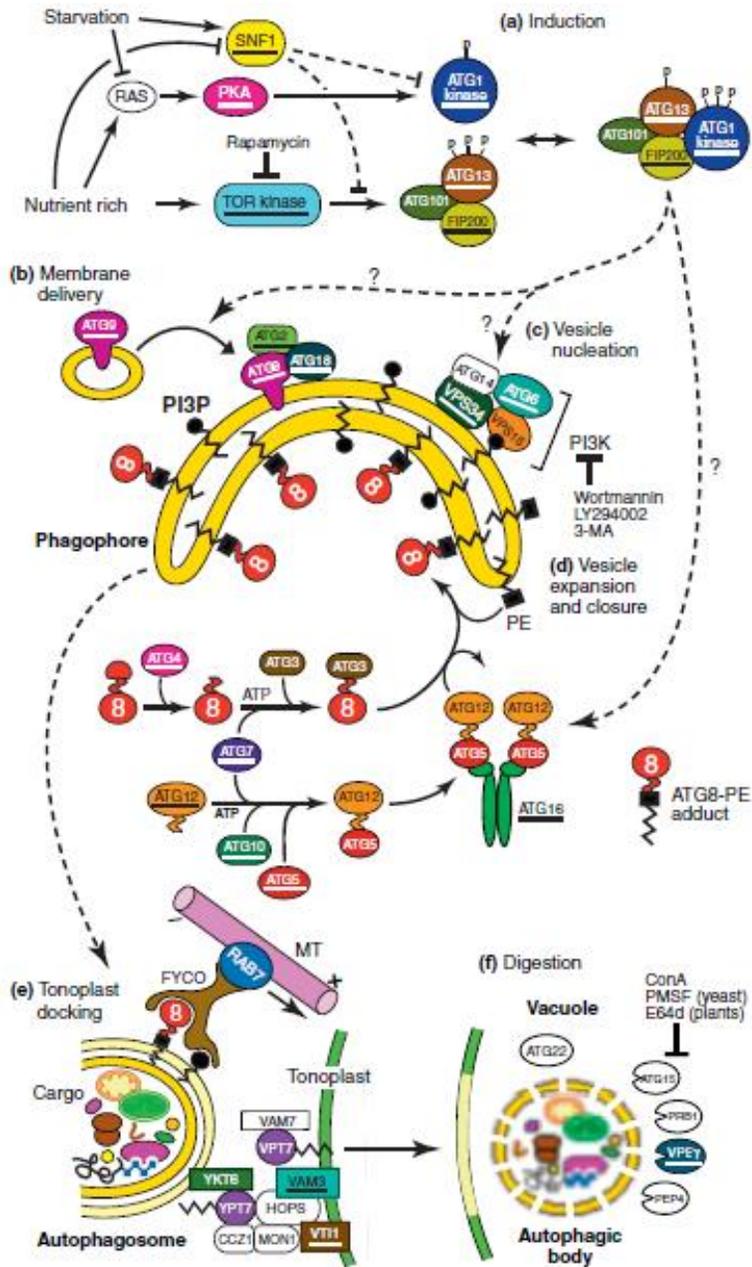


Figura 2. Detalle del proceso macroautofágico descrito en plantas.

La senescencia es un proceso dinámico y altamente regulado que implica una masiva y coordinada muerte celular en respuesta al estadio de desarrollo o inducida por diferentes condiciones de estrés ambiental (Thomas et al. 2003). Durante la senescencia foliar la autofagia cumple dos roles antagónicos, por un lado preserva la longevidad celular y por el otro participa en la degradación metabólica de constituyentes celulares (Masclaux-

Daubresse et al. 2017). También tiene un rol central en la removilización de nutrientes, fundamentalmente de nitrógeno, hacia órganos en crecimiento determinando la productividad y calidad de semillas, tanto en *Arabidopsis* (Guiboileau et al. 2012), como en cultivos de importancia económica como la soja.

La vía autofágica participa en las respuestas de tolerancia a condiciones de estrés abiótico, biótico y oxidativo: cumple una función clave en la remoción de proteínas oxidadas productos del envejecimiento o del estrés oxidativo (Liu and Bassham 2012) y se activa en condiciones nutricionales limitantes principalmente de nitrógeno pero también de carbono y ATP. En el proceso autofágico no solo se reciclan proteínas sino también fragmentos de organelas, lípidos y cualquier micronutriente contenido en macromoléculas (Masclaux-Daubresse et al. 2017). Tanto en plantas superiores como en algas ha sido demostrada la participación de la autofagia en la adaptación a condiciones que involucran la generación de especies reactivas del oxígeno (EAO)(Xiong et al. 2005) como así también la participación de las EAO en la inducción del proceso de autofagia bajo condiciones de limitaciones nutricionales y estrés (Minibayeva et al. 2012).

El estudio de la autofagia ha sido facilitado gracias al desarrollo de marcadores que etiquetan específicamente a los autofagosomas facilitando la detección de la ocurrencia del proceso en células vegetales. Estos marcadores incluyen a la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a la proteína ATG8 y los colorantes fluorescentes acidotróficos monodansilcadaverina (MDC) y LysoTracker Red (Bassham 2007).

Los genes ATGs (previamente llamados APGs) fueron caracterizados por primera vez en levadura (Tsukada and Ohsumi 1993). En plantas se han identificado aumentos en el número de genes de las diferentes familias implicadas en autofagia, lo que podría incrementar la amplitud y especificidad de sus funciones (Hayward et al. 2009). Adicionalmente, las dificultades que supone la obtención de plantas transgénicas completas y la baja disponibilidad de mutantes de soja (*Glycine Max*) que impiden el análisis de genómica funcional en tejidos verdes, plantea la necesidad de abordar el estudio de este proceso en otros organismos modelo como el musgo *Physcomitrella patens*, para posteriormente transferir estos conocimientos a plantas superiores de interés económico como *Glycine max*. El uso de *P. patens* adiciona una perspectiva evolutiva del proceso, por

pertenecer al primer grupo de plantas terrestres; como tal posee todas las bases moleculares y fisiológicas que involucran la adaptación a la vida terrestre. Asimismo, *P. patens* es la única planta que posee una alta frecuencia de recombinación homóloga similar a la tasa observada en levaduras (Schaefer and Zryd 1997), hecho que lo ha convertido en una poderosa herramienta en genómica funcional para el análisis de la función de genes utilizando genética reversa. El uso potencial de *P. patens* como sistema modelo radica también en i) el alto grado de conservación en la respuesta frente a factores abióticos, bióticos y hormonales (auxina, citoquininas y ABA), ii) la simplicidad de la morfología de la planta que permite el seguimiento de procesos celulares y del desarrollo a nivel de células individuales, iii) la dominancia de la generación haploide durante su ciclo de vida (Fig 3) que permite la inmediata visualización de fenotipos iv) su rápida velocidad de crecimiento y simplicidad de medio de cultivo (Cove 2005), y v) su genoma secuenciado (Rensing et al. 2008).

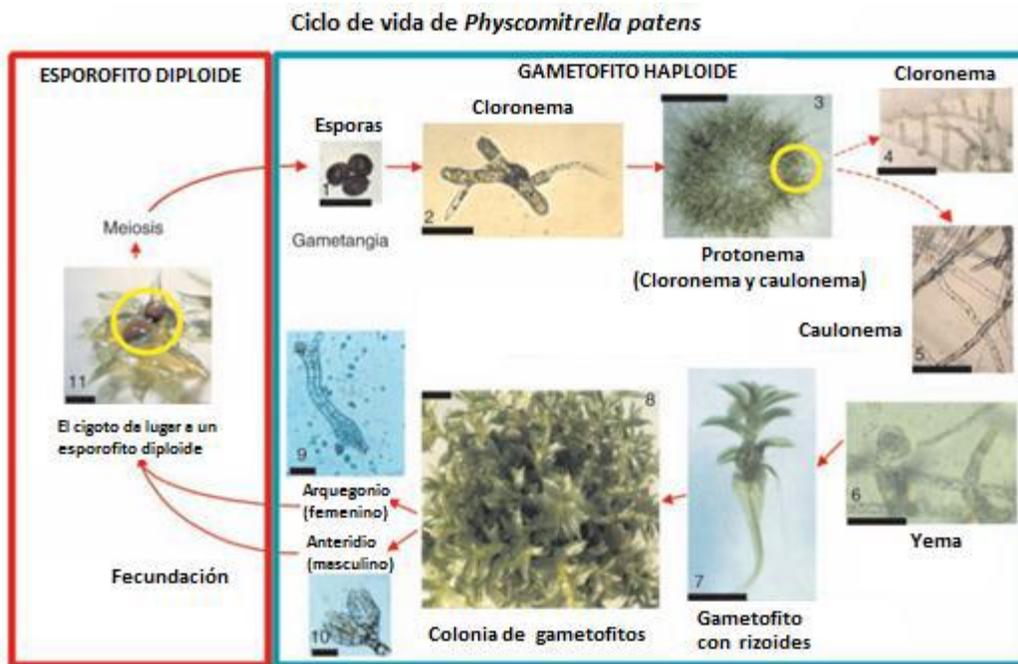


Figura 3. Ciclo de vida de *P. patens*. El gametofito (haploide y autotrófico) se caracteriza por dos estados de desarrollo morfológicamente diferenciados: el protonema (estado juvenil), que consiste en una red filamentosa de células de cloronema y caulonema, ambas exhiben crecimiento polar; y el gametóforo que constituye el estado adulto del musgo, presenta crecimiento tridimensional y se

diferencia a partir de una yema. El gametofito posee un vástago fotosintético, hojas, las estructuras reproductivas (anteridios y arquegonios) y los rizoides filamentosos, estos últimos exhiben crecimiento apical. El esporofito (diploide y heterotrófico) consiste en una seta que sostiene la cápsula donde ocurrirá la meiosis que dará lugar a la formación de esporas y la liberación de las mismas al alcanzar la madurez (Schaefer and Zryd 2001).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Por su alto grado de conservación genética en la respuesta frente a factores abióticos, bióticos y hormonales; su posición filogenética basal en la escala evolutiva, su alta frecuencia de recombinación homóloga, su simplicidad morfológica y manejo en el laboratorio, *Physcomitrella patens* es un organismo potencial para investigar el proceso de autofagia en plantas.

OBJETIVO GENERAL

Abordar desde el punto de vista bioquímico-molecular, celular y fisiológico la función de genes clave relacionados a la autofagia bajo diferentes relaciones carbono/nitrógeno y condiciones de estrés oxidativo, generadores de senescencia, en el musgo *Physcomitrella patens*.

Objetivos específicos:

- 1-Realizar un estudio *in silico* desde el punto de vista evolutivo de algunos genes de autofagia mediante el análisis filogenético de los mismos en distintos organismos incluyendo algas como *Chlamydomonas reinhardtii*, briofitas como *Physcomitrella patens*, y plantas superiores como *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max* (soja), de interés agronómico.
- 2-Evaluar la expresión de genes y otros marcadores de autofagia frente a condiciones inductoras de senescencia como déficit de nitrógeno y/o carbono y estrés oxidativo.
- 3-Realizar la construcción para generar una línea de *P. patens* que permita visualizar el proceso de autofagia *in vivo* mediante la sobreexpresión del gen marcador de autofagia ATG8 fusionado al gen reportero de la proteína fluorescente verde (*GFP*) bajo el control del promotor constitutivo de ubiquitina de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio *in silico*: Se realizó una búsqueda del sistema de genes ATG en *P. patens*. Se confeccionaron árboles filogenéticos para los genes de interés utilizando el software MEGA 6.0 y el método de Neighbour-Joining (bootstrap test con 1,000 réplicas). Para obtener árboles filogenéticos mas consistentes y que presenten raíz, se adicionó al análisis secuencias peptídicas de un organismo no relacionado filogenéticamente (*Homo sapiens*). Para la búsqueda de dominios conservados se utilizó el programa de predicción NCBI Conserve Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Condiciones de crecimiento: *P. patens* fue crecido en condiciones de cultivo *in vitro* a 25°C, con un fotoperiodo de 16h/8h y con una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Protonemas de *P. patens* fueron subcultivados semanalmente en placas de petri en medio mínimo suplementado con tartrato de amonio (BCDAT) (Thelander et al. 2005). Para llevar un control de contaminación, se tomó una alícuota de protonema de cada subcultivo y se lo incubó a 37°C en medio LB (Luria Bertani) para ser rutinariamente monitoreado.

