



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Ciencias Biológicas

Rol de la autofagia inducida por déficit nutricional en la briofita Physcomitrella patens

Tesinista: Juan, Finello

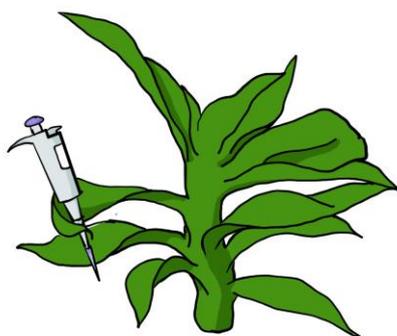
Firma:.....

Directora: Laura Lucía, Saavedra Borelli

Firma:.....

Codirector: Claudio Alejandro, González

Firma:.....



Cátedra de Fisiología Vegetal

Año 2019



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Ciencias Biológicas

Rol de la autofagia inducida por déficit nutricional en la briofita Physcomitrella patens

Tribunal examinador

Marcelo, Desimone:

Firma:

Anahi, Turina:

Firma:

Leonardo David, Amarilla:

Firma:

Calificación:

Fecha:

Índice

Resumen.....	5
Introducción	6
Métodos para el estudio de la autofagia:	8
Autofagia en plantas	10
<i>Physcomitrella patens</i> como modelo de investigación en autofagia.....	11
Autofagia en <i>P. patens</i>	13
Objetivo General	16
Objetivos específicos.....	16
Materiales y métodos	17
Estudio <i>in silico</i> :.....	17
Condiciones de crecimiento:.....	19
Inducción de autofagia:.....	19
Variables fisiológicas y de desarrollo	20
Seguimiento del proceso autofágico.....	20
Variables bioquímicas	21
Análisis estadístico:	22
Resultados.....	23
Filogenia de secuencias peptídicas ATG8.....	23
Inducción de autofagia por déficit nutricional.....	24
PpATG8bpro::GFP-PpATG8b bajo condiciones inductoras de senescencia y autofagia	26
Seguimiento del proceso autofágico.....	30
Estrés nutricional en líneas knockout para autofagia	33
Variables bioquímicas	36
Discusión	39
Conservación de la maquinaria ATG en <i>P. patens</i>	39
Autofagia en <i>P. patens</i> bajo déficit nutricional de C y N.....	42
Inducción de senescencia.....	42
Potencialidad de la línea PpATG8bpro::GFP-PpATG8b para monitorear autofagia	43
En <i>P.patens</i> autofagia se induce por estrés nutricional.....	44
Déficit nutricional en mutantes atg	45
¿Por qué los mutantes atg de <i>P. patens</i> senescen antes?	46

El suministro exógeno de sacarosa ralentiza la senescencia de mutantes atg sometidos a oscuridad.....	47
Conclusión.....	47
Bibliografía.....	48
Anexos.....	53

Resumen

La autofagia es una de las principales vías de degradación de proteínas y componentes celulares y es un proceso fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular en organismos eucariotas. En plantas, diversos estudios con mutantes en los genes ATG (AuTophagic Genes) evidencian que defectos en la autofagia comprometen la viabilidad, crecimiento, desarrollo, productividad y respuestas a condiciones de estrés abiótico y biótico. Por otra parte, se observa sobrevida y mayor productividad cuando el proceso es aumentado con respecto a sus niveles normales. La utilización de *Physcomitrella patens* como modelo para el estudio de autofagia es reciente y se conoce poco en comparación con otros modelos vegetales. En este trabajo se aporta un análisis filogenético de las proteínas ATG8 de *P. patens* con respecto a otros organismos dentro del clado Viridiplantae, los resultados sugieren que la función se encuentra conservada dentro del grupo. Se realizó también un seguimiento de la evolución de la inducción del proceso en condiciones de déficit nutricional de Carbono y Nitrógeno, utilizando una línea reportera ATG8:GFP. También se estudió el efecto de estas mismas condiciones sobre líneas knockout para autofagia *atg5* y *atg7*. Las mutantes resultaron hipersensibles al estrés y mostraron desbalances metabólicos en condiciones óptimas de crecimiento. Con este trabajo se demuestra que la autofagia cumple un rol fundamental en la supervivencia de *P. patens* frente al déficit de Carbono y Nitrógeno y se sientan las bases para estudiar autofagia en este musgo, que aporta una perspectiva innovadora por sus múltiples características..

Introducción

La homeostasis de los sistemas biológicos a nivel celular se basa en la renovación continua de subunidades individuales, el desmantelamiento de estructuras viejas y dañadas y su reemplazo por otras nuevas. La autofagia desempeña un papel primordial en la vida de los organismos eucariotas como un proceso clave que cumple esta función y así mantiene la proteostasis, confiere tolerancia al estrés y previene el envejecimiento ^{1,2}. El secuestro, traslado y degradación de componentes celulares superfluos o dañados ocurren por autofagia que es, además, la única vía conocida, hasta el momento, para la degradación de organelas enteras ³.

Existen tres tipos de autofagia⁴, los cuales difieren en mecanismos, funciones fisiológicas y especificidad de blanco de degradación: 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 receptor⁵, 2) microautofagia, donde ocurre el secuestro de citoplasma por invaginación de la membrana de la vacuola/lisosoma⁶ 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 membrana, conocidas como autofagosomas ⁷ (Fig. 1).

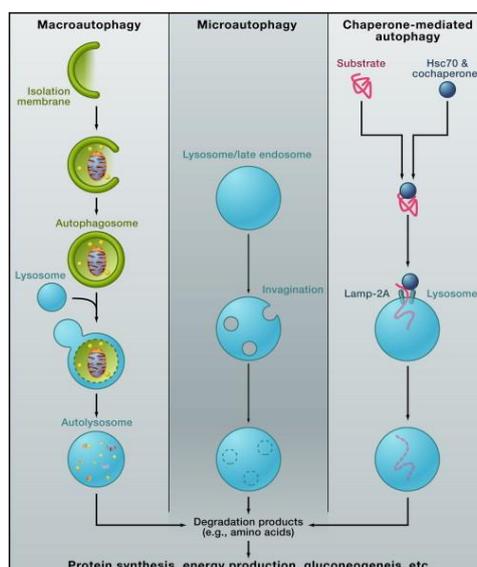


Figura 1. Representación esquemática de los tres tipos de autofagia conocidas en una célula animal. Tomado de Mizushima N (2011)⁴

La macroautofagia (de aquí en más la llamaremos autofagia) es la principal vía descrita en plantas. El proceso *per se* comienza con la formación del fagóforo, que se expande y cierra sobre el cargo, produciendo el autofagosoma. Estudios genómicos y de mutagénesis han permitido la identificación de varios genes de autofagia (ATG, Autophagy Genes), requeridos para la formación de esta estructura y que se encuentran altamente conservados en levaduras, animales y plantas⁸. Finalmente, el autofagosoma, se fusiona con un compartimiento endolítico, la vacuola, donde el cargo es degradado. Esta serie dinámica de eventos (Fig. 2) definen el proceso autofágico, en el cual se describen los siguientes componentes principales:

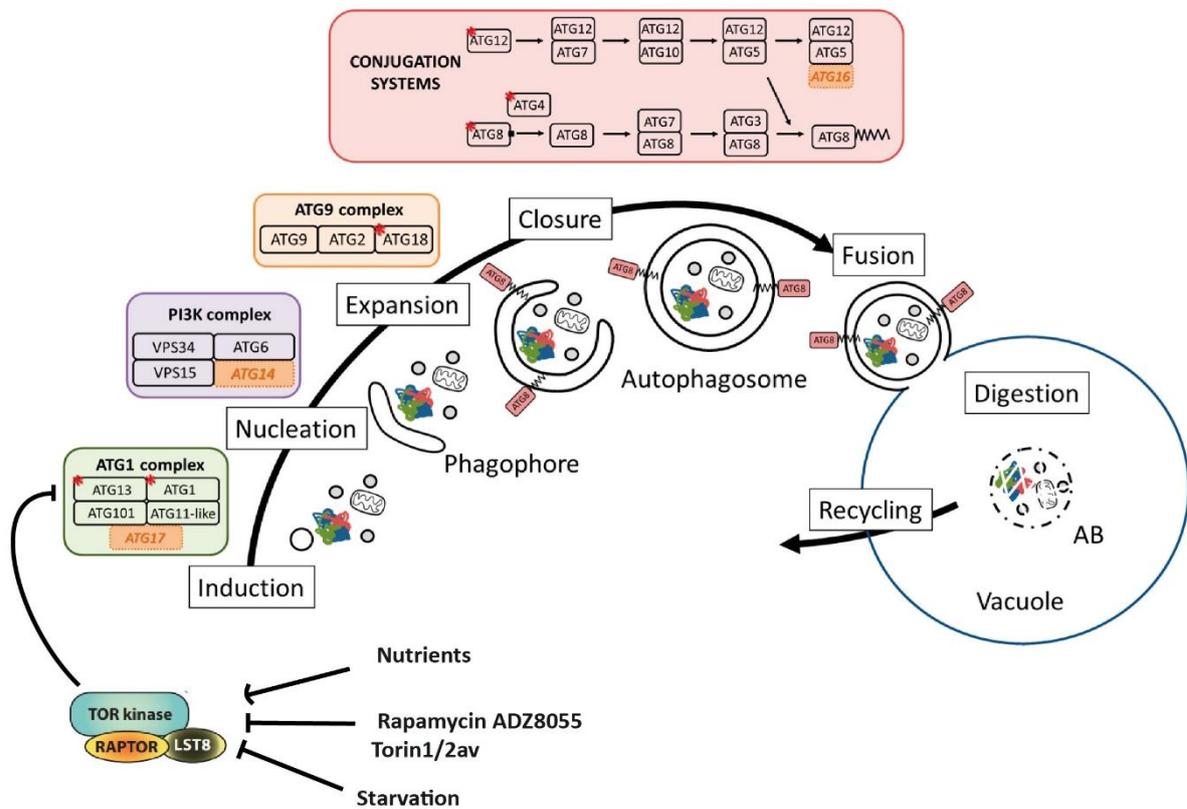


Figura 2 Esquema representativo del proceso de Macroautofagia descrito en plantas, modificado de Marion, J (2018)⁹ y Marshall, R. S (2018)¹⁰

i) TOR1 (Target of Rapamycin) ejerce una regulación negativa de la autofagia bajo condiciones óptimas de crecimiento, por hiperfosforilación de ATG13, impidiendo la formación del complejo ATG1/ATG13. Por el contrario, bajo una condición con alguna deficiencia nutricional de C o N, TOR1 es inhibida dando lugar a la activación de autofagia

ii) El complejo PI3K (Vps34)/ATG6 (Beclin1)/ATG14/Vps15. 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), que reclutan proteínas efectoras para la formación del autofagosoma confiriendo identidad a dicha estructura para ser reconocida por la vacuola ¹².

iii) ATG8, durante la formación del autofagosoma, permite la expansión de la membrana del mismo. A su vez, la proteína ATG8 es un excelente marcador de autofagia, debido a que se localiza en el autofagosoma desde su formación hasta su degradación. 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). La conjugación de ATG8 con PE, requiere una activación previa por la proteasa ATG4. 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, varias proteínas participan en el transporte del autofagosoma hacia la vacuola y su fusión con el tonoplasto, entre ellas los factores v-SNARE, CFS1, FREE1 y VPS2.1. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con el tonoplasto y la vesícula resultante, denominada cuerpo autofágico, se descarga en el interior de la vacuola. Este último libera su contenido para su degradación y la posterior generación de materiales para su reutilización.

Métodos para el estudio de la autofagia:

Actualmente, existen descritas en la bibliografía diferentes técnicas enfocadas a determinar el número de autofagosomas y el flujo autofágico, que incluyen ensayos bioquímicos y técnicas de visualización de autofagosomas por microscopía. Entre los métodos para visualizar autofagosomas, se destaca la utilización de líneas reporteras GFP-ATG8, donde la proteína fluorescente verde (GFP) se encuentra fusionada, por transgénesis, a la proteína ATG8 y el constructo puede ser observado por microscopía.

Se utiliza ATG8 para esta construcción, ya que es un elemento central en el proceso autofágico y además tiene la característica única de localizarse “decorando” el autofagosoma a lo largo de su ciclo de vida, inclusive una vez dentro la vacuola ¹³. La expresión de GFP-ATG8 *in planta* puede ser transiente o estable, bajo la regulación de promotores endógenos o constitutivos. En condiciones óptimas de crecimiento, la fluorescencia emitida por la construcción GFP-ATG8 que expresa la línea reportera, se localiza en el citoplasma con un patrón difuso, pudiendo también observarse alguna estructura punteada que representan autofagosomas resultantes de autofagia basal ¹⁴. Bajo condiciones de estrés, en las cuales se induce el proceso de autofagia el número de estructuras verdes punteadas aumenta en el citoplasma y la vacuola, generalmente de forma proporcional a la severidad del estrés ¹⁵.

La cuantificación de los autofagosomas puede ser utilizada para determinar la evolución de la autofagia bajo determinadas condiciones experimentales¹⁶. Sin embargo, dado que el número de autofagosomas está determinado por la tasa de formación y de degradación, una acumulación de autofagosomas podría ser debida a un aumento de su formación o a una disminución de su degradación, lo cual podría enmascarar resultados y conducir a interpretaciones erróneas. Para lograr una determinación más precisa, la cuantificación de vesículas autofágicas (autofagosomas y cuerpos autofágicos) se realiza también en presencia del inhibidor Concanamicina A (ConcA) que inhibe la H⁺ ATPasa vacuolar, evitando así la acidificación vacuolar e interrumpiendo el tráfico de vesículas entre la red trans-Golgi y la vacuola. La modificación del pH vacuolar ralentiza o impide la degradación de macromoléculas y en consecuencia los cuerpos autofágicos se acumulan en proporción a la actividad autofágica ¹⁵.

Asimismo, los estudios de microscopía se complementan con ensayos bioquímicos de flujo autofágico, definido como la actividad de degradación por autofagia ¹⁷, y que tiene el potencial de proporcionar una evaluación más cuantitativa. Se destaca el uso de inmunotransferencia, con anticuerpos anti ATG8 y anti GFP. En el primer caso podemos ver el ratio de ATG8 lipidado y no lipidado (autofagia activa e inactiva). La relación entre ambas formas existentes, da un indicio del flujo. La inmunotransferencia con anticuerpos anti GFP es una herramienta más útil aún, ya que permite la detección de GFP libre, que se produce en la vacuola después de la degradación del constructo GFP-ATG8 que llega por autofagia. Debido a la diferencia de tamaño entre el constructo y

GFP libre, la separación en la membrana es más fácil de observar que entre ATG8 lipidado y no lipidado. Además, al ser GFP una proteína exógena, no existe riesgo de uniones inespecíficas, que si ocurren en el caso de que existan muchos homólogos de ATG8 en el organismo a estudiar.

Autofagia en plantas

La autofagia de las plantas, comparte muchas características con aquella de los animales y las levaduras pero difiere en otras. En la actualidad, el proceso en plantas, es menos comprendido que en los otros grupos de organismos. Desde que, se induce por condiciones de estrés biótico, abiótico y estrés nutricional (nitrógeno y carbono) ¹⁸, primeramente se pensó y demostró que su función fisiológica es el suministro de productos de degradación hacia órganos en crecimiento ¹⁹. Hoy, después de menos de dos décadas desde los primeros análisis genéticos de la autofagia en el grupo de las plantas verdes ^{18,20}, se sabe que este proceso está implicado en muchos procesos fisiológicos de las plantas. En condiciones favorables, un nivel basal de flujo autofágico cumple las funciones de limpieza y mantenimiento al eliminar el contenido citoplásmico obsoleto. A nivel celular, participa en una serie de procesos vitales, como la degradación de almidón ²¹, el reciclaje de cloroplastos ²², la eliminación de peroxisomas ²³, la señalización de ácido salicílico ²⁴, la citoprotección contra la necrosis ²⁵, y tanto en el inicio como la ejecución de la muerte celular programada ²⁶. A nivel de la planta entera, participa en la resistencia a enfermedades ²⁷ y en procesos asociados al desarrollo, que van desde la maduración de estructuras reproductivas ²⁸, la maduración y diferenciación de tejidos como el xilema ²⁹, hasta la senescencia¹⁹.

La senescencia, es la etapa final en la ontogenia de un individuo o de algunas de sus partes, en organismos bi o plurianuales, y está modulada por factores internos y ambientales, como por ej. una deficiencia de nutrientes ³⁰. La senescencia se caracteriza por ser un proceso dinámico y altamente regulado que, implica una masiva y coordinada muerte celular ³¹ y donde una gran cantidad de compuestos estructurales se desmontan y relocalizan ¹⁹. Esta característica, la vuelve de particular interés agropecuario, ya que una correcta removilización es fundamental para la productividad y la calidad de

semillas en cultivos de importancia económica ^{32,33} como así también en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ³⁴.

Al analizar el rol de la autofagia en la senescencia y relocalización de moléculas de interés fisiológico, queda claro que por un lado, preserva la longevidad celular eliminando proteínas oxidadas y por otro participa en la degradación metabólica de los constituyentes celulares que serán removilizados hacia órganos sumidero ³⁵. Esta doble función está finamente regulada para permitir la supervivencia celular durante el proceso de relocalización.

Cuando la autofagia se encuentra “apagada”, por pérdida de función de los genes de la vía (knockout *atg*), se observa una hipersensibilidad a condiciones de estrés nutricional o en caso de condiciones óptimas de crecimiento, una senescencia temprana. Las líneas *atg* presentan un desbalance C/N, acumulando gran cantidad de moléculas nitrogenadas y una disminución de compuestos carbonados como glucosa, fructosa, sacarosa y almidón ³⁶. Si bien el fenotipo de senescencia temprana por ausencia de autofagia ya ha sido descrito ¹⁹, muchos los detalles de la función de la autofagia en la modulación de la senescencia, aún son desconocidos. En estudios recientes donde se aumentaron los niveles de autofagia en *A. thaliana*, mediante la sobreexpresión constitutiva de genes *ATG*, se pudo observar la supresión del envejecimiento y la fuerte estimulación del crecimiento y la resistencia al estrés nutricional ²⁵.

