



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario



CENTRO DE ESTUDIOS FOTOSINTÉTICOS Y BIOQUÍMICOS

Tesis de Doctorado

“Biogénesis de grupos Fe-S en plantas. Estudios bioquímicos, estructurales y regulatorios de frataxinas de *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*”

Presentada por

Lic. Celeste Buchensky

Director: Dr. Diego Fabián Gomez Casati

Rosario, Argentina

2016

“Biogénesis de grupos Fe-S en plantas. Estudios bioquímicos, estructurales y regulatorios de frataxinas de *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*”

Celeste Buchensky

Lic. en Biotecnología, de la Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la cátedra de Química Biológica, laboratorio 3 del Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 01 de Abril de 2011 y el 29 de febrero de 2016, bajo la dirección del Dr. Diego Fabián Gomez Casati.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones de artículos científicos y presentaciones a congresos:

Publicaciones de artículos científicos en revistas internacionales:

Turowski VR, Aknin C, Maliandi MV, Buchensky C, Leaden L, Peralta DA, Busi MV, Araya A and Gomez-Casati DF (2015) Frataxin is localized to both the chloroplast and mitochondrion and is involved in chloroplast Fe-S protein function in Arabidopsis. *Plos ONE*. 10(10): e0141443.

Manuscritos en preparación

Buchensky C, Turowski, VR, Busi MV, Vicente Carbajosa J, Gomez-Casati DF. Characterization of the promoter region of Arabidopsis thaliana AtFH and AtNfs1 genes involved in Fe-S cluster biogénesis.

Buchensky C, Carrillo M, Busi MV, Capdevila M, Atrian S, Pagani MA, Gomez-Casati DF. Characterization of the two frataxin homologues from Zea mays.

Trabajos presentados en congresos nacionales

- Buchensky C, Carrillo M, Busi MV and Gomez-Casati DF. Identification and characterization of maize frataxin isoforms. *XLVIII Reunión SAIB*, Mendoza, Argentina, 2012.
- Buchensky C, Carrillo M, Busi MV, Gomez-Casati DF. Cloning and characterization of maize frataxin homologs. *8th International Conference for Plant Mitochondrial Biology*, Rosario, Argentine, 2013.
- Buchensky C, Gimenez Mart E, Atrian S, Pagani MA, Busi MV, Gomez-Casati DF. Maize frataxins: a role in iron handling and ROS protection?. *L Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB)*, nov 2014, Rosario, Argentina. *Biocell* 38, PL-P36.

Índice

	Páginas
Índice	I
Resumen	III
Abreviaturas	VI
INTRODUCCIÓN	
1. La mitocondria y la síntesis de los grupos Fe-S	1
2. Ferrosulfoproteínas	2
3. Biosíntesis de Grupos Fe-S	3
4. Biosíntesis de Grupos Fe-S en plantas superiores.	5
5. Biosíntesis de Centros Fe-S en cloroplastos: Sistema SUF.	6
6. Sistema ISC en mitocondrias de plantas.	8
7. Mecanismo del sistema CIA en el citosol	11
8. Frataxina. Estructura y función	11
9. Maduración de frataxinas en mitocondrias	15
10. Estructuras monoméricas y oligoméricas de frataxinas	15
11. Frataxina de <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Cepas bacterianas y de levaduras. Condiciones de cultivo	20
2. Material vegetal y condiciones de crecimiento	21
3. Soluciones amortiguadoras de pH	22
4. Antibióticos	22
5. Vectores y oligonucleótidos utilizados.	23
6. Obtención de ADN plasmídico	26
7. Manipulación enzimática de ADN	29
8. Extracción de ARN total y obtención de ADNc	30
9. Extracción y cuantificación de ADN genómico	31
10. Electroforesis de proteínas	31
11. Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i> utilizando el método de infiltración por floral dip	32
12. Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	32
13. Transformación de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
14. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	34
15. Obtención de protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
16. Microscopia confocal láser de fluorescencia	35
17. Amplificaciones por PCR en tiempo real (QPCR)	35
18. Ensayo de degradación oxidativa de 2-deoxiribosa	36
19. Determinación de actividad ferroxidasa	36
20. Espectrometría de masa de ionización por electrospray (ESI-TOF-MS)	36 37
21. Titulación espectrofluorométrica con cobre.	37
22. Ensayo de determinación de Cu (I)	37
23. Análisis histoquímicos de la actividad β -glucuronidasa (GUS)	38

24.	Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)	39
25.	Programas bioinformáticos utilizados	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
<i>Capítulo I: Identificación y caracterización de las isoformas Frataxina de maíz</i>		
1.	Identificación y análisis in silico de las isoformas frataxina de maíz.	40
2.	Estudio de la función in vivo de ZmFH42 y ZmFH55 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Ensayo de complementación: Sensibilidad frente al estrés oxidativo generado por H ₂ O ₂	42
3.	Análisis de la expresión de ZmFH42 y ZmFH55 en maíz.	43
4.	Localización de ZmFH42 y ZmFH55 en protoplastos de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante microscopia confocal de fluorescencia.	45
5.	Localización subcelular de ZmFH42 y ZmFH55 en <i>Nicotiana benthamiana</i>	48
6.	Discusión Capítulo I	49
<i>Capítulo II: Estudios bioquímicos y estructurales de frataxinas de plantas</i>		
1.	Expresión y Purificación de ZmFH42 y ZmFH55 en <i>E. coli</i> en su forma madura.	52
2.	Estudio de la actividad in vitro de ZmFH42 y ZmFh55. Ensayo de atenuación de la reacción de Fenton	53
3.	Determinación de la actividad ferroxidasa de ZmFH42m, ZmFh55m y AtFHm.	54
4.	Expresión y purificación de formas completas e intermedias de ZmFH42, ZmFH55 y AtFH en <i>E. coli</i> . Estudios por espectrometría de masas ESI-TOF-MS.	55
5.	Ensayos de unión y dimerización de AtFHm, ZmFH42m y ZmFH55m con cobre.	61
6.	Discusión Capítulo II	67
<i>Capítulo III: Estudios sobre la regulación de frataxina y su posible interacción con otras proteínas</i>		
1.	Estudios de la región promotora de AtFH y su efecto en la regulación la expresión.	70
2.	Análisis de elementos regulatorios en las regiones promotoras de AtFH y AtNfs1.	74
3.	Análisis in vitro de la funcionalidad de los motivos regulatorios RY. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) utilizando el factor de transcripción FUSCA3.	79
4.	Discusión Capítulo III	81
CONCLUSIONES		85
BIBLIOGRAFÍA		87

Resumen

Los grupos Fe-S son pequeñas moléculas inorgánicas con capacidad redox que se encuentran entre los cofactores más antiguos de la naturaleza. Las proteínas con centros Fe-S están involucradas en las principales rutas metabólicas y se encuentran ampliamente distribuidas en los tres reinos de la vida. La biosíntesis de estas moléculas requiere de un proceso controlado debido a que los iones Fe^{+2} y S^{-2} en sus formas libres son tóxicos para la célula. En organismos eucariotas y procariotas existen varios complejos proteicos encargados de la biosíntesis de los grupos Fe-S en diferentes situaciones fisiológicas denominados sistemas NIF, SUF, ISC y CIA. El mecanismo básico para el ensamblado de los grupos Fe-S en todos estos sistemas se puede dividir en dos etapas: la unión del hierro y el azufre a una proteína molde y la transferencia del centro Fe-S a las apoproteínas blanco mediado por chaperonas con especificidad variable.

A partir de estudios en células de mamíferos y levaduras, se postuló la participación de frataxina en el ensamblado de centros Fe-S, así como también en el metabolismo energético mitocondrial, respiración y homeostasis del hierro. Frataxina es una proteína mitocondrial y está altamente conservada desde bacterias hasta mamíferos y plantas, sin presentar mayores cambios estructurales. Esto sugiere que esta proteína cumpliría funciones similares en todos estos organismos. Las plantas poseen tres sistemas que conducen a la formación de grupos Fe-S: el sistema ISC en mitocondrias, la maquinaria SUF en cloroplastos y el sistema CIA en el citosol. Debido a esta compartimentación, y a que las proteínas involucradas se encuentran principalmente codificadas en el núcleo, la regulación y la comunicación en y entre los tres sistemas parecen ser complejas y en su gran mayoría desconocidas.

AtFH (frataxina de *Arabidopsis thaliana*) es una proteína esencial para el desarrollo. Líneas de *Arabidopsis* con niveles reducidos de esta proteína presentan retardo en el desarrollo, alto contenido de hierro mitocondrial, aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno, menor contenido de hemo total y disminución en la actividad de hemoproteínas y de proteínas mitocondriales con centros Fe-S. AtFH tendría un rol importante en las mitocondrias de las plantas,

participando en el almacenamiento de Fe biodisponible, en la atenuación del estrés oxidativo y en la formación de los grupos hemo y centros Fe-S. Además, actualmente se demostró que también está presente en cloroplastos.

Recientemente, realizando una búsqueda en bases de datos de plantas de interés económico, encontramos que tanto maíz como soja y sorgo presentaban más de una isoforma de frataxina. En maíz identificamos dos genes que codificarían para diferentes frataxinas en maíz. Con el fin de caracterizar las frataxinas de maíz, se expresaron y purificaron las versiones maduras de *ZmFH42* y *ZmFH55*. Se realizó la caracterización bioquímica *in vitro* de las proteínas maduras y se comprobó su actividad *in vivo* mediante ensayos de complementación en levaduras *knock out*. También se estudió las propiedades de oligomerización de las mismas. El análisis de la secuencia primaria de *ZmFH42* y *ZmFH55* mostró que la región amino terminal presentan un posible péptido tránsito para el direccionamiento a mitocondria. Con el objetivo de determinar la localización subcelular de las mismas se generaron líneas de *Arabidopsis* que expresan una fusión del péptido tránsito predicho de *ZmFH42* y *ZmFH55* con la proteína fluorescente verde (EGFP). Los resultados obtenidos por microscopia confocal láser de fluorescencia demostraron que el péptido tránsito de las isoformas de maíz es capaz de direccionar EGFP tanto a mitocondrias como a cloroplastos. Además se determinaron los niveles de expresión de ambas isoformas en distintos tejidos de maíz.

En trabajos previos en nuestro laboratorio se determinó el patrón de expresión de *AtFH* en diferentes estadios del desarrollo de *Arabidopsis* a partir de la construcción de fusiones transcripcionales de la secuencia promotora de *AtFH* a la secuencia codificante de la enzima β -glucuronidasa (*GUS*). La expresión de *GUS* se observó principalmente en tejidos meristemáticos, en granos polen y durante los primeros estadios del desarrollo de la semilla. Considerando que la presencia de algunos intrones pueden modificar los niveles de expresión de ciertos genes en plantas, entonces se estudió también el efecto del primer intrón de *AtFH*. Se determinó que la presencia de la secuencia correspondiente al primer intrón *AtFH* modifica notablemente la expresión de este gen. Los resultados anteriores indican *AtFH* se

expresa en tejidos y órganos con un alto requerimiento energético, sugiriendo un rol importante para ambas proteínas en el metabolismo mitocondrial de *Arabidopsis*. Además se demostró que la secuencia promotora de *AtFH* contiene los elementos reguladores ABRE y RY que modulan la expresión génica, y que esta regulación está compartida con otro gen de la síntesis de centro Fe-S, la cisteína desulfurasa *AtNfs1*.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis contribuyen a comprender mejor las funciones de los homólogos a frataxina en plantas superiores.

