



ESTUDIO DE PROTEÍNAS VEGETALES PERTENECIENTES A LA FAMILIA OXR

Regina Mencía

Doctorado en Bioquímica y Biología Aplicada

Directora Argentina: Dra. Elina Welchen

Director Alemán: Dra. Jutta Ludwig-Müller

Lugar de realización: Laboratorio: Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral/ Technische Universität Dresden

Fecha de la defensa: 10 de febrero de 2020.

rmencia@santafe-conicet.gov.ar

Resumen

La familia de proteínas eucariotas OXR (*Oxidation Resistance*) se caracteriza por la presencia del dominio TLDc altamente conservado en la mitad C-terminal, sin actividad específica asignada. Se ha descrito previamente su papel en la prevención del daño celular por estrés oxidativo y en respuesta a enfermedades relacionadas con patógenos en animales. En esta Tesis nuestro objetivo fue estudiar la presencia y el papel de las proteínas OXR en *Arabidopsis thaliana*.

Identificamos seis proteínas OXR en *Arabidopsis* y nos centramos en el análisis de 2: AtOXR2 y AtOXR5. Confirmamos su localización subcelular por CLSM usando reporteros fluorescentes y vimos que AtOXR2 se expresa en mitocondrias, mientras que AtOXR5 se localiza en el apoplasto, en condiciones normales de crecimiento.

Analizamos parámetros de crecimiento a lo largo del ciclo de vida, de plantas con altos niveles de expresión de AtOXR2 o AtOXR5 (OXR2, OXR5) y mutantes nulas por inserciones de T-DNA en ambos genes (*oxr2*, *oxr5*). Las plantas OXR2 exhibieron un mayor tamaño, mayor biomasa y una etapa vegetativa prolongada, lo que se tradujo en una mayor producción de semillas. Las mutantes OXR5 y *oxr2* no mostraron características distintivas en comparación con las plantas Wt y las plantas *oxr5* mostraron algunas similitudes a las plantas OXR2, como un mayor número de hojas y un retraso en la transición al estadio reproductivo. Además, las plantas OXR2 presentaron una mayor tasa de respiración mitocondrial, menor potencial de membrana mitocondrial y acumulación de ROS en comparación con las plantas cultivadas en condiciones normales.

Particularmente AtOXR2 es inducido en plantas Wt desafiadas con diferentes compuestos que producen estrés oxidativo y también cuando se enfrentan al patógeno Pst DC3000. Luego, analizamos los fenoti-

pos de crecimiento de las plantas OXR2, Wt, *oxr2* y *oxr5* y sus respuestas a MV y AA. En estos experimentos, las plantas OXR2 fueron más resistentes y, por el contrario, ambos mutantes con pérdida de función fueron más sensibles.

Además, enfrentamos plantas con niveles alterados de *AtOXR2* y *AtOXR5* a dos patógenos de plantas diferentes: Pst DC3000 y *Plasmodiophora brassicae*. Las plantas OXR2 mostraron una mayor resistencia a ambos patógenos en comparación con las plantas Wt. El comportamiento opuesto se observó en las plantas mutantes *oxr2* y *oxr5*. De acuerdo con este resultado, las plantas con expresión alterada de *AtOXR2* acumularon diferentes niveles de la hormona SA. El fenotipo de aumento basal de defensas frente a patógenos depende de la presencia de la vía de síntesis y señalización de SA, debido a la supresión presentada cuando se analizan plantas mutantes con pérdida de función en estos procesos (*ics1/sid2* y *npr1*).

Para explicar el hecho de que las plantas OXR2 exhiben una mayor biomasa y resistencia a aumentada a patógenos, estudiamos la hormona CKs. Las plantas OXR2 acumulan CKs y las *oxr2.2*, por el contrario, presentan menos cantidad. Los fenotipos de crecimiento presentados por las plantas OXR2 se perdieron en plantas mutantes con pérdida de función en la síntesis (*ipt1357+OXR2*) y en la señalización de CKs (*ahp1234+OXR2*). En plantas con ganancia de función en el catabolismo de CKs (*CKX1+OXR2* y *CKX2+OXR2*) detectamos una reversión parcial del fenotipo de longitud de raíz y una mayor sensibilidad hacia Pst DC3000. Es probable que la acumulación de CK en las plantas OXR2 se deba en parte a la disminución de la actividad de CKX.

En general, proporcionamos nuevas evidencias sobre el papel de las proteínas OXR en Arabidopsis. Estas evidencias apuntan a reforzar el papel de las proteínas vegetales OXR en respuestas al estrés oxidativo. Además, las características conferidas a las plantas por la sobreexpresión de *AtOXR2*, resultan muy atractivas para ser utilizadas con fines agrobiotecnológicos.

Abstract

STUDY OF THE NOVEL OXR PROTEIN FAMILY IN PLANT

OXR2 is an Arabidopsis mitochondrial protein that belongs to the newly identified eukaryotic protein family OXR (OXidation Resistance). The main characteristic of this family is the presence of a TLDC domain at the C-terminal half. In order to study the function of the OXR2 protein we analyze Arabidopsis thaliana mutant lines with altered levels of the protein. These plants exhibit interesting phenotypic characteristics, particularly plants that over express the protein under the action of a 35S CaMV promoter have a larger size, higher biomass and prolonged vegetative stage. Also, we face the plants to two different pathogens: *Pseudomonas syringae* and *Plasmodiophora brassicae*, this last one is the responsible for the clubroot disease of economic importance worldwide. Interestingly the over expressor lines present increased resistance to both pathogens compared to wild type (WT) plants and on the contrary a

knockout T-DNA line show to be more sensible to the same pathogens. Furthermore the plants exhibit altered content of hormones like Cytokinins (CK) and Salicylic acid (SA). We conclude that our protein of interest constitute another example regarding to the interplay between mitochondrial activities, hormonal control of growth and defenses in plants.