

ESTUDIO FUNCIONAL Y MOLECULAR DE FACTORES PROTEICOS VINCULADOS CON EL ENSAMBLADO DE LA CITOCROMO C OXIDASA EN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Torres Leonel¹

¹Cientibecario del Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, CONICET.
Director/a: Dra. Elina Welchen
Codirector/a: Dr. Natanael Mansilla

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

La citocromo *c* oxidasa (CcO) constituye la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones en eucariotas y algunos procariotas. La CcO está compuesta por 12 a 14 subunidades en el caso de plantas (Millar y col., 2004). El núcleo enzimático está formado por tres subunidades grandes y altamente hidrofóbicas (Cox1, Cox2 y Cox3) codificadas en el genoma mitocondrial. Además de estas subunidades, la CcO contiene dos centros de cobre y dos grupos hemo que son necesarios para el transporte de electrones y la reducción de oxígeno por parte de la enzima. El corazón catalítico de CcO está rodeado de pequeñas proteínas codificadas en el genoma nuclear, sintetizadas en el citoplasma y luego importadas a la mitocondria.

El ensamblado de la CcO es un proceso secuencial que involucra un gran número de proteínas accesorias (Nijtmans y col., 1998). La proteína SCO1, que está localizada en la membrana interna mitocondrial, y es necesaria para la inserción del centro Cu_A dentro de COX2. SCO1 es capaz de unir cobre a través de dos cisteínas que conforman un motivo CxxxC y una histidina ubicada en la región C-terminal (Horng y col., 2004). Proteínas similares a SCO1 han sido identificadas en numerosos organismos, tanto eucariotas como procariotas. En nuestro laboratorio se han identificado genes que codifican homólogos de proteínas SCO en los genomas de plantas. Las proteínas SCO de plantas han sido llamadas HCC1 y HCC2, por *Homologue of Copper Chaperone* (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). En el caso del gen *HCC1*, se observó que la anulación de la expresión de este gen en *Arabidopsis thaliana* es letal, produciéndose una detención del crecimiento en estadios tempranos del desarrollo embrionario (Attallah y col., 2011; Steinebrunner y col., 2011). Notoriamente, la proteína HCC2 carece de los aminoácidos involucrados en la unión de cobre, que son esenciales para las funciones conocidas de este tipo de proteínas. Sin embargo, se observa una conservación

Título del proyecto: Estudio funcional y molecular de factores proteicos vinculados con el ensamblado de la citocromo *c* oxidasa en *Arabidopsis thaliana*
Instrumento: PICT 2014-3785
Año convocatoria: 2018
Organismo financiador: ANPCyT
Director/a: Dra. Elina Welchen

evolutiva importante en otras Angiospermas y Gimnospermas, lo que sugiere que las proteínas HCC2 tienen algún tipo de función en vegetales. En el caso del gen *HCC2*, las mutantes homocigotas que no expresan el gen (*knockout*) presentan leves alteraciones.

Recientemente hemos realizado una construcción para silenciar el gen *HCC1* en plantas. Se realizó un análisis del perfil transcripcional de las plantas silenciadas en *HCC1* (*AS-HCC1*) y de mutantes en *HCC2* (*hcc2*). Se observó un enriquecimiento en genes vinculados con la respuesta a estrés en ambos tipos de plantas (Mansilla y col., *en preparación*). Notoriamente, muchos de estos genes presentan cambios de expresión opuestos, ya que se encuentran reprimidos en plantas *AS-HCC1* e inducidos en plantas *hcc2*. De acuerdo con esto, se ha enfrentado a ambos genotipos de plantas (*AS-HCC1* y *hcc2*) a condiciones de estrés salino, observándose que las plantas *hcc2* son más tolerantes al estrés, mientras que las plantas *AS-HCC1* presentan mayor sensibilidad que las plantas salvajes (Mansilla y col., *en preparación*). Asimismo, se han transformado plantas con construcciones para sobreexpresar *HCC1* y *HCC2* y se prevé realizar una caracterización de estas plantas similar a la hecha con las mutantes.