Abreviaturas

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*

A. tumefaciens: *Agrobacterium tumefaciens*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

ADNg: ácido desoxirribonucleico genómico

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato

CIA (Cytosolic Iron-sulfur Protein Assembly): sistema para la maduración de ferrosulfoproteínas citosólicas y nucleares

CaMV: virus del mosaico del coliflor

Col0: ecotipo Columbia 0 de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Da: daltons

DAHK: péptido Asp-Ala-His-Lis

DO: densidad óptica

DTT: ditioneitol

E. coli: *Escherichia coli*

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay): ensayo de cambio en la movilidad electroforética del ADN

GUS: β-glucuronidasa

h: hora

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

ISC (Iron-Sulfur Cluster): sistema ubicuo para la maduración de ferrosulfoproteínas

M: molar

Min: minuto

MS: medio Murashige-Skoog

MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*): peptidasa de peptidos señal mitocondrial

MW: masa molecular

NBT: nitroblutetrazolium

NIF (*Nitrogen Fixation*): complejo multiproteico involucrado en la maduración de la enzima nitrogenasa

P/V: peso en volumen

Pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

rpm: revoluciones por minuto

V/V: volumen en volumen

s: segundo

SDS: dodecil sulfato de sodio

SUF (*Sulfur Utilization Factor*): proteínas involucradas en la movilización de sulfuro

wt (wild type): tipo salvaje.

Introducción

Introducción

12. La mitocondria y la síntesis de los grupos Fe-S

Las mitocondrias son organelas fundamentales en las células eucariotas, en ellas ocurren diversos procesos esenciales como por ejemplo la fosforilación oxidativa, el metabolismo del carbono y del nitrógeno, la termorregulación, la homeostasis del calcio y hierro, la regulación de la apoptosis y la síntesis de grupos Fe-S y hemo (1-4). Estas organelas poseen una doble membrana y difieren en tamaño, forma y cantidad, dependiendo del tipo celular, función tisular y la actividad metabólica del tejido donde se encuentran. Se ha informado que en tejidos metabólicamente más activos, las mitocondrias ocupan una gran proporción del volumen celular (5).

Cada una de las mitocondrias presentes en la célula contiene su propio material genético y su propia maquinaria de síntesis de proteínas. Este hecho apoya a la teoría de su origen endosimbiótico (5). Normalmente, el contenido de ADN presente en las mitocondrias de una célula somática no llega al 0.1 % del ADN celular total. Si bien la mitocondria tiene su propio ADN, ARN y ribosomas, el genoma mitocondrial sólo codifica una pequeña fracción de la información genética requerida para su biogénesis y función, más del 99% de las proteínas que se localizan en esta organela están codificadas en el genoma nuclear y luego son sintetizadas en el citosol e importadas a la mitocondria (6, 7). Entonces, para la correcta función de la mitocondria se requiere una adecuada coordinación de la expresión de ambos genomas.

Un modelo interesante para el estudio de los mecanismos de control de la función de la mitocondria lo constituye el ensamblado de las proteínas mitocondriales Fe-S y hemoproteínas. La biogénesis de los centros Fe-S es una de las funciones esenciales de la mitocondria.

Los grupos hierro azufre (Fe-S) son pequeñas moléculas inorgánicas que pertenecen a los cofactores más antiguos y ubicuos en la naturaleza (8). Su importancia radica en la capacidad de óxido-reducción, una propiedad que ha sido extensamente explotada por todos los organismos vivos. Generalmente se asocian a

proteínas para participar en variados procesos de gran importancia y están presentes en todos los compartimentos celulares

Los centros Fe-S están formados por átomos de hierro (encontrado mayoritariamente como Fe^{3+}) y sulfuro. En general, estos están coordinados con las proteínas a través de los grupos tioles de los residuos de cisteína, aunque también se pueden encontrar ligandos como histidina, arginina o serina. Los arreglos más comunes encontrados son los de estructura dimérica [2Fe-2S] y tetramérica [4Fe-4S] (Figura 1), coordinados a 4 residuos cisteína, aunque también se han encontrado formas de mayor complejidad estequiométrica como el grupo [8Fe-7S] en la enzima nitrogenasa (9). En las proteínas de Rieske [2Fe-2S] el *cluster* está ligado a dos cisteínas y dos histidinas (10). Otro ejemplo son los [2Fe-2S] de tipo NEET que están coordinados por 3 cisteínas y una histidina (11).

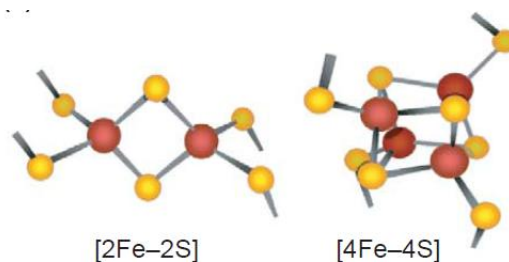


Figura 1. Esquema de la estructura típica de los grupos Fe-S unidos a proteínas. Se muestra la estructura rómbica [2Fe-2S] y cúbica [4Fe-4S]. Los átomos de hierro se encuentran representados en color rojo, mientras que los de azufre en amarillo. Además están representados los cuatro átomos de azufre de las cisteínas del ligando que coordinan el centro Fe-S. Adaptado de Balk y Lobreaux, 2005(10).

13. Ferrosulfoproteínas

Las ferrosulfoproteínas están involucradas en una gran cantidad de procesos celulares como reacciones enzimáticas, respiración celular, biogénesis de ribosomas, regulación de la expresión génica, fijación de nitrógeno y las respuestas a estrés (12). Uno de los roles principales de estas proteínas está relacionado a su papel en

reacciones de transferencia de electrones, pueden participar en estos procesos debido al amplio rango de potencial redox que presentan, ya que varía de -0.65 V hasta +0.45 V. Durante el proceso de transferencia de electrones, un átomo de Fe del centro Fe-S es oxidado o reducido dependiendo del microambiente en que se encuentre y el tipo de proteína a la cual esté unido (13). Por estas características, los centros Fe-S son elementos fundamentales en cloroplastos, en la cadena de transporte de electrones fotosintética, formado parte en la proteína de Rieske del complejo b_6f y como los tres grupos $[Fe_4-S_4]$ a nivel del fotosistema I, que transfieren sus electrones a ferredoxina. También tienen un rol principal en el transporte de electrones de la cadena respiratoria. Hay ocho centros Fe-S en el complejo I: dos $[Fe_2-S_2]$ y seis $[Fe_4-S_4]$; tres en el complejo III: un $[Fe_2-S_2]$, un $[Fe_3-S_4]$ y un $[Fe_4-S_4]$; y una proteína de Rieske en el complejo bc_1 (8).

Además, se identificaron otras funciones de las ferrosulfoproteínas, por ejemplo en la regulación de la expresión génica y en actividades catalíticas que involucran unión de sustrato, activación y/o reducción, entre otras. Un ejemplo de esto en eucariotas, lo constituye la proteína IRP1 (*iron regulatory protein 1*), que controla la homeostasis del hierro celular (14).

14. Biosíntesis de Grupos Fe-S

La biosíntesis de los grupos Fe-S debe llevarse a cabo mediante procesos estrictamente regulados debido a que el $Fe^{+2/+3}$ y S^{-2} en sus formas libres son tóxicos para la célula. Se han descrito varios complejos proteicos asociados a la biosíntesis de grupos Fe-S. Estos están representados por sistemas estructural y funcionalmente relacionados: NIF, SUF, ISC y CIA (15).

El sistema NIF fue el primero en ser descrito en la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii*, asociado con la biogénesis de la enzima nitrogenasa. Este sistema está optimizado para la biosíntesis bajo condiciones anóxicas o microaeróbicas. El segundo sistema, denominado SUF, llamado así por su participación en la movilización de sulfuro, se encuentra en numerosas bacterias, arqueas y en

cloroplastos de plantas. El sistema ISC (*iron sulfur cluster*), se presenta como el mecanismo *housekeeping* para la maduración de las proteínas Fe-S en la mayoría de las células, incluyendo cianobacterias, hongos, insectos, plantas y animales. Finalmente, el sistema CIA (*Cytosolic Iron-sulfur protein Assembly*) ubicado en el citosol de las células eucariotas, se encuentra encargado de la maduración de las proteínas Fe-S citosólicas y nucleares. Se cree que no sería un sistema completo y dependería de algunos componentes de la mitocondria y del sistema ISC (12, 16, 17)

Como muestra la Figura 2, el mecanismo básico de biosíntesis de los grupos Fe-S puede dividirse en dos etapas: (i) el ensamblado de los grupos Fe-S sobre una proteína que actúa como molde (*scaffold*) seguido por (ii) la transferencia a las apoproteínas blanco. En la primer etapa, el azufre es movilizado desde una cisteína por la enzima cisteína desulfurasa, denominadas NifS, SufS o IscS, según el sistema al cual pertenezcan. Esta reacción genera un persulfuro (S-SH) unido al residuo cisteína presente en el sitio activo de la enzima. El persulfuro es transferido luego a una proteína que actúa como molde o *scaffold* (NifU, SufU, IscU), reducido a S^{-2} y combinado con el Fe^{+2} para formar el grupo Fe-S. Frataxina fue propuesta como la enzima encargada de aportar el hierro en este proceso (18). Este mecanismo descrito es un esquema simplificado que se aplica a todos los sistemas de ensamblado conocidos pero existen una gran cantidad de proteínas implicadas en este proceso.

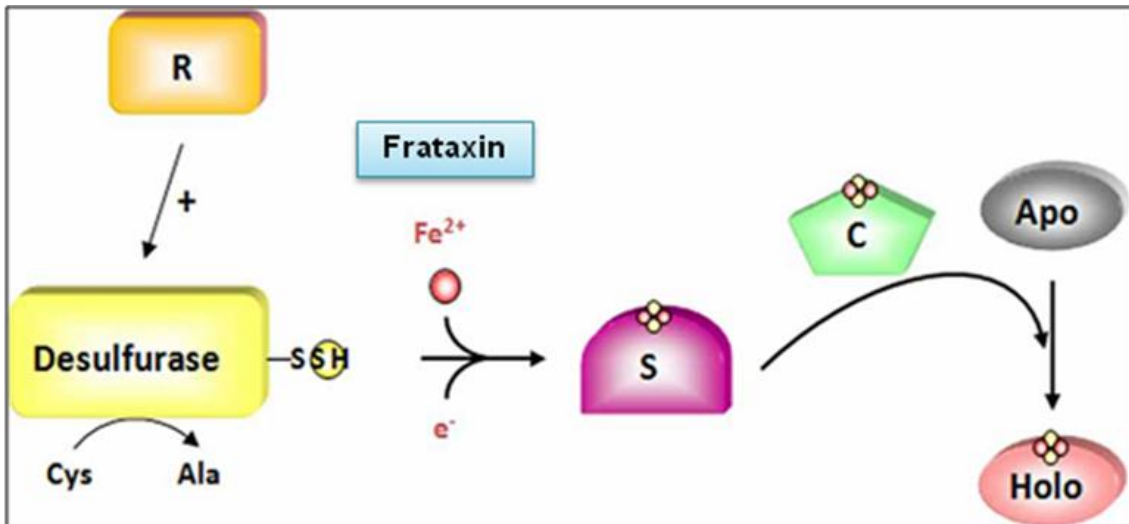


Figura 2. Representación esquemática de los pasos básicos del ensamblaje de los centros Fe-S, común a las vías NIF, SUF e ISC, Adaptado de Couturier et al, 2013(15). Cisteínas desulfurasas catalizan la liberación de azufre de las cisteínas y lo transfieren a proteínas *scaffold*, donde se ensambla al hierro, cedido por frataxina (representada en celeste). El cofactor es luego transferido e insertado en proteínas dianas. La cisteína desulfurasa está representada en amarillo, las proteínas reguladoras en naranja, la proteína *scaffold* putativa y los transportadores en rosa y verde, respectivamente.