***Physcomitrella patens* como modelo de investigación en autofagia**

Históricamente en la elección de organismos modelos para la investigación en plantas primaron aquellos pertenecientes a clados superiores; hasta el año 2017 el 95 % de los genomas secuenciados pertenecían al grupo de las plantas con flores (Angiospermas). Sin embargo, en este último tiempo, gracias al avance y mayor accesibilidad de técnicas de secuenciamiento masivo, existe una tendencia hacia la disminución de esta brecha en el secuenciamiento entre los distintos clados.

En el estudio de mecanismos biológicos celulares, o en cualquier fenómeno biológico, la comprensión de la historia evolutiva siempre beneficia el esclarecimiento o entendimiento de principios universales. Pero, para eso, es necesario ampliar el foco y

considerar el cuadro completo, ya que la reducción a un puñado de especies puede llevarnos fácilmente a interpretaciones erróneas.

En este contexto, en el siguiente trabajo se propone el uso de *P. patens* como organismo modelo para el estudio de la autofagia en plantas no vasculares. Este musgo, perteneciente a la familia Furnariaceae, orden Furnariales y al clado de las briofitas, adiciona una perspectiva evolutiva debido a su parentesco con los primeros grupos de plantas que colonizaron la tierra. Como tal posee todas las bases bioquímicas (moleculares y fisiológicas) que habrían favorecido o posibilitado la conquista de la tierra firme por parte de estos linajes.

Asimismo, existen otras características que apoyan el uso de *P. patens* como un modelo de especial interés dentro del área de la biología celular/molecular. La simplicidad de su morfología, que permite la observación de procesos in vivo y el seguimiento de procesos a nivel de células individuales. También se destaca la facilidad para realizar mutagénesis dirigida, *P. patens* es la única planta no vascular que posee una alta frecuencia de recombinación homóloga, similar a la tasa observada en levaduras³⁷, que por muchos años fue una poderosa herramienta de la genómica funcional. Hoy en día, esta última técnica se adiciona al reciente desarrollo de la técnica CRISPR, que hace posible la edición genética en un sinnúmero de organismos.

Otras ventajas de *P. patens* radican en i) el alto grado de conservación en la respuesta frente a factores abióticos, bióticos y hormonales (ej. auxinas, citoquininas y ABA), ii) la dominancia de la generación haploide durante el ciclo de vida que permite la inmediata visualización de fenotipos (Fig. 3) y iii) su rápida velocidad de crecimiento y simplicidad de medio de cultivo³⁸.

Si bien, los organismos modelos tradicionales continúan siendo poderosos para muchas preguntas y debido a la cantidad de herramientas metodológicas que han sido desarrolladas para los mismos, estamos entrando en una era emocionante en el estudio de la biología celular en la que los organismos de estudio pueden seleccionarse cada vez más por sus atributos biológicos únicos en lugar de su capacidad experimental histórica, siendo *P. patens* uno de ellos.

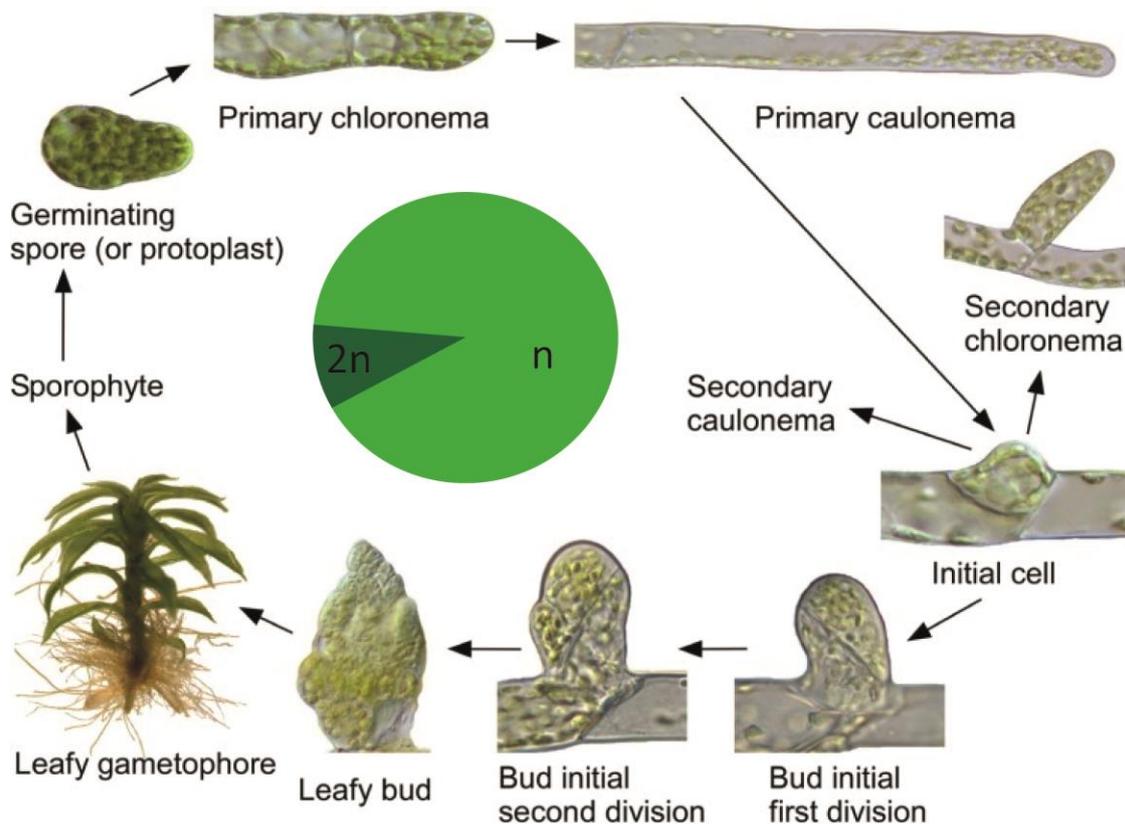


Figura 3 Ciclo de vida de *P. patens*. El gametofito (haploide y autotrófico) se caracteriza por dos estados de desarrollo morfológicamente diferenciados: el protonema (estado juvenil), que consiste en una red filamentosamente de células de cloronema y caulonema, ambas exhiben crecimiento polar; y el 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 estas al alcanzar la madurez. Modificado de Roberts, A (2012)³⁹.

Autofagia en *P. patens*

No es sino recientemente que aparecen los primeros trabajos en *P. patens* sobre autofagia, solamente tres artículos científicos han sido publicados hasta el día de hoy⁴⁰⁻⁴². Con un historial previo tan escaso, abordar este estudio se vuelve una tarea desafiante. *P. patens* tiene muchas características que la vuelven óptima para el estudio en biología celular pero, ¿por dónde empezar?

Por lo expuesto anteriormente, la autofagia en angiospermas es un proceso fundamental, y de interés económico porque está implicada en el llenado de granos y la productividad de semillas. Pero el musgo no tiene flores ni conos reproductivos, ni frutos, ni semillas; su dispersión pasa por esporas haploides que no son órganos de almacenamiento. De hecho, no tiene siquiera diferenciación en verdaderos órganos y la arquitectura de su talo es primitiva, sin auténticas raíces, con filidios muy rudimentarios y elementos conductores apenas diferenciados y escasos. Sin embargo, al igual que las plantas superiores cuenta con la maquinaria genética completa para la ocurrencia de este proceso⁴². Pero... ¿Podemos hablar de un rol de autofagia semejante al de angiospermas?

Según el trabajo de Sánchez Vera (2017) la autofagia en *P. patens* es fundamental en procesos de desarrollo asociados a la maduración de las gametas, y también en respuesta a situaciones de estrés^{40,42}. En respuesta a condiciones de estrés nutricional, en la línea salvaje de *P. patens* se observó que se inducen genes asociados a autofagia y senescencia, y los mutantes *atg5* muestran un fenotipo de senescencia temprana e hipersensibilidad frente a deficiencia nutricional (C/N), semejante al de plantas superiores. Fenotipo que pareciera estar asociado a un desbalance en aminoácidos específicos⁴⁰ y no así a compuestos carbonados como en plantas superiores⁴³.

En lo que respecta a la metodología, Sanchez Vera(2017) contruyó una línea reportera de autofagia en *P.patens*, *PpATG8bpro::GFP-PpATG8b* (Fig. Sup 2), con la que se cuenta en este trabajo. Esta línea posee una inserción en el locus neutral *Pp108*³⁷ que comprende 1500 bp del promotor de *PpATG8b* (Pp1s249_49V6) a continuación de las secuencias codificantes de *GFP* y *PpATG8b*, esta última en posición C-terminal. Lo que resulta novedoso en esta línea es que contiene su promotor endógeno, por lo que la expresión del gen no es constitutiva, sino que responde a los mismos estímulos de inducción que la secuencia original de *P. patens*. Es interesante destacar esta particularidad, ya que la mayor parte de los estudios de autofagia en otras plantas se corresponde a líneas que expresan GFP-ATG8 bajo el control de promotores constitutivos, por ej: el promotor 35S del virus de mosaico de coliflor⁴⁴ o el promotor Ubiquitina 10 de *A. thaliana*⁴⁵, cuya expresión es constante. Esta línea no fue probada

anteriormente para la medición de flujo autofágico, sí en la visualización de vesículas autofágicas.

De acuerdo a la base de datos Physcomitrella eFP Browser (Fig. Sup 3) y los resultados obtenidos por Sánchez-Vera et al., (2017) la expresión de *PpATG8b* ocurre principalmente en las estructuras reproductivas de *P. patens*. Asimismo, Plaza Rojas (2017) demostró, por PCR en tiempo real, la sobreexpresión de este gen en cultivos bajo condiciones de oscuridad.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, se propone a *P. patens* como un organismo potencial para investigar el proceso de autofagia en plantas no vasculares, y se busca estudiar aspectos funcionales, bioquímicos, celulares y fisiológicos de la misma bajo condiciones de estrés nutricional. Como un primer acercamiento a un área de trabajo con el potencial de responder incógnitas actuales sobre el rol de autofagia en las plantas vasculares y no vasculares.

Objetivo General

Estudiar aspectos funcionales, bioquímicos, celulares y fisiológicos de la autofagia en *P. patens* bajo condiciones de estrés nutricional.

Objetivos específicos

- 1) Conocer las relaciones filogenéticas entre secuencias peptídicas ATG8 de *P. patens* y sus homólogos dentro del clado de plantas verdes.
- 2) Evaluar la inducción de autofagia por déficit de carbono (C) y Nitrógeno (N) utilizando la línea reportera de autofagia *PpATG8bpro: GFP-PpATG8b*.
- 3) Evaluar el efecto del déficit nutricional de C y N sobre parámetros bioquímicos y de crecimiento/desarrollo, en la línea salvaje *P. patens* Grandsen y líneas *knockout* para genes *ATG5* y *ATG7*.
- 4) Establecer protocolos y la caracterización de mutantes *atg* y una línea reportera GFP-ATG8 para el estudio de autofagia en *P.patens*.

Materiales y métodos

Estudio *in silico*:

Se seleccionaron 17 organismos para construir las hipótesis filogenéticas de las secuencias peptídicas de ATG8, tomando representantes de diferentes grupos dentro del clado Viridiplantae, incluyendo especies de interés como organismos modelo de investigación, agropecuario y/o posición filogenética (Tabla 1). Utilizando BLASTP de NCBI y BLASTP de Phytozome se realizaron búsquedas en estos organismos de secuencias homólogas a las 9 secuencias peptídicas de ATG8 conocidas en *A. thaliana*. Para obtener un árbol filogenéticos más consistentes y que presente raíz, se adicionó al análisis la secuencias peptídicas correspondiente al homólogo en *Mus musculus* (Ratón), LC3 ⁴⁶

Especie	N° de secuencias ATG8	Grupo taxonómico superior	Abreviación
<i>Arabidopsis thaliana</i>	9	Angiospermas	AtATG8
<i>Triticum aestivium</i>	8	Angiospermas	TaATG8
<i>Amborella trichopoda</i>	3	Angiospermas	AmtATG8
<i>Brassica oleracea</i>	9	Angiospermas	BoATG8
<i>Glycine max</i>	11	Angiospermas	GmATG8
<i>Oryza sativa</i>	4	Angiospermas	OsATG8
<i>Zea mayze</i>	5	Angiospermas	ZmATG8
<i>Solanum lycopersicum</i>	7	Angiospermas	SIATG8
<i>Vitis vinifera</i>	6	Angiospermas	VvATG8
<i>Physcomitrella patens</i>	6	Briofitas	PpATG8
<i>Sphagnum fallax</i>	5	Briofitas	SfATG8
<i>Klebsormidium nitens</i>	1	Charofitas	KnATG8
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1	Clorofitas	ChrATG8
<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	1	Clorofitas	OIATG8
<i>Volvox carteri</i>	1	Clorofitas	VcATG8
<i>Selaginella moellendorffii</i>	3	Lycopodiofita	SmATG8
<i>Marchantia polymorfa</i>	2	Briofitas	MpATG8

Tabla 1 Especies y número de secuencias utilizadas en el análisis filogenético de secuencias ATG8.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa Conserved Domain (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) de NCBI en busca de dominios conservados. El software reconoció en todas ellas un dominio de proteína ubiquitina asociada al receptor GABA (GABARAP) (Fig. Suplementaria 1). 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).

Para el alineamiento se seleccionaron las regiones correspondientes al dominio conservado GABARAP, las cuales fueron alineadas en MEGA7 ⁴⁷ utilizando el algoritmo que implementa MUSCLE, y que considera homologías dinámicas. El alineamiento de secuencias, resultado del análisis, fue a posterior editado manualmente, donde se corroboró la correspondencia entre los aminoácidos pertenecientes a los sitios conservados de GABARAP y también entre las regiones correspondientes a las alfa-hélice y hojas-b específicas de la estructura tridimensional de ATG8 ⁴⁸(Fig. Suplementaria 1). Por último se corroboró que las secuencias contengan el residuo Glicina C-terminal necesaria para el clivaje por ATG4 ⁴⁹ y que dicho sitio se encuentren correctamente alineado.

La hipótesis filogenética se infirió en MEGA7 utilizando el método de Máximo Likelihood basada en el modelo Le_Gascuel_2008 ⁵⁰, el cual utiliza matrices de reemplazo de aminoácidos para calcular las probabilidades de sustitución a lo largo de las ramas de la filogenia y, por tanto, la probabilidad de los datos. El soporte bootstrap fue inferido por 100 repeticiones. El (los) árbol (s) inicial (es) para la búsqueda heurística se obtuvo/obtuvieron automáticamente aplicando Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando un modelo JTT, y luego seleccionando la topología con un valor de log likelihood superior. Se usó una distribución Gamma discreta para modelar las diferencias de tasas evolutivas entre los sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 1.2302)). El modelo se seleccionó utilizando la opción de MEGA7 para probar el modelo que mejor se ajusta a los datos. El análisis involucró 82 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen gaps y datos faltantes. Hubo un total de 104 posiciones en el conjunto de datos final.

Condiciones de crecimiento:

Todas las líneas de *P. patens* (PpATG8bpro: GFP-PpATG8b, salvaje y knockout *atg5* y *atg7*) fueron crecidas en condiciones de cultivo *in vitro* a 25°C, con un fotoperiodo de 16h/8h y con una intensidad luminosa de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Protonema correspondiente a cada línea de *P. patens* fue subcultivado semanalmente en placas de Petri en medio mínimo suplementado con tartrato de amonio (BCDAT) ⁵¹. 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:

Para cada experimento las líneas fueron crecidas *in vitro* en medio completo (BCDAT) durante 7 días en estadio de desarrollo protonema. Posteriormente se formaron manualmente colonias individuales de aproximadamente 1 mm de diámetro, que fueron colocadas en placas de Petri sobre papel celofán con medio de cultivo BCDAT (9 colonias por placa de Petri), las cuales fueron crecidas durante 14 días en medio completo BCDAT. El día 14 fueron transferidas a nuevas placas de Petri con los medios de cultivos correspondientes a cada tratamiento; la transferencia se realizó tomando el papel celofán y colocándolo en la nueva placa.

Tratamientos: condiciones nutricionales inductoras de autofagia/senescencia, puestas a punto por Plazas Rojas (2017):

1. condiciones limitantes de nitrógeno (Luz y medio BCDNaK que carece de NO₃ y NH₄)
2. condiciones limitantes de C (oscuridad y medio completo BCDAT),
3. condiciones de oscuridad en medio completo BCDAT y 4% de sacarosa.

La cosecha de las colonias y las determinaciones se llevaron a cabo en diferentes tiempos de inducción (24 hs, 3, 7 y 14 días). Las colonias fueron cosechadas y luego conservadas a -80°C.

Variables fisiológicas y de desarrollo

Se realizó un seguimiento fotográfico utilizando la lupa SZX16 (Olympus) y escaner Deskjet F380 (HP). Durante el transcurso del experimento se midió el diámetro total de las colonias, escaneando las placas de petri y posteriormente utilizando el software ImageJ ⁵² para determinar el área. Se midió la relación Fv/Fm (daño del fotosistema II) y rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ PSII) de las colonias utilizando un fluorímetro modelo FMS2 (Hansatech) Y el peso de las colonias con una balanza de precisión.