Inducción de autofagia: Se cultivaron colonias de aproximadamente 1mm de diámetro sobre celofán en medio completo BCDAT. A los 14 días de crecimiento de las mismas se aplicaron los distintos tratamientos para inducir senescencia: condiciones limitantes de nitrógeno (medio BCDNaK que carece de NO_3 y NH_4) y condiciones limitantes de carbono (oscuridad). Se tomaron fotografías de las colonias utilizando el microscopio Olympus SZX16. Durante el transcurso del experimento se midió el diámetro total de las colonias utilizando el software ImageJ y se cuantificaron los gametóforos de las mismas.

Pruebas bioquímicas y daño del fotosistema II: Al finalizar los tratamientos inductores de autofagia, antes de conservar las muestras, se midió la relación F_v/F_m (daño del fotosistema II) de las colonias utilizando un fluorímetro. Las colonias fueron pesadas y conservadas a -80°C para posteriormente medir parámetros bioquímicos relacionados con: a) el estado redox: midiendo la capacidad férrico reductora de plasma (FRAP); b) procesos asociados a la senescencia. Para esto se midió el total de clorofilas y azúcares solubles. Para realizar estas pruebas bioquímicas se llevó a cabo una extracción etanólica: a 200 mg de

tejido molido en mortero con N líquido se le agregó 750µl de etanol 80%. Se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos. 60 µl del sobrenadante fueron destinados al FRAP, luego se resuspendió el pellet y se llevó a baño a 80°C por 20 minutos. Se centrifugó la mezcla a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos, del sobrenadante se separó 100 µl para clorofilas y el resto se destinó a la cuantificación de azúcares solubles.

Para el ensayo de actividad antioxidante total no enzimática (FRAP) primero se realizó un mix de reacción compuesto por: acetato de sodio 0.3 M, TPTZ 10 mM y cloruro férrico 200mM. Luego se incubó 20 µl de cada muestra por 20 minutos con 250 µl del mix de reacción y 230 µl de alcohol 80% (Benzie and Strain 1996). Se midió la absorbancia a 600nm. Para el cálculo de concentraciones de FRAP se utilizó una curva de concentraciones conocidas de Trolox (antioxidante sintético). El resultado se expresó en µmoles/µgMuestra.

Para la determinación de clorofilas y carotenoides se utilizaron los 100 µl de la extracción alcohólicas separados para esta medición. Se midió su absorbancia a 654 nm y 470 nm mediante espectofotometría (Thimann et al. 1974). Para el cálculo se utilizó un coeficiente de extinción molar de $39.8 \text{ Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El resultado se expresó en mg/mg de muestra.

Para la cuantificación de azúcares se incubó 25 µl de muestra con 225µl de etanol 80% y 750µl de antrona 0.1% por 10 minutos a 4°C (Yemm and Willis 1954). Luego se pasó a 80°C por 30 minutos. Finalmente se dejó enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 620nm. Para el cálculo de concentraciones de azúcares se utilizó una curva de absorbancia de concentraciones conocidas de glucosa. El resultado se expresó en µg/mgMuestra.

Por último se realizó un western blot para evaluar los niveles de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) empleando anticuerpos específicos de la subunidad mayor de dicha enzima. Se utilizó la misma cantidad de proteína por tratamiento (10µg). El área de cada banda fue calculado con el software ImageJ.

Estrés oxidativo: Colonias de 14 días de aproximadamente 1 mm de diámetro crecidas en celofán en medio BCDAT fueron expuestas a condiciones de estrés oxidativo mediante la

aplicación de paraquat, el cual actúa a nivel del cloroplasto como un aceptor de electrones de las proteínas Fe-S del fotosistema I, inhibiendo la reducción de ferredoxina, y por tanto promoviendo la generación de NADPH y regeneración de ácido ascórbico, conduciendo a un aumento en la producción de EAO. La concentración de paraquat aplicado (a 200 PAR de luz continua) fue de 50 μM y como control se utilizaron colonias expuestas a la misma intensidad de luz pero sin el herbicida. Se midió la eficiencia del fotosistema II (ΘPSII) de las colonias a las 0, 3, 6 y 8 horas de aplicado el tratamiento. Al finalizar el tratamiento las colonias fueron conservadas para posteriores mediciones bioquímicas: cuantificación de clorofilas y carotenoides (metodologías descritas mas arriba).

Además se estudió la viabilidad de las células mediante el test de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este compuesto es amarillo en solución y por la actividad de deshidrogenasas mitocondriales en células vivas, es convertido a un precipitado azul (formazán) que queda retenido dentro de la célula viable (Gerlier and Thomasset 1986). Las colonias fueron incubadas en medio líquido BCDAT adicionado con 200 μl de MTT (0.5% P/V) por 60 minutos a 37 °C. Las células viables fueron observadas mediante microscopía óptica de campo claro.

Seguimiento del proceso autofágico: se realizaron estudios de expresión de todos los genes *PpATG8s* marcadores de autofagia por PCR en tiempo real (qPCR), utilizando como genes de referencia *PpAde* (Adenina fosforibosiltransferasa- Pp3c8_16590) y *PpAct* (actina, Pp3c10_17070). Para esta evaluación colonias de 14 días fueron expuestas a dos condiciones: a) en medio BCDAT y oscuridad, b) en medio BCDAT y luz y c) en medio BCDAT adicionado con sacarosa (2% P/V) y en oscuridad. Luego de 24 hs de tratamiento, se realizaron extracciones de ARN con TRIZOL siguiendo el protocolo propuesto por el proveedor. La obtención de ADNc, se realizó según indicaciones del proveedor de la enzima M-MLV (Promega). Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando iQ SYBR Green Supermix (Bio Rad) y el termociclador iQ5 (Bio Rad). Para poder calcular los niveles de expresión de cada gen analizado mediante el método de Pfaffl

(2001), se realizaron curvas para cada juego de cebadores haciendo diluciones del ADNc de 1, 1×10^{-1} , 1×10^{-2} y 1×10^{-3} .

También se utilizó un marcador de flujo autofágico: la concanamicina A. Esta droga inhibe a la H⁺-ATPasa vacuolar previniendo la acidificación de la misma, de este modo se acumulan los cuerpos autofágicos dentro de la vacuola durante el proceso (Contento et al. 2005). Colonias de 14 días crecidas en condiciones normales de luz y nutrientes fueron tratadas durante 24 horas en oscuridad y luz en medio BCDAT líquido con concanamicina ($1 \mu\text{M}$). Los cuerpos autofágicos fueron visualizados a través de microscopía de interferencia de contraste diferencial (DIC).

Generación de una línea sobreexpresora de *P. patens*: Se diseñó una construcción en la cual la secuencia codificante (CDs) de *PpATG8a* se encuentra fusionada con la región codificante de GFP. Esta construcción se realizó utilizando la técnica SOE (Overlap extension PCR cloning) para lo cual el vector de clonado y enzimas de restricción a utilizar se encuentran disponibles en el laboratorio. A continuación *GFP-PpATG8a* será clonado en el vector pTKUbi que posee el promotor constitutivo de maíz para ubiquitina, el gen de resistencia al antibiótico higromicina, y 1000 bp de las regiones 5' y 3' del gen Pp108 que permitirán la inserción de *GFP-PpATG8a* por recombinación homóloga en dicho locus.

Análisis estadístico: el Análisis de la varianza (ANOVA) fue utilizado para los análisis estadísticos. Los datos fueron transformados con el fin de lograr la normalidad necesaria para evaluar las diferencias entre tratamientos. Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando el Test de Duncan. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05. Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico INFOSTAT.

RESULTADOS

Si bien el estudio de la autofagia en plantas ha demostrado que muchos genes involucrados en este proceso tienen función conservada en mamíferos y levaduras, hay aspectos planta-específicos que no se conocen acabadamente.

1. Estudio *in silico*

Se realizó una búsqueda de ortólogos de los genes ATG en *P. patens* utilizando como motor de búsqueda los genes de *A. thaliana*. Se verificó que existe al menos un gen para cada uno de los genes ATG que conforma el sistema en plantas superiores (Fig 4). En este contexto abordamos el estudio de la autofagia utilizando el musgo *P. patens* como organismo modelo debido principalmente a su conservación en el sistema ATG y a su posición clave en la escala evolutiva asociada a la transición de la vida acuática a la terrestre permitiendo descifrar los componentes básicos adquiridos para esta adaptación.

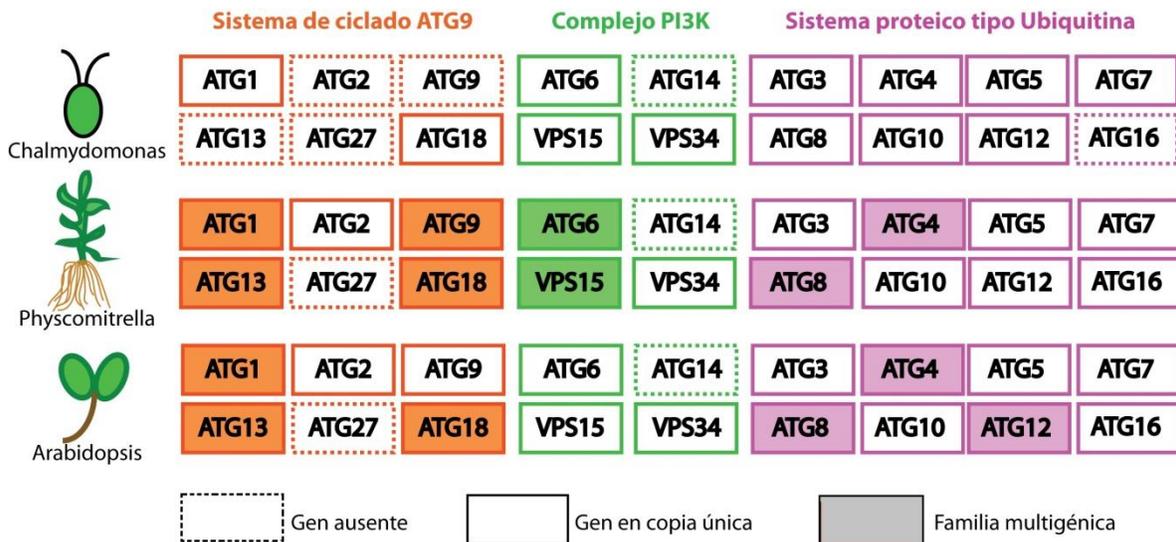


Figura 4. Sistema de genes ATGs en organismos fotosintéticos. En la figura se representan los distintos genes involucrados en el proceso de autofagia de *Chlamydomonas reinhardtii* (perteneciente al grupo Chlorophyta o algas verdes), *Physcomitrella patens* (perteneciente al grupo Bryophyta o musgos) y *Arabidopsis thaliana* (perteneciente al grupo Angiospermae o plantas con flores). Figura adaptada de (Avin-Wittenberg et al. 2012).

Como actualmente se cuenta con los genomas de varias especies secuenciados se realizó una búsqueda de las isoformas a de Atg4 y Atg6 y todas las isoformas de Atg8 en el genoma de varias especies utilizando las secuencias peptídicas de dichas proteínas de *P. patens* brindadas por la base de datos Phytozome. Como se observa en la figura 5 todas las secuencias de *P. patens* se agrupan en la Clase I junto con las secuencias únicas de *C. reinhardtii* (alga verde) y *K. nitens* (charophyta, grupo que dio origen a las plantas terrestres), las isoformas A,B,C y D de ambas *G. max* y *A. thaliana* y la isoforma G de *G. max*. Es importante destacar este agrupamiento que muestra un ancestro en común entre briófitas, algas verdes, charofitas y plantas superiores dando un indicio de la conservación que poseen estas secuencias.

