

Premio Mullor

Metabolismo energético y del poder reductor en células autótrofas y heterótrofas

Claudia Vanesa Piattoni

piattoni@fbc.unl.edu.ar

Director/codirector: Dr. Alberto Álvaro Iglesias / Dr. Sergio Adrián Guerrero.

Lugar de realización: Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL, CONICET–UNL).

Laboratorio, Cátedra y/o Departamento: Laboratorio de Enzimología Molecular.

Facultad: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Universidad: Universidad Nacional del Litoral.

Fecha de la defensa: 23/03/2010.

Resumen

En la naturaleza existe una gran diversidad de organismos que provienen de un largo proceso evolutivo, el cual ha llevado a un ancestro común a diferenciarse y así adaptarse a distintos ambientes generando la aparición de nuevas especies. La teoría de la evolución fue expuesta por Charles Darwin en su obra "El origen de las especies" publicada el 24 de noviembre de 1859. Sin embargo, no fue sino hasta el siglo XX cuando pudo llegar a apreciarse cabalmente el genio de Darwin, ya que la genética, la observación de campo y la investigación de laboratorio nos han demostrado el poder explicativo de sus teorías. Ha quedado claro que el trabajo de Darwin y la obra de Gregor Mendel sobre la genética (publicada en 1866) donde explicaba la teoría de la herencia, ofrecen un cuadro coherente e inteligible sobre el cambio evo-

lutivo. A lo largo de la evolución los organismos procariotas unicelulares se fueron diferenciando de tal manera, que luego de procesos de endosimbiosis dieron lugar a la aparición de organismos eucariotas unicelulares. Las células eucariotas pudieron, a su vez, asociarse y dar lugar a la formación de organismos pluricelulares con subgrupos de células especializados organizados en distintos tipos de tejidos y órganos. La evolución de los organismos vivos fue actuando en forma iterativa, modificando el medioambiente (desde uno estrictamente anaeróbico a uno aeróbico) que en estrecha relación con estos, permitió el desarrollo de formas de vidas más avanzadas (1).

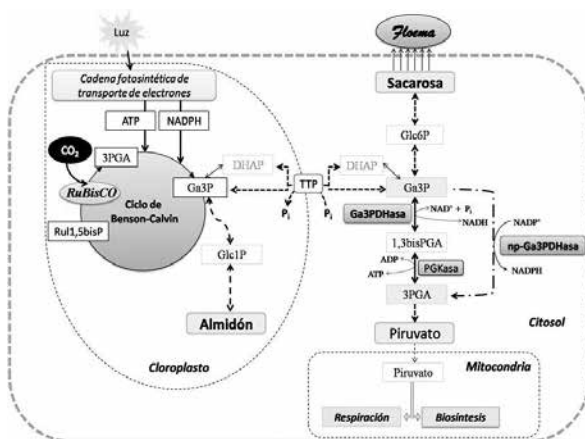
Las plantas son organismos pluricelulares estrictamente aeróbicos, compuestos por diferentes tipos de tejidos y células especializados en determinadas funciones pero que trabajan de manera coordinada. De acuerdo a sus características tróficas hacia el carbono, los tejidos y órganos de una planta pueden clasificarse como fotosintéticos o autótrofos y como no-fotosintéticos o heterótrofos. Estos tejidos comparten ciertas vías metabólicas, pero son funcional y metabólicamente distintos y es por eso que las vías que comparten se encuentran reguladas en forma diferencial y acorde a sus necesidades metabólicas (Figura I).

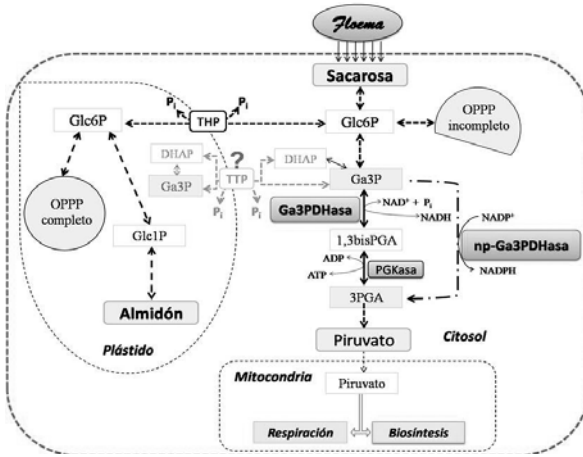
La glucólisis es una vía metabólica central y ubicua, que en plantas tiene la carac-

terística de que puede ocurrir en paralelo en dos compartimentos separados, el citosol y los plástidos. La partición de las vías metabólicas a nivel subcelular es un reflejo de cómo los organismos han evolucionado para llevar a cabo, en forma simultánea y coordinada, vías metabólicas que compiten por los mismos sustratos teniendo un control adecuado y evitando la ocurrencia de ciclos fútiles. La vía glucolítica, que permite durante la oxidación de las hexosas obtener ATP, poder reductor, piruvato y los sustratos necesarios para las reacciones anabólicas, es sumamente importante en plantas debido a que la respiración mitocondrial utiliza el piruvato (y raramente a los ácidos grasos) como fuente principal de energía. Además, las células heterótro-

ficas dependen de la glucólisis para obtener energía y fuentes de carbono a partir del almidón almacenado o de la sacarosa provista por los tejidos fotosintéticos. Por su parte, la glucólisis del citosol en células vegetales es una red particularmente compleja que presenta reacciones enzimáticas paralelas a nivel de varios intermediarios tales como la fructosa-6-fosfato (Fru6P), el gliceraldehído-3-fosfato (Ga3P) y el fosfoenolpiruvato (PEP). Dada esta particularidad, resulta relevante dilucidar qué roles cumplen cada una de las enzimas, cómo es su regulación y cuál es la importancia relativa de cada paso alternativo frente a modificaciones de las demandas metabólicas a lo largo del desarrollo o frente a situaciones de estrés (1, 2).

Figura 1. Esquema simplificado de la partición de carbono en distintos tipos de tejidos vegetales. Principales destinos metabólicos de las triosas-P generadas en el proceso de fotosíntesis en los tejidos autótrofos durante el periodo diurno (superior) y en tejidos no-fotosintéticos (inferior). En los tejidos heterótrofos la sacarosa transportada desde los tejidos autótrofos mediante el floema, es la fuente de carbono y energía cuyo metabolismo permite satisfacer las necesidades metabólicas básicas o el almacenamiento de compuestos de reserva. En ambos casos se resalta el paso de oxidación del Ga3P de la vía glucolítica citosólica. Las dos enzimas que pueden catalizar esta reacción son objeto de estudio del presente trabajo.





