



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR CURSO DE
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

NICOLE PINHEIRO PORTO DA COSTA

**TIORREDOXINAS REGULAM OS FLUXOS METABÓLICOS ATRAVÉS DO
CICLO DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO E VIAS ASSOCIADAS DE FORMA
INDEPENDENTE DA LUZ**

FORTALEZA

2022

NICOLE PINHEIRO PORTO DA COSTA

TIORREDOXINAS REGULAM OS FLUXOS METABÓLICOS ATRAVÉS DO CICLO
DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO E VIAS ASSOCIADAS DE FORMA INDEPENDENTE
DA LUZ

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso
Coorientadora: Ma. Raissa Souza Caminha Bret

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C874t Costa, Nicole Pinheiro Porto da.
Tiorredoxinas regulam os fluxos metabólicos através do ciclo do ácido tricarboxílico e vias associadas de forma independente da luz / Nicole Pinheiro Porto da Costa. – 2022.
34 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso.
Coorientação: Profa. Ma. Raissa Souza Caminha Bret.
1. Ciclo TCA. 2. Marcação isotópica. 3. Tiorredoxinas, . 4. Arabidopsis thaliana. . I. Título.
CDD 661
-

NICOLE PINHEIRO PORTO DA COSTA

TIORREDOXINAS REGULAM OS FLUXOS METABÓLICOS ATRAVÉS DO CICLO
DO ÁCIDO TRICARBOXÍLICO E VIAS ASSOCIADAS DE FORMA INDEPENDENTE
DA LUZ

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovada em: 04/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Marina Câmara Mattos Martins Soldi
Universidade de São Paulo (USP)

Dra. Ana Luiza Sobral Paiva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu forças nessa jornada.

Ao meu professor e orientador Dr. Danilo de Menezes Daloso, por me dar a oportunidade de aprender junto ao seu grupo, por me guiar nos estudos e solucionar os meus anseios com meu projeto. Todo esse processo foi essencial na minha iniciação científica e na minha formação.

À minha coorientadora Ma. Raissa Souza Caminha Bret, por toda a orientação, paciência, carinho, conhecimento e apoio. Essa jornada foi bastante desafiadora, mas agregou muito no meu amadurecimento profissional. Os ensinamentos adquiridos, tenho certeza, farão toda a diferença não só na minha carreira, mas na minha vida.

À minha família, que presenciaram toda a minha jornada e me ajudaram da maneira que puderam me dando suporte e cuidando de mim.

Ao Erick Pinheiro, pelo companheirismo, toda a paciência e apoio na reta final da minha formação. Tornou-se para mim um porto seguro.

À coordenação, especialmente ao professor Dr. Humberto de Carvalho e a professora Dra. Marjory de Holanda, por todo o apoio e planejamento.

Ao Laboratório de Metabolismo de Plantas e seus integrantes, que me acolheram e auxiliaram no meu aprendizado na bancada, contribuindo para a minha formação.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro em meus quatro anos de iniciação científica.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), que me proporcionou todo o aprendizado e oportunidades nesses cinco anos de graduação.

RESUMO

O ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) é uma importante rota metabólica que fornece substratos para a respiração mitocondrial e a síntese de diversos aminoácidos. Em plantas, o fluxo metabólico ao longo do ciclo TCA é inibido na luz por mecanismos transcricionais e pós-traducionais. Por exemplo, os genes associados ao ciclo TCA têm sua expressão diminuída em condição luminosa. Ademais, sabe-se que o sistema tiorredoxina (TRX) mitocondrial é um regulador negativo da atividade de enzimas do ciclo TCA em folhas iluminadas. No entanto, não se sabe como esse sistema contribui para a regulação do metabolismo mitocondrial na ausência de luz. Esse conhecimento é de fundamental importância, uma vez que o ciclo TCA é um importante *hub* para a regulação do *trade-off* entre crescimento e tolerância a diferentes tipos de estresse. Dentro desta perspectiva, este estudo objetivou analisar a influência do sistema TRX mitocondrial no controle dos fluxos metabólicos através do ciclo TCA e rotas associadas em condições de luz e escuro. Para isso, realizamos um experimento de marcação isotópica com $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3$ em folhas destacadas de *Arabidopsis thaliana* L. selvagem (WT) e em plantas nocautes para os genes TRX *o1* (*trxo1.1*), TRX *h2* (*trxh2.2*), ou ambos NADPH dependente TRX redutase A e B (*ntra ntrb*). As folhas foram alimentadas com $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3$ e congeladas após 0, 30 e 60 min sob condições de luz ou escuro. Os dados gerados por cromatografia gasosa associada a espectrômetro de massas foram utilizados para analisar o perfil metabólico e a distribuição do ^{13}C derivado do $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3$. Além disso, a incorporação de ^{13}C relativa e posicional em glicose e malato foi mensurada usando uma abordagem recentemente estabelecida em nosso grupo. Nenhum enriquecimento de ^{13}C foi observado em metabólitos do ciclo TCA em folhas WT iluminadas. No entanto, o conteúdo de succinato aumentou, enquanto alanina diminuiu na luz, sugerindo uma fonte alternativa de carbono para a síntese de succinato em WT na luz. No escuro, houve um aumento significativo do conteúdo de malato, citrato e succinato em WT, evidenciando uma maior atividade do ciclo TCA nesta condição, quando comparado com a luz. Em contraste ao WT, todos os mutantes mostraram mudanças substanciais tanto no conteúdo metabólico quanto no enriquecimento de ^{13}C , independente da condição imposta (luz ou escuro). Análises multivariadas evidenciam que o duplo mutante *ntra ntrb* apresentou mudanças metabólicas mais drásticas, enquanto os mutantes *trxo1* e *trxh2* apresentaram perfil metabólico intermediário, em comparação ao WT na luz e escuro. Interessantemente, observamos enriquecimento de ^{13}C em glutamina de *trxo1.1* na luz e no glutamato de *trxh2* e *ntra ntrb* no escuro. Ademais, houve aumento no enriquecimento de ^{13}C no carbono 4 do malato em *trxh2.2* na luz, como resultado da atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPc). Esses resultados sugerem que TRX *o1* restringe o fluxo

de carbono para a síntese de glutamina, enquanto TRX *h2* restringe a atividade de PEPc, ambos na luz. Tomados em conjunto, nossos resultados fornecem evidências de que o sistema TRX é um importante regulador das vias metabólicas associadas ao ciclo TCA tanto no escuro como na luz.

Palavras-chave: Ciclo TCA, marcação isotópica, tiorredoxinas, *Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

The tricarboxylic acid (TCA) cycle is an important metabolic hub that provides substrates for mitochondrial respiration and the synthesis of several amino acids. In plants, the metabolic fluxes throughout the TCA cycle are inhibited in the light by transcriptional and posttranslational mechanisms. For example, genes associated with the TCA cycle have their expression reduced in light conditions. Furthermore, it has been shown that the mitochondrial thioredoxin (TRX) system is a negative regulator of the activity of TCA cycle enzymes in illuminated leaves. However, it is unknown how this system contributes to the regulation of mitochondrial metabolism in the absence of light. This knowledge is of fundamental importance since the TCA cycle is an important hub for regulating the *trade-off* between growth and stress tolerance. Here, we aimed to analyze the influence of the mitochondrial TRX system on the control of metabolic fluxes throughout the TCA cycle and associated pathways under light and dark conditions. For this, we performed an isotopic labeling experiment with $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3$ in detached leaves of *Arabidopsis thaliana* L. (WT) and in knockout plants for the genes TRX o1 (*trxo1.1*), TRX h2 (*trxh2.2*), or both NADPH-dependent TRX reductase A and B (*ntra ntrb*). The leaves were subjected to $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3$ feeding and frozen after 0, 30 and 60 min under light or dark conditions. The data generated by gas chromatography coupled to mass spectrometer was used to analyze the metabolite profiling and the distribution of ^{13}C throughout the metabolism derived from $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3$. In addition, relative and positional ^{13}C incorporation into glucose and malate was measured using an approach recently established in our group. No ^{13}C enrichment was observed in TCA cycle metabolites in illuminated WT leaves. However, succinate content increased while alanine decreased in the light, suggesting an alternative carbon source for succinate synthesis in WT. In the dark, there was a significant increase in the content of malate, citrate and succinate in WT, evidencing a greater activity of the TCA cycle under this condition, when compared to light. In contrast to WT, all mutants showed substantial changes in both metabolite content and ^{13}C enrichment, regardless of the imposed condition (light or dark). Multivariate analyzes showed that the double mutant *ntra ntrb* showed more drastic metabolic changes, while the *trxo1* and *trxh2* mutants showed an intermediate metabolite profile, compared to WT under both light and dark conditions. Interestingly, we observed ^{13}C enrichment glutamine in *trxo1.1* in the light and in glutamate in *trxh2* and *ntrb ntrb* in the dark. Furthermore, there was an increase in the ^{13}C -enrichment at the carbon 4 of malate in *trxh2.2* in the light, as result of the activity of the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPc). These results suggest that TRX o1 restricts carbon flux for glutamine synthesis, while TRX h2 restricts PEPc activity, both in the light. Taken together, our results provide evidence that the

TRX system is an important regulator of metabolic pathways associated with the TCA cycle in both dark and light conditions.