OBJETIVOS

Realizar la caracterización funcional de proteínas involucradas en el ensamblado de la Citocromo c Oxidasa (CcO). Evaluar la conexión existente entre la regulación del ensamblado, el estado energético celular y la respuesta a diferentes situaciones de estrés. Para eso proponemos los siguientes objetivos específicos:

- (1). Realizar ensayos de complementación de plantas mutantes en la proteína HCC1.
- (2). Caracterizar a nivel fenotípico y molecular las plantas obtenidas en el punto anterior.
- (3). Seleccionar líneas de plantas que sobreexpresen los genes *HCC1* y *HCC2*.
- (4). Caracterizar a nivel fenotípico y molecular las plantas obtenidas en el punto anterior.
- (5). Evaluar el crecimiento y la respuesta fisiológica frente a situaciones de estrés por NaCl en las plantas sobreexpresantes seleccionadas y caracterizadas en los puntos 3 y 4.
- (6). Caracterizar la respuesta molecular a estrés por NaCl en las plantas obtenidas.

METODOLOGÍA

Complementación de plantas Mutantes en *HCC1*

Se transformarán plantas *HCC1/hcc1* con una construcción para sobreexpresar *HCC1*, en la segunda generación de plantas transformantes se intentará identificar plantas *hcc1/hcc1*.

Selección de líneas de trabajo de plantas sobreexpresantes de *HCC1* y *HCC2*.

Se analizarán diversas líneas transformantes mediante RT-qPCR para la cuantificación de los niveles de sobreexpresión. Se seleccionarán líneas con niveles intermedios y niveles altos de expresión del transgén.

Caracterización fenotípica de las plantas sobreexpresantes de *HCC1* y *HCC2*.

Se crecerán plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes de *HCC1* y *HCC2* en un fotoperiodo de día Largo y se analizarán los parámetros de crecimiento establecidos por Boyes y col. (2001) con respecto a los de plantas WT.

Evaluación fenotípica y molecular de plantas que sobreexpresan *HCC1* y *HCC2* frente a situaciones de estrés: se cultivarán las plantas en condiciones normales durante 15 días y luego se regarán con soluciones de concentración creciente de NaCl (iniciando con 25 mM y hasta llegar a 130 mM). Durante el tratamiento se tomarán muestras para la cuantificación de clorofila y la extracción de ARN para cuantificación de transcritos de interés.

Caracterización molecular de la respuesta a estrés por NaCl: se cultivarán plantas durante 7 días en medio MS 0,5X. Luego, se realizará un tratamiento con 250 mM NaCl. Se tomarán muestras a distintos tiempos (0 a 180 minutos) para realizar extracciones de ARN y cuantificar la expresión de genes de interés.

Cuantificación de transcritos por RT-qPCR en tiempo real: sobre el ARN total se realizará una retrotranscripción utilizando como cebador un oligo dT. Los ADNc obtenidos en ese proceso serán sometidos a una qPCR en tiempo real y se utilizará el método $\Delta\Delta C_t$ para la cuantificación de los transcritos.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

La Sobreexpresión de *HCC1* no es capaz de rescatar la letalidad embrionaria de la mutante *hcc1/hcc1*:

Se seleccionaron 6 líneas independientes de la segunda filial para su análisis. Aproximadamente un cuarto de estas plantas deberían presentar ambos alelos genómicos de *HCC1* mutados. Sin embargo luego de analizar 40 plantas (6-7 individuos de cada línea) no se encontraron plantas con ambos alelos de *HCC1* mutados, y a su vez todas las plantas evidenciaron la presencia de la construcción para sobreexpresar *HCC1*. Al analizar las silicuas de estas plantas, se encontró una gran proporción de óvulos no fecundados (Figura 1). Esto probablemente sea debido a algún problema en el desarrollo del polen o en la elongación del tubo polínico.



Figura 1. Vaina representativa de una planta *HCC1/hcc1* transformada con la construcción *35S::HCC1*. Se observan semillas en desarrollo normal, así como óvulos no fecundados (flechas rojas).

Selección de líneas de trabajo de plantas sobreexpresantes de *HCC1* y *HCC2*

Se seleccionaron 6 líneas independientes de cada construcción, a partir de las cuales, se extrajo ARN total. A partir del mismo, se realizó una retrotranscripción para obtener el ADNc. Finalmente se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación de los niveles de transcritos de los genes de interés.