En esta tesis nos centramos en el estudio de las enzimas involucradas en la oxidación del Ga3P a 3-fosfoglicerato (3PGA), que en el citosol de células de plantas puede ocurrir a través de dos caminos distintos. Siguiendo la vía glucolítica clásica actúan dos enzimas, primero la Ga3P deshidrogenasa fosforilante (Ga3PDHasa, EC 1.2.1.12) dependiente de NAD^+ , convierte el Ga3P utilizando ortofosfato (P_i) y generando NADH, en 1,3bisPGA. Este último es luego convertido a 3PGA por la fosfoglicerato quinasa, en una reacción que genera una molécula de ATP. Esta ruta representa un paso clave de la vía glucolítica ya que es el único que genera un enlace de alto contenido energético a partir de P_i y es el primer paso de la vía glucolítica que permite conservar energía al sintetizarse ATP por fosforilación a nivel de sustrato. El camino alternativo de oxidación del Ga3P involucra a la Ga3PDHasa no-fosforilante, dependiente de NADP^+ (np-Ga3PDHasa, EC 1.2.1.9), que cataliza la hidrólisis irreversible del Ga3P a 3PGA generando NADPH (Figura I). Esta bifurcación no es trivial para la energética celular, ya que dependiendo de qué

enzima catalice la oxidación del Ga3P la célula va a obtener ATP y NADH o NADPH (2, 3). Las plantas, con su estilo de vida sésil, monitorean e integran constantemente estímulos internos y externos para optimizar así su crecimiento, y uno de los factores decisivos para mantener el desarrollo y la supervivencia es el control del balance de energía. Es por esto relevante avanzar en la comprensión de cómo las células vegetales pueden regular la partición del Ga3P (así como la de otros metabolitos) en el citosol celular, a fin de modificar los rendimientos de energía o poder reductor acorde a las necesidades metabólicas de cada tipo de tejido vegetal.

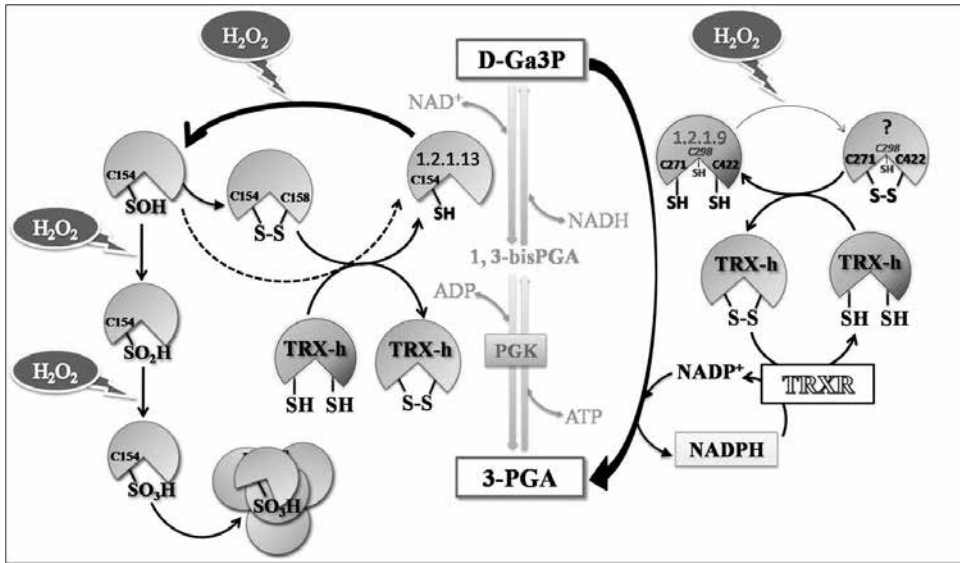
Para avanzar en el análisis comparativo de las propiedades regulatorias, cinéticas y estructurales de las dos Ga3PDHasas citosólicas presentes en células vegetales, nos propusimos estudiar principalmente la Ga3PDHasa y la np-Ga3PDHasa de *Triticum aestivum*. Las enzimas se produjeron en forma recombinante luego de haber clonado los genes, *gapN* y *gapC*, correspondientes a cada enzima de trigo y expresado convenientemente cada uno de ellos

en células de *Escherichia coli*. Las proteínas obtenidas, como polipéptidos fusionados a una etiqueta de histidinas, presentaron actividad enzimática y pudieron purificarse a homogeneidad electroforética por cromatografía de metal inmovilizado. La caracterización cinética permitió corroborar que las enzimas recombinantes presentaban propiedades cinéticas similares a las descritas para las proteínas purificadas a partir de sus fuentes naturales, haciéndolas adecuadas para continuar con el análisis de sus propiedades regulatorias.

Los estudios de regulación nos permitieron identificar modificaciones postraduccionales que afectan en forma diferencial a ambas Ga3PDHasas ante la alteración del estado redox intracelular. La actividad de las dos enzimas mostró ser afectada por agentes oxidantes relacionados a las especies reactivas del oxígeno (H_2O_2) y del nitrógeno ($\cdot NO$ y GSNO), así también como otros compuestos (GSSG). Las determinaciones de la cinética de oxidación indicaron que: mientras la np-Ga3PDHasa fue igualmente oxidada por H_2O_2 , $\cdot NO$ y GSNO, la oxidación de la Ga3PDHasa fue catalizada con mayor rapidez y en el siguiente orden: $H_2O_2 > \cdot NO > GSNO > GSSG$ (este último prácticamente no modificó la actividad de la np-Ga3PDHasa). La reacción de oxidación de la np-Ga3PDHasa y de la Ga3PDHasa, fue cinéticamente menos favorable en presencia de los sustratos específicos, $NADP^+$ y NAD^+ , respectivamente. Además, la sobre-oxidación indujo la formación de agregados proteicos y la precipitación de la Ga3PDHasa, pero no así en el caso de la np-Ga3PDHasa. Los resultados

sugieren que en función de las propiedades exhibidas por la Ga3PDHasa frente a la oxidación, ésta tendría un rol fisiológico en plantas, probablemente asociada a: (i) la transducción de señales relacionadas al estrés oxidativo o (ii) a la muerte celular programada por mecanismos apoptóticos luego de la exposición prolongada de las células a compuestos oxidantes, en forma similar a los roles adicionales descriptos para la enzima en mamíferos (4). La pérdida de actividad de las dos Ga3PDHasas causada por oxidación con H_2O_2 pudo ser recuperada en forma eficiente por reducción con concentraciones micromolares de tioredoxina-*h* (TRX-*h*), lo cual es indicativo de una probable regulación redox *in vivo* de estas dos enzimas. Mientras que la reducción de la np-Ga3PDHasa con TRX-*h* fue posible independientemente del tiempo de oxidación, la reducción de la Ga3PDHasa con TRX-*h*, GSH y DTT fue haciéndose menos efectiva a medida que aumentaba el tiempo de exposición al oxidante de dicha enzima o la concentración del mismo. Los resultados obtenidos nos permiten proponer la hipótesis de que la regulación redox de la np-Ga3PDHasa ocurriría fundamentalmente por formación de un puente disulfuro y posterior reducción por la TRX-*h*; mientras que para la Ga3PDHasa podría formarse tanto el puente disulfuro como los ácidos sulfénico, sulfínico y sulfónico, dependiendo del grado de modificación por oxidación. La reducción de la Ga3PDHasa por TRX-*h* sería posible sólo cuando se forma el puente disulfuro (y tal vez el ácido sulfénico pudiera ser reducido) (Figura II).