Keywords: TCA cycle, isotopic labeling, thioredoxin, *Arabidopsis thaliana*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Heat map</i> do perfil metabólico.....	18
Figura 2 – Análise discriminante parcial de mínimos quadrados (PLS-DA) de <i>A. thaliana</i> genótipos selvagem (WT) e nocautes (<i>trxol.1</i> , <i>trxh2.2</i> , e <i>ntra ntrb</i>) sob luz ou escuro	20
Figura 3 – Variável de importância na projeção (VIP) score do PLS-DA do perfil metabólico	21
Figura 4 – <i>Heat map</i> representando o enriquecimento por ^{13}C	23
Figura 5 – <i>Heat map</i> representando o enriquecimento posicional P^{13}C em malato em folhas de <i>A. thaliana</i>	24
Figura 6 – <i>Heat map</i> representando o enriquecimento posicional P^{13}C em glicose em folhas de <i>A. thaliana</i>	25
Figura 7 – <i>Heat map</i> representando o enriquecimento posicional P^{13}C em glicose em folhas de <i>A. thaliana</i>	26
Figura 8 – <i>Heat map</i> representando o enriquecimento posicional (%) P^{13}C em glicose em folhas de <i>A. thaliana</i>	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Objetivos.....	12
<i>1.1.1 Objetivo geral.....</i>	<i>12</i>
<i>1.1.2 Objetivos específicos</i>	<i>12</i>
1.2 Hipótese	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 Material vegetal e condições de crescimento	13
2.2 Experimento de marcação isotópica com ¹³C	13
2.3 Extração e análise metabólica em GC-MS.....	13
2.4 Determinação do perfil metabólico e enriquecimento de ¹³C	14
2.5 Análise estatística	15
3 RESULTADOS.....	16
3.1 Perfil metabólico na luz	16
3.2 Perfil metabólico no escuro	17
3.3 Análises multivariadas revelam as principais diferenças entre os genótipos	17
3.4 Enriquecimento de ¹³C em metabólitos associados ao ciclo TCA	21
3.5 Enriquecimento posicional em malato	22
3.6 Enriquecimento posicional em glicose.....	23
4 DISCUSSÃO	26
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Tiorredoxinas (TRXs) são enzimas presentes em diversos compartimentos celulares, como cloroplasto, mitocôndria, citosol e núcleo (BELIN et al., 2015). O sítio ativo das TRXs contém dois resíduos de cisteína (Cys) (OKEGAWA, 2021). É possível encontrar TRX na forma reduzida, como tióis, ou na forma oxidada, como molécula de dissulfeto. De modo geral, as TRXs atuam regulando outras enzimas que possuem resíduos de Cys em sua estrutura. Por meio da quebra ou catálise de pontes dissulfetos entre resíduos Cys, as TRXs ativam ou inativam a atividade da enzima alvo (GEIGENBERGER et al., 2017). A principal função das tiorredoxinas na forma tiol é reduzir as proteínas alvo. Essa interação entre a TRX no estado reduzido (tiol) e o substrato de dissulfeto, está relacionada ao poder redutor dos sistemas NADPH/NADP⁺ e ferredoxinas (FTRs). As TRXs são reguladas por TRX redutases, que por sua vez dependem de poder redutor das FTRs ou do NADPH (NTRs) (SOUZA et al., 2019). Assim, via de regra as TRXs atuam na regulação redox do metabolismo das plantas, enquanto as TRXs mitocondriais possuem um papel central na regulação redox do metabolismo desta organela (MØLLER et al., 2020).

O metabolismo mitocondrial e vias metabólicas citosólicas associadas são importantes drenos do poder redutor derivado dos plastídios, prevenindo possíveis efeitos deletérios do estresse redutor gerado pela fotossíntese (LIMA-MELO et al., 2016; NOGUCHI; YOSHIDA, 2008). Várias vias respiratórias alternativas são ativadas sob estresse, o que influencia na aclimação das plantas (ARAÚJO et al., 2011; DEL-SAZ et al., 2018). Além disso, o ciclo TCA é um importante *hub* para a regulação do *trade-off* entre crescimento e tolerância a diferentes tipos de estresse. Isso é sustentado pelo fato de que os intermediários do ciclo TCA podem ser usados para sustentar a respiração mitocondrial e a síntese de aminoácidos no citosol, sendo este um processo chave para o crescimento das plantas ou síntese de metabólitos secundários e fitohormônios, importantes nas respostas das plantas a diversos estresses (HILDEBRANDT et al., 2015; MØLLER et al., 2020; NUNES-NESI et al., 2013). Assim, o *trade-off* entre crescimento e resiliência ao estresse depende de uma delicada regulação dos fluxos metabólicos da planta ao longo do ciclo do TCA e vias associadas. Dessa forma, compreender como os fluxos metabólicos ao longo deste ciclo são regulados certamente contribuirá para melhorar nosso entendimento sobre a regulação desse *trade-off*.

O ciclo TCA ocorre nas mitocôndrias e tem importante papel no metabolismo vegetal, uma vez que este ciclo é diretamente acoplado à síntese de ATP, utilizado como fonte de energia para inúmeras atividades celulares (NUNES-NESI et al., 2013). Diversos

mecanismos de regulação pós-traducional coordenam as atividades das enzimas deste ciclo, dentre os quais destaca-se o sistema NTR/TRX mitocondrial. Mutantes nocauteados para TRX *o1* ou ambos NTRA/NTRB, que representam os principais componentes do sistema NTR/TRX mitocondrial, apresentam aumento dos fluxos de metabólitos ao longo do ciclo TCA e o aumento da taxa de respiração (DALOSO et al., 2015; FLOREZ-SARASA et al., 2019; NIETZEL et al., 2019). Experimentos usando NTRA, NTRB e TRX *o1* recombinantes demonstraram que o sistema NTR/TRX mitocondrial é capaz de diminuir a atividade das enzimas succinato desidrogenase (SDH), fumarase (FUM) e lipoamida desidrogenase (mtLPD), que compõem diversos complexos mitocondriais, tais como piruvato desidrogenase (PDH), 2oxoglutarato desidrogenase (OGDH) e glicina descarboxilase (GDC) *in vitro*. Parece claro que o sistema NTR/TRX mitocondrial atua como regulador negativo do metabolismo (foto)respiratório (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2021).

Recente foi sugerido, por meio de análise de enriquecimento ^{13}C -posicional, que os fluxos metabólicos oriundos da glicólise e da assimilação de CO_2 mediada por fosfoenolpiruvato carboxilase PEPc em direção à síntese de glutamato, são aumentados tanto no mutante *trxol.1* quanto no mutante duplo *ntra ntrb*, em comparação com WT (LIMA et al., 2021). Esses resultados levantam a hipótese que a regulação metabólica coordenada pelo sistema NTR/TRX mitocondrial vai além do metabolismo mitocondrial *per se*. Assim, entender como este sistema regula o ciclo TCA e rotas associadas, pode fornecer informações importantes para a compreensão do funcionamento da célula vegetal. No entanto, apesar de haver um consenso em relação a participação das TRXs na regulação de enzimas do ciclo TCA, não é claro como esta regulação afeta o fluxo de carbono por esta via *in vivo*. Também é desconhecido se esta regulação tem papel predominante em condições de luz ou escuro. Desta forma, o presente trabalho visa desvendar a influência do sistema de TRXs mitocondrial na regulação do fluxo de carbono do ciclo TCA em condições de luz e escuro. Para atingir tais objetivos, folhas destacadas de *Arabidopsis thaliana* selvagens (WT) e mutantes nocauteados (*trxol.1*, *trxh2.2*, e *ntra ntrb*) foram submetidas à marcação com ^{13}C - HCO_3 sob condições de luz e escuro. Por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, foi possível analisar os perfis metabólicos, além do enriquecimento total de ^{13}C nos metabólitos associados ao ciclo TCA e o enriquecimento posicional de ^{13}C em malato e glicose.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Analisar a influência da luz e o papel do sistema NTR/TRX na regulação do fluxo metabólico através do ciclo TCA e rotas metabólicas associadas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Investigar a função do sistema TRX mitocondrial no controle do fluxo metabólico no ciclo TCA das plantas em condições de luz e escuro;
- Analisar como o fluxo de carbono através do ciclo TCA se diferencia em condições de luz e escuro em plantas sem TRX *o1*, TRX *h2* e ambos NTRA e NTRB;
- Analisar a importância do sistema NTR/TRX para a síntese de glutamato e glutamina. - Estudar o fluxo metabólico por meio do enriquecimento posicional de ^{13}C em malato e a influência das TRXs na gliconeogênese como também na fotossíntese por meio do enriquecimento posicional em glicose.

1.2 Hipótese

O sistema TRX regula diferentemente os fluxos de carbono através do ciclo TCA e rotas associadas em condições de luz e escuro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *Arabidopsis thaliana* (Col-0) tipo selvagem (WT) e mutantes nocautes (*trxo1.1*, *trxb2.2*, e *ntra ntrb*) foram obtidas da coleção de sementes Salk. Todos os mutantes foram previamente descritos (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2020; DALOSO et al., 2015; REICHHELD et al., 2007). As sementes foram desinfetadas com três lavagens em etanol 70% por 3 min, em seguida lavadas duas vezes com H₂O destilada. Posteriormente, as sementes foram mantidas no escuro por dois dias e semeadas em solo (1:1:1, solo:vermiculita:areia). As plantas foram cultivadas por oito semanas e regadas três vezes por semana em sala controlada (25 ± 1 °C, 8/16 fotoperíodo claro/escuro, 150 µmol m⁻² s⁻¹ densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) e 53 ± 5 % humidade relativa).

2.2 Experimento de marcação isotópica com ¹³C

Folhas de *A. thaliana* com 8 semanas de idade foram destacadas, o pecíolo foi imediatamente submerso em tampão 5 mM MES-TRIS buffer pH 6,15, e cortado um terço de seu comprimento para evitar bolhas. Os pecíolos foram então submersos no mesmo tampão, com adição de NaH¹³CO₃ (5mM) (DALOSO et al., 2015). As folhas foram submetidas à luz (150 µmol m⁻² s⁻¹) ou escuridão durante 0, 30 e 60 minutos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em -80 °C até posterior análise.

2.3 Extração e análise metabólica em GC-MS

Extração, derivatização e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) foram realizadas de acordo com Lisec et al (2006) com pequenas modificações. As amostras foram maceradas em almofariz com pistilo e nitrogênio líquido. 30 mg do pó foram transferidos para tubos de 2 mL e adicionados 700 µl de metanol puro gelado para a extração metabólica. Foram adicionados 30 µl de ribitol como padrão quantitativo interno. A mistura reacional foi agitada (10 min, 70 °C, 950 r.p.m.) e centrifugada (10 min, 11.000 g). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, no qual foi adicionado 375 µl de clorofórmio e 750 µl de água gelados e novamente centrifugado (15 min, 10.000 g).