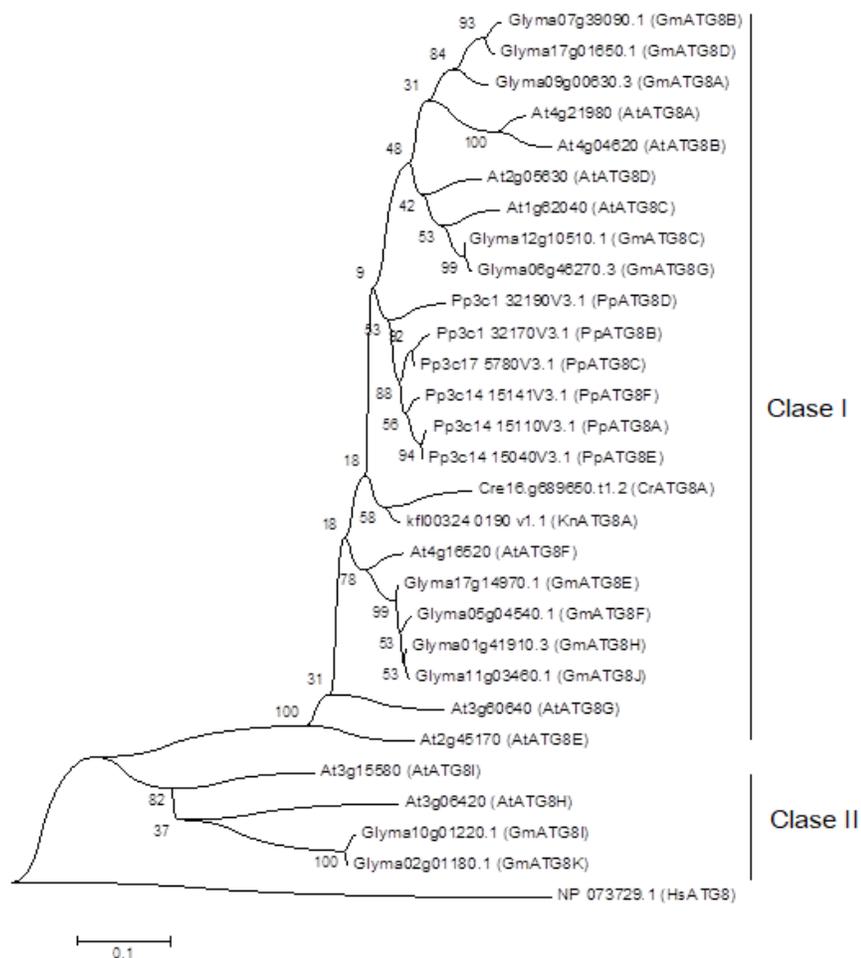


Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias de todas las isoformas de Atg8 de distintos organismos. El árbol fue inferido utilizando el método Neighbor-Joining. Los 16

numeros en los nodos indican los valores de bootstrap (con 1000 repeticiones). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Abreviaciones: Gm= *Glycine max*, At= *Arabidopsis thaliana*, Pp= *Physcomitrella patens*, Cr= *Chlamydomonas reinhardtii*, Kn= *Klebsormidium nitens*, Hs= *Homo sapiens*.

Al realizarse la búsqueda de dominios conservados, el software bioinformático utilizado reconoció al intervalo 6-117 de la secuencia peptídica de Atg8a de *P. patens* como un dominio de una proteína ubiquitina asociada al receptor GABA (GABARAP), considerando un error de 2.75×10^{-72} (Fig 6). Esta GABARAP pertenece a la familia de proteínas que median el tráfico y/o fusión de membranas intracelulares. Los ortólogos de GABARAP incluyen Gate-16 (potenciador de ATPasa asociado a golgi), LC3 (cadena ligera 3 de proteína asociada a microtúbulos) y ATG8 (proteína de autofagia 8).

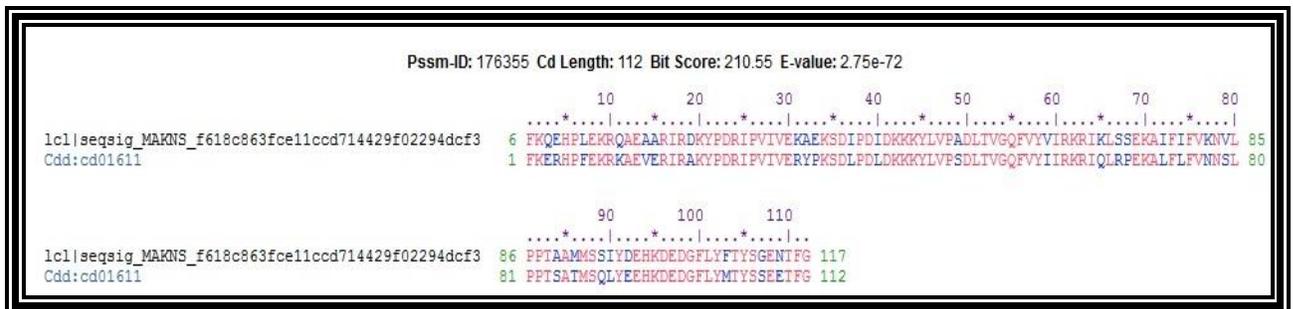


Figura 6. Dominios conservados. Resultado de la búsqueda de dominios conservados. La secuencia superior en el alineamiento corresponde a Atg8a de *P. patens* y la inferior a la proteína encontrada por el software: proteína ubiquitina asociada al receptor GABA.

Adicionalmente se realizó un alineamiento de las secuencias peptídicas de Atg8 del musgo y de levadura. Se verificó que los residuos responsables del reconocimiento de Atg8 por Atg4 (residuos F77 y F79) y los residuos que son expuestos por Atg8 para su activación por lipidación (residuos Y49 y L50) se encuentran conservados (Fig. sup. 1).

ATG6 posee un importante rol en el proceso autofágico, ejerce su función en la etapa de formación de la membrana precursora del autofagosoma. La figura 7 muestra las relaciones filogenéticas que existen entre las secuencias de la isoforma A de este gen en 18 organismos distintos. Se seleccionaron para este estudio algas verdes (dentro de las cuales

es importante destacar a la Charophyta *K. nitens*), hepáticas (*M. polymorpha*), nuestra briófita de interés y plantas superiores. Dentro de estas últimas se encuentran angiospermas tanto de interés agronómico como *G. max* y *Z. mays* como así también de importancia evolutiva como la angiosperma basal *A. trichopoda*. La secuencia de *P. patens* fue agrupada con la de *M. polymorpha* (Hepatophyta), ambas especies se encuentran dentro del grupo Bryophyta *sensu lato*. A su vez este agrupamiento comparte un ancestro en común con *K. nitens* y todas las plantas superiores elegidas para el análisis. Las dos algas seleccionadas para este análisis fueron agrupadas juntas y ubicadas en la base del árbol.

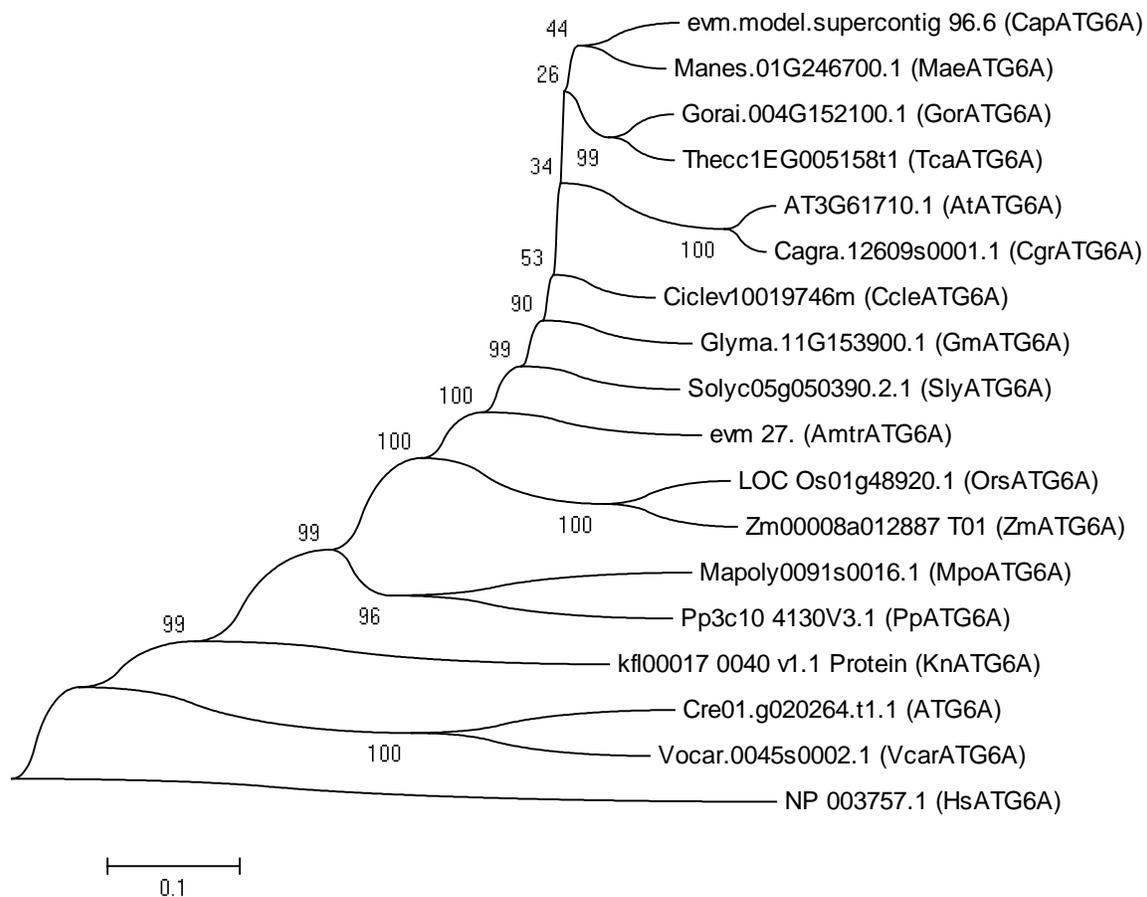


Figura 7. Árbol filogenético de las secuencias de *Atg6a* de distintos organismos. El árbol fue inferido utilizando el método Neighbor-Joining. Los números en los nodos indican los valores de bootstrap (con 1000 repeticiones). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas

para inferir el árbol filogenético. Abreviaciones: Vcar= *Volvox carteri*, Mp= *Marchantia polymorpha*, Zm= *Zea mays*, Ors= *Oryza sativa*, Amtr= *Amborella trichopoda*, Sly= *Solanum lycopersicum*, Cele= *Citrus clementina*, Cgr= *Capsella grandiflora*, Tca= *Theobroma cacao*, Gor= *Gossypium raimondii*, Mae= *Manihot esculenta*, Cap= *Carica papaya*, Gm= *Glycine max*, At= *Arabidopsis thaliana*, Pp= *Physcomitrella patens*, Cre= *Chlamydomonas reinhardtii*, Kn= *Klebsormidium nitens*, Hs= *Homo sapiens*.

ATG4 fue una de las proteínas elegidas para este estudio *in silico* por su importancia en el proceso de autofagia como sensor redox del proceso. Se ha visto en *Chlamydomonas reinhardtii* que la actividad de ATG4 se encuentra regulada por el sistema NAPH/NTR/Tiorredoxina (Perez-Perez et al. 2016). A su vez la conjugación de ATG8 con PE es catalizada por la acción secuencial de esta proteasa. La figura 8 muestra las relaciones filogenéticas que existen entre las secuencias de la isoforma A de ATG4 en los mismos organismos elegidos para el análisis del árbol anterior. Como se puede observar en la figura las relaciones obtenidas fueron similares a las observadas en el árbol para ATG6; la agrupación y ubicación de *P. patens* fue la misma.