Figura II: Esquema propuesto para la regulación redox de las dos Ga3PDHasas que se reparten el metabolismo del Ga3P en el citosol de las células vegetales, ante la presencia de H₂O₂. En gris se marca la ruta alternativa que involucra a la Ga3PDHasa y que se encontraría disminuida, ante el efecto del H₂O₂ que causa su oxidación. Con flechas en negro se indican las rutas que se mantendrán activas: para generar el NADPH, por oxidación del Ga3P a través de la np-Ga3PDHasa; en la oxidación por H₂O₂ y en la reducción de las dos Ga3PDHasas mediante el sistema de las TRXs. La flecha discontinua significa que se discute si tal reacción puede o no ocurrir.



A partir de los resultados de los estudios de regulación redox las dos Ga3PDHasas citosólicas de trigo proponemos la ocurrencia de un escenario redox que modularía la partición citosólica del Ga3P entre las dos vías alternativas (Figura I). Ante el incremento de los niveles de H₂O₂ se favorecería la síntesis de NADPH en lugar de la de ATP, dada la mayor velocidad de reacción del H₂O₂ con la Ga3PDHasa que con la np-Ga3PDHasa, lo que incrementaría el poder reductor que podría ser utilizado por los sistemas antioxidantes para enfrentar el estrés oxidativo. También, la TRX-h retroa-

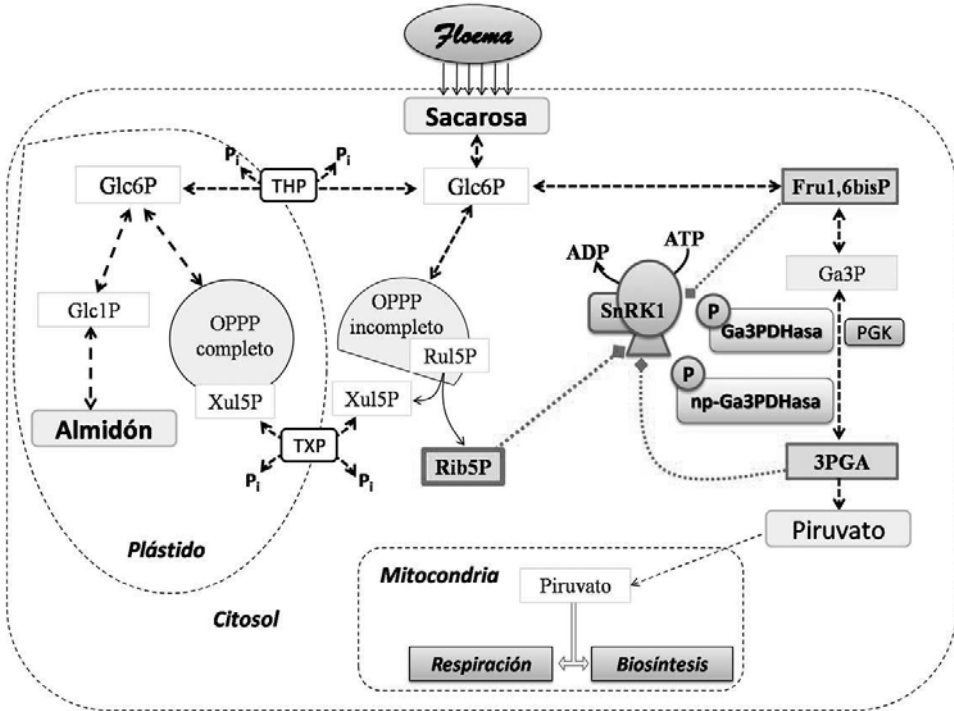
limentaría el proceso al mantener en su estado reducido a la np-Ga3PDHasa (Parte de estos resultados fueron publicados en el *International Journal of Molecular Sciences* (2013) 14, 8073–8092). Los resultados de los estudios *in vitro* están de acuerdo con los obtenidos anteriormente en la caracterización de plantas mutantes deficientes en alguna de las dos Ga3PDHasas (5, 6), así como los informados sobre la caracterización de cómo el estrés oxidativo afecta los niveles de la enzima np-Ga3PDHasa en la hoja (7) (Figura II).

Por otra parte, en trabajos anteriores se había demostrado que la np-Ga3PDHase está fosforilada en células heterotróficas de plantas superiores, forma en la que interactúa con proteínas regulatorias 14-3-3. La consecuencia cinética de esto último es que la enzima es menos activa y más sensible a cambios en los niveles de los nucleótidos de adenina y de PPI (8, 9). Continuando con la caracterización de esta regulación, los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis nos permitieron determinar que la fosforilación de la np-Ga3PDHase es catalizada específicamente por proteínas quinasas de la familia SnRK1 que requieren Mg^{2+} o Mn^{2+} , pero que son independientes de Ca^{2+} , y que estarían presentes sólo en tejidos heterotróficos (endosperma) de trigo. Por estudios de mutagénesis pudimos determinar que la fosforilación ocurre en el residuo de Ser404 de la enzima, el que se encuentra dentro de un dominio conservado para los sitios de fosforilación establecidos para las SnRK1. Encontramos además, que la Ga3PDHase es también fosforilada en células vegetales, principalmente en endosperma de trigo. Su fosforilación ocurre en el residuo de Ser205 presente en un dominio similar al de la np-Ga3PDHase y es catalizada preferentemente

por el mismo tipo de quinasas (SnRK1). Además, la fosforilación no modificó los parámetros cinéticos de la np-Ga3PDHase y afectó levemente las propiedades catalíticas de la Ga3PDHase. La fosforilación y la oxidación de ambas enzimas no exhibieron afectarse recíprocamente.

Para comprender con mejor detalle el sistema que regula por fosforilación a las enzimas en estudio, se purificó parcialmente la SnRK1 que fosforila a las dos Ga3PDHases a partir de endosperma de trigo. Con la quinasa purificada pudimos determinar que su actividad es inhibida por Rib5P ($I_{0,5}$ 0.094 mM) y en menor medida por Fru1,6bisP ($I_{0,5}$ 3,9 mM) y 3PGA ($I_{0,5}$ 5,2 mM), en condiciones cercanas a las fisiológicas; mientras que la Glc6P (principal efector de las SnRK1 de hojas de espinaca) exhibió una modesta inhibición ($I_{0,5}$ > 10 mM). Por ensayos de MALDI-TOF se identificó que la enzima sacarosa sintasa (SuSy) co-purifica con las SnRK1 de endosperma de trigo, quien además fosforila a la primera. Parte de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo fueron publicados en *Plant Physiology* (2011) July; Vol. 156, pp. 1337-1350.