Foram transferidos 150 µl da fase superior (polar) para um novo tubo e realizada secagem. As amostras foram derivatizadas adicionando 20 µl de cloridrato de metoxiamina (20 mg ml⁻¹) dissolvido em piridina pura, agitando (2 h, 37 °C) e adicionando de 35 µl de N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA; 20 µl ml⁻¹ de FAMES dissolvidos em clorofórmio a uma concentração final de 0,4 ml ml⁻¹). A mistura foi agitada (30 min, 37 °C) e 50 µl transferidos para frasco de vidro e submetidos à GC-MS.

2.4 Determinação do perfil metabólico e enriquecimento de ¹³C

Os cromatogramas foram analisados usando o *software* Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific). Também foi utilizado o método descrito por Lima e colaboradores (2021) para investigar o enriquecimento relativo de ¹³C nos metabólitos e o posicional em malato e glicose. Para isso, diferentes fragmentos com razões massa-carga (*m/z*) e estrutura química conhecidas foram utilizados. Primeiramente, o enriquecimento fracionário de ¹³C (F¹³C) foi obtido através da seguinte fórmula:

$$F^{13}C = [\sum (RIA(Mn) \times n)] / N \quad (1)$$

em que **Mn** significa a intensidade relativa do isotopólogo (**M**) com **n** incorporações de ¹³C (ex: M1, M2, M3, etc.) e **N** corresponde ao número de átomos de carbono presente no fragmento. Após, como forma de normalizar o enriquecimento de ¹³C, foi usado o controle (amostras não submetidas à marcação com ¹³C) de cada genótipo. Obtivemos o enriquecimento relativo de ¹³C (R¹³C), através da seguinte equação:

$$R^{13}C = F^{13}C_{(tempo\ n)} / F^{13}C_{(tempo\ 0)} \quad (2)$$

em que **tempo n** e **0** representam amostras após 30 ou 60 min de marcação e amostras não submetidas à marcação com ¹³C, respectivamente. Em seguida, o R¹³C foi multiplicado pelo **N** (número de átomos de carbono presente no fragmento) para obter o enriquecimento total de ¹³C (T¹³C):

$$T^{13}C = R^{13}C \times N \quad (3)$$

O enriquecimento ^{13}C posicional (P^{13}C) em malato e glicose foi então calculado subtraindo o T^{13}C de diferentes fragmentos, como descrito anteriormente (LIMA et al. 2021).

2.5 Análise estatística

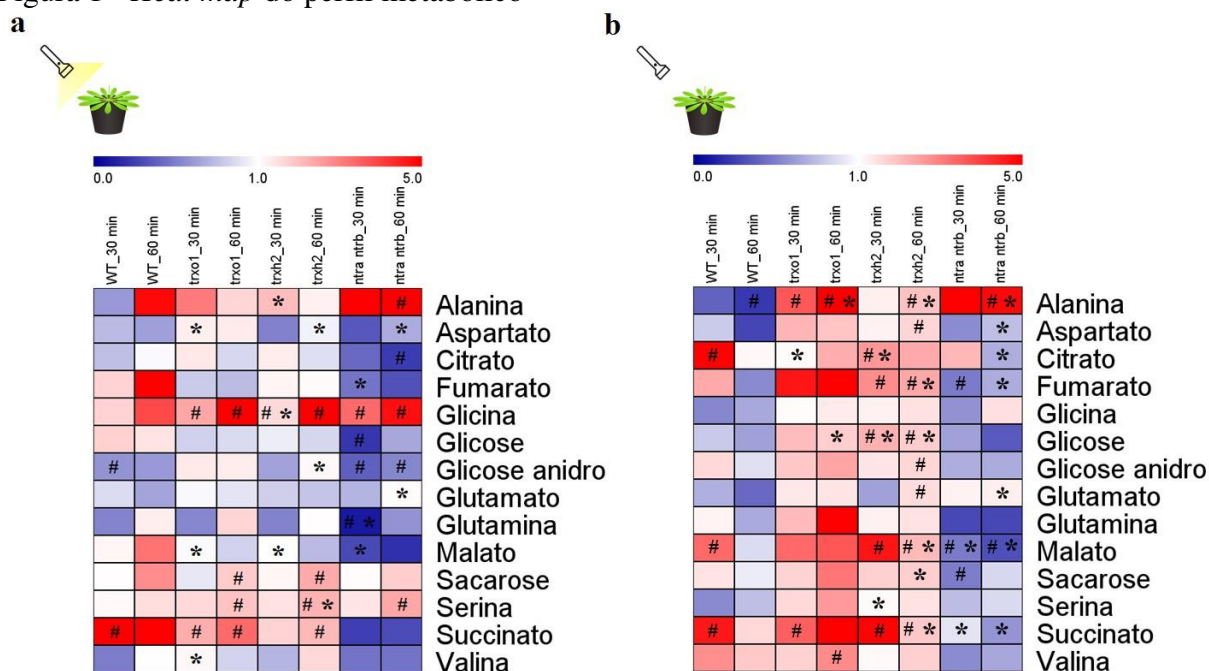
Todos os dados foram apresentados como a média de quatro repetições biológicas independentes. Diferenças significativas foram determinadas pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$). Os perfis metabólicos foram comparados por análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) usando a plataforma Metaboanalyst (CHONG; WISHART; XIA, 2019). Os *Heat map* foram realizados no *software* MeV (MultiExperiment Viewer 4.9.0).

3 RESULTADOS

Para desvendar o papel da TRX mitocondrial e a influência da luz na regulação do ciclo TCA, usamos técnicas de metabolômica associadas à marcação com ^{13}C em folhas destacadas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutantes (*trxol1.1*, *trhx2.2* e *ntra ntrb*) sob luz ou escuro durante 0, 30 e 60 minutos. Os dados foram analisados por meio de perfil metabólico, o qual demonstra alterações no conteúdo dos metabólitos ao longo do tempo. Além disso, o enriquecimento de ^{13}C ressalta a quantidade de ^{13}C incorporada em cada fragmento por meio da fixação de CO_2 por RubisCO e PEPc na luz e apenas PEPc no escuro. Ademais, utilizamos uma abordagem, recentemente estabelecida em nosso grupo, que possibilita a análise de enriquecimento ^{13}C posicional, a nível atômico, em malato e glicose (LIMA et al., 2021).

3.1 Perfil metabólico na luz

Sob condições luminosas, poucas diferenças foram encontradas em WT. Apenas um incremento em succinato e decréscimo em alanina e glicose anidro foram observadas após 30 min de luz. Em contraste, mudanças substanciais foram observadas nos mutantes para esta condição. Quase todos os metabólitos apresentaram diferenças em algum dos mutantes em relação ao tempo 0 ou em comparação ao WT. Por exemplo, o conteúdo de glutamato no tempo 60 e de alanina nos tempos 30 e 60 aumentou no mutante *ntra ntrb*, em relação ao WT, ao passo que glutamina, malato e fumarato diminuíram no tempo 30 e o aspartato diminuiu no tempo 60 no *ntra ntrb*, em comparação com o WT. Os conteúdos de glicina e serina aumentaram significativamente em todos os mutantes, mas não no WT (FIGURA 1a).

Figura 1 - *Heat map* do perfil metabólico

Fonte: dados da pesquisa

Figura 1. *Heat map* representando aumento (vermelho) ou diminuição (azul) no conteúdo dos metabólitos relativizados pelo tempo 0 de cada genótipo. Folhas destacadas de *A. thaliana* selvagem (WT) e mutantes nocaute (*trxo1.1*, *trxh2.2* e *ntra ntrb*) coletadas após 30 e 60 minutos sob luz (a) ou escuro (b). As diferenças significativas foram analisadas pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$). As diferenças entre mutantes e WT são representadas por *, enquanto os valores significativamente diferentes do tempo 0, dentro de cada genótipo, são simbolizados por #.

3.2 Perfil metabólico no escuro

Similar ao observado na luz, observamos aumento de succinato e diminuição de alanina em folhas WT no escuro. No entanto, acúmulo de malato e citrato e redução de glicina também foram observadas neste genótipo no escuro. O duplo mutante *ntra ntrb* teve acréscimo de alanina e glutamato, e decréscimo de malato, fumarato e sacarose, em relação ao WT (FIGURA 1b). Os mutantes *trxo1.1* e *trxh2.2* também apresentaram diferenças significativas em relação ao tempo 0 e/ou ao WT no escuro. Sobretudo no que concerne aos metabólitos do ciclo TCA (malato, succinato, citrato e fumarato) e glicose, que apresentaram maiores quantidades nos mutantes (FIGURA 1b).