Seguimiento del proceso autofágico

Se tomaron fotografías de las colonias utilizando un microscopio de fluorescencia BX61 (Olympus), objetivo 40X para monitorear la presencia de autofagosomas marcados con la proteína fluorescente GFP, para este objetivo se consideraron células apicales o subapicales de cloronema obtenidas de las periferias de las colonias. Las fotografías fueron editadas y fusionadas en Fiji ⁵³.

Mediante western blot se monitoreó el flujo autofágico cuantificando GFP libre, producto proteólisis de GFP-ATG8 en la vacuola. El nivel de GFP libre indica la tasa relativa de degradación del autofagosoma y se puede usar como una medida de flujo autofágico. La extracción de proteínas para el western blot se realizó con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.2 (25 mM sacarosa, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS), en una relación X ul buffer/mg de tejido. La extracción se realizó en frío y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm a 4 °C. La determinación de proteínas fue realizada por el método de Lowry ⁵⁴. Se cargaron 35 ug de proteína por pocillo en un gel de poliacrilamida al 12%. Luego de la corrida electroforética se realizó una transferencia a una membrana de celulosa. Como anticuerpo primario se utilizó anti GFP a una dilución 1:1000 en buffer TBS (50 mM Tris base pH 7.5, 150 NaCl), con una incubación durante la noche. Como anticuerpo secundario se utilizó a una dilución 1:5000 en TBS Anticuerpo Alkaline Phosphatase (AP) Dilución (Sigma A3687), e incubación 1 hora. Para el revelado se utilizó en 5 ml de TBS

33 μ l de NBT; 16,5 μ l de BCIP. Las membranas fueron escaneadas y la cuantificación de intensidad de banda se realizó en ImageJ.

Variables bioquímicas

Para las pruebas bioquímicas se llevó a cabo una extracción alcohólica: en una relación de 90 mg de peso fresco de colonias en 750 μ l etanol 80%. El material homogeneizado se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos. 60 μ l del sobrenadante fueron destinados a FRAP, luego se resuspendió el pellet y se llevó a baño a 80°C durante 20 minutos. Se centrifugó la mezcla a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos y del sobrenadante se separaron 300 μ l para cuantificación de clorofilas y el resto se destinó a la cuantificación de azúcares solubles, almidón y proteínas.

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 10 μ l de cada muestra por 20 minutos con 90 μ l del mix de reacción y 100 μ l de alcohol 80% ⁵⁵. Las reacciones se realizaron en microplacas para ELISA y 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 μ moles/ μ g Muestra.

Para la determinación de clorofilas y carotenoides se utilizaron los 100 μ l de la extracción alcohólica separado para esta medición. Se midió su absorbancia a 470, 652, 645 y 663 nm mediante espectrofotometría (Thimann et al. 1974). Para el cálculo se utilizó un coeficiente de extinción molar de 39.8 Mm⁻¹cm⁻¹. El resultado se expresó en mg/mg de muestra.

Para la cuantificación de azúcares se incubó 5 μ l de muestra con 45 μ l de etanol 80% y 150 μ l de antrona 0.1% por 10 minutos a 4°C ⁵⁶. 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 μ g/mg Muestra.

Para la determinación de almidón, luego de centrifugar la extracción alcohólica, el pellet se secó a 60 °C toda la noche, y fue resuspendido en agua e incubado a 55 °C toda la noche con amiloglucosidasa 22U/10 ul. Se centrifuga a 1200 xg o 12000 rcf 10'. La reacción que se cuantificó a 550 nm en el espectrofotómetro, luego del baño 5 minutos a 100°C, se generó con 30 ul del sobrenadante, 18 ul de agua y 200 ul de reactivo de summer.

Análisis estadístico:

El Análisis de la varianza (ANOVA) fue utilizado para comparar el efecto de las condiciones nutricionales sobre las líneas en aquellas variables que contaban con el número suficiente de repeticiones (Fv/Fm, PslI). Las comparaciones múltiples se realizaron utilizando el Test de Tukey. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05. Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico INFOSTAT.

Resultados

Filogenia de secuencias peptídicas ATG8

El número total de secuencias peptídicas obtenidas mediante la búsqueda bioinformática fue de 82, cabe aclarar que algunas de ellas corresponden a proteínas cuya función se conoce y coincide con aquella descrita en el proceso autofágico en plantas superiores. Otras son solo putativas, es decir su función es una hipótesis, ya que no existen estudios in vivo que lo demuestren pero que por su similitud de secuencia se

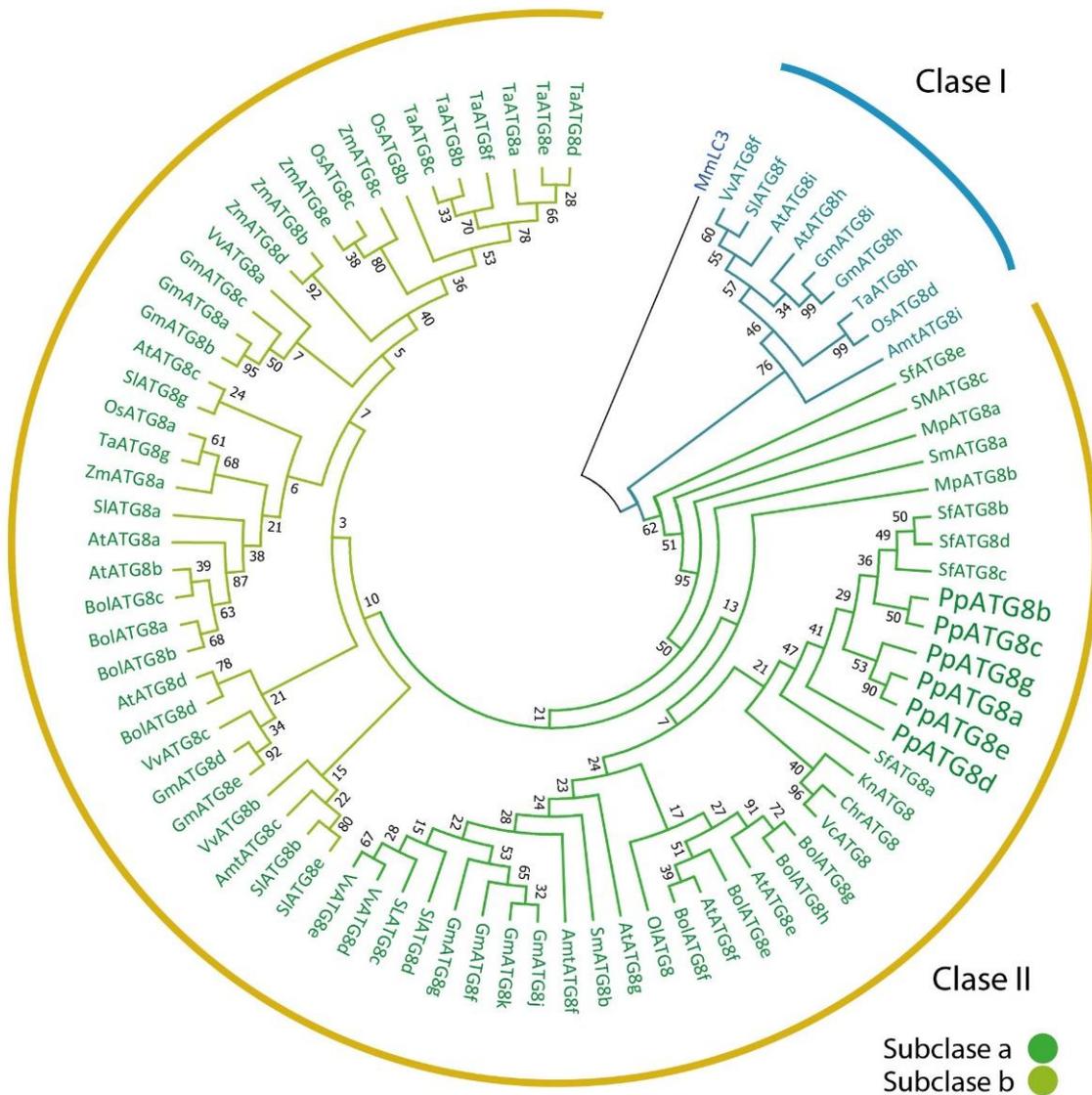


Figura 4 Árbol filogenético de las secuencias peptídicas homólogas de AtATG8. Análisis filogenético molecular por el método de Máximo Likelihood. Sustento bootstrap inferido de 100 repeticiones. Las abreviaciones de las secuencias se encuentran en la Tala 1

consideran homólogas, es decir, que derivan de una proteína ancestral común ⁵⁷.

Según el agrupamiento producto del análisis filogenético se definieron dos clases, Clase I y Clase II (Fig. 4), teniendo en cuenta el patrón de diversificación, los organismos a los que pertenecen las secuencias comprendidas dentro y el sustento bootstrap (Mayor a 50). Dentro de la Clase II se distinguieron dos subgrupos, que si bien carecen del sustento bootstrap necesario como para definir una clase, la agrupación de secuencias se corresponde con aquella que se obtuvo mediante un análisis similar ⁵⁸.

La clase I se compone en su totalidad de secuencias correspondientes a Angiospermas, siendo esta la primera rama en divergir, luego del outgroup, del resto del árbol. Esta clase está conformada por un menor número de secuencias peptídicas, donde se encuentran por ejemplo AtATG8h y AtATG8i, que se diferencian de aquellas en el grupo II en que carecen de los residuos extra a continuación de la glicina conservada el extremo C-terminal ¹⁴.

Todas las secuencias pertenecientes a *P. patens* se agruparon dentro de la Clase II, en la misma subclase con todos los homólogos correspondientes a los representantes seleccionados de los grupos más basales dentro del clado viridiplantae; clorofitas, charofitas, briofitas y lycopodioides. También se encuentran en esta clase secuencias de plantas superiores, como *A. thaliana*, *Glicine max.* *Brassica oleracea*, *Solanum lycopersicum* y *Vitis vinífera*.

Inducción de autofagia por déficit nutricional

Para evaluar la inducción de autofagia en la línea *PpATG8bpro:GFP*, bajo condiciones de estrés nutricional, por microscopía y medir el flujo autofágico mediante western blot, células en estadio de desarrollo “protonema” se sometieron a 24 horas de oscuridad y diferentes concentraciones de sacarosa. Debido a que el déficit de C induce autofagia ^{40,59}, es de esperar que el suministro exógeno de sacarosa, que es un producto de la fotosíntesis, ralentice esta inducción.

La línea *PpATG8bpro::GFP-PpATG8b*, que no había sido utilizada previamente para determinar flujo autofágico por western blot, responde a las condiciones de inducción (Fig. 5). Esto se vio reflejado por un aumento en la banda de GFP libre en el tratamiento de oscuridad, en comparación con el control (luz). Adicionalmente, el tratamiento con 4 % de sacarosa disminuye la GFP libre, sugiriendo una ralentización de la autofagia inducida por oscuridad.

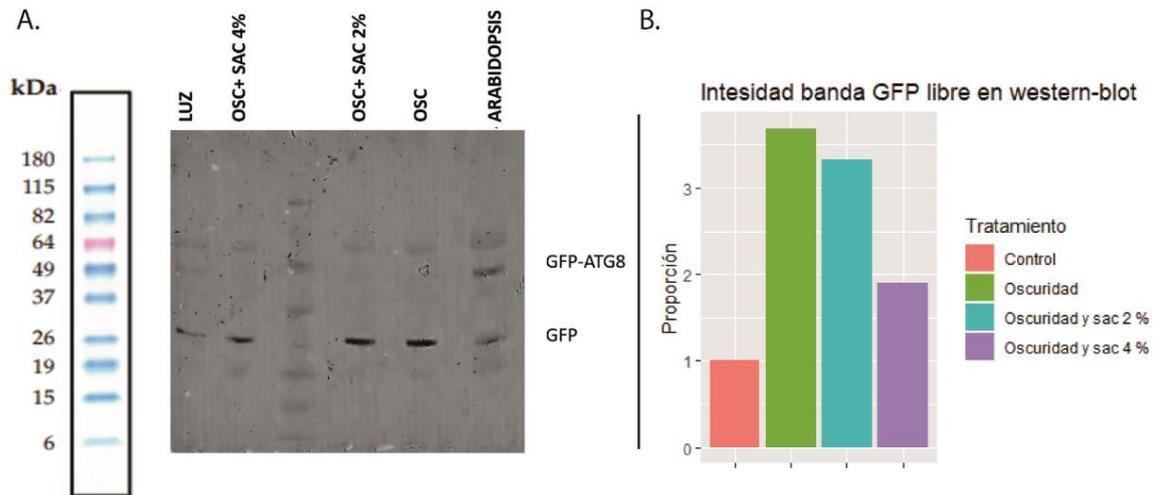


Figura 5 A. Western blot anti GFP de células de protonema de *PpATG8bpro::GFP-PpATG8b* crecidas por 7 días en BCDAT y 24 hs de tratamiento. Condiciones de izquierda a derecha; Luz (control), Oscuridad y 4 % sacarosa, Oscuridad y 2 % de sacarosa, Oscuridad, Muestra correspondiente A. *Thaliana* 35Spro:GFP-AtATG8.

B. Representación gráfica de la intensidad de banda correspondiente a GFP libre en el western blot A, la condición control se toma como valor 1 para estimar la intensidad del resto de las bandas.

En el mismo análisis se incluyó como referencia de peso molecular, una muestra de la línea de *A. thaliana* 35spro::GFP-ATG8a, donde se observan claramente las bandas correspondientes a la fusión GFP-ATG8a y GFP libre. En el caso de *P. patens*, la banda de la fusión GFP-ATG8 se puede observar únicamente y de forma muy tenue en la condición de luz, lo cual parece ser una característica de la línea, posiblemente debida a la naturaleza endógena del promotor.

Diferentes experimentos se realizaron con el objetivo de incrementar la visibilidad del constructo GFP-ATG8 (datos no mostrados) pero en ningún caso se obtuvo un resultado diferente al observado en la figura 5. En consecuencia, la cuantificación del flujo autofágico mediante la relación GFP/GFP-ATG8 no fue posible y se tomó la decisión de

cuantificar solo la banda correspondiente a GFP libre, como medida de la inducción del proceso, siendo conscientes de las limitaciones que eso supone.

PpATG8bpro::GFP-PpATG8b bajo condiciones inductoras de senescencia y autofagia

Con el fin de evaluar la inducción de autofagia frente a un déficit de C y de N se sometió la línea reportera a condiciones inductoras de senescencia⁴², donde se sabe que la autofagia se encuentra por sobre sus niveles basales. Colonias de *P. patens* crecidas durante dos semanas en condiciones óptimas de crecimiento (Fig. 6) fueron sometidas a las dos condiciones de estrés nutricional. Adicionalmente, los ensayos en oscuridad se suplementaron con 4% de sacarosa, que como se demostró previamente (Fig. 5), tendría un efecto ralentizante sobre la inducción. Como control se utilizó la condición de luz en medio con N (BCDAT).

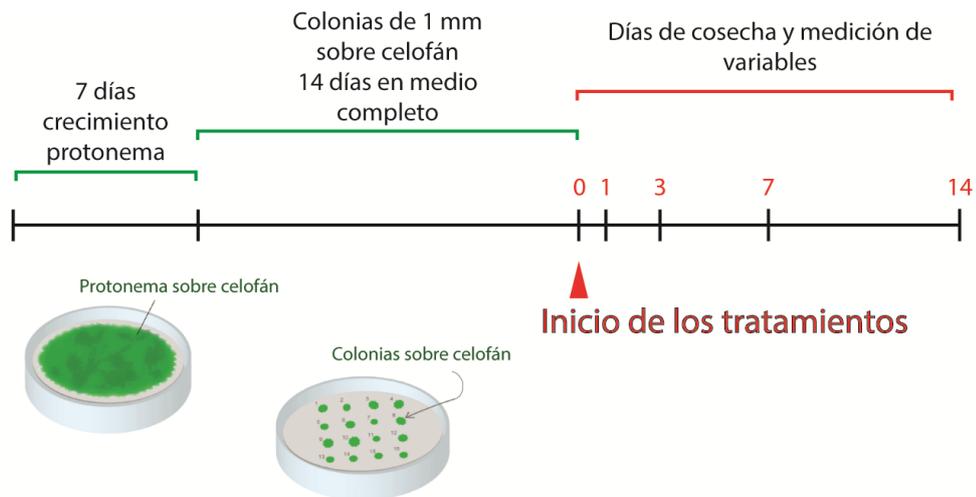


Figura 6 Esquema de crecimiento de *P. patens* para los experimentos realizados.

Después de 14 días de tratamiento, las colonias en la condición control mostraron un crecimiento y desarrollo óptimo: presentado una coloración verde, gran cantidad de gametóforos y rizoides cortos (Fig. 7). Los distintos tratamientos de déficit nutricional tuvieron claros efectos negativos sobre el patrón de crecimiento y desarrollo con respecto al registrado bajo la condición control.

