

## EL PAPEL DEL CITOCROMO C EN LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Rodriguez Carina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL-UNL-CONICET

<sup>2</sup>Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL

Director/a: Gras, Diana E.

Codirector/a: Welchen, Elina

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

Las mitocondrias tienen un papel fundamental en organismos eucariotas. Además de producir parte importante de la energía que la célula requiere, las mitocondrias están involucradas en una amplia variedad de funciones, incluyendo señalización (Rhoads y col., 2006), síntesis de compuestos orgánicos esenciales (Rebeille y col., 2007; Birke y col., 2012) y muerte celular programada (Reape y McCabe 2010). Su papel metabólico está representado por la oxidación de ácidos orgánicos a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) (Sweetlove y col., 2010) y la síntesis de ATP acoplada a la transferencia de electrones a través del proceso conocido como fosforilación oxidativa (Lenaz y Genova 2010). Después del evento de endosimbiosis que dio origen a la mitocondria, la mayoría de los genes necesarios para su biogénesis y función han sido transferidos al núcleo, donde han adquirido las señales necesarias para su expresión en este nuevo compartimento celular y para la localización de las proteínas en la mitocondria (Martin y Herrmann, 1998). Así, la biogénesis y el funcionamiento mitocondrial son procesos complejos y altamente regulados que requieren la coordinación de la expresión génica nuclear y mitocondrial (Zmudjak y col., 2013; González y Giegé, 2014). La actividad respiratoria se lleva a cabo por una serie de complejos multienzimáticos ubicados en la membrana mitocondrial interna: complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo c reductasa) y complejo IV (citocromo c oxidasa) (Lenaz y Genova 2010). Estos complejos, junto con el Citocromo c (CYTc), generan energía a partir de los electrones provenientes de la metabolización de los azúcares y lípidos. El CYTc es una hemoproteína del espacio intermembrana que cataliza la transferencia de electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria. Además de esta función primaria, el CYTc participa en otros procesos importantes, conectando la actividad respiratoria mitocondrial con el

Título del proyecto: "El papel del Citocromo c en la regulación del crecimiento vegetal"

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: Agencia

Director/a: Gras, Diana E.

metabolismo celular global (Racca y col., 2018). En *Arabidopsis* hay dos genes que codifican CYTc: el gen *CYTC-1* (At1g22840) y el gen *CYTC-2* (At4g10040) los cuales provienen de una duplicación reciente del genoma y presentan una estructura exón-intrón conservada (Welchen y col, 2002).

## OBJETIVOS

En este proyecto propusimos profundizar la caracterización funcional de los genes que codifican para el CYTc en plantas de *Arabidopsis thaliana*, con el objetivo de entender de qué manera la función mitocondrial se integra en el funcionamiento celular global. Para eso proponemos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar a nivel fenotípico plantas de *A. thaliana* con niveles alterados del CYTc.
2. Evaluación de posibles hormonas implicadas en el fenotipo observado.
3. Entender los mecanismos moleculares y la función de genes regulados por el CYTc mediante genética reversa.

## METODOLOGÍA

### **Caracterización a nivel fenotípico plantas de *A. thaliana* con niveles alterados del CYTc.**

Con el fin de caracterizar el rol fisiológico del CYTc en *Arabidopsis*, se estudió distintos parámetros del desarrollo en plantas tipo silvestre (WT) y con niveles alterados de las proteínas de interés (mutante *A* para el gen *CYTC-1*, mutantes *B1* y *B4* para el gen *CYTC-2*, mutantes dobles y plantas que sobreexpresan el *CYTC-1* bajo el promotor constitutivo 35SCaMV). Se puso especial énfasis en las etapas del desarrollo y tejidos donde la mitocondria cumple un papel fundamental, como la germinación de las semillas y el desarrollo del polen. Todos los análisis fenotípicos se realizaron comparando entre las plantas silvestres, mutantes y sobreexpresantes.

### **Evaluación de posibles hormonas implicadas en el fenotipo observado.**

Se crecerán plantas salvajes, mutantes, doble mutantes y sobreexpresoras con distintas hormonas e inhibidores de las mismas para evaluar si algunas de ellas se encuentra implicada con el fenotipo observado.