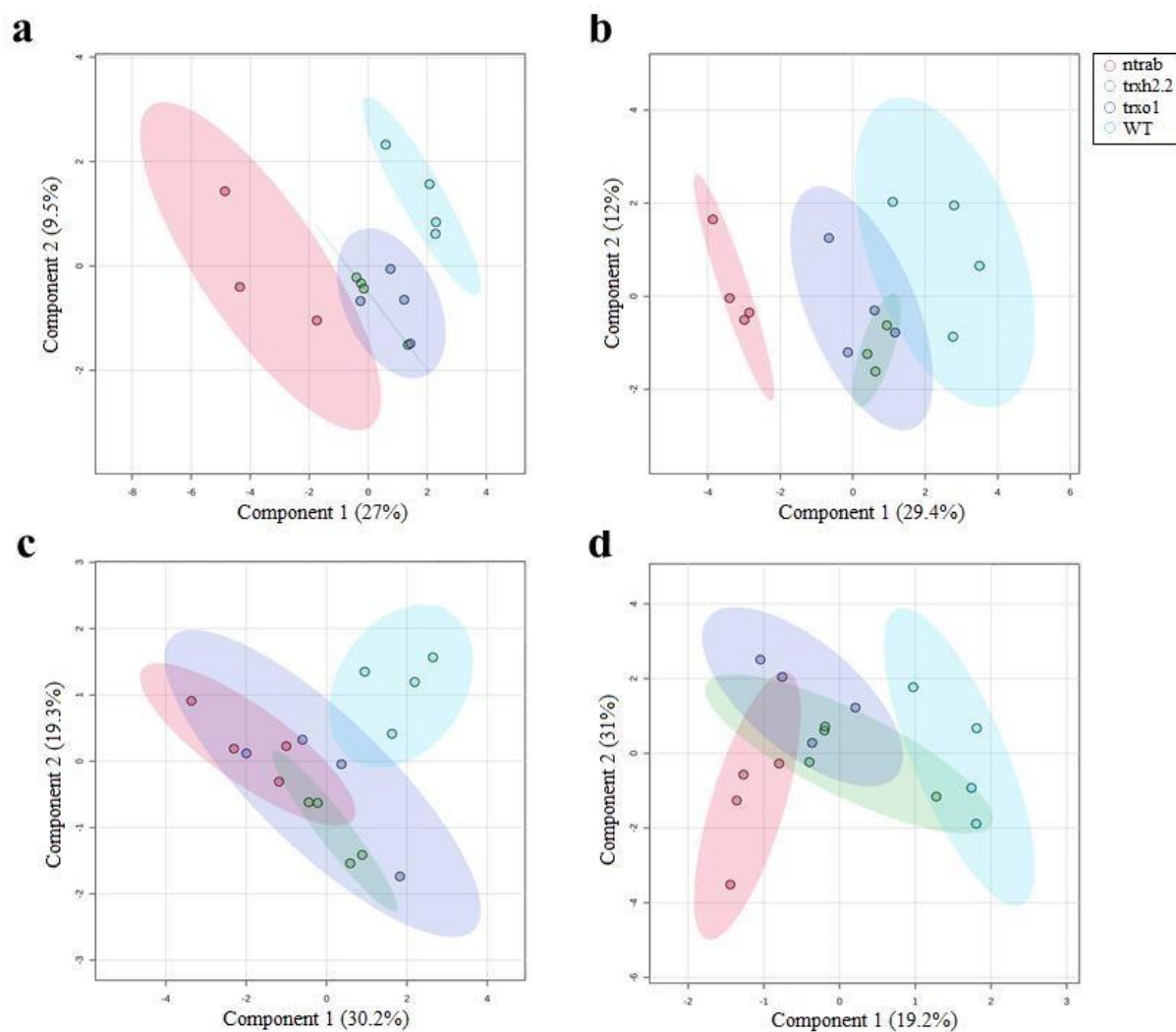
3.3 Análises multivariadas revelam as principais diferenças entre os genótipos

Como forma de entender melhor as diferenças entre os genótipos, nós analisamos os dados de perfil metabólico por meio da análise de discriminante de mínimo quadrado parcial (PLS-DA). Essa análise, além de discriminar grupos amostrais, demonstrado pela separação

especial nos componentes 1 e 2 do gráfico, também fornece uma lista de metabólitos de maior contribuição para a separação dos grupos amostrais. É atribuído para cada metabólito uma variável na pontuação em projeção (VIP) score, interpretado como uma representação desse metabólito no modelo PLS-DA. O VIP score é a soma ponderada das correlações quadradas entre o PLS-DA e o metabólito original (CHONG; WISHART; XIA, 2019). Essa análise é corriqueiramente usada para reduzir o conjunto de dados de larga escala em alguns grupos com base na similaridade multivariada entre as amostras analisadas.

As diferenças entre os genótipos foram mais evidentes na luz do que no escuro (FIGURA 2). No escuro, há pouca separação entre os mutantes e o WT, exceto aos 60 min, em que o *ntra ntrb* foi claramente separado do WT pelo componente 1 (FIGURA 2c-d). Em contrapartida, o componente 1 separou *ntra ntrb* e WT em ambos 30 e 60 minutos de luz (FIGURA 2a-b). Ademais, o WT foi separado dos mutantes simples após 30 min de luz pelo componente 2 (FIGURA 2a). Os metabólitos que provavelmente explicam as diferenças observadas no PLS-DA foram identificados pelo VIP score superiores a 1,0. Neste sentido, alanina, glutamina, valina e metabólitos do ciclo TCA (malato, fumarato e succinato) apresentaram VIP score maior que 1 após 30 e/ou 60 min na luz (FIGURA 3a-b). Interessantemente, esses metabólitos também apareceram na lista de metabólitos com VIP score maior que 1 nas amostras submetidas a escuro, no entanto houve o aparecimento de glicina, sacarose, glutamato, serina e aspartato.

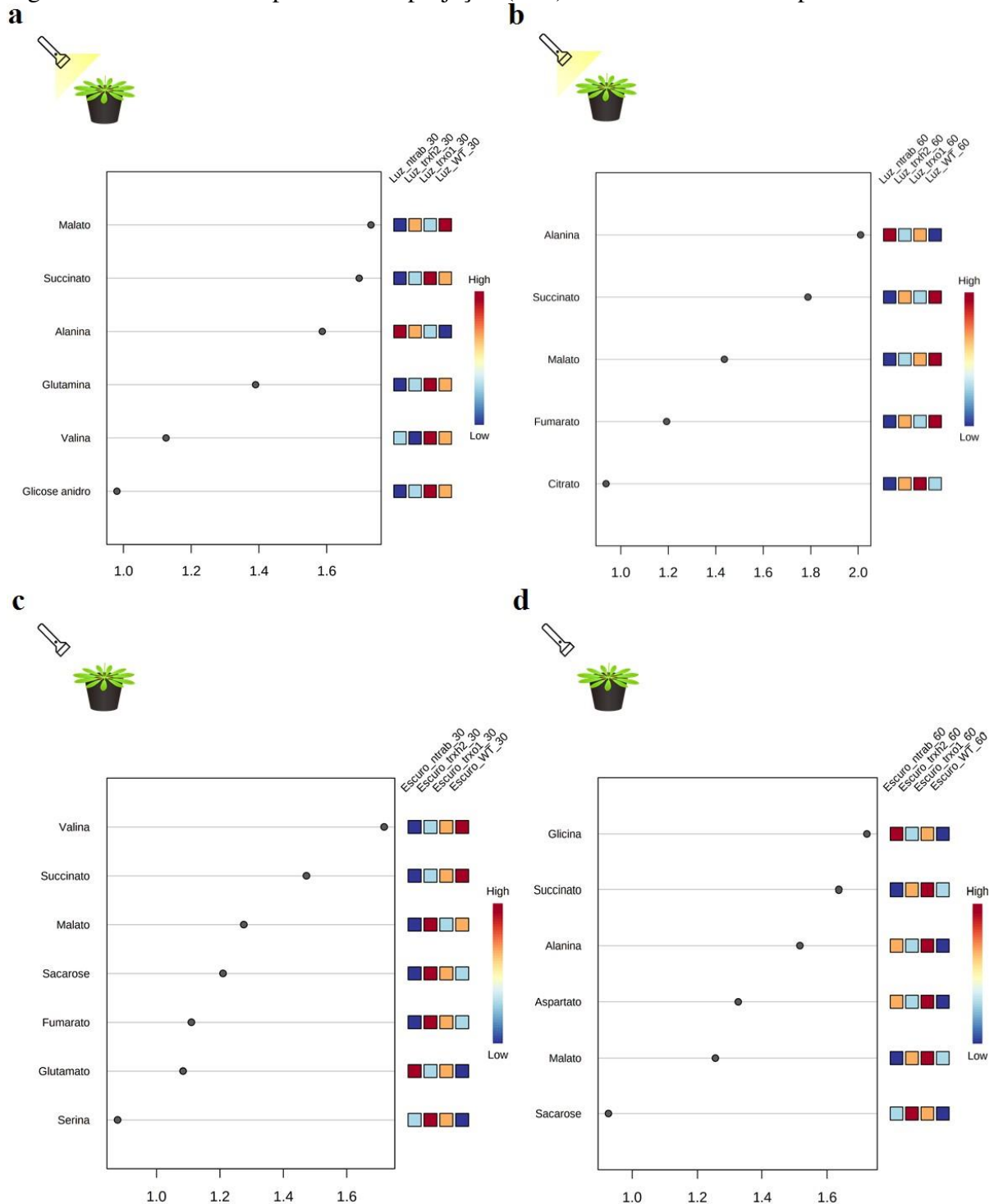
Figura 2 - Análise discriminante parcial de mínimos quadrados (PLS-DA) de *A. thaliana* genótipos selvagem (WT) e nocaute (*trxo1.1*, *trxh2.2*, e *ntra ntrb*) sob luz ou escuro



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 2. Análise discriminante parcial de mínimos quadrados (PLS-DA) de *A. thaliana* genótipos selvagem (WT em azul claro) e nocaute (*trxo1.1* em azul escuro; *trxh2.2* em verde; e *ntra ntrb* em rosa) submetidos à marcação isotópica com $^{13}\text{C-HCO}_3$ submetidas a luz (a – 30 min; b – 60 min) ou escuro (c – 30 min; d – 60 min). Essas análises foram realizadas usando a plataforma Metaboanalyst.

Figura 3 - Variável de importância na projeção (VIP) score do PLS-DA do perfil metabólico