15. Biosíntesis de Grupos Fe-S en plantas superiores.

Las plantas poseen genes homólogos a los grupos de correspondientes de ambos sistemas ISC y SUF, para la biosíntesis de centros Fe-S. En ambos casos se trata de genes de codificación nuclear, la mayoría con señales de localización en sus secuencias N-terminales. En la Tabla 1 se presentan las proteínas homólogas a las de los sistemas ISC y SUF en *Arabidopsis thaliana*, cuya localización fue predicha mediante programas bioinformáticos (19).

Plastids	Mitochondria	Cytosol	Proposed function	
Fe-S cluster assembly				
SUF pathway	ISC pathway	CIA pathway		
NFS2/CpNiS/SUFS (AT1G08490)	NFS1 (AT5G65720)	Donated by NFS1 via ATM3/STA1/ABCB25 (AT5G58270)?	Cysteine desulfurase (Persulfide generation)	
SUFE1-BolA ^a (AT4G26500) SUFE2 (AT1G67810) SUFE3-NADA ^a (AT5G50210)	ISD11 (AT5G61220) SUFE1-BolA ^b (AT4G26500)		Necessary for NFS2 and NFS1 activity, respectively	
FAD cofactor of the SUFBC ₂ D complex	ADXR/MFDR (AT4G32360)	TAH18/ATR3 (AT3G02280)	Reductase	Electron donation
	ADX1/MDFX2 (AT4G21090) ADX2/MDFX1 (AT4G05450)	DRE2/CIAPIN (AT5G18400)	Electron transfer	
SUFBC ₂ D complex (AT4G04770, AT3G10670, AT1G32500)	ISU1 (AT4G22220) ISU2 (AT3G01020) ISU3 (AT4G04080)	NBP35 (AT5G50960)	Fe-S cluster scaffold	
	FH/frataxin (AT4G03240)		Putative Fe donor, regulator of NFS1	
	HSCA1 (AT4G37910) HSCA2 (AT5G09590)		Chaperone	
	HSCB (AT5G06410)		Cochaperone	
NFU1 (AT4G01940) NFU2 (AT5G49940) NFU3 (AT4G25910)	NFU4 (AT3G20970) NFU5 (AT1G51390)		Fe-S carrier	
SUFA/CplscA (AT1G10500)	ISA1/ISCA2 (AT2G16710) ISCA3 (AT2G36260) ISCA4 (AT5G03905)		Fe-S carrier (A-type), Fe donor?	
		CIA1 (AT2G26060) AE7/CIA2 (AT1G68310) MET18/MMS19 (AT3G02280) NARI/GOLLUM (AT4G16440)	Formation of a complex and association with target Fe-S proteins	
GRXS14 (AT3G54900) GRXS16 (AT2G38270)	GRXS15 (AT3G15660)	GRX? ^c	Glutathione-dependent redoxins	
BolA domain of SUFE1	BolA? ^c	BolA? ^c	Interaction with glutaredoxins	
HCF101 (AT3G24430)	INDH (AT4G19540)		Assembly of Fe-S clusters on selected proteins, ATP dependent	
	IBA57 (AT4G12130)		Assembly of Fe-S clusters on aconitase and radical SAM proteins in yeast	
HydEF, HydG (<i>Chlamydomonas</i>)			Assembly of H-type Fe-S clusters in hydrogenase	

Tabla 1. Proteínas involucradas en el ensamblaje de centros Fe-S en *Arabidopsis thaliana*; adaptado de Balk y schaedler, 2014. Las proteínas que se encuentran en especies de plantas superiores, en base a estudios de *Arabidopsis* y análisis del genoma de otras especies están en negrita. También se enumeran los parálogos presentes en el genoma de *Arabidopsis*.

16. Biosíntesis de Centros Fe-S en cloroplastos: Sistema SUF.

El sistema tipo SUF de síntesis de centros Fe-S está presente en bacterias heterotróficas como así también en organismos fotosintéticos como cianobacterias, algas y plantas superiores. Los cloroplastos presentan su propio sistema de

ensamblado de los grupos Fe-S, que posee proteínas adicionales al sistema SUF de *E. coli* (Figura 3).

El primer componente identificado de esta vía fue la cisteína desulfurasa cloroplástica AtNfs2 (20). En líneas de plantas donde el gen *AtNfs2* fue silenciado se encontraron síntomas de clorosis severa, cloroplastos con estructura desorganizada, defectos en el transporte de electrones fotosintéticos, disminución en la actividad de la enzima nitrito reductasa y una reducción en la abundancia de todas las ferrosulfoproteínas analizadas, provocando la muerte en pocos días. Sin embargo, las funciones mitocondriales no se encontraron afectadas sugiriendo que la síntesis de grupos Fe-S mitocondrial y cloroplástica serían independientes. Al igual que SufS (su homóloga del sistema SUF bacteriano), la actividad catalítica de AtNfs2 recombinante aumenta en presencia de la proteína activadora SufE. El genoma de *Arabidopsis* codifica para tres proteínas similares a la SufE bacteriana, AtSufE1-3 de localización cloroplástica, siendo AtSufE1 la isoforma predominante(21). Recientemente se postuló a AtSufE1 como un posible regulador entre los sistemas SUF e ISC en plantas ya que incrementa la actividad de las cisteína desulfurasas mitocondrial y cloroplástica *in vitro* y presenta localización dual en ambas organelas(21).

Como se mencionó anteriormente, las proteínas molde o *scaffold* cumplen un rol fundamental dentro del primer paso hacia la formación de los grupos Fe-S. En *Arabidopsis* se han descrito varias proteínas localizadas en el cloroplasto, que presentan la capacidad de unir grupos Fe-S *in vitro* y podrían cumplir este rol: el complejo SUFBCD y las proteínas NFU1-3 (12). El primer complejo mencionado puede aceptar electrones a través de FAD y unir un grupo 4Fe-4S lábilmemente sobre SufB. En *Arabidopsis* SufB y SufC presentan actividad ATPasa, siendo el único *scaffold* descrito hasta el momento que requiere energía para el ensamblado de los centro Fe-S. El segundo paso en la formación de los grupos Fe-S involucra proteínas que ayudan en la transferencia de los grupos Fe-S desde la proteína *scaffold* a las apoproteínas. En *Arabidopsis* se han identificado los genes *HCF101*, *SufA*, *GRXS14* o *GRXS16* que podrían cumplir este rol en el sistema SUF cloroplástico.

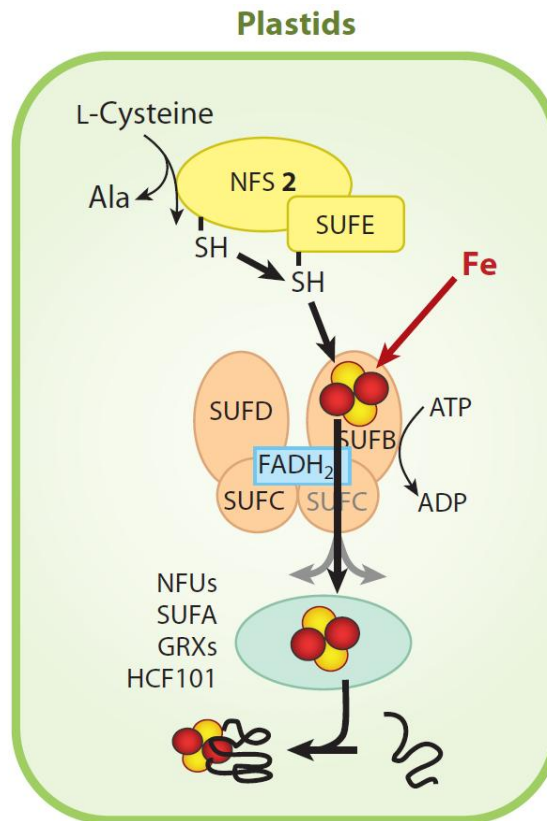


Figura 3. Esquema de la biosíntesis de centros Fe-S en cloroplastos. Tomado de Balk, 2014.

Originalmente se suponía que ferritina era la fuente de Fe para el sistema SUF en el cloroplasto, por su capacidad de unir hierro. Pero un trabajo realizado con plantas de *Arabidopsis* triple mutante para las isoformas de ferritina demostró que estas proteínas no cumplirían dicho rol en la biogénesis de los grupos Fe-S (12). Recientemente se demostró que la proteína frataxina de *Arabidopsis*, AtFH, puede localizarse en cloroplastos además de mitocondrias, determinando su papel como dadora de Fe, al igual que lo informado para la síntesis de estos cofactores en mitocondrias (22).

17. Sistema ISC en mitocondrias de plantas.

La biogénesis de los centros Fe-S en mitocondrias de plantas es llevada a cabo por el sistema ISC (Figura 4). El primer paso de esta ruta biosintética en *Arabidopsis*

está catalizado por la cisteína desulfurasa AtNfs1. La caracterización bioquímica de AtNfs1 recombinante reveló que esta proteína presenta la capacidad de ceder átomos de azufre para ensamblar un grupo 2Fe-2S sobre la proteína *scaffold* AtISU1(16), además *in vitro* es capaz de interactuar con frataxina, AtFH, propuesta como proteína chaperona de átomos de Fe (ver más abajo) (23). *AtNfs1* es un gen esencial, ya que plantas mutantes homocigotas tienen un fenotipo letal. Se expresa en raíces, tallo, hojas de la roseta, silicuas y flores de *Arabidopsis* presentando los mayores niveles de transcriptos en los órganos reproductores (24). Notablemente, estas plantas deficientes en AtNfs1 muestran alteraciones en la actividad enzimática de las aldehído oxidasas citosólicas, indicando que esta enzima podría también estar involucrada en la maquinaria de ensamblado de grupos Fe-S en el citosol (16). Por otra parte, AtSufE1 (el activador de AtNfs2) interactúa *in vitro* con AtNfs1 modificando su actividad catalítica (25). En levaduras y en humanos, la cisteína desulfurasa del sistema ISC se encuentra asociada a una pequeña proteína denominada Isd11 requerida para la estabilidad y la actividad de Nfs1 siendo esencial para el ensamblado de los grupos Fe-S. El genoma de *Arabidopsis* codifica para un homólogo a *Isd11*(12).