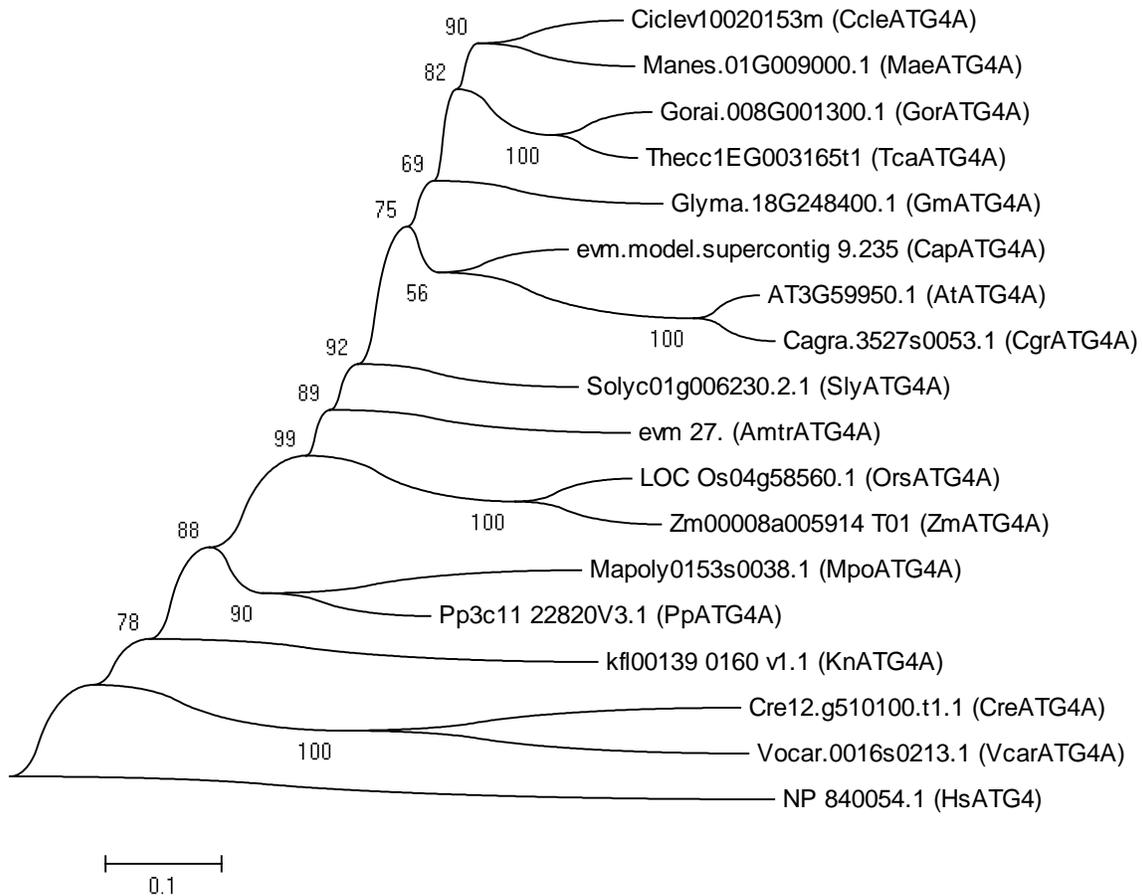


Figura 8. Árbol filogenético de las secuencias de Atg4a de distintos organismos. El árbol fue inferido utilizando el método Neighbor-Joining. Los números en los nodos indican los valores de bootstrap (con 1000 repeticiones). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Abreviaciones: Vcar= *Volvox carteri*, Mp= *Marchantia polymorpha*, Zm= *Zea mays*, Ors= *Oryza sativa*, Amtr= *Amborella trichopoda*, Sly= *Solanum lycopersicum*, Ccle= *Citrus clementina*, Cgr= *Capsella grandiflora*, Tca= *Theobroma cacao*, Gor= *Gossypium raimondii*, Mae= *Manihot esculenta*, Cap= *Carica papaya*, Gm= *Glycine max*, At= *Arabidopsis thaliana*, Pp= *Physcomitrella patens*, Cre= *Chlamydomonas reinhardtii*, Kn= *Klebsormidium nitens*, Hs= *Homo sapiens*.

2. Déficit nutricionales: condiciones inductoras de autofagia

Con el fin de abordar el segundo objetivo específico planteado en este trabajo se sometió a *P. patens* a condiciones inductoras de senescencia, donde se sabe que la autofagia se encuentra por sobre sus niveles basales. Colonias de dos semanas fueron sometidas a tres condiciones de estrés nutricional: luz y medio sin nitrógeno, oscuridad y medio con nitrógeno, oscuridad y medio sin nitrógeno. Como control positivo la condición fue de luz en medio con nitrógeno (BCDAT).

2.1 Variables de crecimiento y desarrollo

Después de 14 días de tratamiento las colonias de la condición control mostraron un crecimiento y desarrollo óptimo: presentado una coloración verde y gran cantidad de gametóforos y rizoides cortos (Fig 9). Los distintos tratamientos tuvieron claros efectos negativos sobre el patrón de crecimiento y desarrollo registrado bajo condiciones controles. Las colonias de ambos tratamientos de oscuridad presentaron un área significativamente menor con respecto al control (Fig 10. A) y claros síntomas de senescencia, con una coloración amarronada. El fenotipo senescente fue menos marcado en el tratamiento de luz sin nitrógeno: las colonias se mostraron verdes y grandes pero presentaban rizoides de mayor longitud respecto al control. Este fenotipo de alargamiento radicular, ha sido ampliamente reportado en plantas superiores frente a deficiencias de nitrógeno.

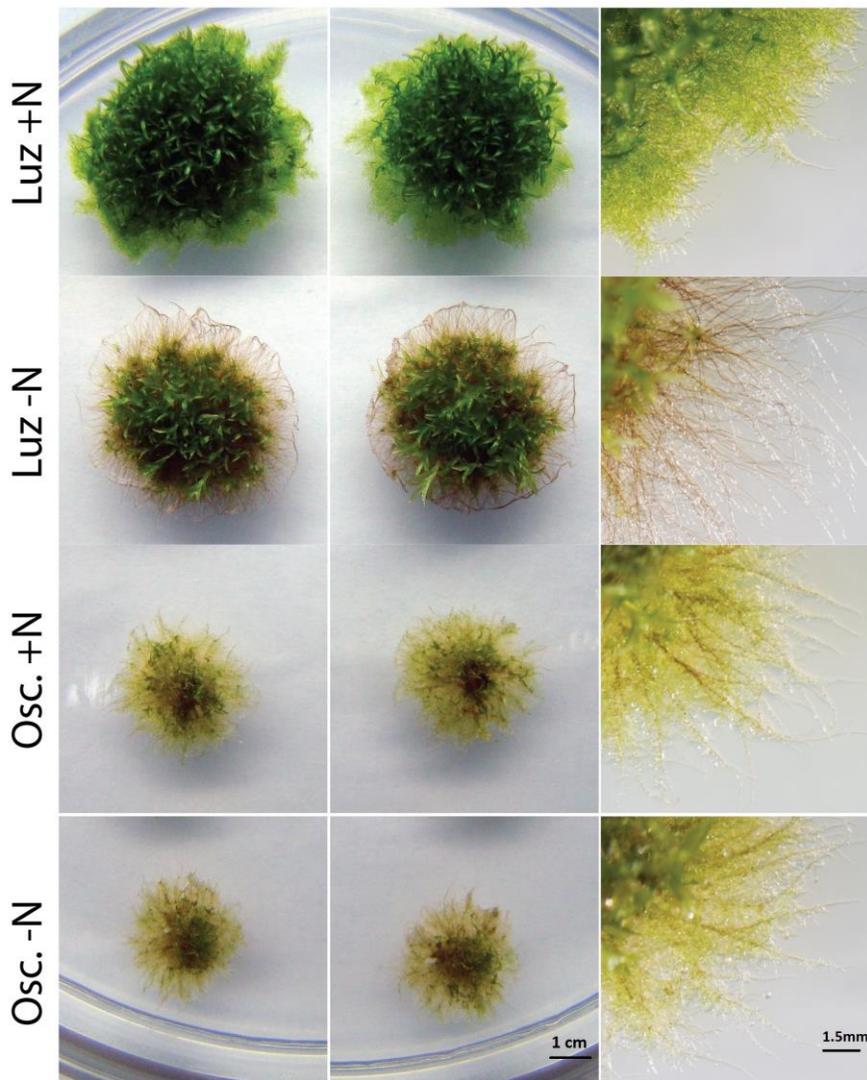


Figura 9. Colonias después de 14 días sometidas a condiciones inductoras de senescencia. Detalle de rizoides en columna derecha.

Con respecto al número de gametóforos, nuevamente las colonias de ambos tratamientos de oscuridad presentaron diferencias significativas con respecto a ambas condiciones de luz (Fig 10. B). Al finalizar el tratamiento ambas condiciones de oscuridad no superaron los 20 gametóforos mientras que el control y la condición de luz sin nitrógeno presentaron más de 50 gametóforos a los 8 días de tratamiento. Una visualización en lupa de los gametóforos al final del tratamiento mostró claras diferencias en el desarrollo de los mismos (Fig 11). Los gametóforos del control eran de mayor tamaño y verdes (Fig 11. D).

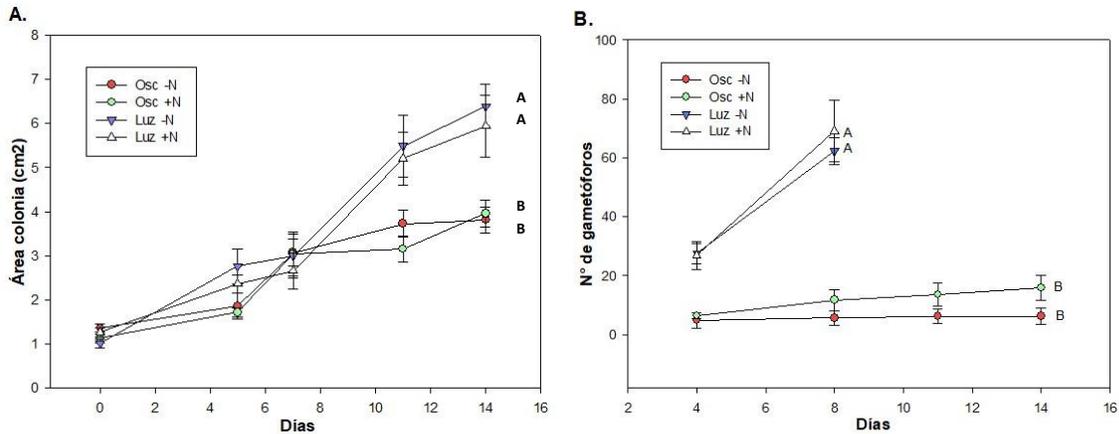


Figura 10. A. Áreas de las colonias en función de días de tratamiento. **B.** Número de gametóforos en función de días de tratamiento. El conteo comenzó en el día 4 porque antes ningún tratamiento presentaba gametóforos. A partir del día 8 las colonias sometidas a las dos condiciones de luz presentaban demasiados gametóforos como para que su conteo sea posible de llevarse a cabo. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos. Test de Duncan. $P < 0.05$.

La sección correspondiente a caulidios y filidios de los gametóforos de luz sin nitrógeno eran de tamaño y pigmentación similar al control, sin embargo poseían mayor cantidad de rizoides de mayor longitud (Fig 11. C). Los gametóforos de ambos tratamientos de oscuridad eran significativamente más pequeños que el control, presentaban coloración amarillada y el tratamiento sin nitrógeno presentó rizoides más largos (Fig 11. A y B).