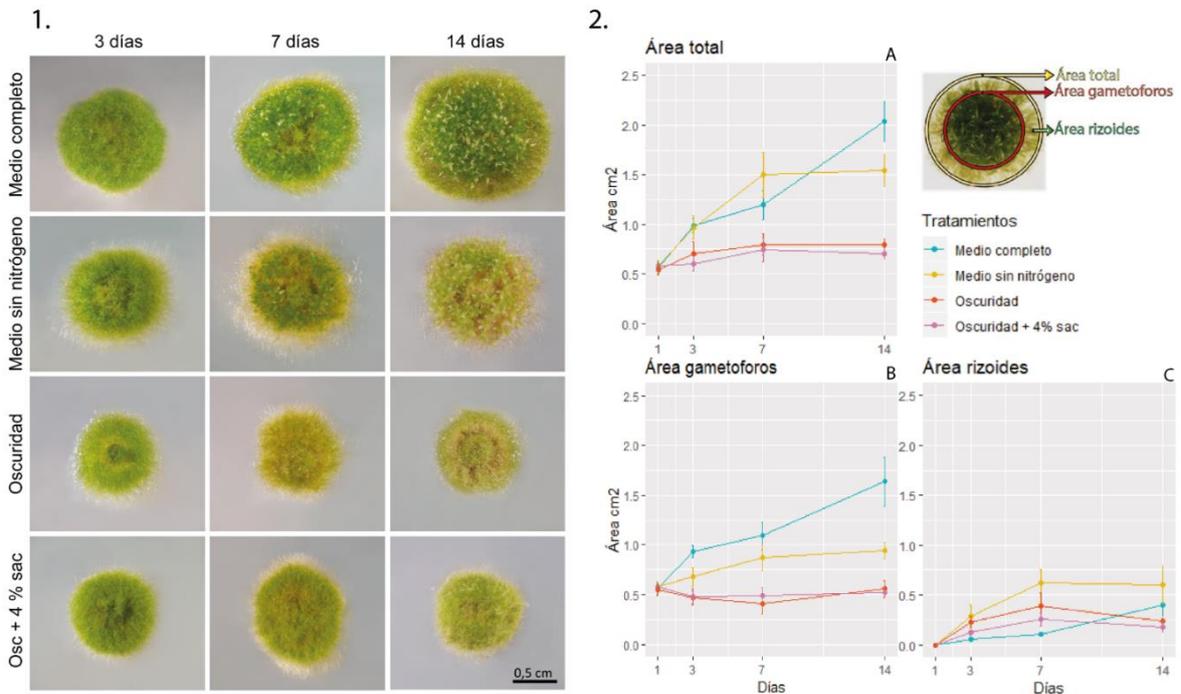


Figura 7.1 Colonias de *PpATG8bpro:GFP-PpATG8b* sometidas a condiciones de estrés de C y N, inductoras de senescencia/autofagia. **7.2** Determinación de área; área gametóforos (parte central sin considerar rizoides), área rizoides, área total (colonia + rizoides). Las determinaciones se realizaron durante los tratamientos inductores de senescencia, después de 14 días de crecimiento en medio completo.

En el tratamiento de oscuridad las colonias mostraron claros síntomas de senescencia, con una coloración amarronada, menor área y escaso desarrollo de gametóforos respecto al control. El tratamiento de oscuridad y 4% sacarosa mantuvo el verdor de las colonias por más tiempo respecto al tratamiento de oscuridad. El fenotipo senescente fue menos severo en el tratamiento de luz sin N, en el cual las colonias se mostraron verdes, con un área y longitud de rizoides mayor con respecto al control (Fig. 9).

En lo que respecta al crecimiento (Fig. 7.2), las colonias bajo el tratamiento control alcanzaron a los 14 días la mayor área total y de gametóforos, con el área ocupada por los rizoides y protonema representando una pequeña porción del total. El

tratamiento sin N alteró el patrón de crecimiento con respecto al control, las colonias mostraron un crecimiento mayor de rizoides. Este fenotipo de alargamiento radicular, y desarrollo de raíces laterales, ha sido ampliamente reportado en plantas superiores como *A. thaliana* frente a deficiencias de N ⁶⁰. En ambos tratamientos de oscuridad el crecimiento se vio ampliamente afectado, la sacarosa no mostró un efecto diferencial sobre el crecimiento en área. La deficiencia de C resultó más severa que la deficiencia de N en lo que respecta al crecimiento en los tiempos evaluados.

La proteína ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) es la más abundante en los tejidos fotosintéticos y su degradación es un indicador de senescencia ⁶¹. Para su estudio, en un gel SDS-PAGE se evaluó el patrón polipeptídico de las colonias en cada uno de los tiempos y tratamientos (Fig. 8). Se observó que la banda correspondiente a la subunidad mayor de Rubisco se vio afectada en su abundancia por los tratamientos de deficiencia de C y N a lo largo del tiempo. Este efecto fue más acentuado en el tratamiento de oscuridad, en la condición de sacarosa al 4% y oscuridad la degradación de esta proteína fue menor que en oscuridad.

El parámetro Fv/Fm mide la eficiencia cuántica del fotosistema II (PSII), que es una medida relativa del daño del mismo. Los valores cercanos a 0.8 son óptimos e indican poco daño, el cual se manifiesta con valores por debajo de estos ⁶². Todos los tratamientos excepto el control mostraron una tendencia a la disminución del valor de Fv/Fm (Fig. 9). En el control, el valor de este parámetro se mantuvo constante a lo largo

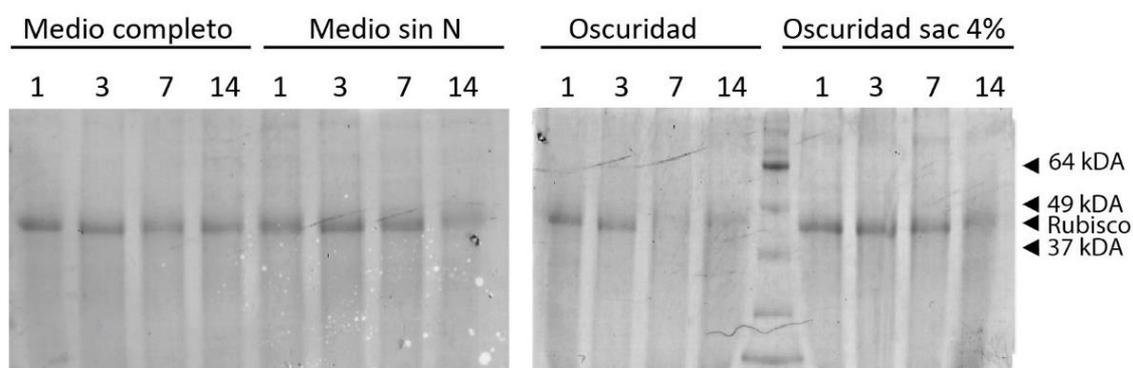


Figura 8 Perfil proteico en gel de poliacrilamida 12% de concentración, tinción con Coomassie. 1=1 días, 3= 3 días, 7=7 días, 4= 14 días

del tiempo y los valores más bajos se observaron en los dos tratamientos de oscuridad, y oscuridad con 4% de sacarosa.

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ PSII), parámetro que valora la cantidad de luz absorbida por el PSII que es transferida a fotoquímica, cuyos valores son óptimos cercanos al 0.8 ⁶³ disminuye en ambos tratamientos de oscuridad, pero no así en el tratamiento de deficiencia de N durante los tiempos evaluados (Fig. 9). Los valores de alto daño y bajo rendimiento cuántico observado en el tratamiento con sacarosa pueden deberse a atrofiación del sistema fotosintético debido a un cambio hacia la heterotrofia disparada por el suministro de azúcar ⁶⁴.

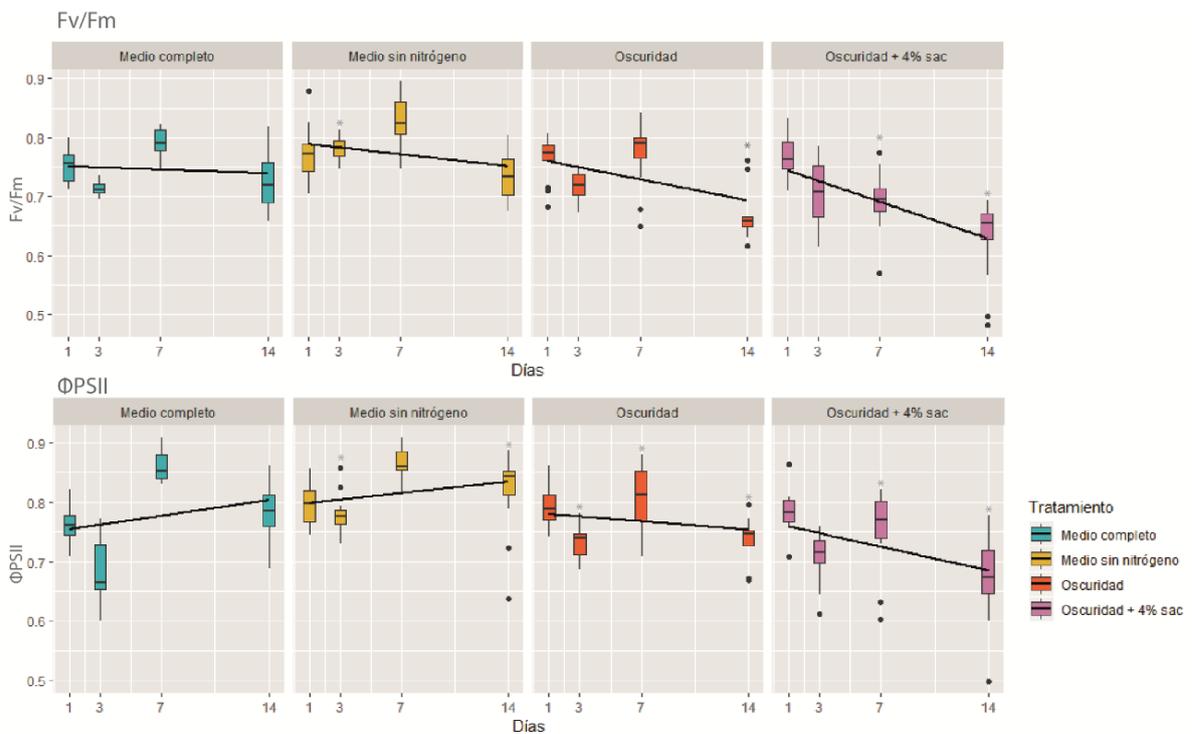


Figura 9 Box plot parámetros fotosintéticos; daño del PsII (Fv/Fm) y rendimiento cuántico del PsII (Φ PSII) durante tratamientos inductores de senescencia. Las columnas representan los diferentes tratamientos y cada box un tiempo. El n para cada punto es e 7 o superior. Los puntos fuera del box representan valores outlier.

Seguimiento del proceso autofágico

Como se observó en el experimento de la Figura 7, en los resultados del western blot (Fig. 10) no fue posible detectar la banda correspondiente al constructo GFP-ATG8, únicamente la banda de GFP libre. La metodología descrita en la bibliografía requiere de la banda del constructo para calcular el flujo autofágico mediante la relación entre GFP libre y GFP-ATG8. En nuestro sistema experimental se cuantificó para cada tiempo (1, 3, 7 y 14 días), la banda de GFP libre de cada tratamiento con relación con la banda GFP libre del control (nivel basal), por encima del cual se considera como inducción del proceso.

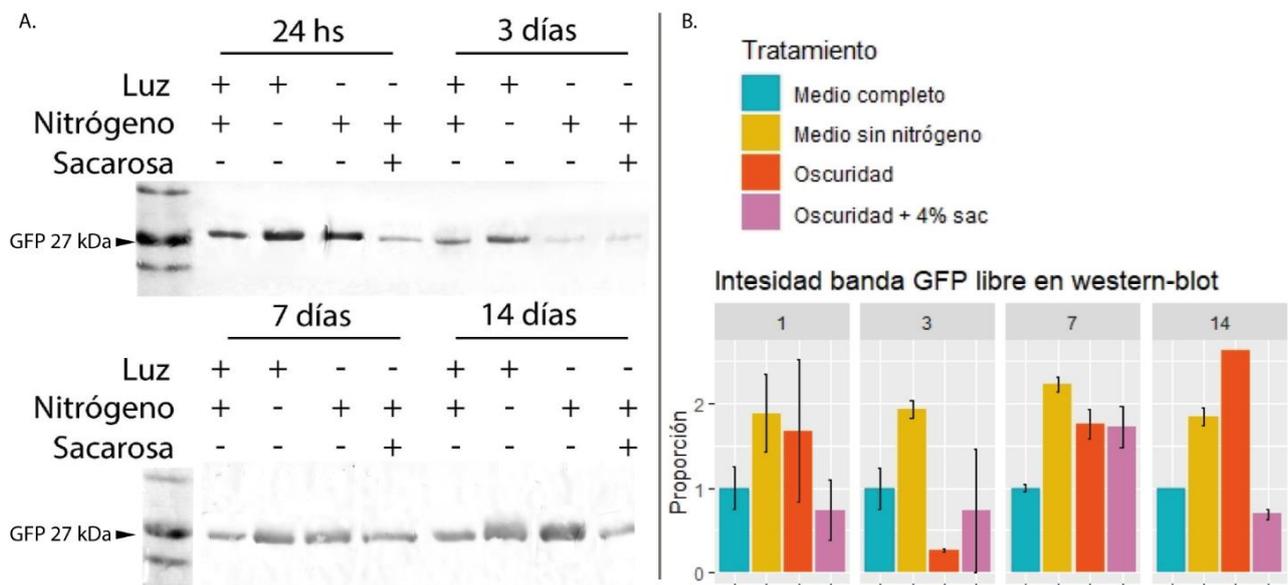


Figura 10 A. Western blot anti-GFP de extractos proteicos de *PpATG8bpro::GFP-PpATG8b* bajo tratamientos de estrés nutricional. B. Intensidad de banda GFP libre del western A, a la intensidad de banda del control en cada tiempo se le asignó 1 como valor para la estimación de la intensidad bajo los tratamientos, en cada condición y tiempo se consideran dos repeticiones.

Los resultados mostraron inducción de autofagia por deficiencia de N en todos los tiempos de tratamiento. También se observó inducción por deficiencia de C, a excepción el día 3 de tratamiento. Con respecto al tratamiento de oscuridad y 4% de sacarosa, la banda de GFP libre respectiva a cada tiempo mostró una intensidad menor que la correspondiente al tratamiento de oscuridad en el día 1 y 14. Los valores para 3 y 7 días son poco concluyentes debido a la discrepancia entre las réplicas.

Paralelamente se realizó un seguimiento por microscopía de fluorescencia para la observación de los autofagosomas marcados con la proteína GFP en la línea *PpATG8bpro:GFP-PpATG8b* (Fig. 11), considerando como indicador de inducción un aumento en el número de estructuras punteadas verdes respecto a la condición control.

A las 24 hs siguientes al inicio de los tratamientos, el control mostró niveles de autofagia observables que continuaron en los primeros intervalos de tiempo, aunque en tiempos posteriores ya no se observó. Se hipotetiza que el estrés causado por el cambio de medio (cambio del celofán con las colonias de una placa de Petri a otra) podría ser la causa de

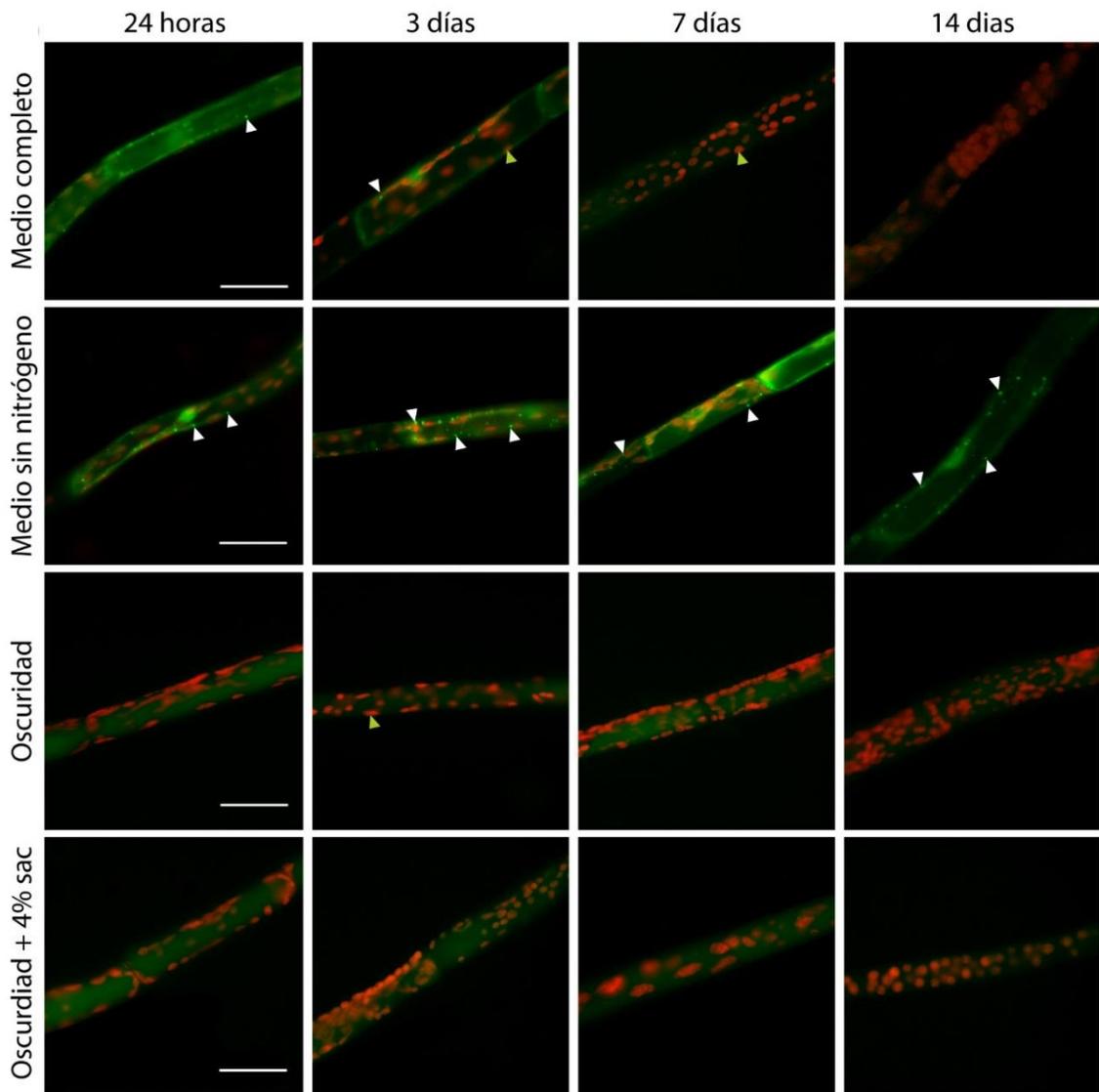


Figura 11 Fotos de microscopia de fluorescencia, aumento 40x. Células apicales y subapicales de *PpATG8bpro:GFP-PpATG8b* en condiciones de estrés nutricional. Barra de escala: 50 μm . Triángulos blancos: Autofagosomas. Triángulos amarillos: Cloroplastos.

que se hayan observado vesículas autofágicas en esta condición y tiempo. El déficit por N fue el tratamiento donde más estructuras verdes punteadas fueron observadas, y esto se repitió durante todos los tiempos de tratamiento, incluso en tratamiento con concanamicina A donde el número de vesículas autofágicas aumenta notablemente (Fig. suplementaria 4). En ambos tratamientos de oscuridad no fue posible la observación de estructuras punteadas durante todo el experimento, siendo el fenotipo observado el de un verde difuso distribuido en toda la célula.

