



INTERACCIONES ENTRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADORAS DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS

Ibarra, Jorge

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral CONICET-UNL

Director: González, Daniel Héctor

Codirectora: Canal, María Victoria

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: Autofagia, Citocromo, Energía

INTRODUCCIÓN

El citocromo C es una hemoproteína transportadora de electrones, ubicada en el espacio intermembrana de la mitocondria, que cumple un rol fundamental en la cadena transportadora de electrones, proceso esencial para la obtención de ATP (moneda energética de la planta). Al mutar esta proteína se observan efectos en el fenotipo tales como raíces más cortas, menor diámetro de roseta y un retraso en el crecimiento, por otra parte, la sobreexpresión de CYTC1 genera un efecto contrario ya que las plantas aceleraron su ciclo de vida y, presentaron rosetas y raíces más grandes. En *Arabidopsis thaliana* existen dos genes que codifican para el Citocromo C (CYTc), CYTc-1 y CYTc-2. Previamente en el laboratorio, se obtuvieron plantas mutantes en el gen CYTc-1, y se las caracterizó fenotípicamente. En estos análisis se observó que dichas plantas presentan raíces e hipocótilos más cortos respecto a las plantas salvajes, así como también una menor biomasa de roseta (Welchen *et al.* 2012, Racca *et al.* 2018). Por otra parte, plantas con mayores niveles de CYTc-1 presentan un fenotipo opuesto, es decir raíces e hipocótilos más largos, así como mayor biomasa de roseta.

Dada la relevancia del CYTc en la obtención de energía, resulta interesante estudiar su relación con la vía TOR, ya que esta se encarga de la regulación del crecimiento en función de la disponibilidad de nutrientes y energía (Pacheco *et al.* 2021).

A su vez, la autofagia es un proceso fundamental en la degradación de componentes celulares con la finalidad de obtener energía para sobrevivir a periodos de estrés o falta de nutrientes (Inoue *et al.* 2006). Se sabe que la vía TOR es el principal inhibidor de este proceso en condiciones óptimas nutricionales. Resultados previos del laboratorio muestran que el proceso de autofagia está aumentado en las plantas mutantes CYTc. En base a

TÍTULO DEL PROYECTO: INTERACCIONES ENTRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y VÍAS HORMONALES REGULADORAS DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS

INSTRUMENTO: PICT2018-01439

AÑO DE CONVOCATORIA: 2018

ORGANISMO FINANCIADOR: ANPCYT

DIRECTOR: GONZÁLEZ, DANIEL HÉCTOR



esto, planteamos profundizar el análisis mediante el uso de mutantes en la vía de autofagia en el *background* mutante CYTc.

OBJETIVOS

- Estudiar la posible coordinación que existe entre la actividad respiratoria mitocondrial, particularmente a través de la producción de energía mediante la vía dependiente de Citocromo c (CYTc), y vías de señalización reguladoras del crecimiento en plantas.

METODOLOGÍA

Para el estudio de la interacción entre la vía TOR y el CYTc, se generaron líneas sobreexpresantes de CYTc-1, en un *background wild type* (WT), así como también en un *background* mutante para la proteína RAPTOR (componente del complejo TOR) y mutantes en la proteína RPS6B (componente de esta vía corriente abajo). A estas líneas se les realizó una extracción de ARN de hojas de roseta para luego detectar mediante RT-qPCR el nivel de transcrito de CYTc-1, y así seleccionar las líneas con mayores niveles. Sobre las líneas seleccionadas, se realizó una medición por Western Blot para detectar los niveles de proteína CYTc, y corroborar de esta manera que los niveles de transcrito se traducen correctamente a proteína. Tanto para la RT-qPCR como para los Western Blot se utilizaron como controles plantas WT, plantas mutantes en RAPTOR y en RPS6B y, sobreexpresantes de CYTc-1.

En cuanto al estudio de la autofagia, se trabajó con mutantes en los genes ATG5 y ATG7, los cuales codifican para dos proteínas claves en la formación del autofagosoma. Se generaron líneas de cruza entre plantas mutantes ATG5 y ATG7 con mutantes en CYTc-1 (AGK o ASALK), para obtener de esta manera líneas mutantes dobles para ambos genes. Al tener líneas con pérdida de función fue necesario realizar sucesivas rondas de selección hasta obtener las líneas dobles homocigotas. Esto se realizó mediante selección con antibiótico en placa y posterior genotipificación mediante PCR. Una vez obtenidas las líneas doble homocigota *atg5 x cytc-1a*(AGK) se les realizaron mediciones de raíces en plántulas en medio MS o suplementado con sacarosa al 1%, con el fin de analizar si afectar la autofagia empeoraba el fenotipo de plantas mutantes CYTc-1 y si el agregado de una fuente exógena de azúcares generaba cambios.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

El análisis mediante RT-qPCR permitió identificar líneas con elevados niveles de transcrito en las líneas sobreexpresantes de CYTc en el *background* WT, RAPTOR y RPS6B. Por otra parte, al realizar el western blot de las líneas con elevados niveles de transcrito para CYTc, se observó en primera instancia que las líneas WT sobreexpresantes presentaban mayores niveles de proteína que su control WT (plantas WT no transformadas). En segunda instancia, al analizar los niveles endógenos de proteína CYTc en plantas mutantes RAPTOR y RPS6B, observamos que presentaban mayores niveles respecto a las plantas WT. Luego al comparar las líneas sobreexpresantes CYTc en el *background* RAPTOR y RPS6B con sus respectivos controles parentales, se observa que los niveles de proteína son iguales o menores en dichas líneas. Esto permite pensar que la expresión de CYTc en el *background* mutante para RAPTOR y RPS6B podría estar

siendo regulada a nivel post-transcripcional o post-traducciona, ya que los altos niveles de transcripto que observamos previamente no se condicen con los niveles de proteína.

En cuanto a la autofagia, pudimos ver que el hecho de alterar este proceso no altera la longitud de las raíces respecto de la mutante CYTc-1, sino que mantiene valores similares. Esto permite pensar que las líneas mutantes en CYTC1 no estarían utilizando como una posible fuente de energía la autofagia para su crecimiento en estadio de plántula. Una observación es que suplementar el medio con sacarosa al 1% mejora notablemente el crecimiento en las líneas mutantes en ATG5, con respecto a la longitud de raíces observadas en medio MS.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., & Moriyasu, Y. (2006). AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. *Plant and cell physiology*, 47(12), 1641-1652.

Pacheco, J. M., Canal, M. V., Pereyra, C. M., Welchen, E., Martínez-Noël, G. M., & Estevez, J. M. (2021). The tip of the iceberg: emerging roles of TORC1, and its regulatory functions in plant cells. *Journal of experimental botany*, 72(11), 4085-4101.

Racca, S., Welchen, E., Gras, D. E., Tarkowská, D., Turečková, V., Maurino, V. G., & Gonzalez, D. H. (2018). Interplay between cytochrome c and gibberellins during Arabidopsis vegetative development. *The Plant Journal*, 94(1), 105-121.

Welchen, E., Hildebrandt, T. M., Lewejohann, D., Gonzalez, D. H., & Braun, H. P. (2012). Lack of cytochrome c in Arabidopsis decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(7), 990-1001.