

## Diseño y preparación de plantas transgénicas que expresan flavín-dihierro proteínas de cianobacterias en cloroplastos

María Paula Morelli, Rodrigo L. Gomez, Néstor J. Carrillo, Anabella F. Lodeyro.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas – U.N.R. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET).

Ciencias Biológicas – Biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Las proteínas de flavín-dihierro (Flv) constituyen una gran familia de enzimas solubles presentes en bacterias y arquea, así como en algunos protistas y organismos fotosintéticos (Vicente et al. 2008) pero no en plantas (Zhang et al. 2009; Peltier et al. 2010). La estructura de las Flv de organismos heterotróficos está formada por dos módulos estructurales: un dominio N-terminal de tipo  $\beta$ -lactamasa que contiene los dos átomos de hierro, y un dominio C-terminal de tipo flavodoxina que une FMN (Frazao et al. 2000). En algas y cianobacterias se agrega un tercer dominio en el extremo C-terminal, que une FAD y presenta homología con flavín-reductasas (Vicente et al. 2002). Gracias a este dominio la enzima es capaz de desplegar actividad NADPH-oxígeno reductasa *in vitro* (Vicente et al. 2002), prescindiendo de la necesidad de una reductasa independiente que actúe en la donación de electrones. El rol fisiológico de estas enzimas es eliminar el exceso de oxígeno y prevenir sus efectos tóxicos generando un mecanismo disipativo. Las funciones de las Flv han sido estudiadas en la  $\beta$ -cianobacteria *Synechocystis* (Vicente et al. 2008; Zhang et al. 2009, 2012). Este microorganismo posee en su genoma cuatro isoformas (Flv1-4) con diferentes potenciales redox, lo cual indica que podrían interactuar con distintos componentes y participar en diversas vías de óxido-reducción. Se ha sugerido que las Flv actuarían *in vivo* como heterodímeros (Flv1-Flv3 y Flv2-Flv4), si bien *in vitro* presentan actividad como homodímeros (Vicente et al. 2002). El par Flv1-Flv3 actuaría eliminando oxígeno del lado reductor del fotosistema (FS) I utilizando NADPH como dador de electrones en una versión particular de la reacción de Mehler que reduce el oxígeno directamente a agua, sin formación de especies reactivas de oxígeno (Vicente et al. 2002). El dímero Flv2-Flv4, en cambio, disiparía el exceso de presión electrónica a nivel del FSII, aunque en este caso la identidad del dador fisiológico de electrones es desconocida (Zhang et al. 2009, 2012).

Resulta sorprendente que estos rasgos genéticos que confieren ventajas adaptativas hayan desaparecido del genoma vegetal. Sin embargo, este no es el único caso, ya que existen otros aceptores electrónicos alternativos que se encuentran ausentes en plantas, como flavodoxina (Tognetti et al. 2006) y citocromo  $c_6$  (De la Rosa et al. 2002). En el caso de flavodoxina, su reintroducción en plantas de tabaco generó líneas transgénicas con tolerancia aumentada a múltiples fuentes de estrés ambiental como sequía, temperaturas extremas, radiaciones, exceso de luz y oxidantes (Tognetti et al. 2006; Zurbriggen et al. 2008). Estos resultados, obtenidos por el grupo de trabajo donde se desarrolla el proyecto, alientan a investigar el efecto de la expresión de estas Flv en plantas, principalmente sobre la tolerancia a distintos tipos de estrés ambiental.

### OBJETIVOS

Generar plantas transgénicas con tolerancia aumentada a estrés ambiental mediante la expresión de flavín-dihierro proteínas (Flv) de origen cianobacteriano y estudiar la tolerancia de estas líneas frente a y distintas situaciones de estrés ambiental.

**Proyecto:** PIP 112 201101 01075 Tolerancia a estrés en plantas transgénicas que expresan el sistema soluble ferredoxina NADP+ reductasa/flavodoxina de cianobacteria.