Estrés nutricional en líneas knockout para autofagia

Con el fin de evaluar las consecuencias de la falta de autofagia frente a un déficit nutricional en *P. patens*, se utilizaron líneas knockout recientemente generadas en el laboratorio, para los genes *PpATG5* y *PpATG7* de autofagia. Ambos genes codifican proteínas que son parte del sistema de conjugación del aducto ATG8-PE, el cual es fundamental para la formación del autofagosoma. En *A. thaliana* mutantes para estos genes muestran un fenotipo similar e inhibición total del flujo autofágico⁴⁵.

Colonias de *P. patens* de dos semanas fueron sometidas a las condiciones de estrés nutricional anteriormente mencionadas. Las líneas *atgs* mostraron en condiciones óptimas de crecimiento, un fenotipo senescente observable en el centro de las mismas, ya evidente antes del comienzo de los tratamientos (Fig. 12). Además presentaron un fenotipo hipersensible a los estreses nutricionales, tanto de C como de N. La deficiencia de C resultó más severa, a los tres días del tratamiento de oscuridad ya se observaron

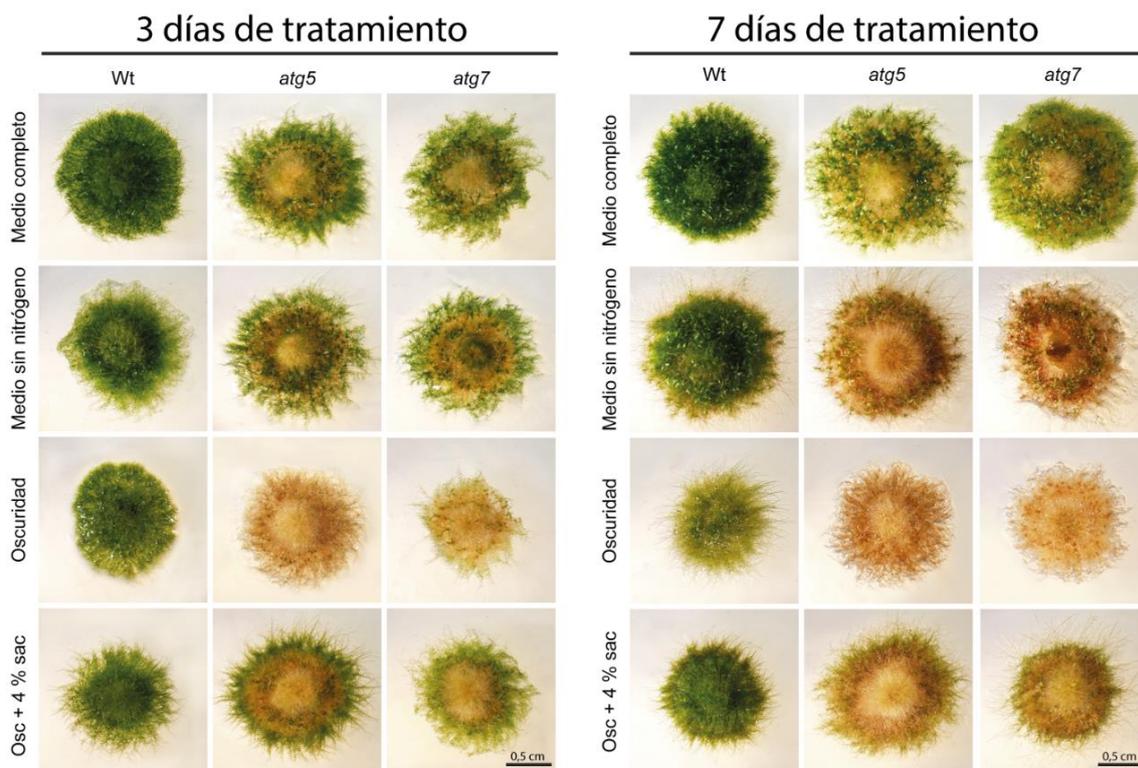


Figura 12 Colonias correspondientes a línea salvaje, knockout *atg5* y *atg7* en 3 y 7 días de tratamiento de deficiencia nutricional. Medio completo y luz, medio sin nitrógeno y luz, oscuridad y oscuridad 4% de sacarosa

colonias completamente cloróticas, mientras que en deficiencia de N un efecto similar se observó recién a los 7 días de tratamiento. En el tratamiento de oscuridad con 4 % de sacarosa las colonias se mantuvieron verdes por más tiempo con respecto al tratamiento de oscuridad, tanto a los 3 como 7 días.

Se determinaron diferentes variables relacionadas a la capacidad fotosintética y al estado bioquímico-fisiológico de las colonias. Las mediciones del daño del fotosistema II (Fig. 13) se evidencian en los mutantes *atg*, a los 7 días en condiciones óptimas de crecimiento poseen niveles de daño significativo con respecto a la línea salvaje. El daño causado por la deficiencia de C resulta más severo que el de N, ya al día 3 de tratamiento, siendo significativamente mayor en el mutante *atg5* con respecto al salvaje. En oscuridad y 4% de sacarosa los valores de daño para *atg7* son significativamente menores, luego de 7 días, que los medidos en oscuridad.

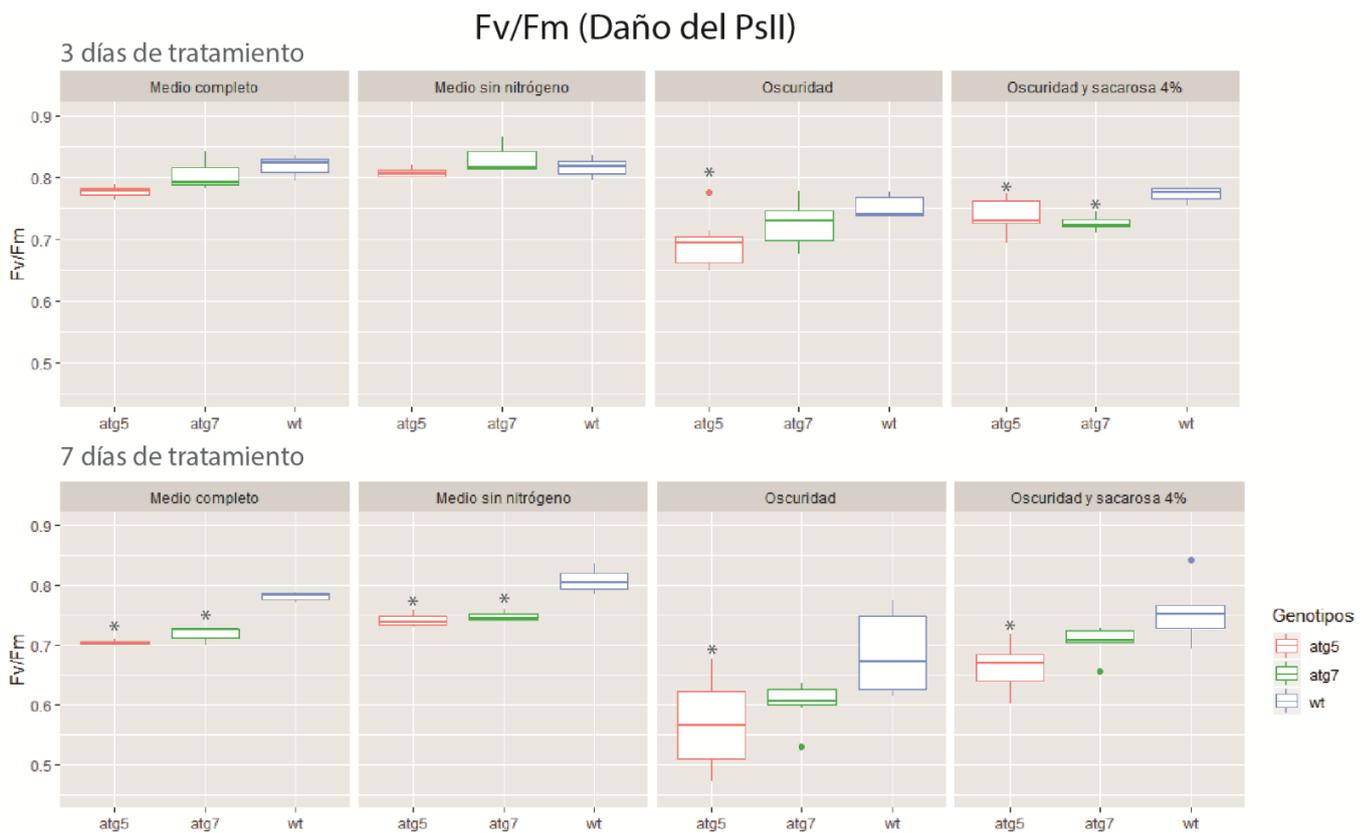


Figura 13 Box plot con determinaciones de daño del fotosistema II (Fv/Fm), en 3 y 7 días de tratamiento. Líneas salvaje, knockout *atg7* y *atg5*. El n utilizado es de 5 mediciones por punto. Los puntos de color representan valores outlier. Los asteriscos sobre los box representan diferencia significativa con respecto al control en ese tiempo y condición.

El rendimiento cuántico en condiciones óptimas de crecimiento también se vio afectado en los mutantes *atg*, que a los 7 días mostraron valores menores con respecto al salvaje (Fig. 14). Nuevamente el efecto de la oscuridad resultó más severo, *atg5* mostró valores significativamente menores con respecto al salvaje ya a los tres días. El tratamiento de oscuridad y 4 % de sacarosa mostró valores de rendimiento cuántico significativamente mayores a los obtenidos en oscuridad para *atg5*.

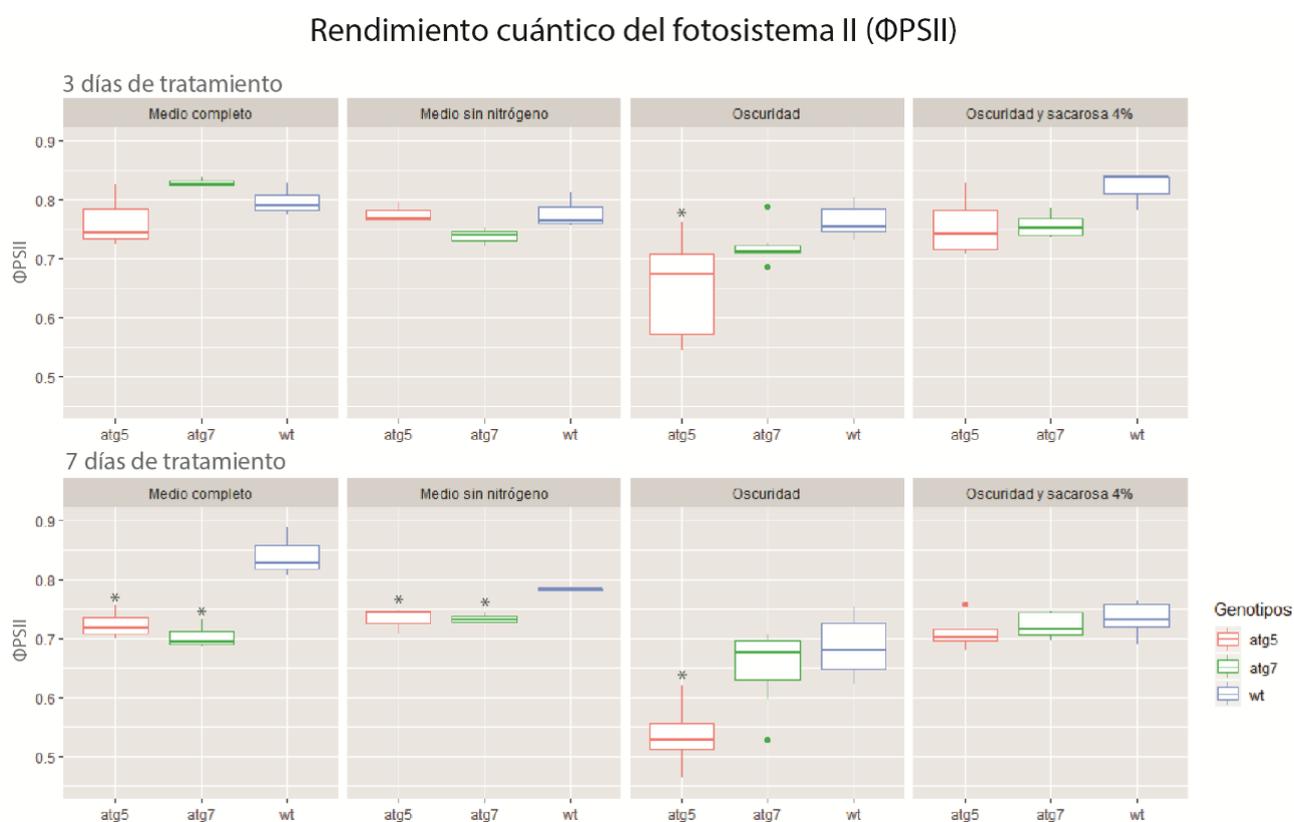


Figura 14 Box plot de determinaciones de rendimiento cuántico (Φ PSII) del fotosistema II, en 3 y 7 días de tratamiento. Líneas salvaje, knockout *atg7* y *atg5*. El n utilizado es de 5 mediciones. Los puntos representan valores outlier.

En lo que respecta al crecimiento en área de las colonias, se observa una disminución en el área total alcanzada por los mutantes en condiciones de estrés nutricional con respecto a la línea salvaje (Fig. 15). En deficiencia de N los mutantes continúan creciendo hasta el día 7 y las diferencias con el salvaje resultan significativas. La oscuridad afectó el crecimiento de todas las líneas.

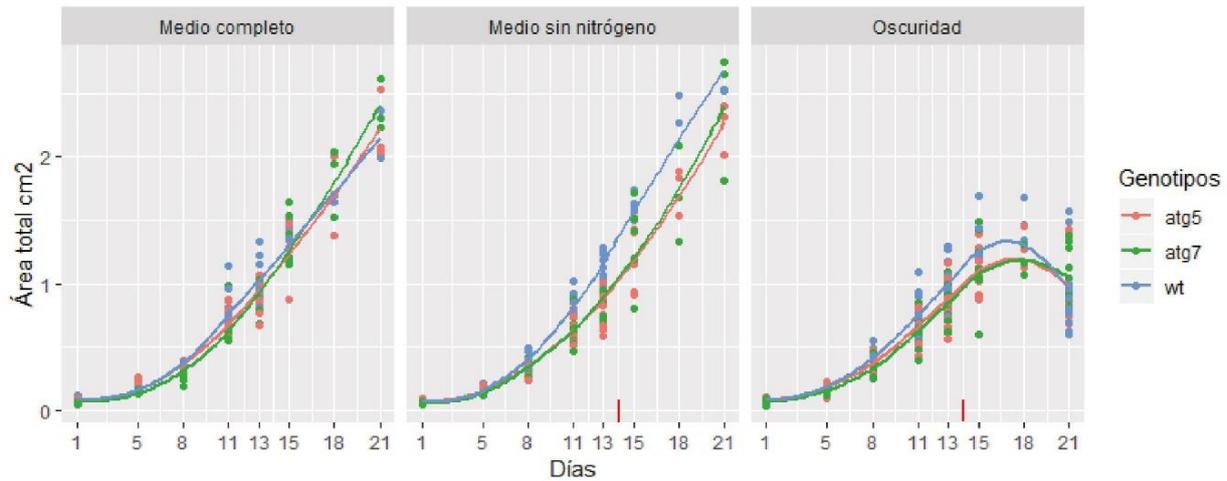


Figura 15 Determinación de área total de colonias de línea salvaje, knockout *atg5* y *atg7* desde el día 0 de crecimiento en medio completo BCDAT hasta cosecha de las colonias los 7 días de tratamiento (21 días en el gráfico). El día 14 inician los tratamientos, marcado con línea roja.