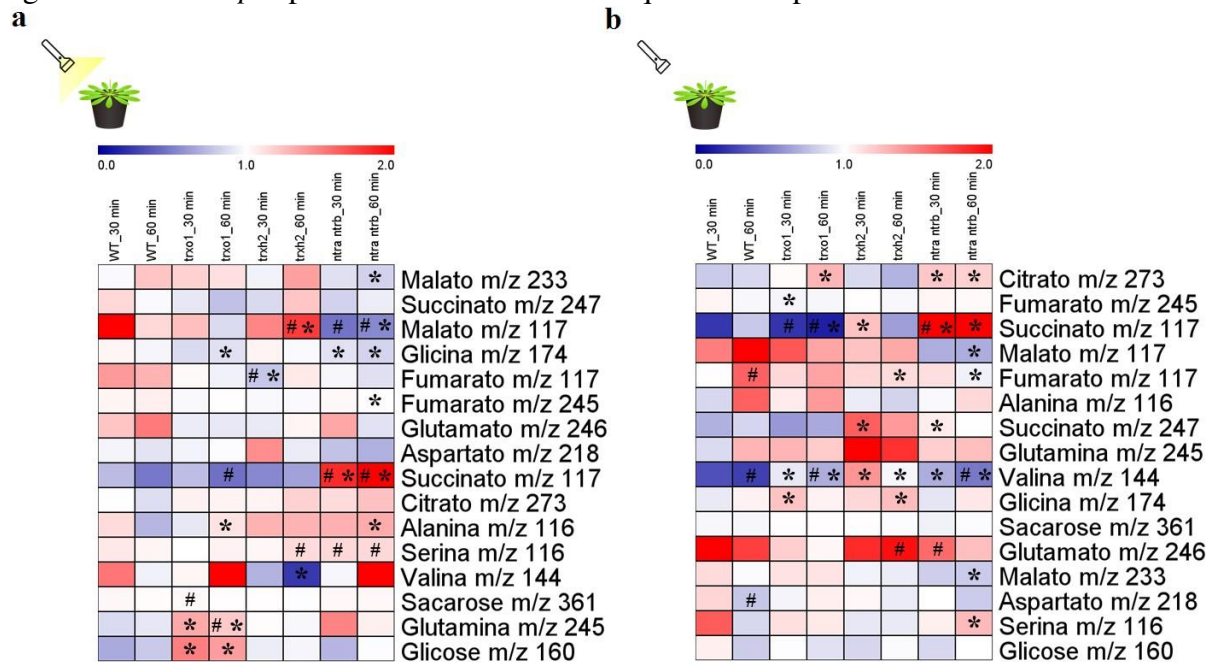
Fonte: dados da pesquisa

Figura 3. Pontuações variável de importância em projeção (VIP) de *A. thaliana* genótipo selvagem (WT) e nocaute (*trxh1.1*, *trxh2.2* e *ntra ntrb*) submetidos à marcação isotópica com $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3$ por 0, 30 e 60 minutos sob luz (a – 30 min, b – 60 min) ou escuro (c – 30 min, d – 60 min). Quanto maior o VIP score do metabólito, maior a sua influência na diferença entre os perfis metabólicos analisados na figura 2.

3.4 Enriquecimento de ^{13}C em metabólitos associados ao ciclo TCA

Após análise do perfil metabólico, nós determinamos o enriquecimento total e posicional de ^{13}C em metabólitos específicos do ciclo TCA (citrato, succinato, fumarato e malato) ou associados a ele. O enriquecimento relativo de ^{13}C (R^{13}C) foi comparado com o tempo 0 de cada genótipo (FIGURA 4). Não foi observado enriquecimento de ^{13}C nos metabólitos das folhas WT iluminadas. Entretanto, apenas glicina apresentou aumento significativo no WT após 60 min no escuro, em comparação com o tempo 0. Em contraste, diversos metabólitos associados ao ciclo TCA apresentaram aumento em ^{13}C nos mutantes, nesse caso a presença de luz foi irrelevante (FIGURA 4a,b). No mutante *trxo1.1*, R^{13}C em glutamina e glicose foi maior que o WT após 30 e 60 min na luz, enquanto na alanina foi maior somente após 60 min de luz (FIGURA 4a). No escuro, os valores de R^{13}C encontrados para citrato, fumarato, valina e glicina foram diferentes entre WT e o mutante *trxo1.1* (FIGURA 4b). No mutante *trxh2.2*, foi detectado enriquecimento significativo no fragmento m/z 117 do malato após 60 min na luz. O enriquecimento neste fragmento e em serina foi maior que o tempo 0 na luz (FIGURA 4a). Houve maior enriquecimento de ^{13}C em succinato, valina, glicina e fumarato no mutante *trxh2.2*, em comparação com WT no escuro. Enquanto isso, succinato e glutamato apresentaram maior R^{13}C em comparação com o tempo 0 (FIGURA 4b). No duplo mutante *ntra ntrb*, foi observado enriquecimento em succinato m/z 117, alanina, serina e fumarato, comparado com o tempo 0 e/ou com WT na luz. No escuro, foi observado um incremento do R^{13}C em citrato, succinato, glutamato e serina em comparação com o tempo 0 e/ou com WT (FIGURA 4b).

Figura 4 - *Heat map* representando o nível de enriquecimento por ^{13}C



Fonte: dados da pesquisa

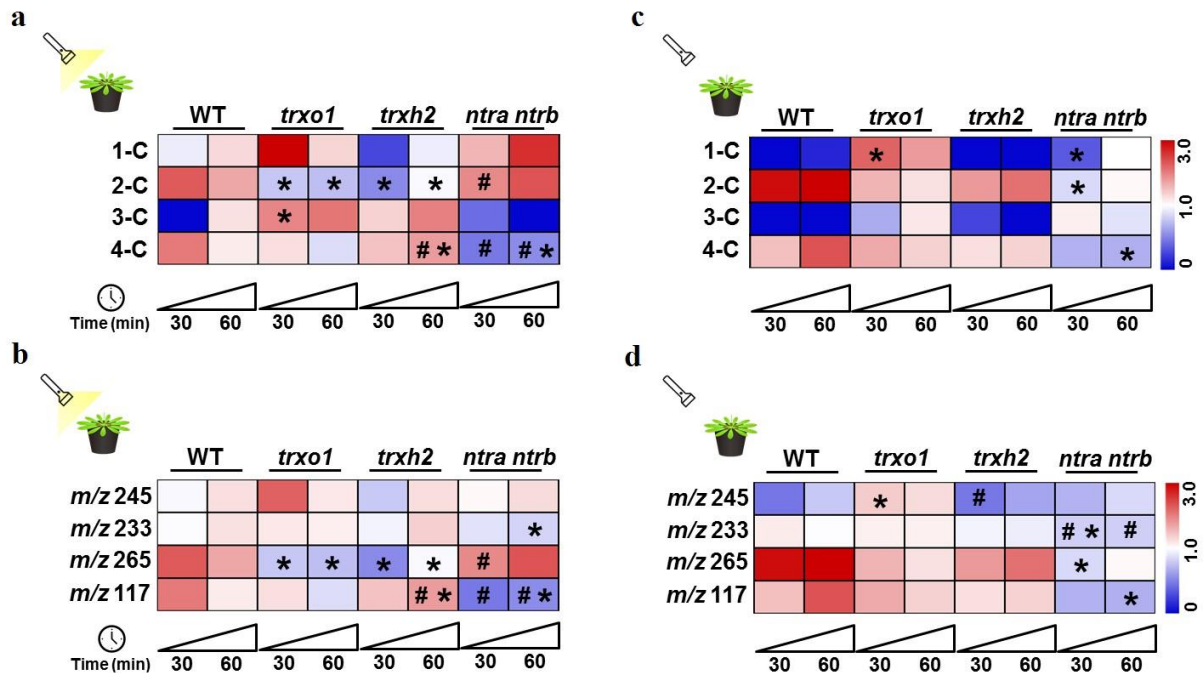
Figura 4. *Heat map* representando aumento (vermelho) ou diminuição (azul) dos enriquecimentos relativos de ^{13}C (R^{13}C) relativizados pelo tempo 0 de cada genótipo. Folhas destacadas de *A. thaliana* selvagem (WT) e mutantes nocaute (*trxo1.1*, *trhx2.2* e *ntra ntrb*) foram submetidas à marcação isotópica com $^{13}\text{C}\text{-HCO}_3$ e coletadas após 30 e 60 minutos sob luz (a) ou escuro (b). As diferenças significativas foram analisadas pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$). As diferenças entre mutantes e WT são representadas por *, enquanto os valores significativamente diferentes do tempo 0, dentro de cada genótipo, são simbolizados por #. Valores em azul e vermelho representam valores de R^{13}C menores e maiores que o tempo 0 de cada genótipo, respectivamente.

3.5 Enriquecimento posicional em malato

Para calcular o enriquecimento posicional de ^{13}C (P^{13}C), nós identificamos diferentes fragmentos de malato e glicose. Cada fragmento utilizado possui diferentes carbonos das moléculas, de acordo com o mapa de fragmentação obtido por GC-MS usando impacto eletrônico (Electron Impact - EI) como fonte de ionização, fornecida por estudos recentes (LIMA et al., 2021; OKAHASHI et al., 2019). Em seguida, calculamos o P^{13}C usando o método estabelecido por Lima e colaboradores (2021). Através desta análise, observamos aumento no enriquecimento do fragmento malato m/z 117 no mutante *trhx2.2* na luz. Este fragmento contém o carbono 4 (4-C) do malato, que é derivado da fixação via PEPc na luz (FIGURA 5a-b). Diferenças substanciais foram encontradas no 2-C do malato na luz, evidenciado pelas diferenças entre os mutantes simples e o WT no P^{13}C do fragmento m/z 265 (2-C), enquanto pouca ou nenhuma diferença foi observada entre os genótipos nos fragmentos m/z 233 (2,3,4C) e m/z 245 (1,2,3,4-C) do malato na mesma condição. No escuro, apenas o mutante *trxo1.1*

apresentou valores superiores de $R^{13}C$ no fragmento m/z 245 de malato, resultando em aumento no $P^{13}C$ no 1-C, em comparação ao WT (FIGURA 5c-d).

Figura 5 - Heat map representando o enriquecimento posicional de ^{13}C em malato em folhas de *A. thaliana*



Fonte: dados da pesquisa

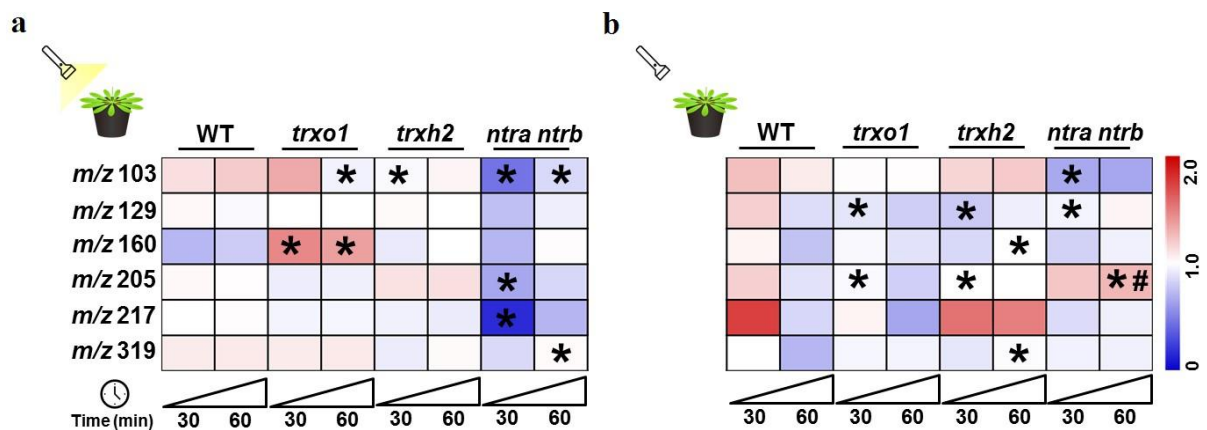
Figura 5. Heat map representando o enriquecimento posicional de ^{13}C ($P^{13}C$) em malato. Os $P^{13}C$ foram relativizados pelo tempo 0 de cada genótipo. Folhas destacadas de *A. thaliana* genótipo selvagem (WT) e mutantes nocaute (*trxo1.1*, *trxh2.2* e *ntra ntrb*) foram submetidas à marcação isotópica com ^{13}C -HCO₃ e coletadas após 30 e 60 minutos sob luz (a, b) ou escuro (c, d). O $P^{13}C$ foi obtido através do enriquecimento total de ^{13}C ($T^{13}C$) nos fragmentos m/z 245 (1,2,3,4-C), m/z 233 (2,3,4-C), m/z 265 (2-C) e m/z 117 (4-C). As diferenças significativas foram analisadas pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$). As diferenças entre mutantes e WT são representadas por *, enquanto os valores significativamente diferentes do tempo 0, dentro de cada genótipo, são simbolizados por #. Valores em azul e vermelho representam valores de $P^{13}C$ menores e maiores que o tempo 0 de cada genótipo, respectivamente.