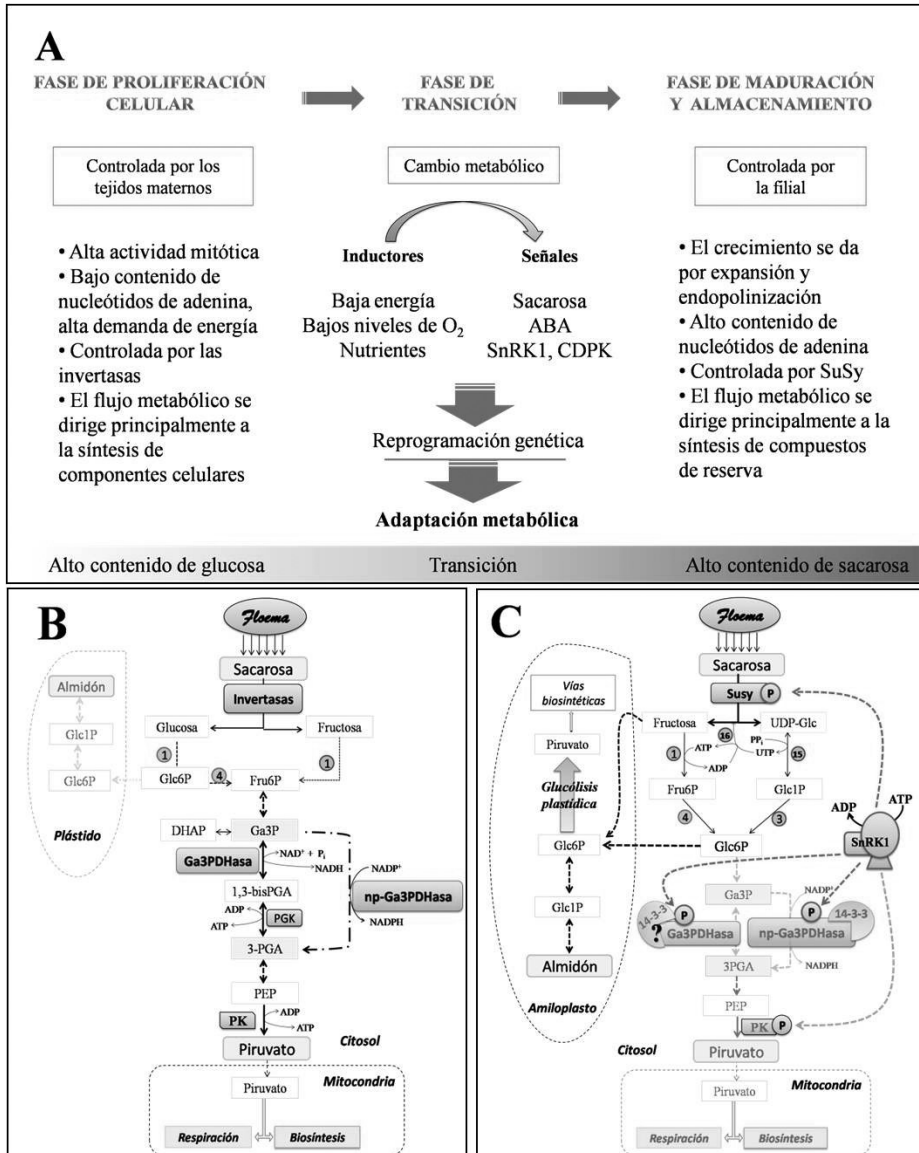
Figura III: Esquema que ubica dentro del contexto metabólico de una célula heterotrófica a los metabolitos que inhiben la actividad de la SnRK1 de endosperma de trigo. En la figura se remarcan en rojo los compuestos efectores, los cuales son intermediarios de vías metabólicas consideradas centrales dentro del metabolismo primario de los hidratos de carbono. Se representa también la fosforilación de las enzimas que son objeto de estudio en el presente trabajo, cuya fosforilación (en condiciones normales) ocurre específicamente en tejidos heterotróficos.



Teniendo presente los antecedentes en el tema, sumados a los aportes de este Trabajo de Tesis nos permiten plantear la hipótesis de que la fosforilación de la np-Ga3PDHase y de la Ga3PDHase ocurriría durante el periodo de acumulación de reservas en semillas de trigo en desarrollo (Figura IV). Tal escenario es compatible con el metabolismo de la sacarosa mediante la SuSy y con el direccionamiento

de las hexosas-P hacia el interior de los plástidos, donde mayoritariamente son utilizadas para la síntesis de almidón. Se ha demostrado que este periodo es en el cual las SnRK1 presentan su máxima actividad y se encargan de regular y coordinar el metabolismo de los hidratos de carbono en respuesta a sus disponibilidades y atendiendo la demanda de energía y los niveles de oxígeno dentro de las células (10, 11).

Figura IV: Representación esquemática para las distintas fases del desarrollo de la semilla y la regulación por fosforilación. (A) Cuadro que resume las principales características de las distintas fases del desarrollo (traducido de Weber, 2005). (B) Esquema para el metabolismo de la sacarosa durante la etapa de proliferación celular, controlado por las invertasas. (C) Esquema para el metabolismo de la sacarosa durante la etapa de acumulación de reservas, controlado por la SuSy. Los detalles y referencias de los esquemas se indican en el texto.



Referencias bibliográficas

1. Nelson, D.L.; Cox, M.M., 2004. *Lehninger, Principles of Biochemistry*. 4^o ed. W.H. Freeman & Co.
2. Plaxton, W.C., 1996. The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **47**: 185–214.
3. Iglesias, A.A., 1990. On the Metabolism of Triose–Phosphates in Photosynthetic Cells. Their Involvement on the Traffic of ATP and NADPH. *Biochemical Education*, **18**: 1–4.
4. Hnacock, J.; Desikan, R.; Harrison, J.; Bright, J.; Hooley, R.; Neill, S., 2006. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *J. Exp. Bot.*, **57**, 8: 1711–10718.
5. Rius, S.; Casati, P.; Iglesias, A.; Diego, F.G.C., 2006. Characterization of an Arabidopsis thaliana mutant lacking a cytosolic non–phosphorylating glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase. *Plant. Mol. Biol.*, **61**, 6: 945–957.
6. Ruiz, S.P.; Casati, P.; Iglesias, A.; Diego, F.G.C., 2008. Characterization of Arabidopsis lines deficient in GAPC–1, a cytosolic NAD–dependent glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase. *Plant Physiol*, **148**, 3: 1655–1667.
7. Bustos, D.M.; Bustamante, C.A.; Iglesias, A.A., 2008. Involvement of non–phosphorylating glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase in response to oxidative stress. *J Plant Physiol*. **165**, 4: 456–61.
8. Bustos, D.M.; Iglesias, A.A., 2002. Non–phosphorylating glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase is post–translationally phosphorylated in heterotrophic cells of wheat (*Triticum aestivum*). *FEBS Lett*, **530**, 1–3: 169–173.
9. Bustos, D.M.; Iglesias, A.A., 2003. Phosphorylated non–phosphorylating glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14–3–3 proteins. *Plant Physiol*, **133**, 4: 2081–2088.
10. Halford, N.G.; Hey, D.; Jhurrea, D.; Laurie, S.; McKibbin, R.S.; Paul, M.; Zhang, Y., 2003.

Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1–related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.*, **54**, 382: 467–475.

11. Weber, H.; Borisjuk, L.; Wobus, U., 2005. Molecular physiology of legume seed development. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **56**: 253–279.