Variables bioquímicas

Como marcador del estado redox, se determinó la capacidad reductora mediante FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) ⁵⁵. Ambas situaciones de estrés nutricional disminuyeron el poder reductor de las líneas (Fig. 16), tanto en los mutantes *atg* como en el salvaje. En deficiencia de N los mutantes mostraron valores más bajos que el salvaje en los últimos intervalos de tiempo analizados (3 y 7 días). En oscuridad, diferencias similares entre genotipos se observaron en las primeras 6 horas de

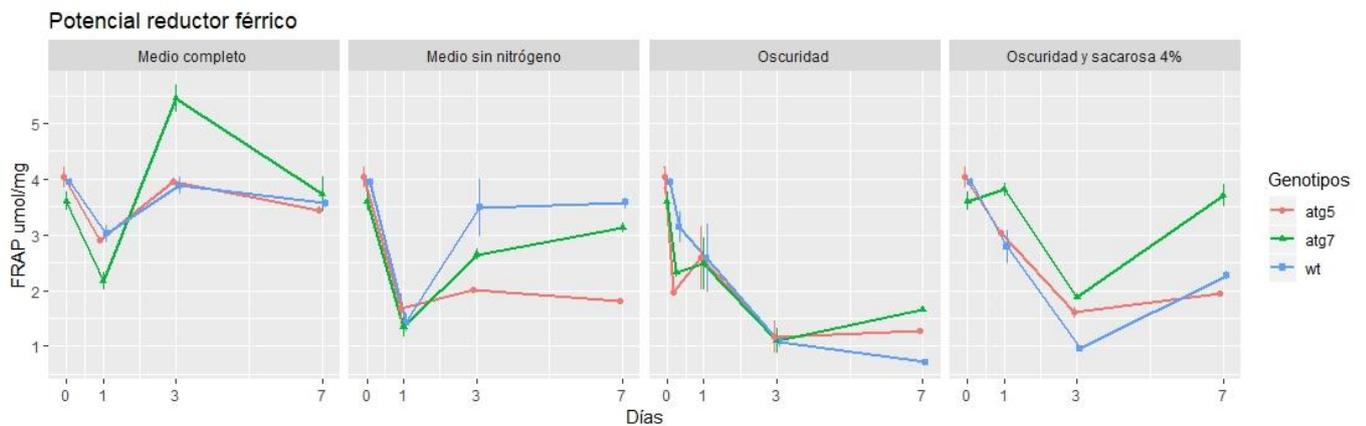


Figura 16. Evolución del FRAP (Potencial férrico reductor del plasma) durante 7 días de tratamiento expresado en umol/mg de peso fresco. Wt: Línea salvaje, knockout: *atg5* y *atg7*.

tratamiento. El tratamiento de oscuridad con sacarosa resultó en valores de FRAP mayores para los mutantes respecto al tratamiento de oscuridad.

También se determinó el contenido de almidón, azúcares solubles y proteínas (Fig. 17). En condiciones óptimas de crecimiento los mutantes *atg* acumularon más proteínas en el tiempo respecto al salvaje. Asimismo, el contenido de azúcares y almidón siempre exhibió valores superiores en el salvaje respecto a los mutantes *atg* al inicio de los tratamientos.

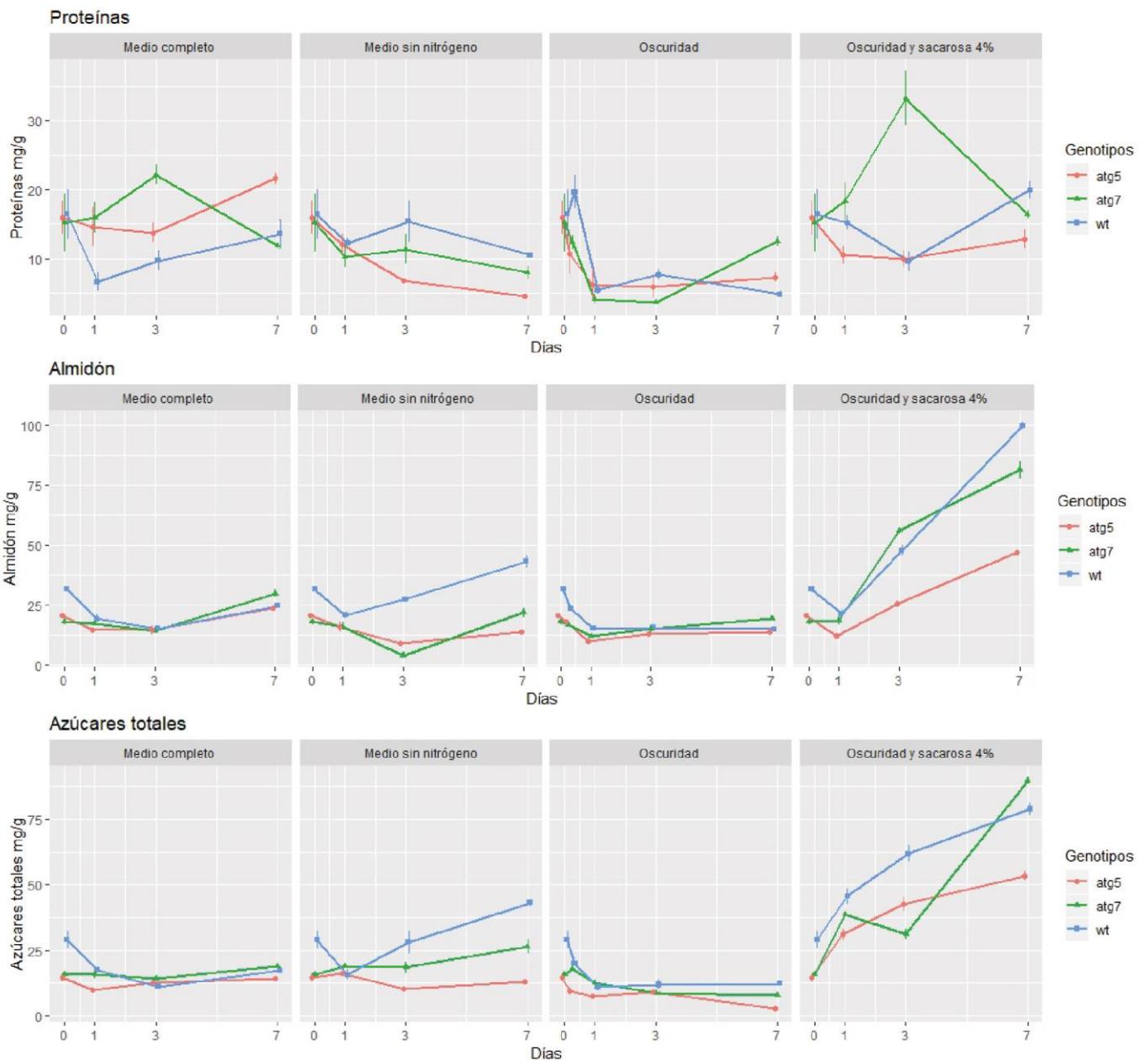


Figura 17 Evolución del contenido de almidón, azúcares solubles y proteínas durante 7 días de tratamiento. Valores expresados en mg/g de peso fresco. Wt: línea salvaje, knockout: *atg5* y *atg7*

Bajo estrés nutricional de N, la línea salvaje acumuló almidón y azúcares solubles. Por el contrario, en los mutantes se observó una disminución de almidón tanto con respecto al salvaje en deficiencia de N, como en comparación con condiciones óptimas de crecimiento. El aumento en proteínas observado en condición control ya no se observa, sino que estas disminuyen a lo largo del tiempo de tratamiento.

En oscuridad, hay una disminución marcada de proteínas y también de almidón y azúcares solubles en todos los genotipos. Se observó una diferencia entre los mutantes y el salvaje únicamente en los primeros puntos de tiempo (6 hs). Las mediciones en el tratamiento de oscuridad y sacarosa corroboran la toma y utilización de este compuesto por las líneas mutantes *atg* y la consiguiente acumulación de almidón y azúcares.

Por último, también se cuantificó el contenido de carotenoides y xantofilas. Los estreses nutricionales disparan los niveles de estos pigmentos, tanto en knockout como en la línea salvaje. El efecto inductor es más marcado bajo déficit de N. Por otra parte, en la línea salvaje la sacarosa moderó el incremento del contenido de pigmentos, con respecto a oscuridad, mientras que lo contrario ocurrió en los mutantes (Fig. 18).

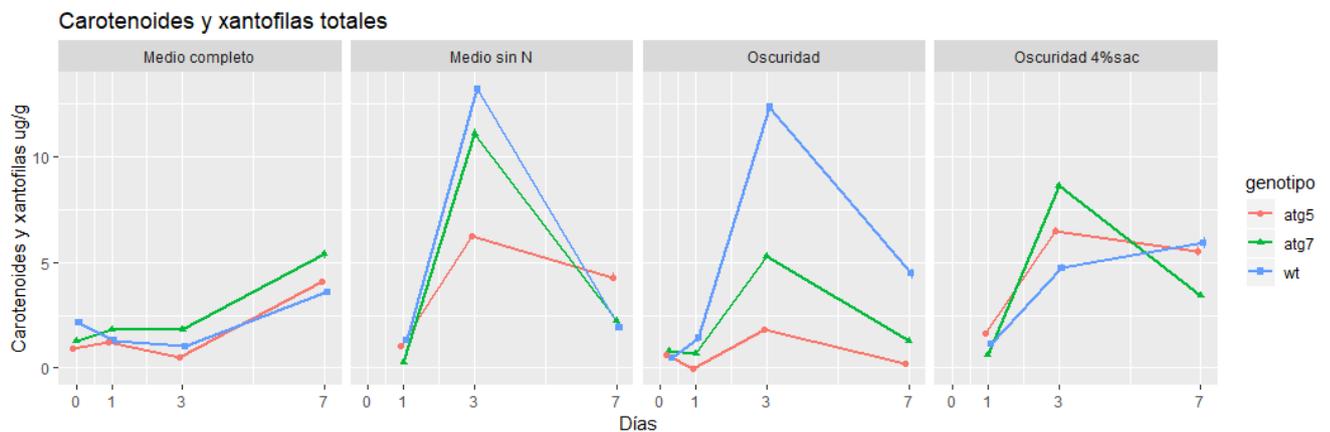


Figura 18 Evolución del contenido de carotenoides y xantofilas en 7 días de tratamiento. Valores expresados en ug/g de peso fresco. Wt: línea salvaje, knockout: *atg5* y *atg7*

Discusión

Conservación de la maquinaria ATG en *P. patens*

El primer objetivo de este trabajo consistió en conocer las relaciones filogenéticas de distintas secuencias peptídicas de ATG8. Se seleccionó ATG8 por ser una proteína fundamental para la ocurrencia de autofagia, que además de estar ampliamente estudiada en plantas superiores, se encuentra asociada a GFP en la línea *PpATG8bpro: GFP-PpATG8b*. En este trabajo se utilizó esta línea como reportera del proceso de autofagia, por lo que un análisis comparativo de la secuencia peptídica de la misma con respecto a la de otras previamente estudiadas puede dar un indicio de conservación o no de la función.

El concepto de función puede tener diferentes interpretaciones contexto dependiente, aunque generalmente describe aspectos bioquímicos, celulares y fenotípicos de los eventos moleculares que involucran a la proteína⁶⁵. Como última instancia, una función debe ser corroborada experimentalmente, pero existen diferentes herramientas que pueden dar una aproximación a ésta sin la necesidad de experimentación.

Una de estas aproximaciones es la construcción de árboles filogenéticos, que son hipótesis de relaciones, originalmente entre taxones y sus hipotéticos ancestros comunes^{66,67}. Esta herramienta puede utilizarse con el propósito de comprender las relaciones entre las secuencias en sí, ya sean nucleotídicas o peptídicas, y no necesariamente entre los taxones a los que corresponden; siendo útil en la dilucidación de las funciones de los genes y proteínas que no han sido estudiados experimentalmente (Hall et al. 2009).

Parálogos y ortólogos, los dos tipos de homólogos generados respectivamente por la duplicación de genes y la especiación durante la evolución, todavía pueden compartir funciones similares o no. Por lo tanto, la función de una proteína o gen puede inferirse de la de sus parálogos u ortólogos, aunque el nivel de su similitud funcional puede depender de su distancia evolutiva y otros factores tales como interacción con otros elementos celulares, sitio de expresión, etc.

En un contexto en donde la velocidad en que la secuenciación masiva pone a disposición genomas de organismos nuevos que supera ampliamente la capacidad experimental, las herramientas bioinformáticas comparativas se vuelven accesibles, rápidas y necesarias para un correcto abordaje de esta problemática. En el área de la autofagia, gran parte de las proteínas y genes están particularmente conservados en los eucariotas donde se ha estudiado el proceso, con modificaciones y características propias de cada grupo, pero sin grandes variaciones incluso en organismos muy alejados filogenéticamente. Un ejemplo es el caso de LC3 en *M. musculus* y ATG8 de *A. thaliana*⁴⁶ utilizado como outgroup en este trabajo. El musgo *P. patens* contiene homólogos para toda la maquinaria autofágica⁴², de los que se tiene poca o nula evidencia experimental sobre su función.

El estudio realizado comprendió 17 organismos dentro del clado Viridiplantae. Se identificó en cada organismo analizado al menos una secuencia homóloga para las 9 AtATG8, incluidos los linajes de plantas inferiores como *V. carteri*, *O. lucimarinus*, *C. reinhardtii* y la recientemente secuenciada *S. falax*. Las especies se diferenciaron en el número de copias homólogas; los representantes de clorofitas y charofitas presentan solo una copia, mientras que las briofitas poseen un número de genes más elevado que va hasta 6 en *P. patens* (Tabla 1). Finalmente las plantas con flores, angiospermas, son el grupo con el mayor número de secuencias por especie, con hasta 11 en *G. max*. Estos datos sugieren por un lado una expansión de genes ATG8, es decir el aumento en el número de secuencias por especie, que se habría producido en el linaje de plantas terrestres ancestrales y por otro lado eventos de duplicación de genes que ocurrieron durante la especiación y evolución de las angiospermas.

Las secuencias en estudio corresponden a proteínas de no más de 130 aa, con dominios conservados que tienen asignada una función putativa. Los análisis filogenéticos de estas regiones sugieren una clasificación de las secuencias en 2 clases, con la clase II subdividida a su vez en dos subclases, a y b. (Fig. 4). Considerando los ATG8s de *A. thaliana*, podemos definir a las clases de acuerdo a la distribución de estas secuencias dentro de ellas⁶⁸; clase II ATG8a-d y ATG8e-g, respectivamente en cada subclase y para la clase I las secuencias ATG8h-i.

Con la duplicación de genes puede ocurrir la diferenciación en nuevas funciones de las copias redundantes, variaciones en la secuencia de aminoácidos dentro de las clases implican que pueden existir diferencias funcionales sutiles. Los miembros de la Clase I, a diferencia de aquellas secuencias en la clase II, no tienen residuos adicionales más allá del Gly carboxi terminal, lo que indica que pueden funcionar sin el procesamiento de la proteasa ATG4¹⁴ a diferencia del resto de las secuencias. Kellner (2017) sugiere que en las plantas con flores posibles subfuncionalización y diversificación de los parálogos llevó a la diversificación del proceso de autofagia en sí, siendo posiblemente el motor para la aparición de la autofagia selectiva. Ningún ATG8 de *P. patens* fue localizado en esta clase, sugiriendo funciones redundantes de las secuencias o tal vez funciones tejido o estímulo específico. En este sentido se podrían analizar los promotores de estos genes. Es interesante, que no hay ATG8 clase I en *P. patens*, pero si hay receptores de autofagia selectiva como el p62⁶⁹.

En la clase II se puede observar que por un lado existen asociaciones entre todas las secuencias de los organismos pertenecientes a los clados más basales de viridiplantae; todas las algas verdes, briofitas y linajes primitivos de plantas terrestres como licopodiácea, agrupadas a la vez con pocos elementos de angiospermas en la subclase a. Las secuencias de *P. patens* están comprendidas en su totalidad aquí. Es importante destacar este agrupamiento, ya que muestra por un lado la similitud relacionada a la posición filogenética entre grupos basales y por otro lado, nos da un indicio de la conservación de estructura que poseen las secuencias de *P. patens* al agruparse con secuencias pertenecientes a organismo derivados. En la subclase a se observan también asociaciones que responden a la proximidad filogenética de las especies; todas las secuencias correspondientes a los representantes de monocotiledóneas por ejemplo, junto con otras angiospermas.

El soporte bootstrap de las subclases es bajo, pero los grupos definidos son congruentes con aquellos en Seo (2016), por lo que fueron identificadas de todas maneras. La falta de sustento podría deberse; por un lado a lo conservado de esta estructura a lo largo de historia de viridiplantae, reflejado en pocas variaciones en las secuencias, o también a la diferencia en el muestreo y tamaño de matriz que aquí se utiliza. Otra posibilidad es que la utilización de secuencias peptídicas y no nucleotídicas enmascare variaciones en caracteres homólogos que pueden adicionar robustez al

análisis. Como el objetivo de este trabajo fue comparar conservación de estructuras y función de una proteína en diferentes organismos y no así los procesos evolutivos que ocurrieron entre los organismos particulares, es que preferimos utilizar secuencias peptídicas. Estas filogenias son valiosas ya que tienen en cuenta las sustituciones de aminoácidos que pueden conservar la función original, algo que en la secuencia de ADN puede pasarse por alto, y porque permitir la identificación de ortólogos y la divergencia de homólogos con nuevas funciones dentro de una línea evolutiva dada. De todas maneras, en estudios futuros complementaremos el análisis utilizando un alineamiento de las secuencias nucleotídicas.

Autofagia en *P. patens* bajo déficit nutricional de C y N

Inducción de senescencia

Se ha reportado que, durante la senescencia foliar en *A. thaliana*, hay un incremento de la autofagia evidenciado por un incremento en la expresión de genes *ATG* y del flujo autofágico^{70,71}. En estudios previos, realizados en la línea salvaje de *P. patens*, se ajustaron las condiciones de estrés nutricional por deficiencia de C y N, que resultaron en una inducción de senescencia⁴². En el caso de la deficiencia de C, por oscuridad, se observó la expresión de homólogos de *AtATG8* y de estructuras vesiculares compatibles con autofagosomas⁴². En dicho estudio, aún no se contaba con una herramienta molecular para la visualización de la autofagia, tal como la línea *PpATG8bpro:GFP-PpATG8b*⁴¹. Esta línea, al expresar la proteína GFP fusionada con ATG8, bajo control del promotor endógeno de ATG8, tendría la potencialidad de ser utilizada para visualización de autofagosomas y cuantificación del flujo autofágico por inmunoblot anti GFP. Cuando la línea GFP-ATG8 fue sometida a las condiciones de déficit nutricional previamente establecidas, también se observó inducción de senescencia (Fig. 7, 8, 9). En particular, la restricción de C fue más efectiva que la restricción de N para inducir la senescencia (Fig. 9.1), alterar negativamente el patrón de crecimiento (Fig. 7.2), disminuir el contenido de Rubisco (Fig. 8), el rendimiento cuántico y estabilidad del fotosistema II (Fig. 9). Estos resultados indican que la línea *PpATG8bpro:GFP.PpATG8b* se comporta de forma similar

a la salvaje en las condiciones inductoras de senescencia ensayadas, y que por lo tanto, la construcción insertada no estaría alterando el comportamiento de la misma.