**Director de investigación:** Dra. Anabella Lodeyro

## METODOLOGÍA

Con el objetivo de preparar plantas transgénicas que expresen Flv1 y Flv3 de *Synechocystis* PCC6803 soluble en el estroma de cloroplastos se utilizaron construcciones previamente realizadas en el laboratorio, donde los genes de interés se encuentran bajo el promotor constitutivo CaMV35, fusionados a la secuencia del péptido tránsito de Ferredoxina NADP(H) reductasa que los direcciona a cloroplastos. Las plantas transgénicas de tabaco, *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana (PH), se obtuvieron por el método de transformación de discos de hojas por co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (Gallois y Marinho, 1995). En las líneas transgénicas obtenidas se corroboró la presencia de ambos genes realizando una reacción en cadena de la polimerasa multiplex.

**Estrés por alta intensidad lumínica.** Con el fin de determinar el efecto del estrés lumínico sobre las plantas, se crecieron semillas de las líneas transformadas con el vector vacío y con los genes *flv1* y *flv3* en placas de Petri con MS-0 agar 0,8 % (p/v). A los 12 días fueron trasplantadas a tierra en recipientes de 200 mL y crecidas a 100  $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Luego de una semana se colocaron a 300  $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

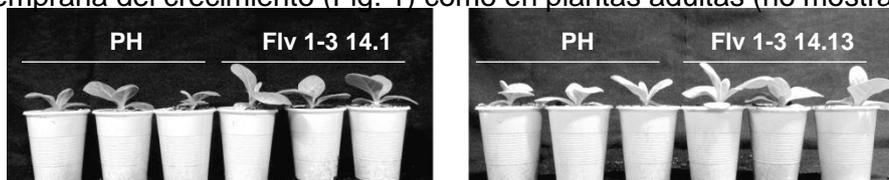
**Estrés salino.** Discos de hojas de 12 mm de diámetro provenientes de las distintas líneas transgénicas fueron incubados con una solución 0,5 M NaCl y mantenidos en la cámara de cultivo. Como control, los discos fueron incubados en agua. Se determinó el contenido de pigmentos colocando un disco de hoja en 1mL de etanol en oscuridad durante 24hs, la concentración de pigmentos fue determinada en este extracto espectrofotométricamente según Lichtenthaler (1987).

**Tolerancia al metil viológeno (MV).** Discos de hojas fueron incubados 16 horas con 1 mL de una solución 10  $\mu\text{M}$  MV en oscuridad. Como control se realizó el mismo tratamiento colocando los discos en agua destilada. Posteriormente, los discos fueron iluminados a con una intensidad de 600  $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y se midió la conductividad de la solución a distintos tiempos del tratamiento.

## RESULTADOS

Se obtuvieron distintas líneas de plantas transgénicas que se denominaron Flv1-3, que expresan Flv1 y Flv3 en el estroma de cloroplastos. Las plantas transgénicas se mostraron fenotípicamente iguales a las salvajes. Las líneas fueron sometidas a diferentes tipos de estrés para determinar si la presencia de los transgenes les confería alguna ventaja.

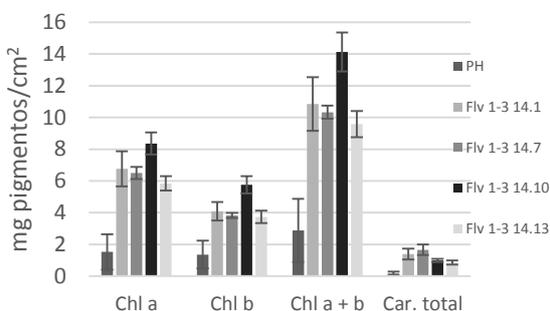
Al crecer plantas jóvenes de tabaco en alta luz (300  $\mu\text{mol quanta. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) durante 4 semanas se evidenció una diferencia de tamaño entre las diferentes líneas, tanto en la etapa temprana del crecimiento (Fig. 1) como en plantas adultas (no mostrado).