Este conjunto de datos muestra que la oscuridad, como condición de déficit de carbono, tiene efectos negativos mucho más severos que el déficit de nitrógeno sobre el crecimiento y desarrollo de *P. patens*.

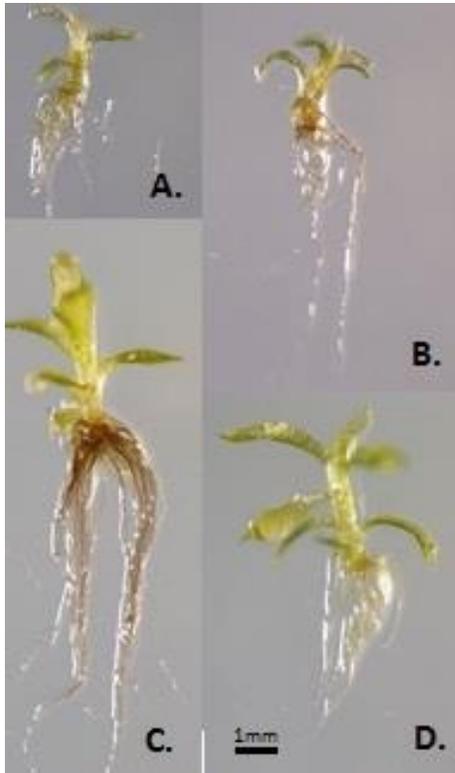


Figura 11. Detalle de gametóforos de *P. patens* después de 14 días bajo condiciones inductoras de senescencia. **A.** Oscuridad sin nitrógeno. **B.** Oscuridad con nitrógeno. **C.** Luz sin nitrógeno. **D.** Control.

Estos resultados también se reflejaron en el peso fresco de las colonias, determinados al final del tratamiento (Fig 12. A), siendo las colonias de ambos tratamientos de oscuridad las que presentaron un menor peso. Las colonias que presentaron mayor peso fueron las del tratamiento de luz sin nitrógeno. Esto puede deberse a que estas colonias presentaban mayor área total y además gran parte de la misma se correspondía a la extensión de sus rizoides.

2.2 Variables bioquímica-fisiológicas

Con el objetivo de profundizar la caracterización de los fenotipos obtenidos a nivel de crecimiento y desarrollo, se determinaron diferentes variables bioquímica-fisiológicas relacionadas a fotosíntesis y estado redox.

Como aproximación a la actividad fotosintética se midió F_v/F_m (daño del fotosistema II) y niveles de clorofila. No se observó daño en ambas condiciones de luz (Fig 12. B), obteniéndose valores próximos a 0.800. Sin embargo en ambas condiciones de oscuridad se observó valores de F_v/F_m mas bajos mostrando un daño mayor en el tratamiento de oscuridad con nitrógeno. El daño fue mayor en las colonias de oscuridad con nitrógeno. Con respecto a clorofilas totales los niveles mas altos fueron observados en el control siendo estos aproximadamente el doble que en ambos tratamientos de oscuridad (Fig 12. C). Las colonias del tratamiento de luz sin nitrógeno fueron las que presentaron el menor contenido de clorofilas, esto puede deberse a que la cuantificación esta relativizada al peso de las muestras y en este caso las colonias presentaban numerosos y largos rizoides.

La determinación del contenido de azúcares solubles denotó claramente el efecto del déficit de carbono sobre las colonias. Se observó una disminución del contenido de azúcares solubles en ambas colonias de oscuridad (Fig 12. D).

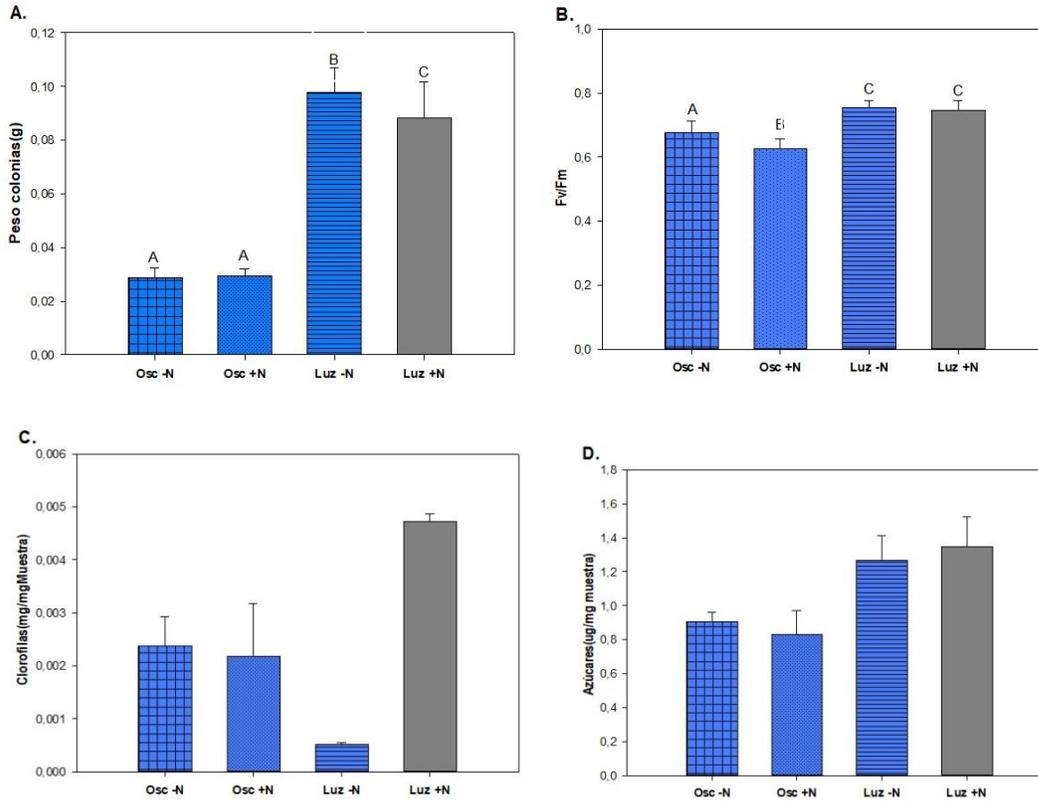


Figura 12. **A.** Peso fresco de las colonias al finalizar los tratamientos. **B.** Daño del fotosistema II. **C.** Contenido de clorofilas totales. **D.** Contenido de azúcares solubles. Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos. Test de Duncan. $P < 0.05$.

Siendo la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) la proteína mas abundante en los tejidos fotosintéticos, se cuantificaron los niveles de la misma en los distintos tratamientos mediante western blot. El control poseía los niveles mas elevados. Las bandas de todos los tratamientos fueron un 40% mas pequeñas que el control no habiendo diferencias significativas entre ellas (Fig 13).

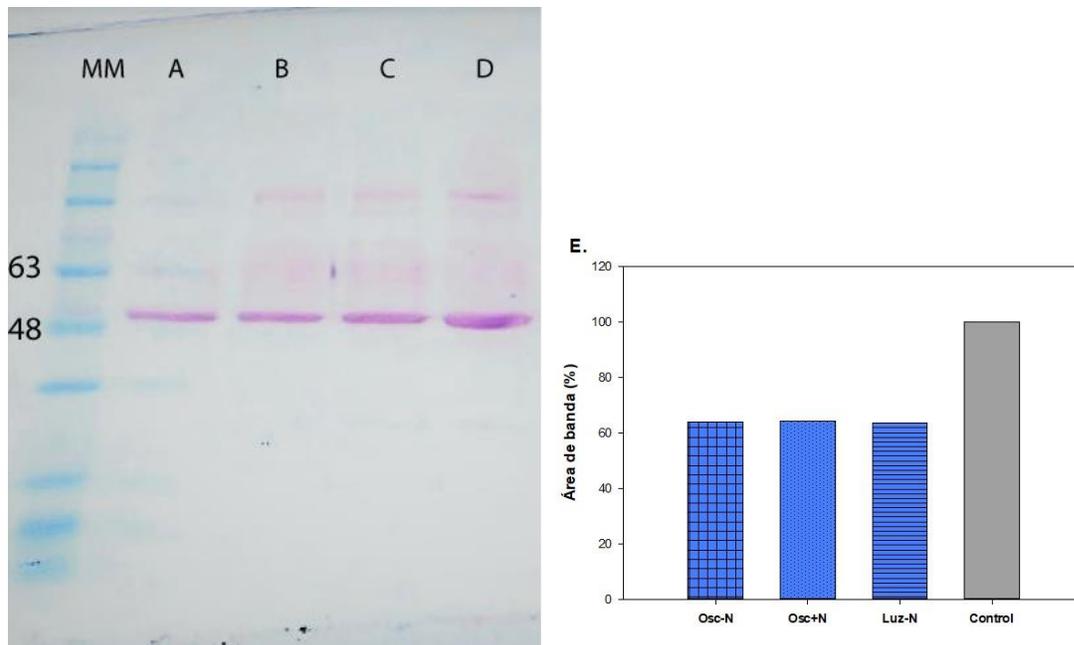


Figura 13. Western blot mostrando los niveles de la subunidad mayor de la enzima Rubisco. **A.** Oscuridad sin nitrógeno. **B.** Oscuridad con nitrógeno. **C.** Luz sin nitrógeno. **D.** Control. **E.** Porcentajes de las distintas áreas de bandas, el área del control fue considerado el %100.

Como marcador del estado redox, se midió la capacidad férrico reductora del plasma (FRAP) de las colonias en los distintos tratamientos (Fig 14). Los niveles menores de esta variable se observaron en oscuridad.

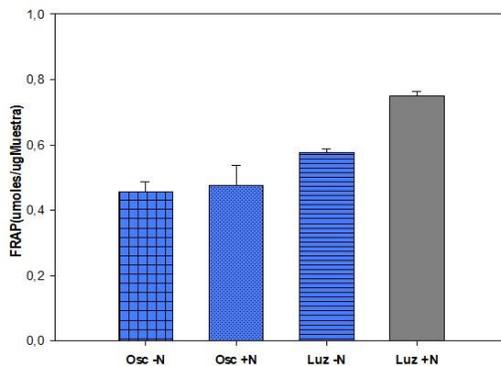


Figura 14. Capacidad férrico reductora del plasma (FRAP).

Los resultados de este conjunto de experimentos corroboran y concuerdan con los resultados del apartado anterior donde el mayor efecto inductor de senescencia está dado por los tratamientos de oscuridad.

3. Estrés oxidativo

Con el fin de explorar el comportamiento de *P. patens* en condiciones de estrés oxidativo, se realizó un estudio preliminar utilizando distintas concentraciones de paraquat (50 μ M y 100 μ M) y distintos tiempos en colonias de 14 días. De acuerdo a lo obtenido se seleccionó un tratamiento 50 μ M paraquat durante 8 horas (a 200 PAR de luz continua) y como control se usaron colonias expuestas a la misma intensidad de luz pero sin el herbicida. Con el fin de evaluar el daño inducido por este tipo de estrés se cuantificaron el total de clorofilas y carotenoides, se midió la eficiencia del fotosistema II a lo largo del tratamiento y se determinó cualitativamente la viabilidad celular.

Los valores del contenido de clorofilas (Fig 14. A) y de carotenoides (Fig 14. B) fueron mas elevados en el control. Al inicio del tratamiento las colonias presentaban valores normales de eficiencia fotosintética (entre 0.8-0.9), con las horas los mismos decayeron tanto en el control como en el tratamiento sin mostrar diferencias significativas entre ellos (Test de Duncan, $p < 0.05$) (Fig 14. C).