Summary*Energetic and reducing power metabolism in autotrophic and heterotrophic cells*

Plants are obligate aerobic organisms composed by photosynthetic (autotrophic) and non photosynthetic (heterotrophic) tissues that work coordinately. Even when the tissues have similarities, they are functional and metabolically different, turning critic its precise metabolic regulation. Glycolysis is a central and ubiquitous metabolic pathway that in plants oddly occurs in parallel in two separately compartments, the cytosol and the plastids. Furthermore, in plants, cytosolic glycolysis is a particularly complex network with alternative enzymatic reactions at different intermediate levels (Fru6P, Ga3P and PEP). Consequently, is relevant elucidate the roles, regulation, and relative importance of the alternative reactions of cytosolic glycolysis in plant cell of different tissues. This Thesis is centered in the study of two different enzymes converting glyceraldehyde–3–phosphate (Ga3P) into 3–phosphoglycerate (3–PGA). We found differential redox regulation (by reactive oxygen species) of the phosphorylating Ga3P dehydrogenase (Ga3PDHase, EC 1.2.1.12) [that together with 3–PGA kinase derives triose–P to the synthesis of ATP and NADH], and the non–phosphorylating enzyme (np–Ga3PDHase; EC 1.2.1.9) [instead producing NADPH]. The Ga3PDHase was signifi-

cantly more sensitive to thiol oxidants than np-Ga3PDHase, while reduced thioredoxin-h differently but effectively reversed the oxidation. Results support a fine-tuning of triose-P fate under changeable redox conditions, rerouting Ga3P toward NADPH synthesis. We also found that both Ga3PDHases are phos-

phorylated in wheat seeds. By characterization of enzymes phosphorylation we identify each phosphorylation site *in vitro*, and the SnRK1 protein kinase family (and its regulation) as responsible of the posttranslational modification. We hypothesized that phosphorylation would be related to metabolic changes occurring during seed development.

Premio Mullor (Primera mención)

Mecanismos moleculares de expresión de componentes de los complejos respiratorios de plantas

Raúl Nicolás Comelli

piattoni@fbc.unl.edu.ar

Director: Dr. Daniel H. González

Lugar de realización: Laboratorio de Investigación de la Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB – UNL).

Fecha de la defensa: 13/12/2010.

Resumen

La biogénesis de la maquinaria respiratoria mitocondrial de plantas requiere la síntesis y el ensamblado en forma coordinada de los productos de más de cien genes localizados en el núcleo y dentro de la organela. Uno de los factores que regula la expresión de los genes nucleares en la disponibilidad de carbohidratos. La regulación de este proceso opera a nivel de la transcripción a través de elementos presentes en las regiones promotoras de los genes codificantes para componentes de la cadena respiratoria. La citocromo c oxidasa (COX), enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, está compuesta por al menos diez polipéptidos diferentes, tres de

ellos codificados en el genoma mitocondrial y los restantes en el genoma nuclear. Entonces, es lógico asumir que el correcto ensamblado de COX requiere la expresión coordinada de los genes codificantes para las diferentes subunidades de la mencionada enzima, o al menos de la mayoría de ellos (1-5).

En este Trabajo de Tesis, se ha caracterizado la expresión de los dos genes nucleares de Arabidopsis codificantes para la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa (COX5b-1 y COX5b-2), la subunidad de codificación nuclear más conservada.

En el primer capítulo se describe el análisis de la región de promotor de COX5b-1 (At3g15640) necesaria para su expresión e inducción por sacarosa, mediante la utilización de plantas transformadas en forma estable con fragmentos mutados de promotor fusionados al gen reportero *gus*. La expresión del promotor es absolutamente dependiente de un elemento G-box (CACGTG) situado en el nucleótido -228 desde el sitio de inicio de la traducción. Una región localizada por encima de este elemento (-333/-259) contiene secuencias

con el núcleo ATCATT y secuencias similares al elemento *distalB* (CCACTTG), las cuales son requeridas para la expresión del gen en tejidos vegetativos. Estas secuencias son capaces de unir diferentes proteínas presentes en extractos nucleares y participan en la inducción por sacarosa y otros carbohidratos (secuencias ATCATT) o potencian la respuesta a la hormona ABA (secuencias similares al elemento *distalB*). Además, un elemento reportado como sitio de unión al factor de transcripción PHR1 (GTATATGC), presente en la misma región que las secuencias mencionadas con anterioridad, actúa como elemento regulador negativo de la expresión del gen principalmente en raíces. El promotor de *COX5b-1* se induce también por el tratamiento de las plantas con fosfato inorgánico, H_2O_2 , citoquininas, giberelinas y ACC (precursor de etileno).

En el segundo capítulo se analizan las secuencias en el promotor de *COX5b-2* (At1g80230) requeridas para la expresión del gen, utilizando plantas transformadas en forma estable con formas mutadas o delecionadas del mencionado promotor fusionadas al gen *gus*. Un fragmento de 1000 pb del promotor dirigió la expresión del gen reportero en meristema apical del vástago, meristema de raíz, ápice de cotiledones y hojas y en anteras. El análisis de las deleciones del extremo distal del promotor indicó la presencia de elementos regulatorios positivos y negativos. Un elemento G-box regulatorio localizado entre -660 y -620 desde el ATG inicial fue identificado mediante análisis de mutación puntual. Este elemento se encuentra en la región codificante del gen adyacente en el genoma de *Arabidopsis*. La mutación del elemento G-box incrementa la expresión de *COX5b-2* en cotiledones y en la lámina de las hojas y, además, anula

completamente la inducción del gen por luz UV, estímulo que probablemente opera removiendo el factor de transcripción inhibitorio capaz de unir el elemento G-box. Los elementos regulatorios positivos identificados incluyen un elemento *site II* típico (TGGGCC), un elemento de secuencia TGGGTC similar al *site II* y cuatro elementos *Iniciadores* (YTCANTYY, Y = C o T). La mutación de estos elementos en forma conjunta anuló completamente la expresión del gen *COX5b-2*. Los elementos *site II* también se encuentran involucrados en la respuesta a sacarosa. El promotor de *COX5b-2* se induce, además, por el tratamiento de las plantas con fosfato inorgánico, H_2O_2 , auxinas y ACC (precursor de etileno).

En el siguiente capítulo se presentan los factores de transcripción capaces de interaccionar con algunos de los elementos regulatorios presentes en los promotores de *COX5b-1* y -2, identificados mediante ensayos de simple híbrido en levaduras. Los elementos G-box influyen la transcripción de los genes estudiados mediante caminos diferentes, ninguno de ellos relacionado con la respuesta a carbohidratos. Consecuentemente, estos elementos mostraron diferentes preferencias de unión por factores de transcripción pertenecientes a las familias ABF (ABRE-binding factor) y GBF (G-box binding factor) de factores con dominios de unión al ADN de tipo bZIP. En *COX5b-1*, las secuencias con el núcleo ATCATT fueron reconocidas por factores de transcripción pertenecientes a las familias HD-ZIP I y GT, mientras que las secuencias similares al elemento *distalB* fueron unidas por una proteína perteneciente a la familia AP2/ERF de factores de transcripción. Además, ensayos de doble híbrido en levaduras permitieron identificar interac-

ciones físicas entre algunos de los factores de transcripción mencionados.