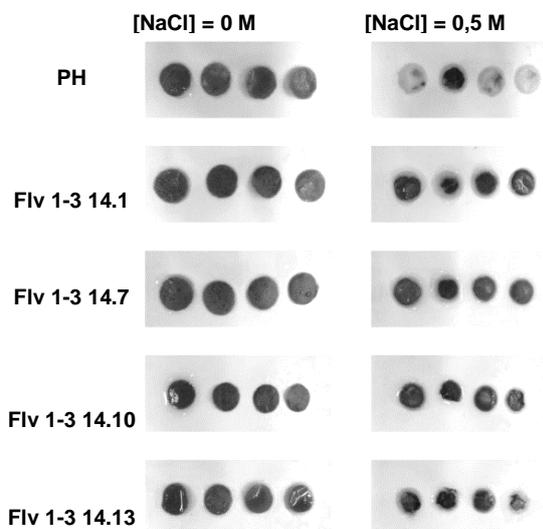
**Fig. 1: Plántulas de tabaco crecidas en alta luz.** Plantas de tabaco de 4 semanas de las líneas PH y Flv 1-3 14.1 y 14.13.

Por otro lado, se determinó el efecto de alta concentración salina sobre discos de hojas, debido a que este produce estrés osmótico e iónico, incluyendo toxicidad por  $\text{Na}^+$  y deficiencia de  $\text{K}^+$  y además genera daño oxidativo en las células, aumentando la producción de especies reactivas del oxígeno (Liu y col., 2009). A los 4 días de la incubación de discos de hojas en una solución 0,5 M de NaCl se observó deterioro tisular, a la mitad de los discos tratados se les realizó extracción de pigmentos (resultado no mostrado); los 4 discos restantes se incubaron durante 3 días más y al igual que a

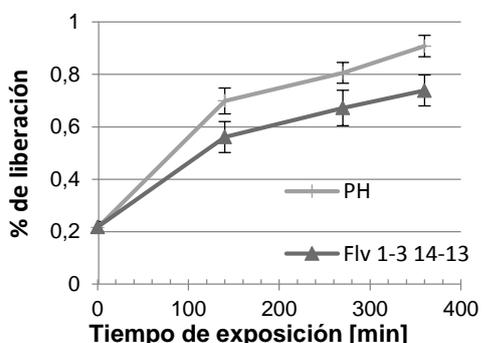
los anteriores, se les determinó la concentración de pigmentos (Fig. 2). La Figura 3 muestra el daño sobre el tejido ocasionado, pudiéndose observar un mayor deterioro en la línea salvaje.



**Fig. 2: Tratamiento de estrés salino sobre discos de Tabaco.** Pigmentos provenientes de discos de hojas incubados en NaCl 0,5 M durante 7 días.



**Fig. 3: Discos de hojas de tabaco en agua y 0,5M NaCl a los 7 días.** Se observa el efecto de 0,5 M NaCl sobre 4 discos de hoja en línea control PH, y en diferentes líneas Flv1-3 14.1, 14.7, 14.10 y 14.13.



**Fig. 4: Porcentaje de liberación de electrolitos.** El experimento se realizó con distintas líneas transgénicas. Se detalla sólo la línea que mostró una diferencia significativa con respecto a la salvaje.

El herbicida MV forma parte de un grupo de herbicidas denominados “redox cíclicos” que pueden provocar una situación de estrés oxidativo en la célula vegetal. En presencia de irradiación moderada el MV es reducido en forma univalente (Nelson y Ben Shem, 2004). Una vez reducido, puede ceder un electrón directamente al O<sub>2</sub> para formar el radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> y regenerar la molécula de MV. El O<sub>2</sub><sup>-</sup> formado sufre una dismutación produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y finalmente, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede oxidar Fe<sup>2+</sup>, generando el radical hidroxilo. Los radicales hidroxilos son los principales agentes causantes de daño en plantas tratadas con el herbicida (Babbs y col., 1989). Para comprobar la tolerancia de las líneas transgénicas a MV, se realizaron experimentos en discos de hoja a los cuales se les evaluó el deterioro de membranas a través de medidas de liberación de electrolitos. La línea transgénica Flv1-3 14.13 presenta un menor daño tisular en comparación con las plantas salvajes (PH), mostrando una mayor tolerancia al herbicida MV. El resto de las líneas estudiadas no mostraron diferencias significativas (Fig. 4).