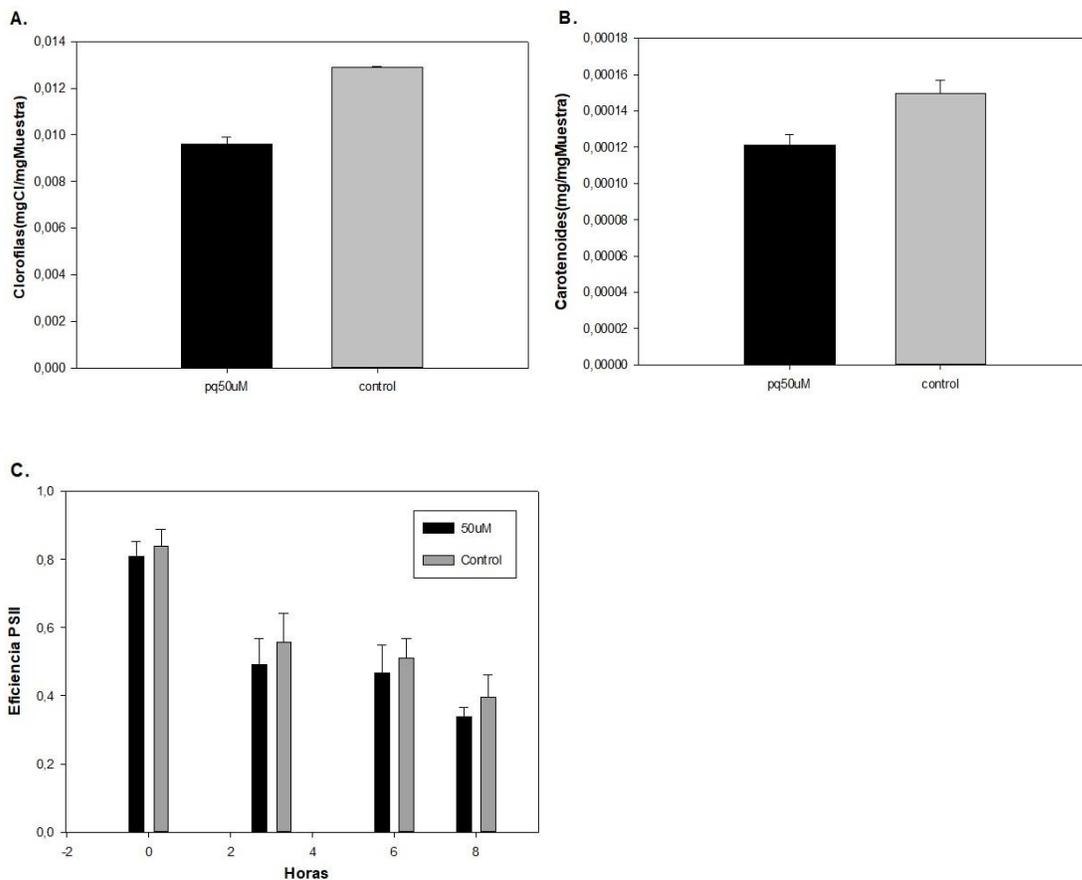


Figura 14. **A.** Clorofilas totales. **B.** Carotenoides totales. **C.** Eficiencia del fotosistema II en función de horas de tratamiento de estrés oxidativo con paraquat.

Por último se observó la viabilidad celular utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio el cual forma un precipitado azul en células viables. Se observaron diferencias significativas entre la coloración del control y el tratamiento (Fig 15). El control presentaba la mayor parte de su protonema coloreado de azul a diferencia del tratamiento que se mostraba verde denotando el efecto negativo del paraquat en el tejido.

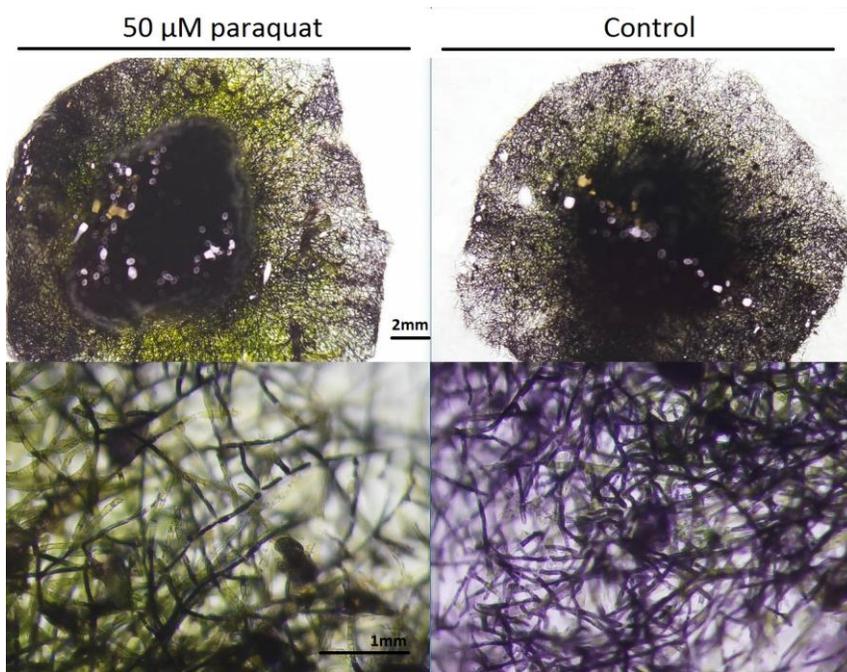


Figura 15. Viabilidad. Fotos de colonias expuestas a condiciones de estrés oxidativo (tratadas con paraquat) y su respectivo control. Fotos superiores de las colonias enteras, fotos inferiores muestran detalles de protonema. El color azul indica viabilidad en células.

4. Seguimiento del proceso autofágico

En base a los resultados obtenidos se eligió la condición de inducción de senescencia mas pronunciada con el fin de evaluar el proceso de la autofagia. Para ello colonias de 14 días fueron sometidas a 24 horas de oscuridad y la inducción de autofagia fue evaluada visualizando la acumulación de cuerpos autofágicos utilizando concanamicina A(ver materiales y métodos) y midiendo la expresión de los genes ATG8s mediante PCR en tiempo real.

En la figura 16 se puede visualizar la acumulación de cuerpos autofágicos luego de 24 horas de incubación en oscuridad con 1µM de concanamicina A. Lo anterior no fue observado en ninguno de los controles.

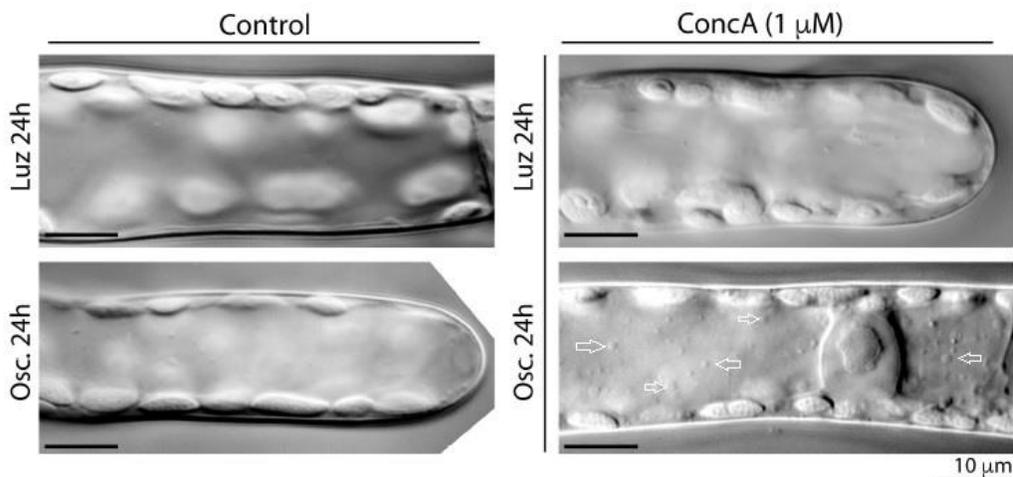


Figura 16. Visualización a través de microscopía de interferencia de contraste diferencial (DIC) de cuerpos autofágicos (flechas blancas) en colonias expuestas a 24 horas de oscuridad y tratadas con concanamicina A.

Se midieron los niveles de expresión de los genes PpATG8s en dos condiciones de 24 horas de oscuridad, con y sin adhesión de 2% de sacarosa. En ambos tratamientos se observó inducida la expresión de todos los genes siendo Atg8a, e y f los que presentaron niveles mas elevados (Tabla 1).

Tabla 1. Expresión de los genes PpATG8s en colonias expuestas a 24 horas de tratamientos: oscuridad y oscuridad mas 2% de sacarosa, en relación a condiciones normales de luz. Números mayores a 0 indican sobreexpresión.

| Gen | Log ₂ Oscuridad/Luz ±Desvío estándar | Log ₂ Oscuridad +Sacarosa/Luz ±Desvío estándar |
|-------|---|---|
| Atg8a | 2,11±0,11 | 1,71±0,30 |
| Atg8b | 1,62±0,11 | 1,86±0,31 |
| Atg8c | 1,76±0,19 | 1,51±0,32 |
| Atg8d | 0,74±0,16 | 1,06±0,31 |
| Atg8e | 1,72±0,34 | 2,02±0,34 |
| Atg8f | 2,23±0,15 | 2,02±0,30 |

5. Obtención de una construcción mEGFP-PpATG8a

Con el fin de crear una línea de *P. patens* en la cual se pueda visualizar el proceso de autofagia *in vivo* se diseñó una construcción en la cual el gen reportero de la proteína

fluorescente mEGFP en posición N-terminal se encuentra fusionado a la proteína PpAtg8a. Se diseñaron los cebadores específicos para amplificar ambas secuencias por separado y luego fusionarlas utilizando la técnica de amplificación de extensión por solapamiento (SOE PCR)(Tabla suplementaria 1, Fig 17. A). Se realizaron dos reacciones de PCR, para amplificar las secuencias de mEGFP(720 bp) y de PpAtg8a(369 bp), luego fueron purificados los respectivos productos. A continuación los mismos fueron combinados obteniéndose el producto de fusión mEGFP-PpAtg8a(1089 bp) (Fig 17. B).

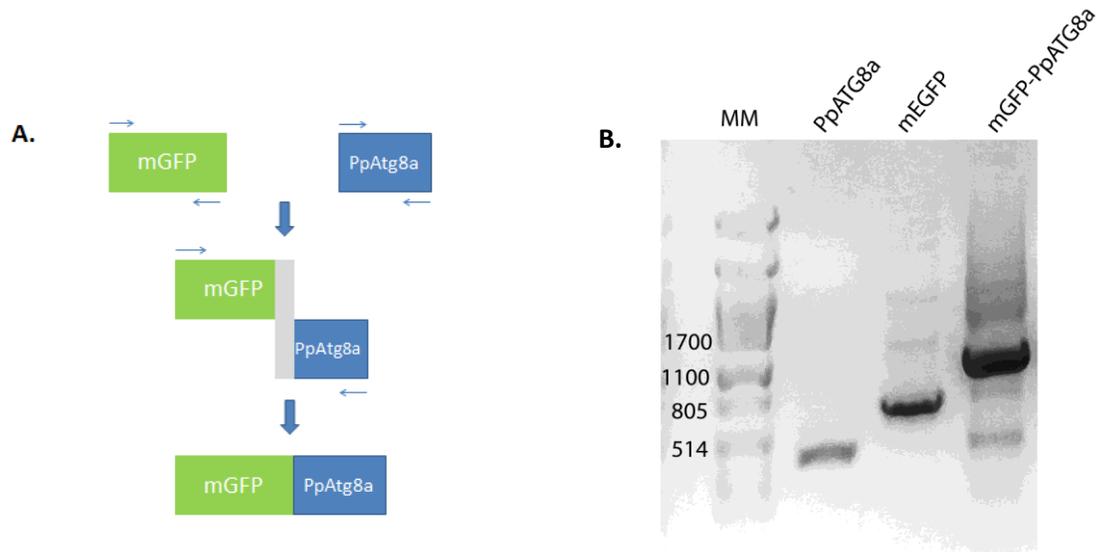


Figura 17. A. esquema representativo de las distintas PCRs. B. PCR de los distintos fragmentos.