3.6 Enriquecimento posicional em glicose

Nós posteriormente utilizamos o método estabelecido por Lima e colaboradores (2021) para analisar o $P^{13}C$ em glicose. Primeiramente, calculamos o $R^{13}C$ em fragmentos de glicose que possuem diferentes carbonos da molécula, tais como m/z 103 (6-C), m/z 129 (4,5,6-C), m/z 160 (1,2-C), m/z 205 (5,6-C), m/z 217 (4,5,6-C) e m/z 319 (3,4,5,6-C). Análise desses fragmentos revelaram um incremento em $R^{13}C$ nos fragmentos m/z 160 em *trxo1.1* após 30 e 60 min na luz e m/z 205 no duplo mutante *ntra ntrb* após 60 min no escuro (FIGURA 6). De acordo com o $R^{13}C$ em glicose m/z 160, o $P^{13}C$ nos carbonos 1 e 2 da glicose ($P^{13}C_{1,2-C}$) foram maiores no

mutante *trxo1.1*, quando comparado ao WT. O $P^{13}C$ foi maior nos carbonos 3 e 5 nos mutantes *trhx2.2* e *ntra ntrb*, quando comparado ao WT na luz (FIGURA 7a). No escuro, o $P^{13}C_{3-C}$ foi maior nos mutantes *trxo1.1* e *trhx2.2* após 30 e 60 min, enquanto que o $P^{13}C_{5-C}$ foi maior nos mutantes *trxo1.1* e *trhx2.2* após 30 min e no *ntra ntrb* após 60 min, quando comparado ao WT (FIGURA 7b). Quando os dados de $P^{13}C$ são analisados de forma relativa (% de enriquecimento em cada par de carbonos (1-2, 3-4 e 5-6), nota-se um maior enriquecimento de ^{13}C nos 1,2-C em todos os mutantes, comparado ao WT na luz (FIGURA 8a). Foi demonstrado que este carbono reflete a incorporação do CO_2 fixado pela RubisCO em glicose (LIMA et al., 2021). De fato, não houve diferença no enriquecimento relativos nestes carbonos (1 e 2) entre os genótipos no escuro. Maior $P^{13}C_{3,4-C}$ foi observado nos mutantes *trhx2.2* na luz e nos mutantes *trxo1.1* e *trhx2.2* no escuro (FIGURA 8b). Ademais, o mutante *trxo1.1* apresentou maior $P^{13}C_{5,6-C}$ na luz (FIGURA 8a), enquanto todos os mutantes apresentaram maior $P^{13}C_{5,6-C}$ no escuro, quando comparado ao WT (FIGURA 8b).

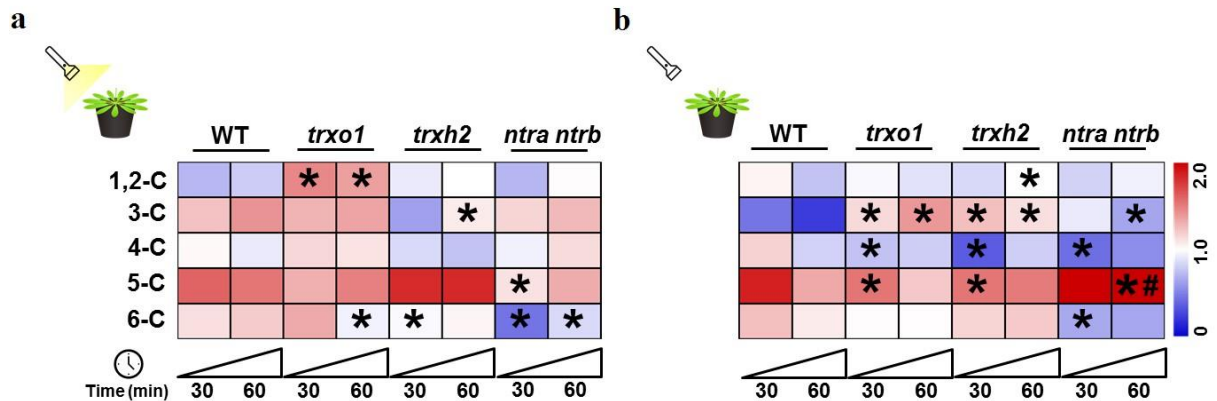
Figura 6 - Heat map representando o enriquecimento posicional $P^{13}C$ em glicose em folhas de *A. thaliana*



Fonte: dados da pesquisa

Figura 6. Heat map representando enriquecimento posicional de ^{13}C em glicose. Os $P^{13}C$ foram relativizados pelo tempo 0 de cada genótipo. Folhas destacadas de *A. thaliana* genótipo selvagem (WT) e mutantes nocaute (*trxo1.1*, *trhx2.2* e *ntra ntrb*) foram submetidas à marcação isotópica com $^{13}C-HCO_3$ e coletadas após 30 e 60 minutos sob luz (a) ou escuro (b). O $P^{13}C$ foi obtido através do enriquecimento total de ^{13}C ($T^{13}C$) nos fragmentos m/z 103 (6C), m/z 129 (4, 5, 6-C), m/z 160 (1, 2-C), m/z 205 (5, 6-C), m/z 217 (4, 5, 6-C), m/z 319 (3, 4, 5, 6-C). As diferenças significativas foram analisadas pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$). As diferenças entre mutantes e WT são representadas por *, enquanto os valores significativamente diferentes do tempo 0 são simbolizados por #. Valores em azul e vermelho representam valores de $P^{13}C$ menores e maiores que o tempo 0 de cada genótipo, respectivamente.

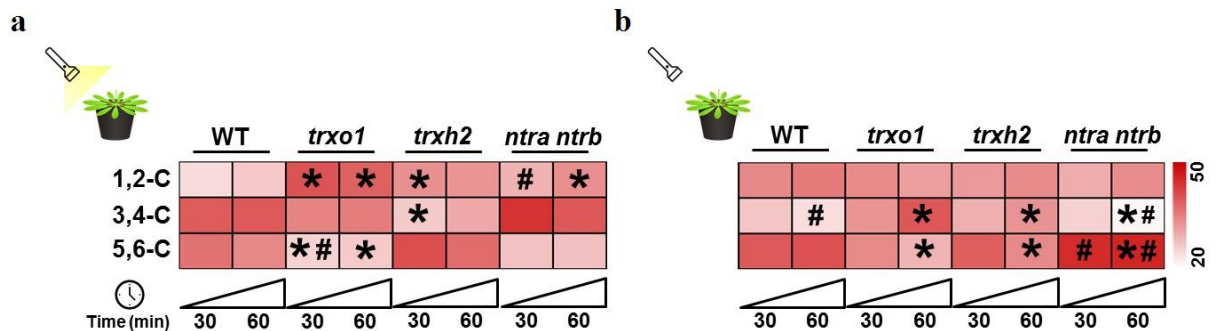
Figura 7 - *Heat map* representando o enriquecimento posicional $P^{13}C$ em glicose em folhas de *A. thaliana*



Fonte: dados da pesquisa

Figura 7. *Heat map* representando enriquecimento posicional ($P^{13}C$) em glicose. Os $P^{13}C$ foram relativizados pelo tempo 0 de cada genótipo. Folhas destacadas de *A. thaliana* genótipo selvagem (WT) e mutantes nocaute (*trxo1.1*, *trxh2.2* e *ntra ntrb*) foram submetidas à marcação isotópica com ^{13}C -HCO₃ e coletadas após 30 e 60 minutos sob luz (a) ou escuro (b). As diferenças significativas foram analisadas pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$). As diferenças entre mutantes e WT são representadas por *, enquanto os valores significativamente diferentes do tempo 0 são simbolizados por #. Valores em azul e vermelho representam valores de $P^{13}C$ menores e maiores que o tempo 0 de cada genótipo, respectivamente.

Figura 8 - *Heat map* representando o enriquecimento posicional (%) $P^{13}C$ em glicose em folhas de *A. thaliana*



Fonte: dados da pesquisa

Figura 8. *Heat map* representando enriquecimento posicional ($P^{13}C$) relativo (% de enriquecimento em cada par de carbonos (1-2, 3-4 e 5-6) em glicose. Os $P^{13}C$ foram relativizados pelo tempo 0 de cada genótipo. Folhas destacadas de *A. thaliana* genótipo selvagem (WT) e mutantes nocaute (*trxo1.1*, *trxh2.2* e *ntra ntrb*) foram submetidas à marcação isotópica com ^{13}C -HCO₃ e coletadas após 30 e 60 minutos sob luz (a) ou escuro (b). Todos os dados foram normalizados pelo tempo 0 de cada genótipo em sua respectiva condição. As diferenças significativas foram analisadas pelo teste T de Student ($P \leq 0,05$). As diferenças entre mutantes e WT são representadas por *, enquanto os valores significativamente diferentes do tempo 0 são simbolizados por #.