En el último capítulo se analiza la presencia en el genoma de *Arabidopsis* de los dos genes estudiados en función de las hipótesis planteadas por el modelo DDC de duplicación de genes. Los genes *COX5b-1* y *-2* mostraron diferentes patrones de expresión y respuesta a varios compuestos, pero compartieron la inducción por sacarosa y otros carbohidratos. Los resultados comentados en los capítulos previos implican que *COX5b-2* retuvo las características de expresión presentes en la mayoría de los genes codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, pero estos mecanismos de expresión han divergido respecto a los observados en *COX5b-1*. Se propone que el promotor de este último habría adquirido nuevos mecanismos regulatorios durante la evolución posterior al evento de duplicación. Estos nuevos mecanismos habrían permitido la diversificación de los patrones de expresión, pero también la conservación de algunas respuestas que, como la inducción por sacarosa, son compartidas por *COX5b-1* y numerosos genes codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial. La conservación de estas respuestas podría ser un requisito previo para la exitosa incorporación de elementos regulatorios nuevos en esta clase de genes.

Los resultados comprendidos en este Trabajo de Tesis fueron publicados en revistas internacionales con referato estricto, comprendiendo cinco artículos originales aceptados [6-10] y uno actualmente en revisión [11]. Además, se presentaron en seis reuniones científicas (cuatro nacionales y dos internacionales) durante el período 2005-2010.

Bibliografía

1. Khalimonchuk, O. and Roödel, G., 2005. Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* **5**: 363-388.
2. Giegé, P.; Grienenberger, J. M. and Bonnard, G., 2008. Cytochrome c biogenesis in mitochondria. *Mitochondrion* **8**,1: 61-73.
3. Fontanesi, F.; Soto, I. C. and Barrientos, A., 2008. Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* **60**, 9: 557-568.
4. Richter, O. M. and Ludwig, B., 2003. Cytochrome c oxidase: structure, function and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **147**: 47-74.
5. Stiburek, L.; Hansikova, H.; Tesarova, M.; Cerna, L. and Zeman, J., 2006. Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res.* **55**: 27-41.
6. Comelli, R. N. and González, D. H., 2009. Identification of regulatory elements involved in expression and induction by sucrose and UV-B light of the *Arabidopsis thaliana* *COX5b-2* gene, encoding an isoform of cytochrome c oxidase subunit 5b. *Physiologia Plantarum* **137**, 3: 213-224.
7. Comelli, R. N.; Viola, I. L. and González, D. H., 2009. Characterization of promoter elements required for expression and induction by sucrose of the *Arabidopsis* *COX5b-1* nuclear gene, encoding the zinc-binding cytochrome c oxidase subunit. *Plant Molecular Biology* **69**: 729-743.
8. Comelli, R. N. and Gonzalez, D. H., 2009. Divergent regulatory mechanisms in the response of respiratory chain component genes to carbohydrates suggest a model for gene evolution after duplication. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 12: 1179-1181.
9. Welchen, E.; Viola, I. L.; Kim H. J.; Prendes, L. P.; Comelli, R. N.; Hong, J. C. and Gonzalez, D.H., 2009. A segment containing a G-box and an ACGT motif confers differential expression characteristics and responses to the *Arabidopsis* *Cyt-c-2* gene, encoding an isoform of cytochrome c. *Journal of Experimental Botany* **60**: 829-845.

10. Gonzalez, D. H.; Welchen, E.; Attallah, C. V.; Comelli, R. N.; Mufarrije, E. F., 2007. Transcriptional coordination of the biogenesis of the oxidative phosphorylation machinery in plants. *The Plant Journal* **51**: 105-116.

11. Comelli, R. N.; Welchen, E.; Kim, H. J.; Hong, J. C. and Gonzalez, D. H., 2012. Delta subclass HD-Zip proteins and a B-3 AP2/ERF transcription factor interact with promoter elements required for expression of the Arabidopsis cytochrome c oxidase 5b-1 gene". *Plant Molecular Biology, en revisión*.

Summary

Molecular mechanisms of expression of components of plant respiratory complexes

The biogenesis of the plant mitochondrial respiratory chain needs the coordinated synthesis and assembly of the products of more than 100 genes located in the nucleus and within the organelle. One of the factors that regulate the expression of nuclear genes is the availability of carbohydrates. This regulation operates at the transcriptional level through elements present in the promoter regions of respiratory chain component genes. Cytochrome c oxidase (COX), the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, is composed of at least ten different polypeptides encoded either in the mitochondrial genome or the nuclear genome. Then, it is logical to assume that correct COX assembly requires the coordinated expression of the genes that encode its different subunits, or at least most of them.

In this thesis we have characterized the expression of the two Arabidopsis nuclear genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5b (COX5b), the most conserved nuclear-encoded subunit.

In the first chapter, a promoter region required for expression and induction by sucrose of the *COX5b-1* gene (At3g15640) was analyzed using plants stably transformed with mutagenized promoter fragments fused to the *gus* reporter gene. Expression is absolutely dependent on a G-box present at -228 from the translation start site. A region located upstream of the G-box (-333/-259) contains elements with the core sequence ATCATT and *distalB*-like sequences (CCACTTG) that are required for expression in vegetative tissues. These sequences bind different sets of proteins present in plant nuclear extracts and participate in induction by sucrose (ATCATT) and abscisic acid (*distalB*-like) of the *COX5b-1* promoter. In addition, an element described as a binding site of the PHR1 transcription factor (GTATATGC) present in the same region that contains the sequences mentioned above acts as a negative regulatory element, mainly in roots. The *COX5b-1* promoter is also induced by treatment of plants with Pi, H₂O₂ and the hormones BAP (cytokinin), GA and the ethylene precursor ACC.

In the second chapter, we analyzed the promoter sequences required for expression of the *COX5b-2* gene (At1g80230) using plants transformed with deleted and mutagenized forms of the promoter fused to *gus*. A 1000-bp promoter fragment produced expression in root and shoot meristems, leaf and cotyledon tips, and anthers. Deletion analysis indicated the presence of positive and negative regulatory elements. A regulatory element located between -660 and -620 from the translation start site was identified as a G-box by mutagenic analysis. Mutation of the G-box, that is present within the coding region of the preceding gene in the genome, increases expression of *COX5b-2* in cotyledon and

leaf lamina and abolishes induction by UV light, which presumably acts through the removal of an inhibitory factor. Identified positive regulatory elements include a *site II* element (TGGGCC), a related element with the sequence TGGGTC and four *Initiator* elements (YTCANTYY) that completely abolish expression when mutated in combination. *Site II* elements are also involved in the response to sucrose. The *COX5b-2* promoter is also induced by treatment of plants with Pi, H₂O₂ and the hormones IAA (auxin) and the ethylene precursor ACC.