El fragmento obtenido será clonado en el vector pTKUbi que posee el promotor constitutivo de maíz para ubiquitina, el gen de resistencia al antibiótico higromicina, y 1000 bp de las regiones 5' y 3' del gen Pp108 que permitirán la inserción del mEGFP-*PpATG8a* por recombinación homóloga en dicho locus (Fig 18). Como consecuencia, la línea de *P. patens* resultante expresará en forma constitutiva mEGFP-PpATG8a. En condiciones de crecimiento óptimas PpATG8a tendrá una localización citosólica, mientras que en condiciones inductoras de autofagia estará localizada en los autofagosomas como consecuencia de la activación de esta proteína.

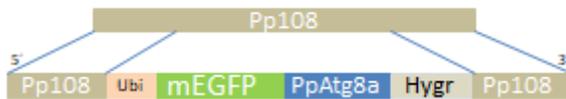


Figura 18. La construcción resultante se insertará en el genoma de *P. patens* por recombinación homóloga del gen Pp108.

DISCUSIÓN

La autofagia es un mecanismo altamente conservado encargado de la degradación de contenidos celulares con el fin de reciclar nutrientes y/o degradar desechos resultado de estreses bióticos, abióticos o de ciertas etapas del desarrollo como la senescencia. En este trabajo se buscó demostrar la importancia del uso de *Physcomitrella patens* en el estudio de la autofagia para poder utilizar posteriormente estos conocimientos en plantas superiores. Varias especies de musgos han sido utilizadas como organismos modelo para el estudio de procesos fisiológicos como la respuesta a hormonas, el crecimiento celular polar y otras vías correspondientes al metabolismo secundario (Thornton et al. 2005). Además, estudios han demostrado la presencia de genes homólogos a genes controladores de la floración cumpliendo funciones claves en el control de las primeras divisiones del cigoto en *P. patens* (Tanahashi et al. 2005). Esto demuestra una clara evidencia de la diversificación funcional de los genes.

El proceso de autofagia es llevado a cabo por una familia de genes conocidos como ATGs (Autophagy related genes). Al realizarse la búsqueda de ortólogos del sistema ATG en *P. patens* se verificó que este se encontraba conservado en el musgo. Es importante destacar la presencia de los genes ATG13, ATG2 y ATG16 en su genoma, los mismos están ausentes en *C. reinhardtii* pero están presentes en plantas superiores. Ante condiciones de disponibilidad óptima de nutrientes, la kinasa TOR (target of rapamicyn) se encuentra regulando negativamente a la autofagia. En dichas condiciones, TOR se encuentra hiperfosforilando a una subunidad de ATG 13(Díaz-Troya et al. 2008), de esta manera ATG13 no puede cumplir su función de activar el proceso de autofagia. ATG2 se encuentra involucrada en la expansión de la membrana del fagóforo ayudando al transporte de lípidos hacia dicha estructura. ATG16 es una proteína dimérica que permite la asociación de ATG12 y ATG5 para la finalización de la activación de ATG8. La presencia

de estas proteínas en *P. patens* convierte a este musgo en una herramienta interesante para estudiar procesos asociados a la autofagia en plantas superiores.

Este primer estudio permitió indagar sobre las relaciones filogenéticas entre varios organismos utilizando las secuencias peptídicas de algunas proteínas implicadas en el proceso de autofagia. Para la construcción del árbol filogenético de ATG8 se incluyeron todas las isoformas de ATG8 de *P. patens* (6 isoformas) y de dos plantas superiores de gran interés científico: *A. thaliana* (9 isoformas) y *G. max* (11 isoformas). También se incluyeron, por su ubicación en la escala evolutiva, las secuencias de los genes ATG8 únicos de *C. reinhardtii* y *K. nitens*. Esta última pertenece a la división Charophyta, grupo último del cual derivan las plantas terrestres. Estudios de su genoma han revelado que posee genes con funciones específicas de plantas terrestres (Hori et al. 2014). ATG8 es una proteína clave para el funcionamiento de la autofagia; permite la expansión de la membrana del autofagosoma, estructura encargada de llevar el cargo a la vacuola. El árbol resultante mostró un antecesor común entre las secuencias de *P. patens* y varias secuencias de ambas angiospermas seleccionadas. Las secuencias de *P. patens* fueron agrupadas junto con todas las secuencias de Clase I. Por otro lado las isoformas K,H e I de *A. thaliana* y *G. max* fueron agrupadas dentro de la Clase II. *P. patens* no posee proteínas de esta clase. Se cree que las proteínas ATG8s de Clase II se encuentran vinculadas a la autofagia selectiva (Kellner et al. 2017). Es importante destacar que *C. reinhardtii* y *K. nitens* fueron agrupados juntos dándole más valor al árbol ya que se sabe que estos dos organismos están más cerca entre ellos en la escala evolutiva que con los demás organismos seleccionados.

Actualmente las herramientas bioinformáticas nos permiten realizar profundos análisis utilizando la información que se encuentra en las bases de datos. Al indagar qué dominios conservados poseía esta proteína en *P. patens* el software derivó, nuevamente, en la proteína asociada al tráfico de membranas intracelulares; ATG8. Además, basándose en estudios realizados en levadura sobre residuos esenciales para la activación de ATG8, se realizó un alineamiento entre ambas secuencias de *P. patens* y *S. cerevisiae*. Todos los sitios se encontraban presentes en la secuencia de nuestro organismo de interés. Por un lado ATG4 reconoce a los residuos F77 y F79, y por otro se sabe que los residuos hidrofóbicos

Y49 y L50 son expuestos como resultado del cambio estructural que sufre ATG8 después de su activación (Amar et al. 2006).

ATG6 juega un papel fundamental en la autofagia, permite la formación del autofagosoma mediante la nucleación de otras proteínas ATG. También se sabe que actúa como regulador negativo de la muerte celular programada en plantas frente a la infección por patógenos (Liu et al. 2005). ATG4, otra proteína importante en el proceso de autofagia, actúa como una proteasa removiendo un residuo de arginina en el extremo carboxiterminal de ATG8 para la posterior activación de este último. Estudios en *C. reinhardtii* demostraron que ATG4 cumple un rol fundamental en la regulación redox de la autofagia. Su actividad depende del potencial redox celular y se requieren potenciales muy bajos para su activación (Perez-Perez et al. 2016). Es interesante destacar que *P. patens*, al igual que *G. max*, presenta dos isoformas codificantes para ambos genes, en cambio en *A. thaliana* ambos genes son de copia única. Al realizarse los árboles filogenéticos de ATG6 y ATG4, ambos presentaron las mismas agrupaciones. Se observó la agrupación de *P. patens* con *M. polymorpha*; ambos organismos se encuentran ubicados en el mismo grupo en la escala evolutiva (plantas terrestres no vasculares- Briófitas *sensu latu*). Esta agrupación presentó un ancestro en común con todas las plantas vasculares seleccionadas para el análisis. Estos resultados sugieren que existe un grado de conservación de funciones para ambos genes.

Los resultados anteriores apoyan la hipótesis de utilizar a *P. patens* para estudios funcionales de procesos conservados.

En los experimentos de inducción de senescencia por déficit nutricional se observó que el déficit de carbono tuvo efectos negativos más severos que el déficit de nitrógeno sobre el crecimiento y desarrollo de *P. patens*. Las mediciones de área y peso fresco demostraron que las colonias expuestas a tratamientos de oscuridad tuvieron un crecimiento reducido. Esto también se vislumbró en la cuantificación y en el fenotipo de los gametóforos. Estudios en mutantes *atg* con pérdida de función en *A. thaliana* sometidos a 9 días de oscuridad presentaron una disminución en el contenido de clorofilas y en la eficiencia máxima del fotosistema II (Fv/Fm), además de presentar senescencia temprana manifestada fenotípicamente, por ejemplo en hojas cloróticas (Barros et al. 2017). En *P. patens*, se observó una disminución de Fv/Fm en ambos tratamientos de oscuridad, con y sin

nitrógeno. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre el tratamiento de luz sin nitrógeno respecto al control. Esto puede deberse a que en este tratamiento las colonias presentaban un área similar al control en el cual gran parte del mismo fue proporcionado por un desarrollo de rizoides elongados los cuales son fotosintetizantes. También se observó una disminución del contenido de clorofilas en los tres tratamientos con respecto al control, siendo el de luz sin nitrógeno el más afectado. Esto probablemente sea consecuencia a que gran parte del peso de las colonias se correspondía a rizoides los cuales, si bien fotosintetizantes, exhiben un menor contenido de cloroplastos. En este sentido, sería interesante abordar un estudio más detallado de los pigmentos que se sintetizan en *P. patens* en estas condiciones.

En condiciones de oscuridad ocurre una disminución de azúcares solubles, como consecuencia del proceso respiratorio (Barros et al. 2017). En este trabajo, como era de esperarse, se observó una concentración menor de azúcares solubles en los tratamientos de oscuridad. Para tener un conocimiento más detallado de este proceso deberían repetirse estos experimentos de déficit nutricional realizando todas las mediciones antes descritas en distintos puntos en el tiempo, ya que mediante el uso de concanamicina A se observó que el proceso de autofagia estaba ocurriendo a las 24 horas de sometimiento a oscuridad. Sería óptimo también realizar cuantificaciones de almidón y una diferenciación de los distintos azúcares mediante cromatografía.

Como última variable fisiológica relacionada a la fotosíntesis se cuantificaron los niveles de la proteína más abundante de los tejidos fotosintéticos, la enzima Rubisco. Los niveles más elevados se observaron en el control, sin embargo la diferencia fue solo del 40% con respecto a los tratamientos. Esto demuestra que si bien se observa degradación de Rubisco en los tratamientos de déficit nutricional, estos aún presentan altos niveles de la enzima. Como parámetro del estado redox se midió la actividad antioxidante total no enzimática mediante la cuantificación de la capacidad férrico reductora del plasma (FRAP). Se observaron niveles menores en los tratamientos de déficit nutricional con respecto al control.

Los resultados anteriores demuestran que *P. patens* responde a condiciones inductoras de senescencia por déficit nutricional, si bien exhibe cierta resistencia respecto a los días de tratamiento.

Los ensayos de expresión de genes *PpATG8s* demostraron que estos se vieron inducidos en condiciones de déficit de carbono. Sin embargo esta inducción también se observó en el tratamiento con sacarosa (2%) en oscuridad. Esto pudo deberse a que la concentración de carbono adicionada no fue la suficiente como para que las colonias puedan asimilarla de tal manera que este tratamiento actúe como un control. Por otro lado estudios realizados por Bricker y colaboradores demostraron que cuando *P. patens* es crecido en condiciones de luz y 1% de sacarosa, y luego se le aplican tratamientos de oscuridad, se observa crecimiento heterotrófico, de esta forma deducen que el musgo requeriría una aclimatación al crecimiento en medio suplementado con sacarosa antes de ser aplicados los tratamientos (Bricker et al. 2014). A partir de estos resultados sería interesante experimentar si concentraciones mayores de sacarosa y oscuridad inducen estos genes de autofagia.

La regulación de la autofagia frente a estrés oxidativo ha sido estudiada previamente en plantas modelo como *A. thaliana* y se ha demostrado, por ejemplo, que el tráfico de proteínas oxidadas hacia la vacuola ocurre por vía autofágica (Bassham 2007). En este trabajo también se exploró la respuesta de *P. patens* frente a condiciones de estrés oxidativo. Si bien la prueba de viabilidad de células mostró que el tratamiento con paraquat tuvo un efecto negativo sobre las colonias, la medición de la eficiencia del fotosistema II a lo largo del tratamiento no mostró diferencias con respecto al control. Esto puede deberse a que el control y el tratamiento se encontraban bajo una intensidad de luz mas elevada (200 PAR) que la condición de crecimiento normal, probablemente dañando el aparato fotosintético en ambos. Sin embargo, se observaron diferencias en la cuantificación de clorofilas y carotenoides totales. La disminución de clorofilas observada en el tratamiento con paraquat sugiere un daño mayor en el aparato fotosintético respecto al control. En cuanto a los carotenoides, se sabe que estos tienen una acción antioxidante al actuar como neutralizantes de especies reactivas del oxígeno, entre otras funciones (Igielska-Kalwat et al. 2015). Se esperaría que el tratamiento de estrés oxidativo presente mayor cantidad de carotenoides como señal de defensa antioxidante. Sin embargo, se observó lo contrario.