Frataxina es la proteína propuesta que cede los átomos de hierro (12, 26). En *Arabidopsis* la proteína homóloga a la frataxina de humanos, AtFH, se expresa en raíces, hojas y flores, con mayores niveles en este último órgano (27). Las plantas mutantes homocigotas para *AtFH* (*knock-out*) presentan un fenotipo letal y las plantas con niveles reducidos de esta proteína (*knock-down*), muestran una marcada disminución en la actividad de las proteínas Fe-S mitocondriales, indicando una importante función para AtFH en la formación de los grupos Fe-S (27, 28).

Los genes que codifican para las proteínas molde del sistema ISC de *Arabidopsis* (*AtIscU1-3*) están relacionados con sus contrapartes bacterianas y eucariotas. Estas proteínas pueden unir hierro *in vitro* y tienen un rol clave en la formación de los grupos Fe-S (16, 29). En *Arabidopsis*, *AtIsu1* se expresa en todos los órganos y es la isoforma más abundante, *AtIsu2* se encuentra en hojas y flores mientras que *AtIsu3* se expresa mayoritariamente en el órgano reproductor (29). Las tres proteínas AtIsu1-3 se localizan en mitocondrias. Además, *Arabidopsis* presenta las proteínas molde

adicionales AtNfu4-5 que funcionarían como *scaffold* “alternativas” en el sistema ISC mitocondrial.

El paso final de la síntesis es la liberación de los grupos Fe-S y su transferencia e incorporación a las apoproteínas. Los grupos Fe-S son liberados de la proteína molde mediante la interacción de Isu1-2 con la chaperona Hsp70 (HscA1) y la co-chaperona tipo Dnaj (HscB) que estimula la función ATPasa de HscA. Otro componente involucrado en el último paso de la biogénesis de grupos Fe-S en mitocondrias son las monotiolo glutaredoxinas (Grxs), pequeñas oxidoreductasas que reducen puentes disulfuro. En el genoma de *Arabidopsis* existe un gen homólogo a *Grx5* de levaduras denominado *AtGrx15* (12).

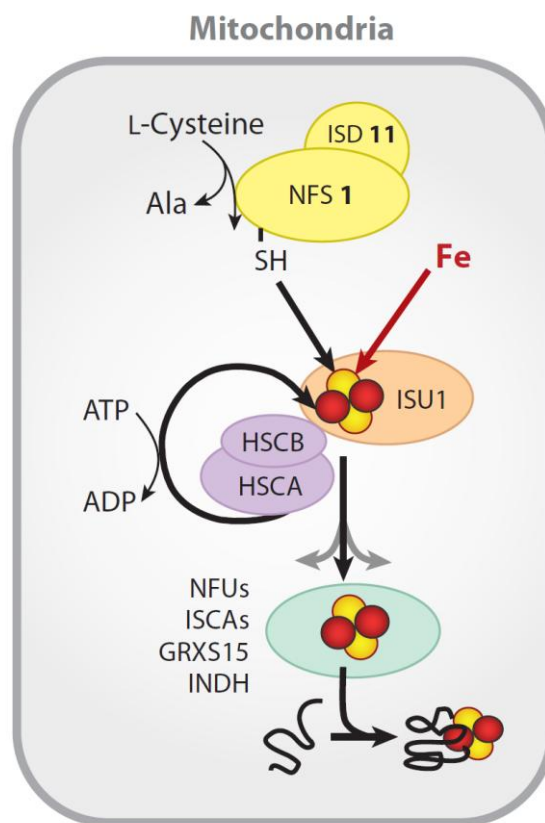


Figura 4. Esquema de la biosíntesis de centros Fe-S en mitocondrias de plantas superiores. Tomado de Balk, 2014.

18. Mecanismo del sistema CIA en el citosol

El sistema para la biosíntesis de grupos hierro-azufre en el citosol CIA fue descrito por primera vez en levaduras. Es esencial para la maduración de las proteínas Fe-S citosólicas y nucleares y se caracteriza por depender del sistema ISC mitocondrial (21).

El modelo más aceptado implica la exportación desde la mitocondria hacia el citosol de un compuesto aun no identificado, sintetizado por el sistema ISC, que es utilizado por la maquinaria de ensamblado citosólica CIA (Figura 5). La exportación está mediada por componentes de la maquinaria de ISC que involucra a la proteína AtM3, transportador ABC de la membrana interna mitocondrial, y a la sulfhidril oxidasa Erv1, localizada en el espacio intermembrana. Posteriormente, los grupos Fe-S son ensamblados sobre Nbp35 que forma un complejo con función de *scaffold* en el citosol. Las proteínas Tah18 y Dre2 son requeridos para proveer el poder reductor(30).

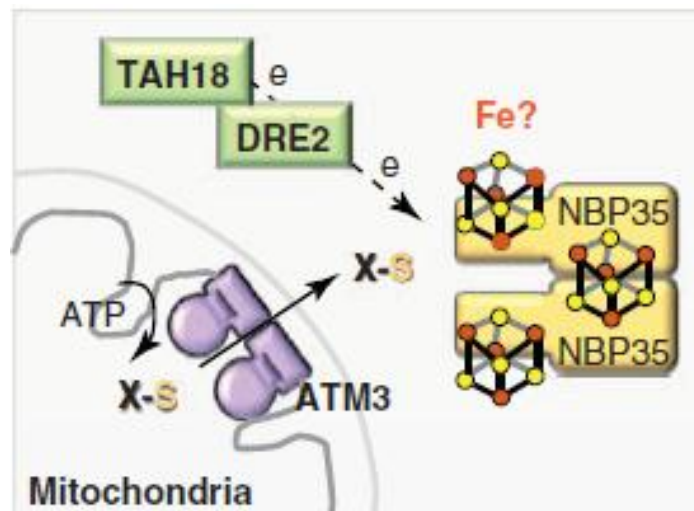


Figura 5. Esquema del sistema CIA en citosol Tomado de Balk y Pilon, 2011.

19. Frataxina. Estructura y función

Frataxina es una proteína mitocondrial altamente conservada en la evolución. Presenta homólogos en casi todos los organismos conocidos, incluidos mamíferos,

bacterias, hongos y plantas (31-33). También se identificó un homólogo a frataxina en el parásito humano *Trichomonas vaginalis*, esto es interesante ya que este eucariota unicelular no tiene mitocondria pero sí hidrogenosomas, que comparte un ancestro común con estas organelas (34).

A partir del análisis de secuencias de frataxina se puede distinguir dos regiones distintas, un bloque N-terminal de 70-90 residuos aminoacídicos, ausentes en procariontes y no conservado en eucariotes; y una parte C-terminal que comprende un bloque de 100-120 aminoácidos que está conservado en la mayoría de los organismos, indicando que es la parte funcional de las proteínas. Diversos trabajos describieron la participación de frataxina en el ensamblaje del *cluster* Fe-S a proteínas, principalmente en levaduras y células de mamíferos (35, 36). Además se sugirió su participación en la biogénesis de hemoproteínas celulares (37, 38).

El gen de frataxina fue inicialmente identificado a partir de la enfermedad humana denominada Ataxia de Friedreich (FRDA). Se trata de una enfermedad autosómica recesiva cardio-neurodegenerativa con baja sobrevivencia, causada por la deficiencia de frataxina. La proteína frataxina de humanos contiene 169 aminoácidos y está codificada por un gen de 507 pb ubicado en el cromosoma 9 (33, 39, 40). La deficiencia en la expresión del gen de frataxina es consecuencia de la presencia de una expansión del triplete GAA en el primer intrón (33). Esta expansión intrónica provoca una conformación inusual en la heterocromatina dando una estructura de ADN triple hélice, poco común, que determina el silenciamiento y la subsecuente reducción de la expresión de frataxina (41).

Esta enfermedad es progresiva y en los tejidos especializados de alta demanda energética, (neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, células de músculo cardíaco y células β del páncreas) se observa una disfunción mitocondrial y muerte celular (42). La ataxia progresiva de los miembros, la hipertrofia cardíaca y la diabetes mellitus encontrada en estos pacientes se atribuyen a los bajos niveles de ATP producidos en estos tejidos (43). Cuanto mayor sea la expansión del triplete GAA, se produce mayor deficiencia en la expresión de frataxina determinando mayor gravedad de la enfermedad (44).

Como se mencionó antes, frataxina es una proteína altamente conservada en eucariotas y algunos procariotas. En eucariotas está codificada en el genoma nuclear y se localiza en la matriz mitocondrial (45). Presenta un único y novedoso plegamiento proteico característico. El dominio frataxina en humanos (residuos 88-210, sin la secuencia de importe a mitocondria) tiene una conformación $\alpha\beta$ -sandwich (Figura 6A), donde las láminas β forman un piso de β antiparalelas que interaccionan con dos α -hélices. Doce residuos acídicos de la hélice $\alpha 1$ y de la hoja $\beta 1$ forman una zona de alta densidad de carga negativa en la superficie de la proteína creando un dipolo, que se postula como un potencial sitio de interacción con ligandos u otras proteínas necesarias para ejercer su función (46). Se ha informado la existencia de múltiples proteínas que interaccionan con frataxina humana, y de otros organismos (26).

Tanto la estructura global como su superficie aniónica, se encuentra conservada en todos los organismos estudiados (Figura 6B) (31).

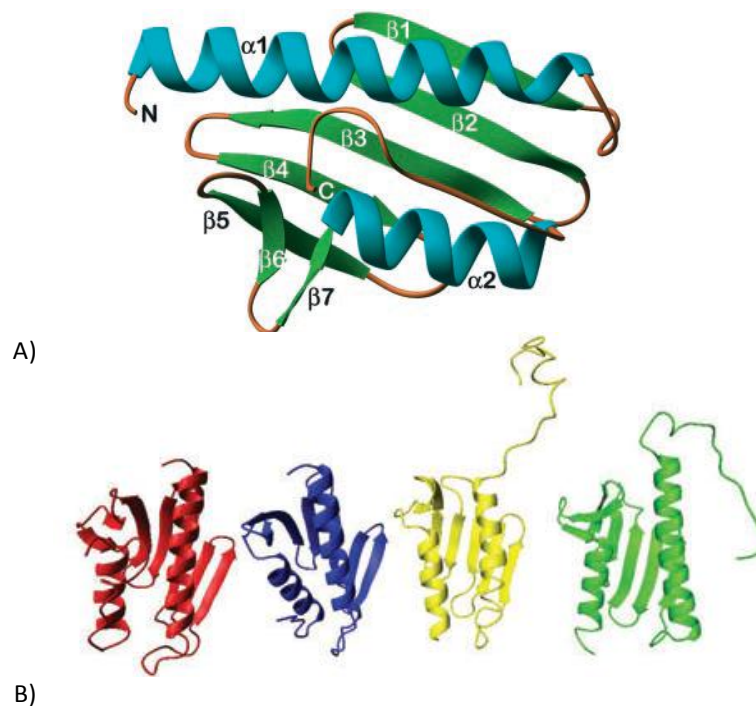


Figura 6. Estructura de frataxina. **A)** El diagrama muestra el plegamiento de la frataxina humana, una estructura compacta $\alpha\beta$ -sandwich, adaptado de Dhe Paganon y col, 2000. Las α -hélices están mostradas verde agua y laminas β en verde brillante. Las laminas desde $\beta 1$ a $\beta 5$, forman un piso de laminas β antiparalelas, que interacciona con las dos α hélices, además se forma una pequeña lámina β en el extremo C terminal ($\beta 6$ y $\beta 7$). **B)** 4 estructuras

representativas de frataxina encontradas en PDB, adaptado de Pastore y col, 2013. En rojo se muestra la estructura por cristalografía de rayos X de la CyaY de *E. coli* (1ew4), en azul la estructura de la frataxina humana (1ekg), en amarillo la estructura determinada por RMN de levaduras Yfh1 (2ga5) y en verde la estructura por rayo x de Yfh1 (3oeq).