Como se observa en la Figura 2, se obtuvieron plantas que mostraron entre 3 y 16 veces más niveles de transcritos de *HCC1* que las plantas salvajes (WT). Por su parte, las plantas que sobreexpresaron *HCC2* evidenciaron niveles de transcritos entre 10 y 45 veces mayores que los de las plantas salvajes.

Evaluación fenotípica y molecular de plantas sobreexpresantes de *HCC1* y *HCC2* frente a situaciones de estrés.

Debido a que las plantas con niveles reducidos de *HCC1* y *HCC2* presentan alteraciones en su tolerancia al NaCl, se procedió a evaluar cuál era la respuesta de las plantas sobreexpresantes a esta condición. Luego de realizar una caracterización fenotípica exhaustiva, tanto en condición de crecimiento control como con presencia de NaCl, no se pudieron evidenciar diferencias significativas en los distintos parámetros evaluados en ambas condiciones. Además se realizó un ensayo de respuesta al NaCl para evaluar la respuesta transcripcional de las

plantas sobreexpresantes. En línea con el resultado anterior, tampoco se observó una respuesta diferencial de transcritos que son regulados en presencia de NaCl.

Las evidencias obtenidas en el presente trabajo nos llevan a preguntarnos si las construcciones utilizadas son capaces de generar proteínas funcionales las cuales se importen en las mitocondrias de plantas. Esto se debe al hecho de que a pesar de observar niveles de sobreexpresión elevada, no se pudo observar ninguna alteración fenotípica/transcripcional en condiciones de crecimiento control o en presencia de NaCl. Así mismo, la sobreexpresión de *HCC1* en la mutante *HCC1/hcc1*, no fue capaz de rescatar la letalidad embrionaria generada por la falta de *HCC1*. Una posibilidad es que el promotor utilizado no genere un patrón de expresión correcto. La segunda posibilidad es que la etiqueta presente en el C-terminal de la construcción impida la correcta importación e inserción en la membrana interna mitocondria y/o que impida las interacciones proteína-proteína necesaria para el ensamblado de la CcO.

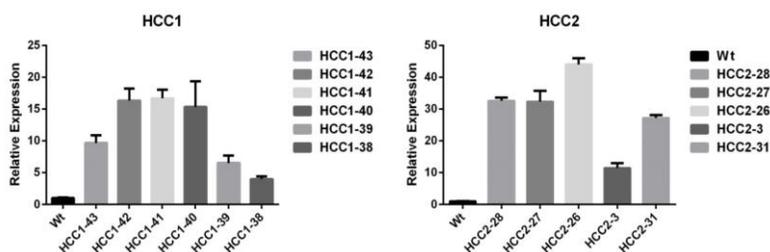


Figura 2. Cuantificación de los niveles de transcritos de genes de interés mediante RT-qPCR en tiempo real. Del lado izquierdo y derecho se muestra los niveles relativos de los transcritos de *HCC1* y *HCC2* en las distintas plantas sobreexpresantes.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Attallah CV, Welchen E, Martin AP, Spinelli SV, Bonnard G, Palatnik JF, Gonzalez DH (2011) Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis. *J. Exp. Bot.*, 12: 323-335

Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rotig A, Rustin P, Tzagoloff A (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286, 53-63.

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13: 1499-1511

Hornig YC, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS, Winge DR. (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem.* 279 (34), 35334-40

Nijtmans LG, Taanman JW, Muijsers AO, Speijer D, Van Den Bogert C (1998). Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem.* 254, 389-394.

Steinebrunner I, Gey U, Andres M, Garcia L and, H. GD (2014) Divergent functions of the Arabidopsis mitochondrial SCO. *Front. Plant Sci.* 5

Steinebrunner I., Landschreiber M., Krause-Buchholz U., Teichmann J. & Rödel G. (2011) HCC1, the Arabidopsis homologue of the yeast mitochondrial copper chaperone SCO1, is essential for embryonic development. *J exp bot* 62, 319–30.