Esto podría atribuirse nuevamente a la intensidad de luz a la cual se encontraban sometidas las colonias del control. Se debería adicionar a este experimento mediciones en colonias crecidas en condiciones de luz normal. Sería ventajoso cuantificar e identificar las EAO resultado de este estrés y estudiar la regulación de los genes de autofagia por luz, para profundizar la respuesta de *P. patens* en esta condición.

La alta frecuencia de recombinación homóloga que exhibe *P. patens* y el hecho de que la generación haploide domine su ciclo de vida, favorece la integración de ADN exógeno en su genoma. En este contexto, se diseñó una construcción en la cual la secuencia codificante de *PpATG8a* se encuentra fusionada con la región codificante de mEGFP. Posteriormente a este trabajo se continuará con la creación de esta línea que permita la visualización del proceso autofágico *in vivo*. El fragmento obtenido en este trabajo será clonado en el vector pTKUbi que posee el promotor constitutivo de maíz para ubiquitina, el gen de resistencia al antibiótico higromicina, y 1000 bp de las regiones 5' y 3' del gen Pp108 que permitirán la inserción del mEGFP-*PpATG8a* por recombinación homóloga en dicho locus. Esta construcción permitirá visualizar el proceso autofágico mediante la sobreexpresión de mEGFP-*PpATG8a*. Esta línea será una herramienta esencial para estudiar el proceso de autofagia bajo todos los tratamientos que se han tratado en este trabajo y futuros experimentos.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten corroborar la hipótesis de que por su grado de conservación genética en la respuesta frente a factores abióticos, bióticos y hormonales; su posición filogenética basal en la escala evolutiva, su alta frecuencia de recombinación homóloga, su simplicidad morfológica y manejo en el laboratorio, *P. patens* es un organismo potencial para investigar el proceso de autofagia en plantas.

BIBLIOGRAFÍA

Amar N, Lustig G, Ichimura Y, Ohsumi Y, Elazar Z (2006) Two newly identified sites in the ubiquitin-like protein Atg8 are essential for autophagy. EMBO reports 7 (6):635-642. doi:10.1038/sj.embor.7400698

- Avin-Wittenberg T, Honig A, Galili G (2012) Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* 249 (2):285-299. doi:10.1007/s00709-011-0296-z
- Barros JA, Cavalcanti JHF, Medeiros DB, Nunes-Nesi A, Avin-Wittenberg T, Fernie AR, Araujo W (2017) Autophagy deficiency compromises alternative pathways of respiration following energy deprivation. *Plant physiology*. doi:10.1104/pp.16.01576
- Bassham DC (2007) Plant autophagy--more than a starvation response. *Current opinion in plant biology* 10 (6):587-593. doi:10.1016/j.pbi.2007.06.006
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry* 239 (1):70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bricker TM, Bell AJ, Tran L, Frankel LK, Theg SM (2014) Photoheterotrophic growth of *Physcomitrella patens*. *Planta* 239 (3):605-613. doi:10.1007/s00425-013-2000-3
- Contento AL, Xiong Y, Bassham DC (2005) Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42 (4):598-608. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02396.x
- Cove D (2005) The moss *Physcomitrella patens*. *Annual review of genetics* 39:339-358. doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.110214
- Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2008) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4 (7):851-865
- Gerlier D, Thomasset N (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods* 94 (1-2):57-63
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataille MP, Avice JC, Masclaux-Daubresse C (2012) Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *The New phytologist* 194 (3):732-740. doi:10.1111/j.1469-8137.2012.04084.x
- Hayward AP, Tsao J, Dinesh-Kumar SP (2009) Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation. *Seminars in cell & developmental biology* 20 (9):1041-1047. doi:10.1016/j.semcd.2009.04.012
- Hori K, Maruyama F, Fujisawa T, Togashi T, Yamamoto N, Seo M, Sato S, Yamada T, Mori H, Tajima N, Moriyama T, Ikeuchi M, Watanabe M, Wada H, Kobayashi K, Saito M, Masuda T, Sasaki-

- Sekimoto Y, Mashiguchi K, Awai K, Shimojima M, Masuda S, Iwai M, Nobusawa T, Narise T, Kondo S, Saito H, Sato R, Murakawa M, Ihara Y, Oshima-Yamada Y, Ohtaka K, Satoh M, Sonobe K, Ishii M, Ohtani R, Kanamori-Sato M, Honoki R, Miyazaki D, Mochizuki H, Umetsu J, Higashi K, Shibata D, Kamiya Y, Sato N, Nakamura Y, Tabata S, Ida S, Kurokawa K, Ohta H (2014) *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature communications* 5:3978. doi:10.1038/ncomms4978
- Igielska-Kalwat J, Goscianska J, Nowak I (2015) [Carotenoids as natural antioxidants]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* 69:418-428
- Kellner R, De la Concepcion JC, Maqbool A, Kamoun S, Dagdas YF (2017) ATG8 Expansion: A Driver of Selective Autophagy Diversification? *Trends in plant science* 22 (3):204-214. doi:10.1016/j.tplants.2016.11.015
- Kim SH, Kwon C, Lee JH, Chung T (2012) Genes for plant autophagy: functions and interactions. *Molecules and cells* 34 (5):413-423. doi:10.1007/s10059-012-0098-y
- Levine B (2005) Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120 (2):159-162. doi:10.1016/j.cell.2005.01.005
- Liu Y, Bassham DC (2012) Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annual review of plant biology* 63:215-237. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105441
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Tallozy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121 (4):567-577. doi:10.1016/j.cell.2005.03.007
- Masclaux-Daubresse C, Chen Q, Have M (2017) Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current opinion in plant biology* 39:8-17. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.001
- Massey A, Kiffin R, Cuervo AM (2004) Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36 (12):2420-2434. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.010
- Minibayeva F, Dmitrieva S, Ponomareva A, Ryabovol V (2012) Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant physiology and biochemistry : PPB* 59:11-19. doi:10.1016/j.plaphy.2012.02.013
- Perez-Perez ME, Lemaire SD, Crespo JL (2016) Control of Autophagy in *Chlamydomonas* Is Mediated through Redox-Dependent Inactivation of the ATG4 Protease. *Plant physiology* 172 (4):2219-2234. doi:10.1104/pp.16.01582

- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud PF, Lindquist EA, Kamisugi Y, Tanahashi T, Sakakibara K, Fujita T, Oishi K, Shin IT, Kuroki Y, Toyoda A, Suzuki Y, Hashimoto S, Yamaguchi K, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Anterola A, Aoki S, Ashton N, Barbazuk WB, Barker E, Bennetzen JL, Blankenship R, Cho SH, Dutcher SK, Estelle M, Fawcett JA, Gundlach H, Hanada K, Heyl A, Hicks KA, Hughes J, Lohr M, Mayer K, Melkozernov A, Murata T, Nelson DR, Pils B, Prigge M, Reiss B, Renner T, Rombauts S, Rushton PJ, Sanderfoot A, Schween G, Shiu SH, Stueber K, Theodoulou FL, Tu H, Van de Peer Y, Verrier PJ, Waters E, Wood A, Yang L, Cove D, Cuming AC, Hasebe M, Lucas S, Mishler BD, Reski R, Grigoriev IV, Quatrano RS, Boore JL (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319 (5859):64-69. doi:10.1126/science.1150646
- Schaefer DG, Zryd JP (1997) Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 11 (6):1195-1206
- Schaefer DG, Zryd JP (2001) The moss *Physcomitrella patens*, now and then. *Plant physiology* 127 (4):1430-1438
- Tanahashi T, Sumikawa N, Kato M, Hasebe M (2005) Diversification of gene function: homologs of the floral regulator FLO/LFY control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 132 (7):1727-1736. doi:10.1242/dev.01709
- Thelander M, Olsson T, Ronne H (2005) Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*. *Journal of experimental botany* 56 (412):653-662. doi:10.1093/jxb/eri040
- Thimann KV, Tetley RR, Van Thanh T (1974) The Metabolism of Oat Leaves during Senescence: II. Senescence in Leaves Attached to the Plant. *Plant physiology* 54 (6):859-862
- Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C, Stead AD (2003) Defining senescence and death. *Journal of experimental botany* 54 (385):1127-1132
- Thornton LE, Keren N, Ohad I, Pakrasi HB (2005) *Physcomitrella patens* and *Ceratodon purpureus*, mosses as model organisms in photosynthesis studies. *Photosynthesis research* 83 (1):87-96. doi:10.1007/s11120-004-5577-3
- Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 333 (1-2):169-174

- Wang CW, Klionsky DJ (2003) The molecular mechanism of autophagy. *Molecular medicine* 9 (3-4):65-76
- Xiong Y, Contento AL, Bassham DC (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42 (4):535-546. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02397.x
- Yemm EW, Willis AJ (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical journal* 57 (3):508-514

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por incentivar me a seguir mis pasiones. Gracias a mis padres por inculcarme los mejores valores y a mi hermana Rocío por ser una gran amiga. Sin ellos no hubiera llegado a escribir estas líneas.

A mis amigos de toda la vida. A mis amigos de la facultad por compartir conmigo el transcurso de esta carrera tan hermosa. Ellos fueron mi sostén en momentos difíciles y son parte de mis recuerdos más vívidos.

A mi directora Laura por ser la mejor guía para esta etapa final de mi formación y por darme a conocer lo excelente persona que es. A mi codirector Ramiro por todo su aporte en esta tesina y por invitarme a formar parte de este hermoso grupo de fisiología.

A mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y darme su opinión. Especialmente Tomi, Nacho, Ale y Flor, con los cuales pude formar una linda amistad.

Y por último a mi Tribunal de Tesina, que de manera altruista formaron parte de este proceso y me obsequiaron parte de sus horas.

Anexo

```

Query 2  KSTFKSEYPF EKRRKAE SERIADR FKNRI FVICEKAEKSDIPEIDKRKYI V PADLTVGQFV 61
          K++FK E+P EKR+AE+ RI D++ +RIFVI EKAEKSDIP+IDK+KYLVPADLTVGQFV
Sbjct 3  KNSFKQEH PLEKRQAE AARIRDKYPDRI FVIVEKAEKSDI PDIDKKKYI V PADLTVGQFV 62

Query 62 YVIRKRIMLPPEKAIIFVNDL PPTAALMSAIYQEHKDKDGF LYVTYS GENTFG 116
          YVIRKRI L EKAIFIFV + LPPTAA+MS+IY EHKD+DGFL Y TYSGENTFG
Sbjct 63 YVIRKRIKLSSEKAIIFVKNVLPPTAAMSS IYDEHKDE DGF LYFTYS GENTFG 117
  
```

Figura suplementaria 1. Alineamiento de las secuencias de Atg8 de *Saccharomyces cerevisiae* (Query 2) y *Physcomitrella patens* (Sbjct 3). En verde se marcan los residuos conservados para el reconocimiento de Atg4 y la posterior lipidación (activación) de Atg8.

Tabla suplementaria 1. Secuencias de primers utilizados para amplificar cDNA y plásmidos.

| Nombre | Secuencia (5' - 3') | Tm (°C) | Secuencia correspondiente |
|--------|--------------------------------------|---------|---------------------------|
| MP01 | CACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT Fw | 65.8°C | >mEGFP |
| MP02 | ACTCTTCGCCATCTTGTACAGCTCGTCCATGCC Rv | 66.9°C | >mEGFP >Pp3c14_15110 |
| MP03 | GAGCTGTACAAGATGGCGAAGAGTTCTTTCAAG Fw | 63.2°C | >mEGFP >Pp3c14_15110 |
| MP04 | CTAACACCCGCTCGCTCCTCCGAACGT Rv | 65.8°C | >Pp3c14_15110 |