In the next chapter, transcription factors able to interact with some regulatory sequences present in the *COX5b-1* and *COX5-2* promoter regions were identified using yeast one-hybrid assays. The G-boxes influence transcription of both genes but in rather different ways, none of them related with the response to carbohydrates. Accordingly, these elements have different preferences for transcription factors from the ABRE-binding factor (ABF) and G-box binding factor (GBF) classes. For *COX5b-1*, elements with the core sequence ATCATT were recognized by transcription factors from the HD-Zip and GT families, while *distalB*-like sequences (CCACTTG) were able to interact with a transcription factor

from the AP2/EFR family. In addition, yeast two-hybrid assays indicated the existence of physical interactions between some of the mentioned factors.

In the last chapter, we analyzed if the presence in the Arabidopsis genome of the two *COX5b* genes could be explained by the DDC model for gene duplication. The *COX5b-1* and *COX5b-2* genes have different expression patterns and respond to several compounds, but share induction by sucrose and other carbohydrates. The results described in previous chapters imply that the *COX5b-2* gene has retained expression characteristics presented by most respiratory chain component genes, but the expression mechanisms have diverged for *COX5b-1*. We propose that the *COX5b-1* promoter has acquired novel regulatory mechanisms during evolution after gene duplication. These novel mechanisms have allowed the diversification of expression patterns, but also the conservation of some responses that, as induction by sucrose, are shared by *COX5b-1* and other genes encoding components of the mitochondrial respiratory chain. Conservation of these responses may be a pre-requisite for the successful incorporation of new regulatory elements in this class of genes.

Premio Mullor (Segunda mención)

Desarrollo de metodologías de preconcentración/ fluorescencia molecular: monitoreo ambiental y biológico de cadmio y níquel como marcadores de exposición y/o adicción al tabaco

Bqca. María Carolina Talio

piattoni@fcb.unl.edu.ar

Director: Dra. Liliana Patricia Fernández

Co-Directora: Dra. Adriana Noemí Masi¹

Lugar de realización: Universidad Nacional de San Luis. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Área de Química Analítica. Instituto de Química de San Luis (INQUISAL-CONICET).

Fecha de la defensa: 28/10/2011.

Resumen

En la actualidad, el consumo de tabaco constituye la primera causa evitable de morbi-mortalidad en el mundo, ocasionando 5 millones de defunciones por año. De mantenerse las pautas actuales de tabaquismo, su consumo provocará aproximadamente 10 millones de defunciones en el 2020 (1-3). Sin embargo, la distribución no será mundialmente uniforme; en los países desarrollados el número de defunciones aumentará el 50% (de 2 a 3 millones de muertes) mientras que para el resto de los países el aumento será del 700% (de 1 a 7 millones de muertes por año) (1, 4).

La prevalencia del consumo de tabaco en Argentina muestra un progresivo y lento aumento (35 al 40%) principalmente entre los grupos de menores recursos, las mujeres y los adolescentes (5, 6). Este hecho ocasiona más de 40.000 muertes

cada año, y se gastan aproximadamente 20 millones de pesos por día para atender enfermedades relacionadas con el consumo de cigarrillos (2, 7).

La Organización Mundial de la Salud ha declarado que el consumo crónico de tabaco constituye para la mayoría de los consumidores una adicción, causando más muertes por año que las producidas en forma conjunta por SIDA, tuberculosis, alcoholismo, accidentes de tránsito, drogas de abuso, homicidios y suicidios, a nivel mundial (2).

El humo de tabaco constituye una mezcla compleja de más de 4.000 sustancias químicas conocidas entre las que se encuentran numerosos tóxicos metálicos. Un cigarrillo contiene entre 1 y 2 mg de cadmio que se libera como óxido de cadmio; el 10% del óxido de cadmio inhalado se deposita en los tejidos pulmonares (8-10). El cadmio ocasiona contaminación ambiental e industrial y, en el ser humano actúa inhibiendo enzimas encargadas de los procesos de reparación del ADN; es un irritante local, inhibe la absorción intestinal de calcio impidiendo su depósito en los tejidos óseos y se acumula en distintos órganos, principalmente en riñón, hígado, placenta y eritrocitos. Tiene una vida media prolongada, de aproximadamente 20 a 30 años (11). Por otro lado, la exposición crónica a compuestos de níquel puede

ocasionar las siguientes patologías: alergias, rinitis, sinusitis, enfermedades respiratorias, cáncer en la cavidad nasal, de pulmón y de otros órganos (12-15). En particular, los fumadores están expuestos a compuestos de este metal en cantidades que fluctúan entre 2 a 6,2 μg /cigarrillo (16). Aproximadamente del 10 al 20 % es liberado en el humo de cigarrillo y puede ser inhalado como carbonilo de níquel (17).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se desarrollaron metodologías para la determinación de los analitos propuestos, cadmio y níquel, empleando fluorescencia molecular, precedida de etapas de preconcentración/separación/sensibilización. Las mismas fueron satisfactoriamente aplicadas a muestras biológicas, ambientales y en humo de tabaco, representando una alternativa a los métodos convencionales de análisis de metales a niveles de vestigios, en las áreas de análisis clínico y monitoreo ambiental, empleando un instrumental accesible en laboratorios de control.

Las concentraciones de cadmio (18) y níquel (19-21) halladas en orina y saliva fueron significativamente superiores en fumadores que en no fumadores; a su vez los fumadores pasivos mostraron concentraciones intermedias de ambos metales y la mayor exposición se relacionó con el hábito de masticar tabaco.

Los parámetros clínicos anormales y/o patológicos identificados en las muestras biológicas no interfirieron en la determinación de los metales. Las metodologías desarrolladas pudieron ser aplicadas al total de las muestras biológicas, confirmando la robustez de las mismas. Los estudios de correlación nos permiten aseverar que la exposición al humo de tabaco constituye un riesgo para la salud.

Las concentraciones de cadmio halladas en muestras de agua de la región, destinadas a consumo humano, fueron inferiores a los niveles permitidos por la legislación nacional, concluyéndose que las mismas no constituyen una fuente de exposición al tóxico metálico (22).

La metodología desarrollada para la cuantificación de níquel en la corriente principal de humo de cigarrillos (23), resultó apropiada para el control de este metal en productos de tabaco debido a su adecuada selectividad y elevada sensibilidad. Las concentraciones de níquel halladas en humo de cigarrillos mostraron una buena correlación con las de níquel urinario de fumadores de las diversas marcas de cigarrillos analizadas. Se concluye que el hábito de fumar constituye una severa exposición a este tóxico metálico, independientemente del tipo de tabaco que se consuma. No se obtuvo información concluyente respecto de la incidencia de las microperforaciones del filtro sobre los niveles de níquel en el humo de la corriente principal.

En base a los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Tesis Doctoral, se puede concluir que la exposición de los fumadores a cadmio y níquel es severa. Por lo tanto, los organismos de control y agentes de salud deben aunar esfuerzos para desalentar el consumo de cigarrillos y generar ambientes 100% libres de humo de tabaco.

Como las conclusiones a las que se han arribado en este trabajo involucran un riesgo para la salud de la comunidad, se tomó la determinación de realizar talleres de prevención y concientización en Colegios Secundarios de San Luis, aportando argumentos científicos genuinos y propios que orienten a nuestros jóvenes hacia una libre y conciente elección en este tema.