4 DISCUSSÃO

O ciclo TCA é composto por um conjunto de oito enzimas que atuam de forma complementar na síntese de substratos para a respiração e rotas associadas, como síntese de aminoácidos, lipídios e metabólitos secundários (NUNES-NESI et al., 2013). Para isso, os carbonos são exportados para o citosol, principalmente como citrato, 2-oxoglutarato, malato ou fumarato (MØLLER et al., 2020). A entrada do piruvato na mitocôndria e sua descarboxilação em Acetil-CoA pela PDH é importante para o funcionamento do ciclo, embora diferentes rotas alternativas à essa vem sendo demonstrada (LE; LEE; HARVEY-MILLAR, 2021). A reação da PDH libera H^+ e CO_2 bem como reduz NAD^+ à NADH, sendo, portanto, importante para suprir a demanda da cadeia respiratória mitocondrial (SCHERTL; BRAUN, 2014). No entanto, sabe-se que a PDH é inibida na luz por fosforilação (TOVAR-MÉNDEZ; MIERNYK; RANDALL, 2003). Ademais, visto que a isoforma lipoamida desidrogenase mitocondrial (mtLPD) é desativada por TRX *o1* e TRX *h2* *in vitro* (DA FONSECA-PEREIRA et al., 2020; REINHOLDT et al., 2019), acredita-se que a PDH seja também inibida via regulação redox mediada por TRX *o1*, uma vez que a mtLPD corresponde à subunidade E3 da PDH. Além disso, foi demonstrado que genes do ciclo TCA têm sua expressão diminuída e a atividade das enzimas SDH e FUM são reduzidas em condições iluminadas (EPRINTSEV et al., 2016; POPOV et al., 2010). Esses dados fornecem evidência que explicam, em partes, a inibição da respiração na luz. De acordo com essas evidências, nossos resultados demonstraram que a ausência de TRX *o1* aumenta o enriquecimento de ^{13}C em malato *m/z* 245 no escuro, que contém todos os carbonos da molécula (FIGURA 5d). Ademais, houve um maior enriquecimento nos carbonos 3 na luz e 1 no escuro no mutante *trxo1.1*, em comparação com o WT (FIGURA 5a,c), indicando um papel proeminente da TRX *o1* no controle do fluxo metabólico através do ciclo TCA.

A regulação do metabolismo mitocondrial vegetal na luz também está relacionada ao poder redutor disponível nas mitocôndrias, uma vez que a fração $NAD(P)H/NAD(P)^+$ é fortemente influenciada pela presença de luz (GEIGENBERGER et al., 2017). Esses cofatores dinucleotídeos são importante doadores de elétrons e tem papel crucial na regulação redox por ser a fonte de elétrons para as NTRs (DALOSO et al., 2015). Nas mitocôndrias, $NAD(P)H$ é usado para reduzir as enzimas NTR A e B, que por sua vez ativa as TRXs mitocondriais (MEYER et al., 2009). Nossos resultados mostraram mudanças substanciais no conteúdo de metabólitos no duplo mutante *ntra ntrb*. Os níveis de citrato, succinato, fumarato e malato reduziram substancialmente no duplo mutante no claro e no escuro, enquanto o nível destes metabólitos permaneceram inalterados ou aumentaram no WT (FIGURA 1). Esses resultados

evidenciam que a ausência das NTRs A e B afeta sobremaneira a atividade do ciclo TCA. Dentre as enzimas do ciclo TCA, evidências apontam que citrato sintase, isocitrato desidrogenase (IDH), SDH e FUM são reguladas via TRXs, que, por sua vez, dependem de ambas NTRs A e B (MARTÍ; JIMÉNEZ; SEVILLA, 2020). Assim, as drásticas mudanças observadas no duplo mutante *ntra ntrb* se deve ao severo comprometimento no sistema redox mitocondrial. Em contrapartida, as mudanças nos mutantes simples (*trxo1.1* e *trxh2.2*) foram menos drásticas, em comparação ao WT, fruto, provavelmente, da ativação de sistemas compensatórios na mitocôndria, como outras TRXs e/ou glutaredoxinas (GRXs). De fato, estudo anterior demonstrou que a ausência de TRX *o1* não alterou o estado redox da enzima oxidase alternativa (AOX), um dos alvos de TRX mais bem descritos (FLOREZ-SARASA et al., 2019). Essa complexidade da regulação redox em plantas é evidenciada pela redundância funcional entre os diferentes sistemas tiol e o amplo espectro do potencial redox das TRXs de diferentes compartimentos (YOSHIDA; YOKOCHI; HISABORI, 2019). Assim, diferentes sistemas redundantes e/ou compensatórios podem ser ativados na ausência de TRXs. Neste sentido, as mitocôndrias possuem um sistema redox compensatório bem orquestrado, mas ainda pouco caracterizado (SOUZA et al., 2019), o que ressalta a importância dos estudos envolvendo o sistema NTR/TRX mitocondrial para melhor compreender a dinâmica do metabolismo redox vegetal.

É importante salientar que os resultados de perfil metabólico não necessariamente se correlacionam com os dados de fluxo metabólico de um dado experimento (WILLIAMS et al., 2008). No entanto, nossos resultados de enriquecimento de ^{13}C corroboram com os dados do perfil metabólico, em que as maiores mudanças foram observadas nos mutantes (FIGURAS 1 e 4). Por exemplo, enquanto o WT não apresentou enriquecimento de ^{13}C na luz, houve um maior enriquecimento de ^{13}C em succinato *m/z* 117 no duplo mutante *ntra ntrb* nos tempos 30 e 60, e maior enriquecimento em malato *m/z* 117 no mutante *trxh2.2* no tempo 60 na luz. Foi demonstrado recentemente que a falta de TRX *o1* afeta a conversão de glicina em serina em *Arabidopsis* (REINHOLDT et al., 2019). Esta reação é catalisada por glicina descarboxilase/hidroximetiltransferase (GDC/SHMT) no ciclo de reações da fotorrespiração. Similarmente, nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de glicina e serina em todos os mutantes, mas não no WT na luz (FIGURA 1). Ademais, houve um maior enriquecimento de ^{13}C em serina nos mutantes *trxh2* e *ntra ntrb* após 60 min na luz (FIGURA 4a) e maior enriquecimento de ^{13}C em glicina nos mutantes *trxo1* e *trxh2* e em serina no *ntra ntrb* no escuro (FIGURA 4b). Esses resultados, aliados aos dados de perfil metabólico,

corroboram dados prévios e ressaltam o papel do sistema NTR/TRX na inibição dos fluxos metabólicos através do ciclo TCA e metabolismo fotorespiratório *in vivo* (DA FONSECAPEREIRA et al., 2021; TIMM; ARRIVAU, 2021).

A família TRX *h* de *Arabidopsis* contém oito isoformas. Inicialmente, acreditava-se que estavam presentes somente no citosol (MEYER; VIGNOLS; REICHHELD, 2002). No entanto, foi proposto que TRX *h2* residiria nas mitocôndrias em *Populus trichocarpa* e *Arabidopsis* (GELHAYE et al., 2004; MENG et al., 2010) bem como associada ao sistema de membrana do retículo endoplasmático (ER)-Golgi de *Arabidopsis* (TRAVERSO et al., 2013). Recente análises de fracionamento celular, combinando análises de imunoblot em *Arabidopsis*, demonstraram que TRX *h2* foi encontrado em frações microsomais (HOU; LEHMANN; GEIGENBERGER, 2021). Esta é uma evidência bioquímica de que TRX *h2* é encontrado no sistema endomembranar, em vez de mitocôndrias ou citosol. Acredita-se que a TRX *h2* fique ancorada na face citoplasmática do Golgi/ER por ser uma proteína miristoilada, o que explica por que essa proteína resgata funções em frações citoplasmáticas em vez de funções características do Golgi/ER (HOU; LEHMANN; GEIGENBERGER, 2021). No entanto, as mudanças metabólicas do mutante *trxh2.2* são semelhantes ao do mutante *trxo1.1*, evidenciado pela semelhança da clusterização na análise de PLS-DA (FIGURA 2). Resultados prévios demonstraram que esses mutantes tem mudanças semelhantes nos níveis de NAD(H) e NADP(H) (HOU; LEHMANN; GEIGENBERGER, 2021). Portanto, independente de estarem em subcompartimentos celulares diferentes, a falta de TRX *o1* ou TRX *h2* leva a efeitos semelhantes causados por alterações no metabolismo redox de NAD(P)(H).

Nossos resultados sugerem que o sistema NTR/TRX tem um papel importante no fluxo de carbono para a síntese de glutamina na luz. Essa ideia baseia-se no fato de que houve enriquecimento de ^{13}C em glutamina nos tempos 30 e 60 em *trxo1.1* em relação ao WT e no tempo 60 em relação ao tempo 0 (FIGURA 4a). Ademais, houve enriquecimento em glutamato somente nos mutantes *trxh2* e *ntra ntrb* no escuro (FIGURA 4b). Portanto, parece claro que o sistema NTR/TRX restringe o fluxo de carbono em direção à glutamina e glutamato *in vivo*. A síntese de glutamina ocorre através da reação de incorporação de amônio no grupo carboxila do glutamato pela glutamina sintetase (GS). A GS é uma enzima chave da assimilação primária de amônio, que utiliza amônio derivado da redução de nitrato, fotorrespiração e também da liberação catabólica de amônio durante a senescência (WANG et al., 2021). Estudos de cromatografia de afinidade em que um alvo TRX é aprisionado, formando um heterodissulfeto estável, demonstraram que a GS é um possível alvo de TRXs (BALMER et al., 2004). Assim, é possível que o sistema TRX regule diretamente essa enzima *in vivo*. Alternativamente, o maior

fluxo de carbono para o ciclo TCA poderia resultar em maiores níveis de 2-oxoglutarato, que seria exportado para o citosol e usado para a síntese de glutamato e glutamina.