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se lograron obtener plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que expresan los genes *flv1* y *flv3*. Las diferentes líneas transgénicas obtenidas no presentaron diferencias fenotípicas en condiciones normales de crecimiento. Sobre el análisis de los resultados obtenidos al aplicar distintos tipos de estrés a las plantas transgénicas, se evidenció un aumento de tamaño de las plantas adultas transgénicas cuando fueron expuestas a alta luz, con respecto al control. Por lo tanto,

se puede concluir que a alta intensidad de luz estarían actuando las proteínas Flv1 y Flv3 consumiendo parte del NADPH generado y evitando la sobrerreducción de la cadena, aliviando de esta manera el consiguiente efecto oxidativo.

Las líneas transgénicas Flv1-3 presentaron tolerancia aumentada al estrés por alta concentración salina sobre discos de hojas con respecto a los provenientes de plantas salvajes.

Se plantea continuar realizando experimentos aplicando otros tipos de estrés (sequía, bajas temperaturas combinada con alta luz, entre otros) y ampliar los experimentos realizados utilizando mayores intensidades lumínicas y distintas aproximaciones experimentales en cuando a los tejidos ensayados, para corroborar que la presencia de las proteínas flavin-dihierro confieren una ventaja adaptativa frente a distintas condiciones adversas.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Babbs C., Pham J., Coolbaugh R.** 1989. Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol*, 4,1267-70.
- **De la Rosa, M., Navarro, J., Díaz-Quintana, A., De la Cerda, B. Molina-Heredia, F., Balme, A., Murdoch, P., Díaz-Moreno, I., Durán, R., Hervás, M.** 2002. An evolutionary analysis of the reaction mechanisms of photosystem I reduction by cytochrome c and plastocyanin. *Bioelectrochemistry* 55, 41-45.
- **Frazao, C., Silva, G., Gomes, C., Matias, P., Coelho, R., Sieker, L., Macedo, S., Liu, M., Oliveira, S., Teixeira, M., Xavier, A., Rodrigues-Pousada, C., Carrondo, M., Le Gall, J.** 2000. Structure of a dioxygen reduction enzyme from *Desulfovibrio gigas*. *Nat Struct Biol* 7, 1041–1045.
- **Gallois P. y Marinho P.** 1995. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*—expression of heterologous genes in tobacco. *Plant Gene Transfer and Expression Protocols* (Jones, H. ed.) 39-48.
- **Lichtenthaler H. K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, 148, 350–382.
- **Lichtenthaler H. K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148, 350–382
- **Liu Y., Xiong Y. y Bassham D.** 2009. Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Landes Bioscience*, 5, 954-963.
- **Nelson N. y Ben Shem A.** 2004. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 971-982.
- **Peltier, G., Tolleter, D., Billon, E., Cournac, L.** 2010. Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. *Photosynth Res* 106 (1-2), 19-31.
- **Tognetti, V., Palatnik, J., Fillat, M., Melzer, M., Hajirezaei, M., Valle, E., Carrillo N.** 2006. Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco plants confers broad range stress tolerance. *Plant Cell* 18, 2035-2050.
- **Vicente J., Gomes, C., Wasserfallen, A., Teixeira, M.** 2002. Module fusion in an A-type flavoprotein from the cyanobacterium *Synechocystis* condenses a multiple-component pathway in a single polypeptide chain. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 82–87.
- **Vicente, J., Justino, M., Gonçalves, V., Saraiva, L., Teixeira, M.** 2008. Biochemical, spectroscopic, and thermodynamic properties of flavodiiron proteins. *Methods Enzymol* 437, 21-45.
- **Zhang, P., Allahverdiyeva, Y., Eisenhut, M., Aro, E.** 2009. Flavodiiron proteins in oxygenic photosynthetic organisms: photoprotection of photosystem II by Flv2 and Flv4 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *PLoS One* 4 (4), e5331.
- **Zhang, P., Eisenhut, M., Brandt, A., Carmel, D., Silén, H., Vass, I., Allahverdiyeva, Y., Salminen, T., Aro, E.** 2012. Operon flv4-flv2 provides cyanobacterial photosystem II with flexibility of electron transfer. *Plant Cell* 24, 1952–1971.
- **Zurbriggen, M., Tognetti, V., Fillat, M., Hajirezaei, M., Valle, E., Carrillo N.** 2008. Combating stress with flavodoxin: a promising route for crop improvement. *Trends Biotechnol* 26, 531-538.