Se han propuesto diversas funciones en las cuales frataxina podría intervenir, incluyendo la homeostasis del hierro y respiración (47), el metabolismo del hemo (37), el ensamblado de centros Fe-S (36), la fosforilación oxidativa y estrés oxidativo (48) y la acumulación de Fe en mitocondria en forma hidrosoluble y no tóxica (47, 49). Sin embargo, hasta el momento no está determinada su función precisa.

En eucariotas, frataxina es necesaria para el funcionamiento normal de la mitocondria (32). Levaduras deficientes en la expresión del homólogo de frataxina, YFH, presentaron una disminución en la respiración, pérdida de DNA mitocondrial (50) y acumulación de hierro en la mitocondria (47). En extractos de mitocondrias de levaduras que carecen de frataxina, la formación de proteínas Fe-S está severamente reducida, sugiriendo su participación en la biogénesis de proteínas Fe-S (35, 51).

Se ha descrito recientemente que la frataxina actuaría como una chaperona de hierro y modularía la actividad de proteínas mitocondriales como por ejemplo, la aconitasa (52). Diversos trabajos han sugerido que frataxina jugaría un papel importante en la protección del Fe biodisponible dentro de la mitocondria, facilitando su utilización no solo en el ensamblaje de grupos Fe-S, sino también para síntesis del grupo hemo (53).

Otros trabajos sugieren que frataxina estaría involucrada en la conversión energética mitocondrial y la fosforilación oxidativa. Se informó que la sobreexpresión de frataxina en células de mamíferos provoca una inducción del flujo del ciclo de Krebs con un incremento en la actividad respiratoria, aumento del potencial de membrana mitocondrial y elevado contenido de ATP celular (48).

20. Maduración de frataxinas en mitocondrias

La forma madura mitocondrial del ortólogo de frataxina en levaduras, Yfh1, fue descrita que comienza a partir del residuo 52 de su secuencia aminoacídica (54). En cambio, la naturaleza exacta de la frataxina humana madura ha sido materia de controversia. Esta proteína es sintetizada como un precursor de 210 aminoácidos importado a la mitocondria, donde sufre un proceso proteolítico de dos etapas, llevado a cabo por la enzima MPP (*mitochondrial processing peptidase*) que genera una forma intermediaria de 19 kDa (residuos 42–210), y luego un clivaje sucesivo da lugar a la forma madura funcional de 14 kDa (residuos 81–210) (32, 55). Otra forma fue descrita comenzando en el aminoácido S56 (56), pero actualmente se conoce que la forma 81-210 es la más abundante encontrada tanto en individuos sanos, como aquellos con FRDA (57).

21. Estructuras monoméricas y oligoméricas de frataxinas

Otra diferencia encontrada entre los ortólogos de frataxina tiene que ver con la tendencia que poseen de autoensamblarse. Los tres casos estudiados, frataxina de *E.coli* (CyaY), de levaduras (Yfh1) y la humana (hFXN), son proteínas monoméricas solubles en ausencia de hierro. Cuando se agrega hierro en exceso a una solución de proteínas, en condiciones aeróbicas, tanto Yfh1 como CyaY forman oligómeros (58, 59). Esta oligomerización en levaduras procede a través de la formación de trímeros, hexámeros, etc, hasta un total de 48 subunidades, con el trímero como unidad básica (60). Esta estructura esferoidal puede almacenar aproximadamente entre 50 y 75 átomos por unidad, similar a la ferrihidrita, que es la forma principal de encontrar al hierro en las proteínas ferritinas (61). A diferencia de Yfh1 y CyaY, la frataxina humana se ensambla sólo bajo condiciones extremas, de un modo independiente de hierro (62). Residuos presentes en el extremo N-terminal no conservado de hFXN son esenciales para la oligomerización y estabilidad (63), sin embargo la formación de oligómeros no es requisito para que frataxina sea funcional (55).

22. Frataxina de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana presenta en su genoma una única secuencia que codifica para frataxina denominado *AtFH*. Este gen se encuentra codificado en el cromosoma 4, y está compuesto por cinco exones y cuatro intrones, dando un ARNm de 564 pb que codifica una proteína de 187 aminoácidos. *AtFH* presenta una expresión elevada en órganos con alto requerimiento energético como las flores (64). *AtFH* es capaz de complementar células de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes nulas para la expresión del gen de frataxina *YFH* (Δyfh), restaurando la tasa respiratoria y disminuyendo la sensibilidad a agentes oxidantes, sugiriendo una función similar en ambos organismos (64).

Las plantas mutantes nulas homocigotas para *AtFH* (*knock out*) son letales en las primeras etapas del embrión. Las plantas con niveles reducidos de *AtFH* (*atfh-1 knock-down*) presentan retardo en el desarrollo y menor producción de semillas sugiriendo que esta proteína tiene un papel esencial en el metabolismo de las plantas (28). Por otra parte, las plantas *atfh-1* poseen un alto contenido de hierro mitocondrial, un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y una inducción en los ARNm que codifican para proteínas marcadoras de estrés oxidativo. Además se observó una inducción en los niveles de transcritos de *AtFH* en plantas tratadas con agentes oxidantes, indicando que, de modo similar a levaduras y humanos, *AtFH* participaría en el almacenamiento de Fe biodisponible y en la atenuación del estrés oxidativo (27, 65). Por otra parte, extractos de células obtenidos a partir de plantas deficientes en *AtFH* presentaron una disminución en la actividad de proteínas con centro Fe-S como la aconitasa y la succinato deshidrogenasa, sugiriendo que *AtFH* también cumpliría un rol similar en el ensamblado de los grupos Fe-S en mitocondrias de plantas (27).

Además de actuar como chaperona de hierro en la formación de grupos Fe-S, se cree que *AtFH* participaría en la formación de los grupos hemo en plantas, debido a que las líneas deficientes en *AtFH* presentaron modificaciones en los niveles de

transcriptos para proteínas involucradas en la ruta biosintética de los grupos hemo. Estas plantas también presentan menor contenido total de hemo y una disminución en la actividad de hemoproteínas como la catalasa (66).

AtFH presenta localización dual en mitocondrias y cloroplastos. En plantas de *A. thaliana* antisentido que presentan disminución en el transcritto *AtFH* (*as-AtFH*) se observa una alteración en el funcionamiento normal de los cloroplastos, con una disminución en los niveles de clorofila *b*, un aumento en el contenido de hierro total, variaciones en los parámetros fotosintéticos y modificación en la actividad y abundancia de proteínas con grupos Fe-S. Estas evidencias sugieren que AtFH es una proteína funcional en el cloroplasto y que posiblemente se encuentre asociada a la maquinaria de biosíntesis y/o reparación de grupos Fe-S de esta organela (22). Esto indica que frataxina podría intervenir en ambos sistemas de biosíntesis de centros Fe-S, SUF e ISC, tanto en cloroplastos como mitocondrias, respectivamente.

Hipótesis de trabajo

- ✓ Maíz es la primera especie encontrada que presenta dos isoformas frataxinas funcionales, similares a sus homólogas en organismos eucariotas, pero que pueden presentar características diferentes entre ellas.
- ✓ Las frataxinas de maíz poseen localización dual en mitocondrias y cloroplastos y podrían tener un rol similar en ambas organelas, igual a lo observado en *Arabidopsis thaliana*.
- ✓ Los genes que codifican para AtFH y AtNfs1 tienen una regulación conjunta que se refleja en su patrón de expresión y está relacionado con sus funciones en el primer paso que conduce a la formación de grupos Fe-S.
- ✓ El primer intrón de *AtFH* posee propiedades regulatorias claves para la expresión del gen de frataxina.

Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es contribuir al conocimiento general sobre la biogénesis de los grupos Fe-S en plantas superiores. Particularmente se profundizarán los estudios sobre la función y regulación de proteínas frataxina de plantas: de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* y de una especie de interés agronómico, *Zea mays* (maíz).

Objetivos Específicos de la Tesis

I. Identificar las secuencias codificantes de las isoformas frataxinas de maíz. Evaluar la funcionalidad de las frataxinas de maíz *in vivo*. Estudiar la localización subcelular de las isoformas frataxina de maíz.

II. Caracterizar bioquímica y funcionalmente las isoformas frataxina de maíz *in vitro*, mediante clonado, expresión y purificación de las mismas en células de *E.coli* y su análisis estructural.

III. Estudiar el patrón de expresión de los genes *AtFH* y *AtNfs1* y sus regiones promotoras y evaluar posibles reguladores de dichos genes.

Materiales y Métodos

Materiales y métodos

26. Cepas bacterianas y de levaduras. Condiciones de cultivo

E. coli BL21 (DE3): dcm ompT hsdSB(rB-mB-) gal *Stratagene*. Cepa de expresión.

E. coli DH5 α : fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.

E.coli XL-1 Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac. F' proAB lacIq Δ M15 Tn10 Tet^r.

Agrobacterium tumefaciens GV3101: plásmido Ti: pTiC58; chromo C58; opines: Nopalina. Resistencia a rifampicina (genoma) y gentamicina (plásmido).

Saccharomyces cerevisiae wild-type DY150: MATa, ura3-52, leu2-3,112, trp1-1, his3-11, ade2-1, can1-100(oc).

Saccharomyces cerevisiae Δ yfh::his3 mutante nula (47).

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37°C mientras que los de *A. tumefaciens* y los de levaduras se crecieron a 28-30°C. Los cultivos en medio líquido se mantuvieron con agitación continua (180 rpm) y los medios sólidos se obtuvieron por adición de agar 1,2% (P/V). Todas las cepas bacterianas fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) conteniendo los antibióticos requeridos. El crecimiento celular se determinó por medición de la densidad óptica a 600 nm.

- Medio LB: Tripteína 10 g; Extracto de levadura 5 g; NaCl 10 g; Agua c.s.p 1 litro; pH 7,0.
- Medio LB agar: medio LB con el agregado de 12 g/l de agar.

Para el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizaron los siguientes medios:

- Medio de cultivo rico (YP). Contiene extracto de levadura 1% p/v, peptona de carne 2% p/v. Además, como fuente de carbono puede contener: glucosa 2% p/v (YPGlc), galactosa 2% p/v (YPGal) o rafinosa 2% p/v (YPRaf).

- Medio de cultivo sintético (SC). Contiene YNB (bases nitrogenadas) 1.7 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l, *Drop out mix* 1.3 g/l (posee todos los L-aminoácidos y vitaminas, histidina, uracilo o triptófano). Según la fuente de carbono utilizada: SCGlc (glucosa 2% p/v) o SCGal (galactosa 2% p/v). Ambos medios en su versión sólida contienen agar 2% p/v.

27. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Material vegetal

***Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0):** plantas del tipo salvaje (wt). Utilizadas como control y para generar líneas transgénicas. Sin marcador de selección.
Nicotiana benthamiana del tipo salvaje. **Plantas de maíz B73.**

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se esterilizaron con una solución de lavandina comercial 5% (V/V) y Tween 20 0,05% (V/V) durante 8 min. Luego se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en tierra o en medio MS-agar suplementado con los antibióticos adecuados, según se indica en cada ensayo. Finalmente se mantuvieron en oscuridad a 4°C por 48 h y se transfirieron a invernadero a 25°C con humedad variable (40-70%). Las condiciones de iluminación se lograron mediante la combinación de lámparas fluorescentes blancas frías (Cool White, Philips) y de tipo GroLux (Sylvania, Vinhedo, SP, Brasil) con una intensidad de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ utilizando un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad (día largo).

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas se seleccionaron durante 15 días en placas de Petri con medio MS agar utilizando el antibiótico adecuado. Luego de este período las plantas resistentes al antibiótico se trasplantaron a macetas con tierra.

Medios de cultivo

Medio MS (Murashige & Skoog): N° catálogo: M0404 (Sigma-Aldrich) (67).

Medio MS agar: medio MS con el agregado de 0,9% (P/V) de agar.

28. Soluciones amortiguadoras de pH

- TBE 10X: TRIZMA base 108 g; ácido bórico (H_3BO_3) 55 g; EDTA 0,5 M; agua c.s.p. 1 litro; pH 8.0.
- TE Buffer: TRIZMA base 10 mM; EDTA 1 mM; agua c.s.p. 800 ml; ajustar a pH 8 con HCl; agua c.s.p. 1 litro.
- PBS 10X: NaCl 80 g; KCl 2 g; $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 26.8 g; KH_2PO_4 2.4 g; HCl hasta pH 7.4; agua c.s.p. 1 litro.

29. Antibióticos

Los antibióticos usados en la selección de clones positivos y plantas transgénicas se detallan en la Tabla 2.

Antibiótico	Concentración de uso
Ampicilina	100 μ g/ml
Kanamicina	50 μ g/ml
Gentamicina	50 μ g/ml
Cloramfenicol	30 μ g/ml
Espectinomicina	50 μ g/ml
Rifampicina	100 μ g/ml
Higromicina	20 μ g/ml

Tabla 2. Antibióticos y concentraciones de uso de los mismos.

30. Vectores y_oligonucleótidos utilizados.

Tabla 3. Vectores empleados en esta tesis.

Vector	Especificidades	Fuente
pGEX4T1	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Secuencia codificante para fusión a <i>GST</i> en extremo amino terminal. Contiene sitio de corte con trombina.	<i>Amersham</i>
pGEXAtFH	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Contiene la secuencia codificante de AtFH madura, entre los sitios BamHI y XhoI, fusionada a <i>GST</i> en extremo amino terminal. Contiene sitio de corte con trombina.	Esta tesis
pGEXZmFH42	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Contiene la secuencia codificante de ZmFH42 madura, entre los sitios BamHI y XhoI, fusionada a <i>GST</i> en extremo amino terminal. Contiene sitio de corte con trombina.	Esta tesis
pGEXZmFH55	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Contiene la secuencia codificante de ZmFH55 madura, entre los sitios BamHI y XhoI, fusionada a <i>GST</i> en extremo amino terminal. Contiene sitio de corte con trombina.	Esta tesis
pGEXAtFHsc	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Contiene la secuencia codificante de AtFH completa, entre los sitios BamHI y XhoI, fusionada a <i>GST</i> en extremo amino terminal. Contiene sitio de corte con trombina.	Esta tesis
pGEXZmFH42sc	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Contiene la secuencia codificante de ZmFH42 completa, entre los sitios BamHI y XhoI, fusionada a <i>GST</i> en extremo amino terminal. Contiene sitio de corte con trombina.	Esta tesis
pGEXZmFH55sc	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Contiene la secuencia codificante de ZmFH55 completa, entre los sitios BamHI y XhoI, fusionada a <i>GST</i> en extremo amino terminal. Contiene sitio de corte con trombina.	Esta tesis
pGEXZmFH42sm	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Contiene una secuencia codificante de ZmFH42 intermedia entre la forma madura y la completa, entre los sitios BamHI y XhoI, fusionada a <i>GST</i> en extremo amino terminal. Contiene sitio de corte con trombina.	Esta tesis
pGEXZmFH55sm	Ampicilina ^R . Vector de expresión en bacterias. Contiene una secuencia codificante de ZmFH55 intermedia entre la forma madura y la completa, entre los sitios BamHI y	Esta tesis

	Xhol, fusionada a <i>GST</i> en extremo amino terminal.	
pYES3CT	Auxotrofia a triptófano. Vector de expresión en levaduras.	<i>Invitrogen</i>
pYES3-ZmFH42	Auxotrofia a triptófano. Vector de expresión en levaduras. Contiene la secuencia codificante de la proteína madura ZmFH42, fusionada a la secuencia que codifica el péptido tránsito de COXIV.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
pYES3-ZmFH55	Auxotrofia a triptófano. Vector de expresión en levaduras. Contiene la secuencia codificante de la proteína madura ZmFH55, fusionada a la secuencia que codifica el péptido tránsito de COXIV.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
pZmFH42-gfp	Espectinomicina ^R (bacteria) y Kanamicina ^R (plantas). Promotor CaMV35S. Terminador NOS. Derivado del vector pPZP212. Contiene la secuencia correspondiente al péptido tránsito de la proteína ZmFH42 fusionada al gen reportero <i>EGFP</i> (Clontech®). Expresión en plantas.	Esta tesis
pZmFH55-gfp	Espectinomicina ^R (bacteria) y Kanamicina ^R (plantas). Promotor CaMV35S. Terminador NOS. Derivado del vector pPZP212. Contiene la secuencia correspondiente al péptido tránsito de la proteína ZmFH55 fusionada al gen reportero <i>EGFP</i> (Clontech®). Expresión en plantas.	Esta tesis
pBI101.3	Kanamicina ^R . Vector binario (bacterias y plantas). Terminador NOS. Expresión en plantas. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β -glucuronidasa).	<i>Clontech</i>
pPromAtNfs1	Kanamicina ^R . Contiene 935 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>AtNfs1</i> (-818 a +117 pb) clonada en el vector pBI101.3 entre los sitios Sall y BamHI. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β -glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
PB	Kanamicina ^R . Contiene 1143 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>AtFH</i> (-794 a +349) clonada en el vector pBI101.3 entre los sitios Sall y BamHI. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β -glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
PE	Kanamicina ^R . Contiene 1026 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>AtFH</i> (-794 a +232) clonada en el vector pBI101.3 entre los sitios Sall y BamHI. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β -glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati

p1MDS-RY	Kanamicina ^R . Contiene la región promotora del gen <i>AtNfs1</i> (-818 a +117 pb) clonada en el vector pBI101.3, mutada en el sitio RY -34. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β-glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
p2MSD-ABRE	Kanamicina ^R . Contiene la región promotora del gen <i>AtNfs1</i> (-818 a +117 pb) clonada en el vector pBI101.3, mutada en el sitio ABRE -47. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β-glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
p3MSD-ABREyRY	Kanamicina ^R . Contiene la región promotora del gen <i>AtNfs1</i> (-818 a +117 pb) clonada en el vector pBI101.3, mutada en el sitio RY -34 y ABRE -47. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β-glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
p4MDS-RY	Kanamicina ^R . Contiene 1143 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>AtFH</i> (-794 a +349) clonada en el vector pBI101.3, mutada en el sitio RY -102. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β-glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
p5MSD-ABRE	Kanamicina ^R . Contiene 1143 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>AtFH</i> (-794 a +349) clonada en el vector pBI101.3, mutada en el sitio ABRE -92. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β-glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
p6MSD-ABREyRY	Kanamicina ^R . Contiene 1143 pb correspondientes a la región promotora del gen <i>AtFH</i> (-794 a +349) clonada en el vector pBI101.3, mutada en el sitio RY -102 y ABRE -92. Unión transcripcional al gen reportero <i>GUS</i> (β-glucuronidasa). Expresión en plantas.	Laboratorio Dr. Diego Gomez Casati
pFUSCA3	Ampicilina ^R . Contiene la secuencia codificante del gen <i>FUSCA3</i> en el vector pGEX-2T (<i>Amersham Bioscience</i>). Fusión a <i>GST</i> en la región N-terminal de la proteína.	Dr. Vicente Carbajosa

Tabla 4. Oligonucleótidos cebadores más importantes empleados en esta tesis.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido cebador	Uso
ZmFH42_GFP fw	AAATCTAGAATGGCGTCGCCGTCG	Clonado del péptido tránsito de ZmFH42 fusionado a GFP
ZmFH42_GFP rv	AAAAGGATCCGCGTCACTGAAGGC	Clonado del péptido tránsito de ZmFH42 fusionado a GFP

ZmFH55_GFP fw	AAATCTAGAATGGCATCGCGTAAGCTT	Clonado del péptido tránsito de ZmFH55 fusionado a GFP
ZmFH55_GFP rv	AAAAGGATCCACTGCAGATGGGCTAGA	Clonado del péptido tránsito de ZmFH55 fusionado a GFP
ZmFH42m fw	ATTGGATCCGCCTTCAGTGACGC	Clonado de ZmFH42m
ZmFH42 rv	AAACTCGAGTTATGAAAGTTGTACTGGAGTA	Clonado de todas las versiones ZmFH42
ZmFH42sm fw	ATTGGATCCCTCGCGGCCGC	Clonado de ZmFH42sm
ZmFH42sc fw	ATTGGATCCATGGCGTCGCCG	Clonado de ZmFH42sc
ZmFH55m fw	ATTGGATCCGCCTTCAGTGACGC	Clonado de ZmFH55m
ZmFH55 rv	AAACTCGAGCTAAAGTTCTACTGGAGTACCA	Clonado de todas las versiones de ZmFH55m
ZmFH55sm fw	AAAGGATCCCTAATGGTGGCTGC	Clonado de ZmFH55sm
ZmFH55sc fw	AAAGGATCCATGGCATCGCGTAAG	Clonado de ZmFH55sc
AtFHsc fw	AAAGGATCCATGGCTACAGCTTC	Clonado de AtFHsc
ZmFH42qPCR fw	AACTGGATCGAATCTTGTGCAACTTC	qPCR
ZmFH42qPCR rv	CTAGTTGTGTGGCATTTCCTGTACTATTATG	qPCR
ZmFH55qPCR fw	CTAGGTTTGATTGGGATGCAACAGC	qPCR
ZmFH55qPCR rv	TGTACTACACTTCGACATTCAGAGCAC	qPCR
Mac1 fw	TACCATGTTTCCTGGGATTGCCG	qPCR
Mac1 rv	CCACATCTGCTGCTGAAAAGTGC	qPCR

31. Obtención de ADN plasmídico

I. Obtención de células competentes

Células de *E.coli* de la cepa de interés se obtuvieron a partir de una colonia aislada en medio LB agar suplementado con el antibiótico adecuado y se inocularon en