Potencialidad de la línea *PpATG8bpro:GFP-PpATG8b* para monitorear autofagia

Estudios previos, en levaduras, reportaron el uso de líneas transgénicas GFP-ATG8 bajo el control de promotores endógenos ^{72,73}. En plantas, las líneas GFP-ATG8 bajo el control del promotor endógeno fueron ineficientes para la medición de flujo autofágico (data no publicada de Chung T and Vierstra RD). La importancia del uso de líneas transgénicas con promotores endógenos radica en la capacidad de estos para responder de la misma forma que el gen nativo y no expresarse continuamente, como es el caso de los promotores constitutivos.

En el presente trabajo, fue posible la visualización de autofagosomas en la línea *PpATG8bpro:GFP-PpATG8b* (Fig. 11) tal como en plantas superiores ⁷⁴. Sin embargo, no fue posible detectar la banda correspondiente a la proteína de fusión GFP-ATG8, lo cual impidió la evaluación de flujo autofágico (Fig. 5 y 10). La ausencia de la proteína de fusión, en el western blot de *P. patens*, podría deberse a un error en el marco abierto de lectura en la secuencia codificante o a una baja sensibilidad del método de detección utilizado por fosfatasa alcalina. Desde que la construcción GFP-ATG8 presenta GFP en posición N-terminal podría ocurrir que un error en el clonado de GFP o ATG8 resultaría en un cambio del marco de lectura del constructo. Sin embargo, se verificó mediante secuenciación que el marco de lectura era correcto. En lo que respecta a la sensibilidad del método para revelado del western blot, el empleo de quimioluminiscencia (alta sensibilidad) tampoco permitió la detección de GFP-ATG8. Otras hipótesis, para explicar la ausencia de la proteína de fusión, podría ser que el turnover (síntesis vs. degradación) de GFP-ATG8 estuviera desbalanceado por una baja tasa de síntesis de la proteína de fusión, por causa del promotor endógeno, o que su degradación fuera rápida o ambos simultáneamente. En cualquier caso, no sería posible observar el constructo, resultando

que la banda de GFP detectada sea una simple acumulación favorecida por la, reportada, estabilidad de GFP frente a proteasas de vacuola ⁷⁵.

En *P.patens* autofagia se induce por estrés nutricional

La inducción de autofagia, durante la senescencia desencadenada por estrés nutricional, ha sido reportada en plantas superiores, mamíferos y levaduras ⁷⁶.

Las colonias de *P. patens* sometidas a deficiencia de N sobrevivieron por más de 30 días con modificación de su patrón de desarrollo⁴². Aunque en este trabajo, el tiempo máximo de deficiencia fue la mitad, fue suficiente para observar un crecimiento de los rizoides con respecto a otras estructuras (Fig. 7.2). Esto podría correlacionarse, con el efecto del N en la regulación de las raíces laterales observado en plantas superiores ⁶⁰. La deficiencia de N indujo autofagia en todos los tiempos analizados, hecho evidenciado tanto por un aumento en GFP libre (Fig. 10) como por la observación de vesículas autofágicas (Fig. 11), observación ratificada en células tratadas con Concanamicina A, donde se observa un aumento en el número de vesículas (Fig. suplementaria 4). Esto es coincidente con resultados similares reportados en otras especies vegetales ⁷⁷.

En *P. patens* (salvaje) se reportó la expresión de genes *ATG8*, *ATG5* y *ATG7* luego de hasta 3 días de oscuridad ^{40,42}. Consistentemente, en la línea PpATG8bpro:GFP-PpATG8b la oscuridad indujo un aumento de la GFP libre (Fig.10) que, si bien, no pudo correlacionarse con un incremento de vesículas autofágicas, fue paralelo con un sorprendente aumento de fluorescencia verde difusa (Fig. 11). Este desbalance entre acumulación de GFP sin un correspondiente incremento de vesículas autofágicas, podría deberse a que los tiempos considerados, para el monitoreo del proceso, hayan sido tardíos para la observación de estructuras autofágicas definidas y que, adicionalmente, ocurre una enorme acumulación de GFP en el tiempo, debido a la estabilización vacuolar de esta proteína fluorescente por oscuridad ⁷⁵. A este respecto, un experimento más corto (dos horas de oscuridad) mostró que en *P. patens* se acumularon un gran número de vesículas autofágicas (Fig. suplementaria 5).

Desde que el déficit de C induce autofagia, se espera que, un suministro de C externo ralentice esta inducción. Sin embargo, la sacarosa 2% fue incapaz de revertir la

expresión de genes *PpATG8*⁴² lo que podría deberse a que dicha concentración era insuficiente. En este sentido, el suministro de 4% de sacarosa disminuyó los niveles de GFP libre con respecto al 2% (Fig. 5) reforzando la evidencia de que, en *P. patens*, la deficiencia de C también induce autofagia.

Déficit nutricional en mutantes *atg*

Las líneas knockout son una herramienta muy importante en los estudios de genética reversa ya que permiten estudiar los efectos que trae aparejada la pérdida de función, además la generación y caracterización de estas líneas tiene valor adicional para su uso como controles negativos de autofagia más allá de este trabajo.

En condición control, la región central (más vieja) de las colonias mutantes exhibió senescencia temprana (Fig. 12), hecho que también se evidenció en la disminución de los parámetros fotosintéticos (Fig. 13 y 14). Sin embargo, la única diferencia observada, en la evolución de los parámetros bioquímicos fue un mayor contenido de proteínas en los mutantes *atg*, hecho coincidente con lo, previamente, reportado en *A. thaliana*⁷⁸.

Bajo condiciones de deficiencia nutricional de N los mutantes mostraron ser hipersensibles, lo cual se evidenció a los 7 días de tratamiento con una marcada clorosis (Fig. 12) y disminución de los parámetros fotosintéticos (Fig. 13 y 14). El crecimiento fue menor con respecto a la línea salvaje, pero no cesó (Fig. 15). En lo que respecta a los parámetros bioquímicos, las líneas mutantes se mostraron agotadas tanto en almidón como azúcares, en contraste con la salvaje donde estos compuestos se acumularon; resultado esperable debido al desbalance entre la fijación de C por fotosíntesis y la falta de asimilación de N en estas condiciones. El contenido de proteínas disminuyó en los mutantes con respecto al salvaje y en relación a los mutantes en condiciones óptimas, correspondiéndose con trabajos previos en *Chlamydomonas*⁷⁹. Esta disminución es un indicio de que en los mutantes estaría ocurriendo reciclado de nutrientes por métodos alternativos a la autofagia.

La oscuridad resultó ser un factor más severo para las líneas *atg*, ya que a los tres días de tratamiento mostraron una fuerte disminución en parámetros fotosintéticos

(Fig. 13 y 14), marcada clorosis (Fig. 12) y un cese del crecimiento (Fig. 15). También en oscuridad las mutantes mostraron una disminución en el nivel de proteínas, almidón y azúcares solubles. Frente al déficit de carbohidratos las plantas pueden utilizar proteínas como sustrato para la respiración⁸⁰. En plantas de *A. thaliana* en oscuridad, la autofagia contribuye a la degradación de proteínas cloroplásticas⁸¹ y almidón²¹. Consecuentemente, las líneas atg acumulan proteínas y almidón⁸². Sin embargo, esto no parece ocurrir en *P. patens* ya que, aún con la autofagia apagada, hubo degradación de proteínas y almidón, lo que sugiere la ocurrencia de vías alternativas a la autofagia⁸³.

Si bien ambos tratamientos de deficiencia mostraron severidad diferencial, acentuada en el tratamiento de oscuridad, en ambas condiciones los mutantes senescen antes que la línea salvaje, característica también observada en mutantes atg de otras especies vegetales^{84,16}

¿Por qué los mutantes atg de *P. patens* senescen antes?

La capacidad reductora de todas las líneas se vio afectada en los tratamientos de estrés nutricional, principalmente en oscuridad, y esta caída se corresponde con un aumento en los niveles de compuestos antioxidantes como carotenoides y xantofilas (Fig. 18). Únicamente, en el caso del déficit de N se observó diferencia entre los mutantes y la línea salvaje, donde esta última recupera su capacidad reductora en los últimos tiempos de tratamiento (Fig. 16).

En plantas superiores se reportó que los mutantes atg sufren un desbalance redox⁴³ que sería causa de la senescencia temprana. Así, en genotipos wild type la autofagia funcionaria en un loop de retroalimentación negativo controlando la señalización por acumulación de ácido salicílico (SA) y de especies reactivas del oxígeno (ROS), incrementada bajo estrés, lo que regularía negativamente la senescencia y la muerte celular²⁴. Por el contrario, los mutantes acumulan estos compuestos y al ser incapaces de capturarlos por autofagia, se dispara la senescencia temprana. Como propuesta mejoradora, se propone estudiar el rol de SA y ROS en mutantes atg de *P. patens* en estas condiciones.

El suministro exógeno de sacarosa ralentiza la senescencia de mutantes atg sometidos a oscuridad

En lo que respecta al efecto de la sacarosa, estudios previos en *P. patens* mostraron que el suministro de C exógeno (glucosa) a mutantes atg5 en oscuridad, no tuvo efecto ralentizante sobre la senescencia ⁴⁰. Nuestros resultados prueban que el suministro exógeno de sacarosa si resultó en un retraso de la senescencia de los mutantes atg (Fig. 12). En estas condiciones, los mutantes acumulan almidón y azúcares solubles, lo que confirma que estas colonias utilizaron la sacarosa del medio y este hecho, además, haya sido probablemente la causa de la recuperación del poder reductor con respecto a la condición de oscuridad (Fig. 16).

Conclusión

El análisis filogenético y el estudio de los dominios funcionales de los de AtATG8 sugieren conservada la función de la proteína involucrada la biogénesis del autofagosoma en viridiplantae y en *P. patens*. En lo que respecta a la línea *PpATG8bpro::GFP-PpATG8b*, se concluye que resulta una herramienta aceptable para observación de autofagosomas y estimar la inducción de autofagia por las variaciones de GFP libre con respecto a una condición control, pero para la medición de flujo autofágico se propone la utilización de líneas bajo control de promotor constitutivo, como ser *UBQpro::GFP-PpATG8b*.

La inducción de autofagia en la respuesta al déficit nutricional de C y N está conservada en *P. patens* como en otras especies y resulta fundamental para su supervivencia en estas condiciones. En este trabajo se brindan las bases para la diversificación y profundización del estudio de autofagia a futuro en el musgo *P.patens*.

Bibliografia

1. Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323 (2011).
2. Rubinsztein, D. C., Marino, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* **146**, 682–695 (2011).
3. Levine, B. & Klionsky, D. J. Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463–477 (2004).
4. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
5. Massey, A., Kiffin, R. & Cuervo, A. M. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2420–2434 (2004).
6. Wang, C.-W. & Klionsky, D. J. The Molecular Mechanism of Autophagy. *Mol. Med.* **9**, 65–76 (2003).
7. Avin-Wittenberg, T., Honig, A. & Galili, G. Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* **249**, 285–299 (2012).
8. Kim, S.-H., Kwon, C., Lee, J.-H. & Chung, T. Genes for plant Autophagy: Functions and interactions. *Mol. Cells* **34**, 413–423 (2012).
9. Marion, J., Le Bars, R., Besse, L., Batoko, H. & Satiat-Jeunemaitre, B. Multiscale and Multimodal Approaches to Study Autophagy in Model Plants. *Cells* **7**, 5 (2018).
10. Marshall, R. S. & Vierstra, R. D. Autophagy: The Master of Bulk and Selective Recycling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **69**, 173–208 (2018).
11. Dobrenel, T. *et al.* TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**, 261–285 (2016).
12. Zhuang, X. *et al.* A BAR-Domain Protein SH3P2, Which Binds to Phosphatidylinositol 3-Phosphate and ATG8, Regulates Autophagosome Formation in *Arabidopsis*; *Plant Cell* **25**, 4596 LP-4615 (2013).
13. Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. ‘Protein modifications: beyond the usual suspects’ review series. *EMBO Rep.* **9**, 859–864 (2008).
14. Thompson, A. R., Doelling, J. H., Suttangkakul, A. & Vierstra, R. D. Autophagic Nutrient Recycling in *Arabidopsis* Directed by the ATG8 and ATG12 Conjugation Pathways. *Plant Physiol.* **138**, 2097 LP-2110 (2005).
15. Yoshimoto, K. *et al.* Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* **16**, 2967–2983 (2004).
16. Yoshimoto, K. Processing of ATG8s, Ubiquitin-Like Proteins, and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy. *PLANT CELL ONLINE*

- 16**, 2967–2983 (2004).
17. Bassham, D. C. Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods* **75**, 181–188 (2015).
 18. Hanaoka, H. *et al.* Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol.* **129**, 1181–1193 (2002).
 19. Yoshimoto, K., Avila-Ospina, L., Moison, M. & Masclaux-Daubresse, C. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *J. Exp. Bot.* **65**, 3799–3811 (2014).
 20. Doelling, J. H., Walker, J. M., Friedman, E. M., Thompson, A. R. & Vierstra, R. D. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* **277**, 33105–33114 (2002).
 21. Wang, Y. & Liu, Y. Autophagic degradation of leaf starch in plants. *Autophagy* **9**, 1247–1248 (2013).
 22. Xie, W. *et al.* Chaperone-mediated autophagy prevents apoptosis by degrading BBC3/PUMA. *Autophagy* **11**, 1623–1635 (2015).
 23. Shibata, M. *et al.* Highly Oxidized Peroxisomes Are Selectively Degraded via Autophagy in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 4967 LP-4983 (2013).
 24. Yoshimoto, K. *et al.* Autophagy Negatively Regulates Cell Death by Controlling NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling during Senescence and the Innate Immune Response in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 2914–2927 (2009).
 25. Minina, E. A. *et al.* Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. *J. Exp. Bot.* **69**, 1415–1432 (2018).
 26. Minina, E. A., Bozhkov, P. V & Hofius, D. Autophagy as initiator or executioner of cell death. *Trends Plant Sci.* **19**, 692–697 (2014).
 27. Lai, Z., Wang, F., Zheng, Z., Fan, B. & Chen, Z. A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J.* **66**, 953–968 (2011).
 28. Harrison-Lowe, N. J. & Olsen, L. J. Autophagy protein 6 (ATG6) is required for pollen germination in Arabidopsis thaliana. *Autophagy* **4**, 339–348 (2008).
 29. Escamez, S. *et al.* METACASPASE9 modulates autophagy to confine cell death to the target cells during Arabidopsis vascular xylem differentiation. *Biol. Open* **5**, 122–129 (2016).
 30. Lim, P. O., Kim, H. J. & Nam, H. G. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 115–136 (2007).
 31. Stead, A. D., Wagstaff, C., Ougham, H. J. & Thomas, H. Defining senescence and death. *J. Exp. Bot.* **54**, 1127–1132 (2003).
 32. OKUDA, M. *et al.* The Ethylene Signal Mediates Induction of GmATG8i in Soybean Plants under Starvation Stress. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1408–1412 (2011).
 33. Li, F. *et al.* Autophagic Recycling Plays a Central Role in Maize Nitrogen

- Remobilization. *Plant Cell* **27**, 1389–1408 (2015).
34. Guiboileau, A. *et al.* Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. *The New phytologist* **194**, (2012).
 35. Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q. & Have, M. Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Curr. Opin. Plant Biol.* **39**, 8–17 (2017).
 36. Masclaux-Daubresse, C. Autophagy controls carbon, nitrogen, and redox homeostasis in plants. *Autophagy* **12**, 896–897 (2016).
 37. Schaefer, D. & Zrýd, J.-P. Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* **11**, (1997).
 38. Cove, D. The moss *Physcomitrella patens*. *Annual review of genetics* **39**, (2005).
 39. Roberts, A., Roberts, E. & Haigler, C. Moss cell walls: structure and biosynthesis . *Frontiers in Plant Science* **3**, 166 (2012).
 40. Mukae, K., Inoue, Y. & Moriyasu, Y. ATG5-knockout mutants of *Physcomitrella* provide a platform for analyzing the involvement of autophagy in senescence processes in plant cells. *Plant Signal. Behav.* **10**, e1086859 (2015).
 41. Sanchez-Vera, V. *et al.* Autophagy is required for gamete differentiation in the moss *Physcomitrella patens*. *Autophagy* **13**, 1939–1951 (2017).
 42. Plaza Rojas, P. M. Uso de *Physcomitrella patens* como herramienta para el estudio de la autofagia en plantas. (Universidad Nacional de Córdoba, 2017).
 43. Masclaux-Daubresse, C. Autophagy controls carbon, nitrogen, and redox homeostasis in plants. *Autophagy* **12**, 896–897 (2016).
 44. Chung, T., Phillips, A. R. & Vierstra, R. D. ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled ATG12A AND ATG12B loci. *Plant J.* **62**, 483–493 (2010).
 45. Shin, K. D., Lee, H. N. & Chung, T. A revised assay for monitoring autophagic flux in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement of AUTOPHAGY-RELATED9 in autophagy. *Mol. Cells* **37**, 399–405 (2014).
 46. Weidberg, H. *et al.* LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* **29**, 1792–1802 (2010).
 47. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874 (2016).
 48. Maqbool, A. *et al.* Structural Basis of Host Autophagy-related Protein 8 (ATG8) Binding by the Irish Potato Famine Pathogen Effector Protein PexRD54. *J. Biol. Chem.* **291**, 20270–20282 (2016).
 49. Maruyama, T. & Noda, N. N. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **71**, 72–78 (2017).
 50. Gascuel, O. & Le, S. Q. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1307–1320 (2008).
 51. Thelander, M., Olsson, T. & Ronne, H. Effect of the energy supply on filamentous