A análise de enriquecimento posicional demonstrou enriquecimento de ^{13}C no carbono 4 (4-C) do malato no mutante *trxh2.2* na luz (FIGURA 5a). O carbono 4 de malato é derivado da fixação mediada pela enzima PEPc. Esta enzima fixa HCO_3 no 4-C de oxaloacetato (OAA) no citosol, usando PEP como substrato. Após, a enzima malato desidrogenase (MDH) converte OAA em malato (MELZER; O'LEARY, 1987). Assim, nossos resultados sugerem que TRX *h2* restringe o fluxo de carbono derivado da PEPc para o ciclo TCA na luz. PEPc e o transporte de OAA/malato entre citosol e mitocôndria possuem papel crucial tanto para o metabolismo respiratório como para a síntese de amino ácidos como aspartato, alanina, glutamato e glutamina (TIMM, 2020). De fato, diferenças substanciais foram encontrados nestes amino ácidos no mutante *trxh2.2* (FIGURA 1a-b). Esses resultados fornecem novas perspectivas para a regulação da enzima PEPc e, por consequência, para o metabolismo vegetal.

O método de análise de P^{13}C recentemente estabelecido permite investigar a incorporação do carbono derivado de HCO_3 a nível atômico em glicose, ou seja, em qual(is) carbono(s) da molécula de glicose o ^{13}C foi incorporado (Lima et al., 2021). Com isso, é possível investigar a contribuição da gliconeogênese e fotossíntese para a síntese de glicose, através da incorporação de ^{13}C nos carbonos 3-4 e 1-2, respectivamente. Neste estudo, observamos um maior enriquecimento nos carbonos 1 e 2 de glicose no mutante *trxo1* na luz, quando comparado com WT (FIGURA 7a). Não houve enriquecimento nestes carbonos no escuro, evidenciando serem carbonos preferencialmente marcados na luz. Quando os dados de P^{13}C são analisados de forma relativa (%), fica claro que os mutantes investigados possuem maior direcionamento dos fluxos fotossintéticos para a molécula de glicose, como evidenciado pelo maior enriquecimento relativo nos 1-2C nos mutantes, quando comparado ao WT (FIGURA 8a). No escuro, os mutantes *trxo1.1* e *trxh2.2* apresentaram maior enriquecimento nos carbonos 3 e 5, enquanto que o duplo mutante apresentou maior enriquecimento somente no 5-C (FIGURA 7b), quando comparado ao WT, sugerindo um aumento na atividade gliconeogênica nestes mutantes. Essa ideia é reforçada pelo fato de que os mutantes apresentaram maior enriquecimentos em 3,4-C e 5,6-C no escuro (FIGURA 8b). Portanto, nossos dados sugerem que o sistema TRX influencia diretamente os fluxos fotossintéticos e da gliconeogênese para a glicose, fornecendo novas perspectivas para melhor entender essas rotas metabólicas. Estudos futuros visando identificar quais proteínas da gliconeogênese são reguladas por TRXs são necessários para desvendar como as TRXs controlam essa rota metabólica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados fornecem evidências de que o sistema NTR/TRX mitocondrial é um importante regulador das vias metabólicas associadas ao ciclo TCA. O mecanismo de regulação é independente da presença da luz, uma vez que mudanças substanciais no conteúdo e no enriquecimento de ^{13}C foram observadas nos mutantes sob condições iluminadas e no escuro. Além do fato de diversas enzimas do ciclo TCA serem reguladas por TRXs, como citrato sintase, IDH, SDH e FUM, os resultados obtidos aqui são também possivelmente influenciados por alterações nas reações bioquímicas mediadas por PEPc, GS e outras enzimas associadas ao metabolismo de aminoácidos, ciclo TCA e gliconeogênese. Embora não tenha sido possível identificar novas enzimas reguladas pelo sistema NTR/TRX, este estudo fornece diversas possibilidades a serem testadas em estudos bioquímicos futuros.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, W. L. et al. Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 9, p. 489–498, 2011.
- BALMER, Y. et al. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 8, p. 2642–2647, 2004.
- BELIN, C. et al. A comprehensive study of thiol reduction gene expression under stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, v. 38, n. 2, p. 299–314, 1 fev. 2015.
- CHONG, J.; WISHART, D. S.; XIA, J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 68, n. 1, p. 1–128, 2019.
- DA FONSECA-PEREIRA, P. et al. Thioredoxin h2 contributes to the redox regulation of mitochondrial photorespiratory metabolism. **Plant Cell and Environment**, v. 43, n. 1, p. 188–208, 2020.
- DA FONSECA-PEREIRA, P. et al. Thioredoxin-mediated regulation of (photo)respiration and central metabolism. **Journal of Experimental Botany**, 2021.
- DALOSO, D. M. et al. Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 11, p. E1392–E1400, 17 mar. 2015.
- DEL-SAZ, N. F. et al. An In Vivo Perspective of the Role (s) of the Alternative Oxidase Pathway. v. 23, n. 3, p. 1–14, 2018.
- EPRINTSEV, A. T. et al. Light inhibition of fumarase in *Arabidopsis* leaves is phytochrome A-dependent and mediated by calcium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 102, p. 161–166, 2016.
- FLOREZ-SARASA, I. et al. The Lack of Mitochondrial Thioredoxin TRXo1 Affects In Vivo Alternative Oxidase Activity and Carbon Metabolism under Different Light Conditions. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 11, p. 2369–2381, nov. 2019.
- GEIGENBERGER, P. et al. The Unprecedented Versatility of the Plant Thioredoxin System. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 3, p. 249–262, mar. 2017.
- GELHAYE, E. et al. A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 40, p. 14545–14550, 2004.
- HILDEBRANDT, T. M. et al. Amino Acid Catabolism in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 11, p. 1563–1579, 2015.

HOU, L.-Y.; LEHMANN, M.; GEIGENBERGER, P. Thioredoxin h2 and o1 Show Different Subcellular Localizations and Redox-Active Functions, and Are Extrachloroplastic Factors Influencing Photosynthetic Performance in Fluctuating Light. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 705, 2021.

LE, X. H.; LEE, C. P.; HARVEY MILLAR, A. The mitochondrial pyruvate carrier (MPC) complex mediates one of three pyruvate-supplying pathways that sustain Arabidopsis respiratory metabolism. **Plant Cell**, v. 33, n. 8, p. 2776–2793, 2021.

LIMA-MELO, Y. et al. Mitochondrial GPX1 silencing triggers differential photosynthesis impairment in response to salinity in rice plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 58, n. 8, p. 737–748, 2016.

LIMA, V. F. et al. Establishment of a GC-MS-based ¹³C-positional isotopomer approach suitable for investigating metabolic fluxes in plant primary metabolism. **The Plant Journal**, set. 2021.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, 2006.

MARTÍ, M. C.; JIMÉNEZ, A.; SEVILLA, F. Thioredoxin Network in Plant Mitochondria: Cysteine S-Posttranslational Modifications and Stress Conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. September, p. 1–20, 2020.

MELZER, E.; O'LEARY, M. H. Anapleurotic CO₂ Fixation by Phosphoenolpyruvate Carboxylase in C₃ Plants. **Plant Physiology**, v. 84, n. 1, p. 58–60, 1987.

MENG, L. et al. A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3900–3905, 2010.

MEYER, Y. et al. Thioredoxins and Glutaredoxins: Unifying Elements in Redox Biology. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, p. 335–367, dez. 2009.

MEYER, Y.; VIGNOLS, F.; REICHHELD, J. P. Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. **Methods in Enzymology**, v. 347, n. 2000, p. 394–402, 2002.

MØLLER, I. M. et al. Matrix redox physiology governs the regulation of plant mitochondrial metabolism through posttranslational protein modifications. **Plant Cell**, v. 32, n. 3, p. 573–594, 2020.

NIETZEL, T. et al. Redox-mediated Kick-Start of Mitochondrial Energy Metabolism drives Resource-efficient Seed Germination. **bioRxiv**, v. preprint, 2019.

NOGUCHI, K.; YOSHIDA, K. Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. **Mitochondrion**, v. 8, n. 1, p. 87–99, 2008.

NUNES-NESI, A. et al. Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 335–343, 2013.

OKAHASHI, N. et al. Fragmentation of Dicarboxylic and Tricarboxylic Acids in the Krebs Cycle Using GC-EI-MS and GC-EI-MS/MS. **Mass Spectrometry**, v. 8, n. 1, p. A0073–A0073, 2019.

OKEGAWA, Y. As Clear as Night and Day: Redox-Dependent Metabolic Switching in Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 62, n. 3, p. 389–391, 2021.

POPOV, V. N. et al. Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A. **FEBS Letters**, v. 584, n. 1, p. 199–202, 2010.

REICHHELD, J. P. et al. Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. **Plant Cell**, v. 19, n. 6, p. 1851–1865, 2007.

REINHOLDT, O. et al. Redox-regulation of photorespiration through mitochondrial thioredoxin O1. **Plant Physiology**, v. 181, n. 2, p. 442–457, 2019.

SCHERTL, P.; BRAUN, H. P. Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. APR, p. 1–12, 2014.

SOUZA, P. V. L. et al. Function and Compensatory Mechanisms Among the Components of the Chloroplastic Redox Network. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 38, n. 1, p. 1–28, 2019.

TIMM, S. The impact of photorespiration on plant primary metabolism through metabolic and redox regulation. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 6, p. 2495–2504, 2020.

TIMM, S.; ARRIVAUULT, S. Regulation of central carbon and amino acid metabolism in plants. **Plants**, v. 10, n. 3, p. 1–4, 2021.

TOVAR-MÉNDEZ, A.; MIERNYK, J. A.; RANDALL, D. D. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 6, p. 1043–1049, 2003.

TRAVERSO, J. A. et al. Roles of N-terminal fatty acid acylations in membrane compartment partitioning: *Arabidopsis* h-type thioredoxins as a case study. **Plant Cell**, v. 25, n. 3, p. 1056–1077, 2013.

WANG, J. et al. **Transcription factor CsDOF regulates glutamine metabolism in tea plants (*Camellia sinensis*)** **Plant Science**, 2021.

WILLIAMS, T. C. R. et al. Metabolic network fluxes in heterotrophic *Arabidopsis* cells: Stability of the flux distribution under different oxygenation conditions. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 704–718, 2008.

YOSHIDA, K.; YOKOCHI, Y.; HISABORI, T. New Light on Chloroplast Redox Regulation: Molecular Mechanism of Protein Thiol Oxidation. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. November, p. 1–6, 2019.