Bibliografía

1. Kevorkof, G.; Lungo, B.; Rojas, R.; Alchapar, R.; Figueroa Casas, M.; Videla, A.; Angueira, M.; Pitarque, R.; Abbate, E.; Hendriksen, B.; Caneva, J., 2004. Estudio F.U.M.Ar (Fumar en Universitarios de Medicina en Argentina). Informe final. Sección de Tabaco y Epidemiología AAMR 1-13.
2. WHO report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package. Geneva, World Health Organization.
3. Fiore, M.C.; Jaén, C.R.; Baker, T.B.; Bailey, W.C.; Benowitz, N.L.; Curry, S.J.; Dorfman, S.F.; Froelicher, E.S.; Goldstein, M.G.; Heaton, C.G.; Henderson, P.N.; Heyman, R.B.; Koh, H.K.; Kotkic, T.E.; Lando, H.A.; Mecklenburg, R.E.; Mermelstein, R.J.; Mullen, P.D.; Orleans, C.T.; Robinson, L.; Stitzer, M.L.; Tommasello, A.C.; Villejo, L.; Wewers, M.E.; 2008. Treating tobacco use and dependence. Clinical Practice Guideline. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service.
4. Montes, A.; Pérez, M.; Gestal, J.J.; 2004. Impacto del tabaquismo sobre la mortalidad en España. Adicciones 16-29.
5. Verra, F.; Zabert, G.; 2004. El Tabaquismo entre los Adolescentes de la Argentina. Encuesta del Ministerio de Salud de la Nación. Arch. Bronconeumol. **4**, 40 :1-38.
6. Stok, A.; Altieri, H.; Willigs, M.; Dantur, C.; Vega, N.; Lencina, V.; Altieri, G.; Verra, F.; Figueroa, S.; 2004. Tabaquismo en Escuela Primaria. Arch. Bronconeumol. **4**, 40:17-45.
7. Pitarque, R.; Abbate, E.; Hendriksen, B.; Julia, C.; Caneva, J.; 2004. Estudio F.U.M.Ar (Fumar en Universitarios de Medicina en Argentina). Informe final. Sección de Tabaco y Epidemiología AAMR 1-13.
8. Eisler, R.; 2000. Cadmium. In: Government, US (Ed.), Handbook of Chemical Risk Assessment. (Florida) 1-43.
9. Menden, E.E.; Elia, V.J.; Michael, L.W.; Petering, H.G.; 1972. Distribution of cadmium and nickel of tobacco during cigarette smoking. Environ. Sci. Technol. **9**, 6: 830-832.
10. Afridi, H.; Kazi, T.; Kazi, N.; Jamali, M.; Sirajuddin, M.; Baig, J.; Kandhro, G.; Wadhwa, S.; Shah, A.; 2010. Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. J. Hum. Hypertens. **24**: 34-43.
11. Ramirez, A.; 2002. Toxicología del cadmio. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos **63**: 54-64.
12. Nestle, F.O.; Speidel, H., Speidel, M.O.; 2002. Metallurgy: High nickel release from 1- and 2-euro coins. Nature **419**: 132-133.
13. Thyssen, J.P.; Linneberg, A.; Menné, T.; Johansen, J.D.; 2007. The epidemiology of contact allergy in the general population-prevalence and main findings. Contact Dermatitis **5**, 57: 287-299.
14. Goodman, J.E.; Prueitt, R.L.; Thakali, S.; Oller, A.R.; 2011. The nickel ion bioavailability model of the carcinogenic potential of nickel-containing substances in the lung. Crit. Rev. Toxicol. **2**, 41:142-174.
15. Kang, G.S.; Gillespie, P.A.; Gunnison, A.; Rengifo, H.; Koberstein, J.; Chi Chen, L.; 2011. Comparative pulmonary toxicity of inhaled nickel nanoparticles; role of deposited dose and solubility. Inhal. Toxicol. **2**, 23: 95-103.
16. Torjussen, W.; Zachariasen, H.; Andersen, I.; 2003. Cigarette smoking and nickel exposure. J. Environ. Monit. **5**: 198-201.
17. Martin Ruiz, A.; Rodríguez Gómez, I.; Rubio, C.; Revert, C.; Hardisson, A.; 2004. Efectos tóxicos del tabaco. Rev. Toxicol. **21**: 64-71.
18. Talio, M.C., Luconi, M.; Masi, A.; Fernández, L.; 2010. Cadmium monitoring in saliva and urine as indicator of smoking addiction. Sci. Total Environ. **16**, 408: 3125-3132.
19. Talio, M.C., Luconi, M.; Masi, A.; Fernández, L.; 2010. Solid surface spectroscopic methodology for ultra-trace urinary nickel monitoring in

smokers and non-smokers' subjects. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52**: 694–700.

20. Talio, M.C., Luconi, M.; Fernández, L.; 2011. New silver nanosensor for nickel traces. Part i: synthesis, characterization and analytical quality. *Journal of Life Sciences, USA* **5**: 1072-1077.

21. Talio, M.C., Luconi, M.; Fernández, L.; 2012. New silver nanosensor for nickel traces. Part ii: urinary nickel determination associated to smoking addiction. *Journal of Life Sciences, USA.* **6**: 36-40.

22. Talio, M.C., Luconi, M.; Masi, A.; Fernández, L.; 2009. Determination of cadmium at ultra-trace levels by CPE-molecular fluorescence combined methodology. *J. Hazard. Mater* **170**: 272-277.

23. Talio, M.C., Luconi, M.; Fernández, L.; 2011. Determination of nickel in cigarettes smoke by molecular fluorescence. *Microchem. J.* **99**: 486-491.

Summary

Development of preconcentration/molecular fluorescence methodologies: environmental and biological monitoring of cadmium and nickel as exposure markers and/or tobacco addiction.

Analytical methodologies were developed for cadmium and nickel determination by molecular fluorescence coupled to preconcentration / separation / sensitization strategies and they were satisfactorily applied to biological and environmental samples, and tobacco smoke.

Found concentrations of urinary and salivary toxics were significantly superior

for smokers than non-smokers; passive smokers showed intermediate concentrations. The highest exposure was related with the tobacco chewing habit.

Cadmium concentrations in regional water samples destined to human consumption were lower than the permitted levels for national legislation; so, it can be concluded that waters do not represent a source of exposure to this metal.

The developed methodology for nickel determination in mainstream of cigarette smoke resulted appropriate for quantifying this metal in tobacco product, for its adequate selectivity and elevated sensitivity. Found nickel concentrations in cigarette smokes can be correlated with urinary nickel contents of smoker of different analyzed cigarette brands.

Taking into account the results, it can be concluded that smoker's exposure to cadmium and nickel is severe. Hence, control agencies and health agencies must join efforts to discourage smoking and generate environment 100% smoke-free snuff.

Prevention and awareness workshops have been realized in Secondary Schools of San Luis, providing genuine and proper scientific arguments to guide our youth toward a free and conscious choice in this matter.

Nota

¹ Fallecida el 5 de agosto de 2010.