- growth and development in *Physcomitrella patens*. *J. Exp. Bot.* **56**, 653–662 (2005).
52. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–5 (2012).
 53. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
 54. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–75 (1951).
 55. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
 56. YEMM, E. W. & WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* **57**, 508–14 (1954).
 57. Fitch, W. M. Distinguishing Homologous from Analogous Proteins. *Syst. Biol.* **19**, 99–113 (1970).
 58. Seo, E. *et al.* Comparative analyses of ubiquitin-like ATG8 and cysteine protease ATG4 autophagy genes in the plant lineage and cross-kingdom processing of ATG8 by ATG4. *Autophagy* **12**, 2054–2068 (2016).
 59. Ren, C., Liu, J. & Gong, Q. Functions of autophagy in plant carbon and nitrogen metabolism. *Front. Plant Sci.* **5**, 301 (2014).
 60. Hirai, M. Y. *et al.* Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10205–10210 (2004).
 61. Nagy, Z. *et al.* Metabolic indicators of drought stress tolerance in wheat: Glutamine synthetase isoenzymes and Rubisco. *Plant Physiol. Biochem.* **67**, 48–54 (2013).
 62. Gerotto, C., Alboresi, A., Giacometti, G. M., Bassi, R. & Morosinotto, T. Coexistence of plant and algal energy dissipation mechanisms in the moss *Physcomitrella patens*. *New Phytol.* **196**, 763–773 (2012).
 63. Johnson, G. N. & Maxwell, K. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**, 659–668 (2000).
 64. Rybczynski, N. Castorid Phylogenetics: Implications for the Evolution of Swimming and Tree-Exploitation in Beavers. *J. Mamm. Evol.* **14**, 1–35 (2007).
 65. Radivojac, P. *et al.* A large-scale evaluation of computational protein function prediction. *Nat. Methods* **10**, 221–227 (2013).
 66. Nei, M. & Kumar, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford Univ. Press* (2000).
 67. Rohlf, F. J. J. Felsenstein, *Inferring Phylogenies*, Sinauer Assoc., 2004, pp. xx + 664. *J. Classif.* **22**, 139–142 (2005).
 68. Kellner, R., De la Concepcion, J. C., Maqbool, A., Kamoun, S. & Dagdas, Y. F. ATG8

- Expansion: A Driver of Selective Autophagy Diversification? *Trends Plant Sci.* **22**, 204–214 (2017).
69. Svenning, S., Lamark, T., Krause, K. & Johansen, T. Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy* **7**, 993–1010 (2011).
 70. Xiong, Y., Contento, A. L., Nguyen, P. Q. & Bassham, D. C. Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **143**, 291 LP-299 (2007).
 71. Breeze, E. *et al.* High-Resolution Temporal Profiling of Transcripts during Arabidopsis Leaf Senescence Reveals a Distinct Chronology of Processes and Regulation. *Plant Cell* **23**, 873–894 (2011).
 72. Xie, Z., Nair, U. & Klionsky, D. J. Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3290–3298 (2008).
 73. Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z. & Klionsky, D. J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.* **281**, 30299–30304 (2006).
 74. Jung, H. *et al.* Autophagic flux analysis of Arabidopsis seedlings exposed to salt stress. *J. Plant Biol.* **60**, 199–206 (2017).
 75. Tamura, K. *et al.* Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J.* **35**, 545–55 (2003).
 76. Rose, T. L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D. & Marty, F. Starvation-induced expression of autophagy-related genes in Arabidopsis. *Biol. cell* **98**, 53–67 (2006).
 77. Jung, H. *et al.* Autophagic flux analysis of Arabidopsis seedlings exposed to salt stress. *J. Plant Biol.* **60**, 199–206 (2017).
 78. Guiboileau, A. *et al.* Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in Arabidopsis leaves depending on nitrate availability. *New Phytol.* **199**, 683–694 (2013).
 79. Kajikawa, M. *et al.* Isolation and Characterization of *Chlamydomonas* Autophagy-Related Mutants in Nutrient-Deficient Conditions. *Plant Cell Physiol.* **60**, 126–138 (2019).
 80. Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J. & Fernie, A. R. Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci.* **16**, 489–98 (2011).
 81. Wada, S. *et al.* Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. *Plant Physiol.* **149**, 885–93 (2009).
 82. Di Berardino, J. *et al.* Autophagy controls resource allocation and protein storage accumulation in Arabidopsis seeds. *J. Exp. Bot.* **69**, 1403–1414 (2018).
 83. Izumi, M. & Nakamura, S. Chloroplast Protein Turnover: The Influence of Extraplasmidic Processes, Including Autophagy. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
 84. Xiong, Y., Contento, A. L. & Bassham, D. C. AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **42**, 535–546 (2005).

Anexos

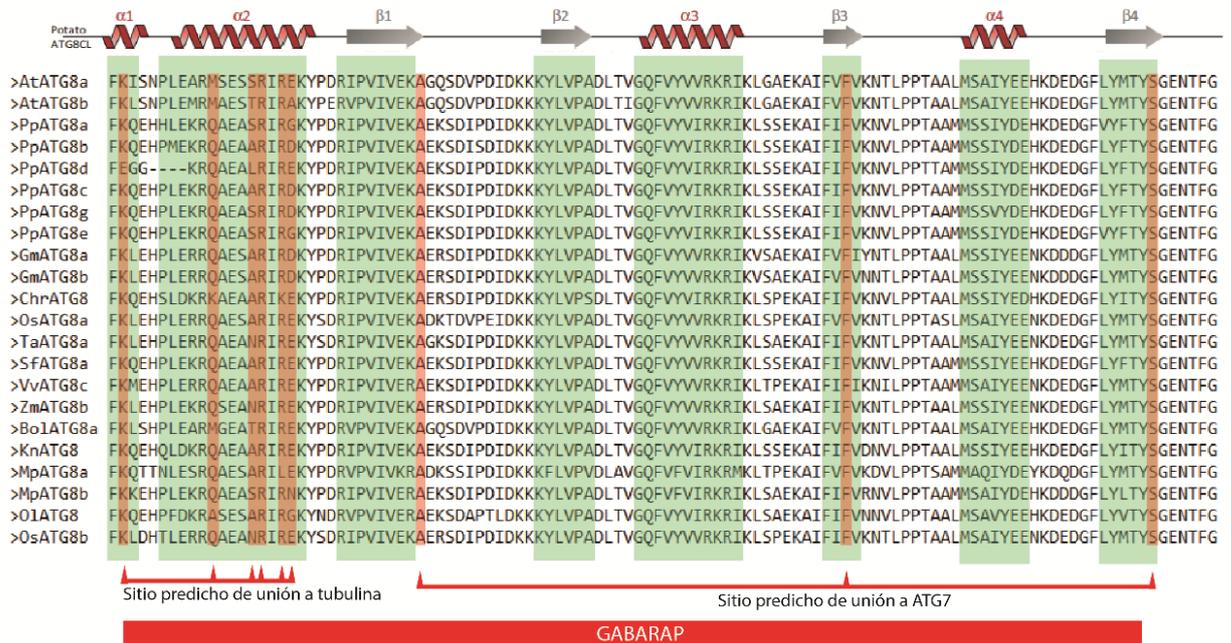


Figura Suplementaria 1 Alineamiento de secuencias homólogas de AtATG8 en diferentes especies de Viridiplantae. En rojo se identifican los residuos conservados del dominio GABARAP. En verde se identificaron las regiones correspondientes a la estructura tridimensional que se adoptó del homólogo de papa ATG8CL.⁴², basado en Kellner (2016)⁶⁴.

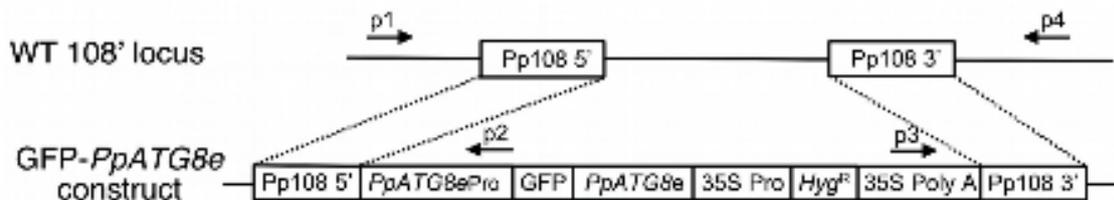


Figura suplementaria 2 Imagen esquemática del constructo PpATG8bpro:GFP.PpATG8b. Donde ATG8e se corresponde con la nomenclatura *previamente utilizada* ATG8b

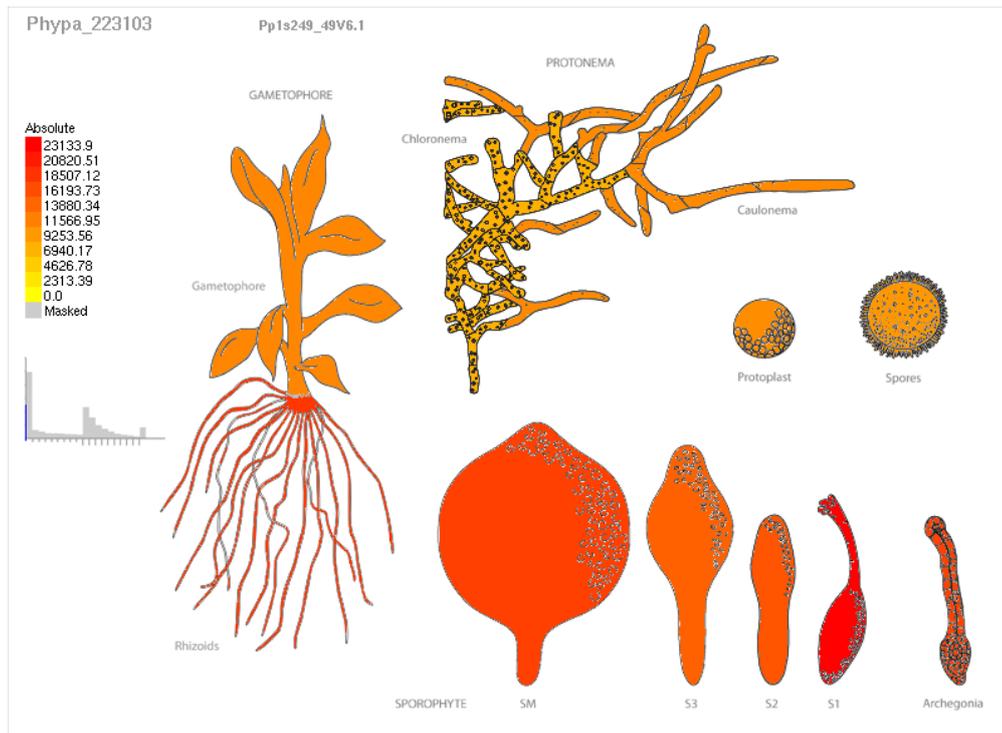


Figura suplementaria 3 Patrón de expresión en valores absolutos del gen correspondiente a la línea PpATG8bpro: GFP-PpATG8b, obtenido de Physcomitrella eFP browser. La expresión corresponde la línea salvaje crecida en condiciones óptimas de cultivo.

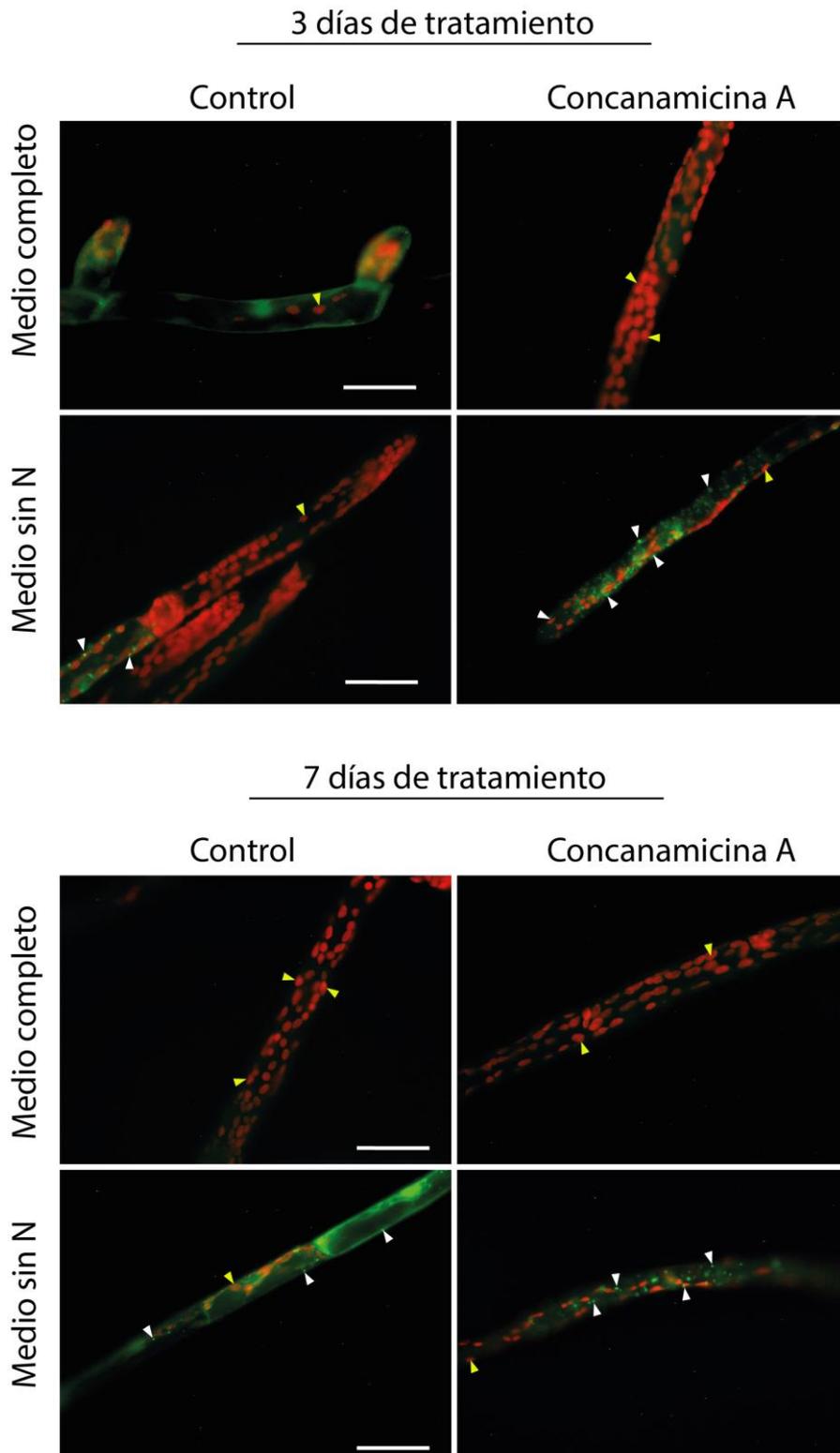


Figura suplementaria 4. Línea PpATG8bpro:GFP.PpATG8b 3 y 7 días de tratamiento en medio completo y luz y medio sin nitrógeno y luz. Tratamiento de 4 hs con Concanamicina A 1 μ m. Barra de escala: 50 μ m. Triángulos blancos: Autofagosomas. Triángulos amarillos: Cloroplastos.

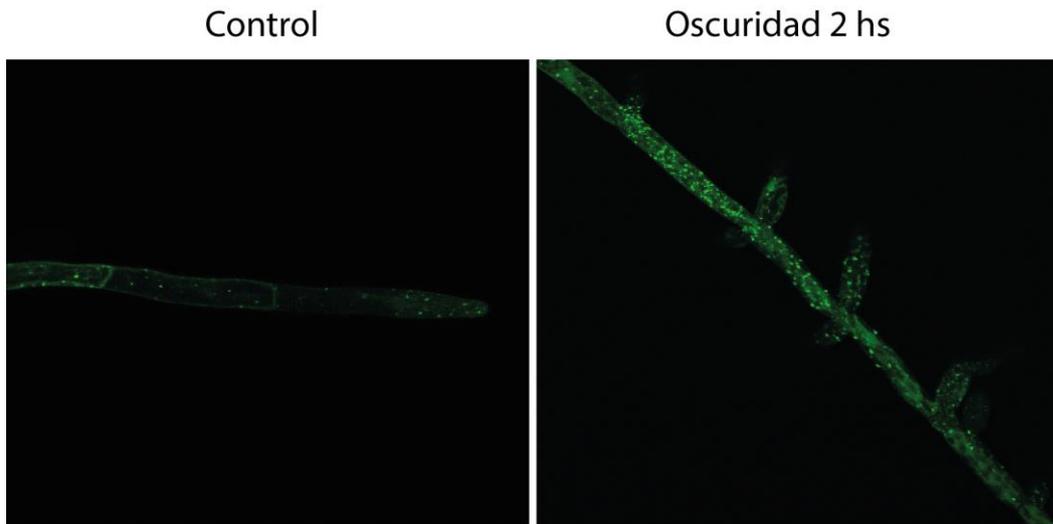


Figura suplementaria 5 Fotografías de microscopia confocal, de células de protonema de la línea *PpATG8bpro:GFP-PpATG8b* luego de dos horas de oscuridad (derecha) y control (luz, izquierda).