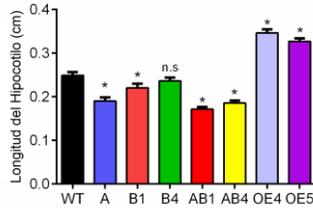
## RESULTADOS/CONCLUSIONES

### **Caracterización fenotípica.**

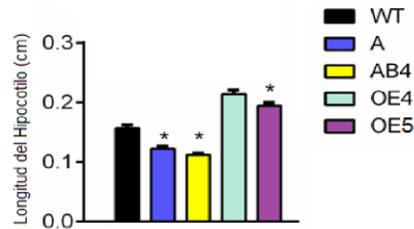
Se evaluó la elongación del hipocotilo en distintas condiciones de crecimiento, día largo (LD), día corto (SD) y oscuridad. Los resultados obtenidos muestran que los mutantes *A* y *AB* presentaron hipocotilos más cortos que las plántulas salvajes, tanto en condiciones de día largo como de día corto. Por otro lado, plántulas que sobreexpresan *CYTC-1* mostraron el fenotipo opuesto (hipocotilos más largos), lo que sugiere que el CYTc juega un rol en la elongación del hipocotilo, siendo el gen *CYTC-1*, el principal responsable del fenotipo de hipocotilos cortos (Figura 1A-C).

A fin de corroborar que la alteración en la elongación del hipocotilo pudiera deberse a diferencias en la velocidad de crecimiento y germinación, se procedió a evaluar el crecimiento durante esta etapa. En la Figura 1D se puede observar que la mutante *A* no presenta una germinación retrasada con respecto a la WT. Por lo tanto, el fenotipo observado en la elongación del hipocotilo no tiene que ver con una germinación diferencial de la

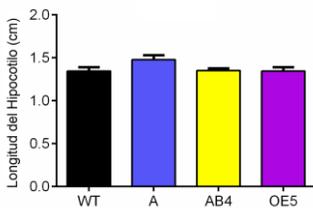
línea A. Por otro lado, las mutantes dobles *AB* y las plantas sobreexpresantes (*OE5*) mostraron una geminación diferenciada.



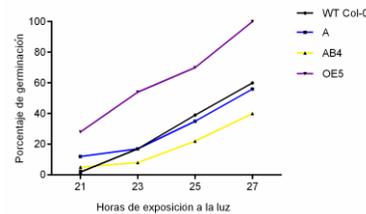
**Figura 1A.** Longitud del hipocotilo medido en plántulas de 6 días de crecimiento, en condiciones de LD.



**Figura 1B.** Longitud del hipocotilo medido en plántulas de 6 días de crecimiento, en condiciones de SD.



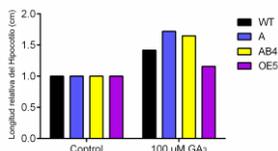
**Figura 1C.** Longitud del hipocotilo medido en plántulas de 6 días de crecimiento, en condiciones de oscuridad.



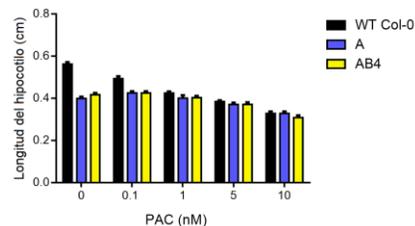
**Figura 1D.** Porcentaje de germinación de semillas luego de ser sometidas a 21 horas de luz continua.

### CYTc promueve la elongación del hipocotilo a través de giberelinas (GA).

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio han permitido establecer que plantas mutantes que presentan una deficiencia de CYTc presentaron menores niveles de GAs activas y una acumulación de proteínas DELLA, reguladores negativos de la respuesta a esta hormona (Racca y col., 2018). A fin de evaluar el rol de las GA en la regulación de la elongación del hipocotilo en plántulas mutantes *A* y *AB*, se estudió la sensibilidad de las mismas a dicha hormona y su inhibidor, utilizando placas con concentraciones crecientes del compuesto de interés. Se observó que  $GA_3$  promovió el crecimiento del hipocotilo en plántulas salvajes y mutantes, pero con una respuesta diferenciada entre los genotipos, ya que las plántulas *A* y *AB* respondieron en mayor medida al  $GA_3$  (Figura 2A). Por otro lado, al inhibir la biosíntesis de GA con paclobutrazol (PAC), se observó que la respuesta de elongación del hipocotilo en plántulas salvajes disminuyó considerablemente, mientras que en plántulas mutantes *A* y *AB* prácticamente no presentaron sensibilidad al compuesto. Con respecto a las plántulas *OECYTc*, estas fueron ligeramente más sensibles que las WT (Figura 2B). Estos resultados sugieren que la homeostasis de  $GA_3$  es uno de los factores que limita la elongación de hipocotilo en las mutantes *A* y *AB*.



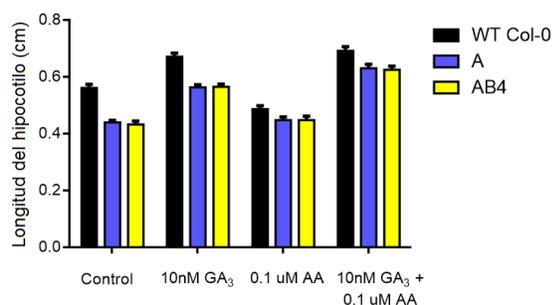
**Figura 2A.** Longitud relativa del hipocotilo medido en plántulas crecidas 6 días en LD, en situación control y tratadas con  $GA_3$ .



**Figura 2B.** Longitud del hipocotilo medido en plántulas crecidas 6 días en LD, en situación control y tratadas con PAC.

### La inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial presenta el mismo efecto que la deficiencia de CYTc en el crecimiento del hipocotilo y la homeostasis GA.

Luego nos propusimos evaluar si el defecto de elongación del hipocotilo de las mutantes *cytc* puede estar relacionado con la función del CYTc en la cadena transportadora de electrones. Para ello, utilizamos antimicina A (AA), la cual inhibe el transporte entre el complejo III y IV. El tratamiento de plántulas salvajes con AA produjo una inhibición considerable del crecimiento del hipocotilo. Al evaluar el efecto de AA sobre la elongación del hipocotilo en plántulas mutantes A y AB, observamos que estas presentaron la misma longitud de hipocotilo que las plántulas WT (Figura 3). Estos resultados sugieren que la respiración dependiente de CYTc es necesaria para la elongación del hipocotilo. Interesantemente, la inhibición del crecimiento del hipocotilo por AA fue rescatada con el agregado exógeno de GA<sub>3</sub>. Estos resultados sugieren los cambios observados en la homeostasis de GA en las mutantes *cytc* pueden estar relacionados con una deficiente producción energética en estas plantas.



**Figura 3.** Longitud del hipocotilo medido en plántula crecidas 6 días en LD, en situación control, tratadas con GA<sub>3</sub>, con AA y tratadas con ambas, GA<sub>3</sub> y AA.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Birke, H., Müller, S. J., Rother, M., Zimmer, A. D., Hoernstein, S. N., Wesenberg, D., & Hell, R. (2012). The relevance of compartmentation for cysteine synthesis in phototrophic organisms. *Protoplasma*, 249(2), 147-155.
- Lenaz, G., & Genova, M. L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxidants & redox signaling*, 12(8), 961-1008.
- 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.
- Reape, T. J., & McCabe, P. F. (2010). Apoptotic-like regulation of programmed cell death in plants. *Apoptosis*, 15(3), 249-256.
- Rébeillé, F., Alban, C., Bourguignon, J., Ravanel, S., & Douce, R. (2007). The role of plant mitochondria in the biosynthesis of coenzymes. *Photosynthesis research*, 92(2), 149-162.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C., & Siedow, J. N. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant physiology*, 141(2), 357-366.
- Sweetlove, L. J., Beard, K. F., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., & Ratcliffe, R. G. (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in plant science*, 15(8), 462-470.
- 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.