3 ml de medio LB líquido. Se crecieron a 37°C con agitación durante 16 h y 1 ml de este cultivo saturado se utilizó para inocular 100 ml de medio LB fresco que se creció a 37°C con agitación hasta llegar a la densidad óptica de 1 cuantificada espectrofotométricamente a 600 nm. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4°C y 3000 × g durante 10 min y el precipitado resultante se resuspendió en 50 ml de la solución TfbI [AcOK 30 mM; KCl 100mM; CaCl₂ 10mM; MnCl₂ 50mM; Glicerol 15% (V/V); pH 5,8 ajustado con HAc 0,2M; filtrado) durante 20 min en hielo. Luego de este periodo se volvió a centrifugar a 4°C y 2100 × g durante 10 min. Finalmente el precipitado se resuspendió en 1 ml de solución TfbII [MOPS 10mM; CaCl₂ 75mM; KCl 10mM; Glicerol 15% (V/V); pH 6,5 ajustado con AcONa filtrado] y se recogieron alícuotas de 110 µl que fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

Células de *A. tumefaciens* GV3101 aisladas a partir de una colonia se inocularon en 5 ml de medio LB con los antibióticos adecuados (rifampicina 100 µg/ml, gentamicina 25 µg/ml) y se crecieron a 28°C con agitación durante 24 h. Posteriormente se utilizó 2 ml de este cultivo líquido saturado para inocular 200 ml de medio LB, suplementado con los antibióticos antes indicados, y se creció durante 6 h a 28°C con agitación constante. Las células se centrifugaron a 4200 rpm durante 20 min a 4°C y el precipitado (*pellet* de células) se resuspendió en buffer TE frío. Finalmente, las células se centrifugaron, se resuspendieron en LB, se alicuotaron de a 500 µl y se guardaron a -80°C hasta su uso.

II. Transformación de células competentes

Las células de *E. coli* competentes (110 µl), se transformaron por choque térmico con los plásmidos correspondientes utilizando protocolos de rutina (68). Brevemente, las células competentes fueron incubadas en presencia del plásmido correspondiente durante 30 min en hielo, posteriormente se colocaron a 42°C durante 1 min y se llevaron nuevamente al hielo durante 10 min. Luego de este período se agregó 1ml de LB líquido y se incubaron a 37°C con agitación durante 1 h. Finalmente, las bacterias se centrifugaron (5 min a 7000 rpm), se resuspendieron en 100 µl de LB y

se sembraron en placas de medio LB agar conteniendo los antibióticos adecuados para la selección de las colonias transformadas. Las placas se incubaron 16 h a 37°C.

Por otra parte, la transformación de *A. tumefaciens* se realizó con una alícuota de 500 µl células competentes que se incubaron con 1 µg de ADN plasmídico de modo sucesivo: 5 min en hielo, 5 min en N₂ (líquido) y 5 min a 37°C. La suspensión se diluyó a 1 ml con medio LB y se incubó con agitación a 28°C durante 2 h. Posteriormente las células se centrifugaron a 7000 rpm y se resuspendieron en un volumen de 200 µl que se sembraron en medio LB agar suplementados con los antibióticos adecuados. Las bacterias se incubaron a 28°C durante 48 h.

III. Aislamiento de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizó el *kit* comercial *Illustra plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare Bio-Sciences) según las instrucciones del fabricante, obteniéndose ADN libre de ARN. Este método se utilizó para obtener ADN plasmídico con el que se llevaron a cabo procesos de secuenciación, clonado o digestión con enzimas de restricción.

IV. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las moléculas de ADN con un tamaño comprendido entre 0,2 y 12 Kb se separaron en geles de agarosa 1% (P/V) con SYBR® Safe 0,05 µl/ml (*Invitrogen*). Los geles fueron sometidos a electroforesis horizontal en un campo eléctrico de dirección constante, utilizando el buffer TAE 1 X. Los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador de luz azul y sus tamaños fueron determinados por comparación con marcadores comerciales (400 bp, 100 bp, *Productos bio-Lógicos*, UNQ).

V. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de interés se aislaron de los geles de agarosa y se purificaron utilizando el *kit* comercial "*GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit*" (GE Healthcare Bio-Sciences). El ADN se purificó siguiendo las instrucciones del fabricante.

32. Manipulación enzimática de ADN

I. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR realizadas se llevaron a cabo utilizando buffer de PCR 10X (Promega), dNTPs 0.4 mM, 0.4 μ M de cada oligonucleótido, MgCl₂ 2 mM, *Taq* ADN Polimerasa 1 U, H₂O c.s.p. 25 μ l y ADNg (ADN genómico) o ADNc (ADN copia) como molde. El protocolo general de amplificación constó de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min y un número determinado de ciclos: (i) fase de desnaturalización a 94°C 40 s., (ii) fase de hibridación a la temperatura óptima para cada juego de oligonucleótidos (determinado por gradiente de temperatura), (iii) fase de elongación 1 min por cada 1000 pb a amplificar a 72°C, más una extensión final de 10 min. a la misma temperatura (iv). El número de ciclos se estableció en función del objetivo buscado en cada experimento.

I. Reacciones de digestión empleando enzimas de restricción

Todas las reacciones de digestión realizadas siguieron un mismo procedimiento que consistió en tratar 50-100 ng de ADN y el vector plasmídico con 10- 15 U de enzima de restricción (*Promega*), 2 μ l de buffer 10X específico para cada enzima según las indicaciones del fabricante y H₂O destilada estéril c.s.p. 20 μ l. La mezcla de reacción se incubó durante 2 h a la temperatura correspondiente para cada enzima.

II. Reacción de ligación

Las reacciones de unión de los fragmentos aislados de ADN a los vectores plasmídicos se llevó a cabo utilizando una relación molar inserto:vector igual a 3:1. Se utilizó 1 U de T4 ADN ligasa (*Promega*), el buffer de reacción provisto por el fabricante de la enzima y agua destilada c.s.p 10 μ l. La reacción se incubó a 16°C durante 18 h.

33. Extracción de ARN total y obtención de ADNc

El ARN total de diferentes tejidos vegetales fue extraído usando el reactivo Trizol (Invitrogen). Cada muestra se homogeneizó con nitrógeno líquido, según la relación 50-100 mg de tejido: 1 ml de Trizol. Se agregó 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente de forma manual durante 15 s. La mezcla se dejó reposar durante 3 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 15 min. a $12000 \times g$ a 4°C . Luego de esta etapa se observa una separación en la mezcla de dos fases, una inferior orgánica de color rojo y otra superior, acuosa e incolora, que contiene al ARN. Se transfirió la fase superior a otro tubo y se agregó 200 μ l de isopropanol. Luego de agitar, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a $12000 \times g$ durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante (el ARN precipita en el fondo del tubo). Se lavó exhaustivamente el precipitado con etanol 70% (V/V) y se agitó durante 2 min. Finalmente se centrifugó a $7000 \times g$ durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El ARN se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, para la inactivación de ARNasas).

La cantidad de ARN total se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a 40 μ g de ARN). La pureza de las muestras obtenidas se determinó mediante la relación de absorbancia 260/280 nm.

Obtención de ADN copia

El ADNc se obtuvo por transcripción reversa a partir de 5 μ g de ARN. La mezcla de reacción estaba compuesta por: 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega); 15 μ g de hexámeros *Random pd(N)* (Amersham Biosciences); 500 μ M de dNTPs; 1X buffer 5X M-MLV (Promega); 25 U Inhibidor de ARNasa (Promega); H₂O DEPC c.s.p. 50 μ l. La reacción se incubó a 42°C durante 1h.

34. Extracción y cuantificación de ADN genómico

El ADN genómico (ADNg) se extrajo a partir de 100 mg de hojas de *A. thaliana* trituradas en presencia de N₂ líquido. Posteriormente se agregó 300 µl de buffer bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB), se trituró hasta lograr la completa homogeneización del tejido y se incubó a 60°C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13400 rpm durante 5 min, se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó 300 µl de cloroformo. Después de agitar, se centrifugó nuevamente a 13400 rpm por 5 min. La fase acuosa (superior) fue transferida a otro tubo al que se le agregó un volumen igual de isopropanol y se precipitó el ADN por 20 min. a temperatura ambiente. El precipitado obtenido luego de centrifugar a 7000 × *g* por 10 min se lavó en etanol 70% (V/V) y se seco a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 µl de agua destilada y se conservó a -20°C. La cantidad de ADN total se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a 50 µg/µl de ADN). La pureza de las muestras obtenidas se determinó mediante la relación de absorbancia 260/280 nm.

35. Electroforesis de proteínas

Las muestras provenientes de extractos bacterianos, de tejido u órganos vegetales o de proteínas recombinantes purificadas se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), utilizando un equipo Mini Protean III Cell (*BioRad*). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando BSA como proteína testigo (69). La concentración de acrilamida en el gel de separación fue de 8-15% (P/V) según la muestra a analizar y de 5% (P/V) en el gel de concentración. Las muestras se incubaron a 100°C durante 5 min en presencia del siguiente buffer de muestra: Tris-HCl 12 mM, pH 6,8; glicerol 5% (V/V); SDS 0,4% (P/V); 2-mercaptoetanol 2,88 mM y azul de bromofenol 0,02 % (P/V). La electroforesis se realizó a 120 V (voltaje constante). Las bandas de proteína se revelaron por tinción con azul brillante de Coomassie R-250, seguido del desteñido con una solución de etanol:

ácido acético: agua (3:1:6 V/V). Las electroforesis en condiciones nativas se realizaron del mismo modo antes expuesto pero empleando buffers no desnaturalizantes.

36. Transformación de plantas de *A. thaliana* utilizando el método de infiltración por *floral dip*

La transformación de plantas de *Arabidopsis* se realizó mediante la técnica de *floral dip* (70). Brevemente, se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* tipo salvaje en estadio de floración (aprox. 6 semanas). Para tener un buen número de brotes florales, las inflorescencias primarias fueron cortadas aproximadamente 4 días antes de la transformación para eliminar la dominancia apical y posibilitar la emergencia de múltiples botones florales secundarios. Dos días antes de la transformación se inició un cultivo de 3 ml de células de *A. tumefaciens* GV3101, transformadas con la construcción correspondiente. El cultivo se realizó a 28°C en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Con estos pre-cultivos se inocularon 250 ml de medio LB más antibióticos y se crecieron en agitación a 30°C por 6 h. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 7000 × *g* por 10 min. y se resuspendieron en 250 ml de medio de infiltración, sacarosa 5% (P/V); detergente SILWET® L-77-Ag 0,005% (V/V). El medio de infiltración se colocó en vasos de precipitado y se sumergieron los brotes florales durante 45 s. Las macetas se colocaron en forma horizontal en bandejas de plástico y cubiertas con plástico transparente, de forma tal de mantener la humedad y posibilitar el paso de luz. Luego un día, las plantas se colocaron de forma vertical y se retiró la cubierta plástica. Luego de 3 a 5 semanas se cosecharon las semillas y fueron mantenidas a 4°C hasta ser seleccionadas con el antibiótico adecuado.

37. Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

Células de *Agrobacterium* transformadas se crecieron en 5 ml de LB durante toda la noche a 28°C, con los apropiados antibióticos. Luego, se realizó una dilución 1:25, se agregó 20 µM de acetosiringona y se creció toda la noche. Se centrifugó 5,000

x g 15 min., y el precipitado se resuspendió en la solución adecuada (10 mM MgCl₂, 10 mM MES-K pH 5.6, 100 μM acetosiringona) para lograr una densidad óptica a 600 nm de 0,4. Finalmente, se incubó a 2-3 h a temperatura ambiente. La infiltración se realizó con una jeringa de 5 ml, mediante presión de la misma en la parte inferior de la hoja de *Nicotiana benthamiana*. Luego de 7-10 días se observaron las hojas en un microscopio confocal de fluorescencia.

38. Transformación de células de *Saccharomyces cerevisiae*

Las células de *S. cerevisiae* fueron sometidas a transformación química en presencia de acetato de Litio (71). Las levaduras se crecieron a 30°C y 250 rpm en medio YPGlc durante toda la noche. Luego, se hizo una dilución de 1.5 ml del cultivo ON saturado en 30 ml de medio líquido YPGlc tal que la densidad óptica sea de 1, y se creció durante 4 h con agitación hasta alcanzar una DO^{600nm} de 4. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm, durante 5 min. a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 ml de solución de Litio (10 mM Tris:HCl pH7.5, 1 mM EDTA pH 8.0 y 0.1 M Acetato de Litio). Se repitió el paso de centrifugación, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en la solución de Litio residual. Por cada evento de transformación a realizar se agregó a un tubo de eppendorf: 0.5-1 μl de ADN plasmídico (0.2-0.3 μg/μl), 60 μl de suspensión de células de levadura y 10 μl de ADN *carrier* (ADN de esperma de salmón, 2 mg/ml previamente hervido por 10 min. y mantenido en hielo hasta su uso). Luego de de obtener una suspensión homogénea se añadió 0.45 ml de solución de PEG 40% P/V (10 mM Tris:HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1 M Acetato de Litio y 40% P/V PEG 3500). Se incubaron las células a 30°C por 30-40 min. A continuación, se las sometió a un choque térmico por incubación durante 15 min a 42°C seguida de la transferencia de las células a temperatura ambiente. Por último se sembró de 100 a 200 μl de células en el medio selectivo correspondiente, y se incubó a 30°C por 2-3 días.

39. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Las secuencias nucleotídicas que codifican para ambas frataxinas de maíz (GRMZM2G062342 y GRMZM2G083755) se amplificaron por PCR a partir de ADNc obtenido de hoja. Las secuencias codificantes, sin la regiones predichas como péptido transito, se clonaron en el plásmido pGEX-4T1 (General Electric HC) río abajo del marco de lectura abierto de la glutatión-S-transferasa (GST). Los plásmidos que codifican las enzimas recombinantes, pGEX-ZmFH42 y pGEX-ZmFH55, fueron usados para transformar la cepa de expresión *Escherichia coli* BL21 (DE3). La síntesis de las proteínas se indujo con isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,5 mM. Después de un 3-h de inducción a 37°C, las células fueron cosechadas por centrifugación.

Para la purificación de proteínas, las células se resuspendieron en PBS frío (1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 101 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 18 mM), se sometieron a sonicación y se centrifugaron a 10.000 x g durante 30 min. El sobrenadante recuperado se utilizó para purificar ZmFH42m y ZmFH55m por cromatografía de afinidad con resina de glutatión sepharosa 4B (*GE Healthcare*), incubando la mezcla con agitación suave durante 60 min. a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados en PBS, y finalmente, se realizó la digestión con trombina durante la noche a 23°C. Esto permitió la separación del fragmento de GST de las proteínas de fusión. Luego de concentrar las muestras fueron finalmente separadas de trombina mediante FPLC de filtración en gel, empleando una columna a Superdex75 (*GE Healthcare*) equilibrada con 50 mM Tris-HCl, pH7.0. Las fracciones seleccionadas fueron mantenidas a -80°C hasta su uso posterior.

40. Obtención de protoplastos de *Arabidopsis thaliana*

Los protoplastos se obtuvieron a partir de hojas jóvenes de *Arabidopsis thaliana* salvajes y transformantes. Brevemente, las hojas se cortaron en tiras de 1 mm y fueron colocadas en un recipiente con 500 μ l de celulasa 1.5% (P/V) (Sigma) y

macerozima 0,4% (P/V) (Sigma) en buffer MES 20 mM, pH 5,7 conteniendo Manitol 0,4 M; KCl 20mM; CaCl₂ 10mM y BSA 1% (P/V). La digestión de la pared celular se realizó a 25°C entre 3 y 14 h. Posteriormente las muestras se colectaron por centrifugación a 100 x *g* y se lavaron en el mismo buffer sin enzimas. Una vez obtenidos, los protoplastos se mantienen intactos en hielo hasta un máximo de 24 h (72).

Para la marcación de mitocondrias, los protoplastos obtenidos se trataron con MitoTracker Orange 200 nM (*Invitrogen*) durante 15 min. y luego se lavaron.

41. Microscopia confocal láser de fluorescencia

Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal invertido Nikon Modelo Eclipse TE-2000-E2, con el objetivo 60X. La fluorescencia de GFP fue excitada con un laser de argón a 488 nm y detectada a 515 nm. Las mitocondrias fueron identificadas por la fluorescencia del MitoTracker excitada a 543 nm con un laser de helio-neon y detectada a 585 nm. La autofluorescencia de la clorofila se detectó a 665 nm luego de ser excitada con un laser de argón.

42. Amplificaciones por PCR en tiempo real (QPCR)

La reacción de PCR en tiempo real se realizó utilizando como templado ADNc obtenido de plantas de maíz salvajes. Las reacciones de amplificación se realizaron en placas de 96 pocillos cada una de las cuales contenía 20 µl de medio de reacción [10 ng de ADNc; 500 nM de oligonucleótidos; 1X buffer Go Taq incoloro (*Promega*); 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM dNTPs; 1X de Syber Green; 0,8 U de ADN polimerasa Go Taq (*Promega*); agua destilada c.s.p 20 µl]. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (QPCR Systems, *Stratagene*) utilizando como controles interno el gen de actina de maíz. Para la cuantificación relativa se empleó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (73).

43. Ensayo de degradación oxidativa de 2-deoxiribosa

Una mezcla de Fe (II) 15 μM , H_2O_2 8 μM , 2- deoxyribosa 5 mM (*Fluka*) en buffer Hepes-KOH 10 mM, pH 7.0, fue incubada en ausencia o en presencia de ZmFH42 y ZmFH55 recombinantes por 30 min. a 25 °C (vol. Final 100 μl). Posteriormente, se agrego 50 μl de acido fosfórico 4 % V/V y 50 μl de acido tiobarbitúrico 1% P/V. La mezcla de reacción fue incubada por 10 min. a 100 °C y posteriormente enfriada en hielo. Después de este procedimiento se agrego 75 μl de SDS 10% V/V. La cantidad de malondialdehido producida fue determinada espectrofotométricamente a 532 nm.

44. Determinación de actividad ferroxidasa

La actividad ferroxidasa se determinó siguiendo la oxidación de una solución de $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ 18 μM , en presencia de 3 μM de proteína y ferrozina ($\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{S}_2\text{O}_6\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$, *sigma*) en exceso. La formación de complejo coloreado se determinó a 562 nm ($\epsilon=27800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

45. Espectrometría de masa de ionización por electrospray (ESI-TOF-MS)

Las proteínas purificadas fueron sometidas a ESI-TOF-MS en un instrumento Micro TOF- Q (Bruker) en interfase con una bomba de HPLC Agilent 1100 Series, equipado con un muestreador automático , todos ellos controlados por el software Compass. Las muestras fueron analizadas en las siguientes condiciones: 20 μl de proteína fueron inyectados a través de un tubo PEEK (1,5 m x 0,18 mm de diámetro interno), a 40 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, 90-110°C temperatura desolvatación, gas seco 6 l min^{-1} , los espectros fueron recolectados en el rango 800-2000 m/z. El tampón de *carrier* fue una mezcla 5:95 (V/V) de acetonitrilo:acetato de amonio/amoniaco (15 mM , pH 7,0).

46. Titulación espectrofluorométrica con cobre.

Se determinó la disminución de la intensidad de fluorescencia a 350 nm con el agregado de Cu(II) de soluciones de las proteínas. AtFHm, ZmFH42m y ZmFH55m (3 μ M), excitando a 280 nm. Se realizaron medidas en el tiempo luego del agregado de cada equivalentes de cobre. Finalmente, se adicionó un exceso del quelante de este ión metálico, DAHK (péptido Asp-Ala-His-Lys) para observar la recuperación de la fluorescencia.

47. Ensayo de determinación de Cu (I)

Se determinó la presencia de Cu (I) en muestras de frataxinas de maíz (30 μ M) tratadas previamente con CuSO₄ 30 μ M empleando el reactivo BTA (ácido batocuproindisulfónico, sigma) en exceso, que forma un complejo coloreado con el Cu (I) que presenta un máximo de absorción a 480 nm.

48. Análisis histoquímicos de la actividad β -glucuronidasa (GUS)

Para analizar la actividad β -glucuronidasa en forma histoquímica en las plantas transformadas con las construcciones correspondientes las plántulas, órganos y tejidos se colectaron en acetona al 90% (V/V) fría y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Posteriormente las muestras se transfirieron a la solución de teñido compuesta por buffer fosfato de sodio 50 mM, Tritón X-100 0,2% (V/V), ferricianuro de potasio 2 mM y ferrocianuro de potasio 2 mM durante 20 min. Luego de este tiempo, se retiró y se reemplazó por una nueva solución de teñido conteniendo X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -Dglucurónido) 2 mM preparado en N,N-dimetilformamida. Las muestras se sometieron a vacío durante 7 min. y se incubaron a 37°C durante 16 h. Una vez transcurrido este tiempo, se removió la solución de teñido y las muestras se colocaron en sucesivas soluciones de etanol 20%, 35% y 50% (V/V). A continuación se fijaron en una solución de etanol 50%, ácido acético 10% y formaldehído 5% (V/V) durante 30

min. Finalmente se retiró la solución de fijación y las muestras fueron conservadas en etanol 70% (V/V) a 4°C hasta ser analizadas(74).

El análisis histoquímico se realizó en plántulas de 5 y 15 días crecidas en placas de Petri con medio MS agar mas el agregado de kanamicina (30 µg/ml). Para las muestras de plantas de 30 días, luego de la selección en kanamicina, se trasplantaron a tierra y se crecieron.

49. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Los ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) se realizaron utilizando como sondas oligonucleótidos (ADN doble hebra) marcados en la región 5' con biotina (75). La secuencia de los oligonucleótidos corresponden a las regiones promotoras de los genes *AtNfs1* y *ATFH* que contienen los motivos ABRE y RY en su forma salvaje (wt). El ensayo de unión se realizó con 1 µg de proteína FUSCA3 recombinante o 1 µg de GST (control negativo) incubada con 8 ng de las sondas biotiniladas en buffer de unión, HEPES 10 mM, pH 8, KCl 50 mM, DTT 5 mM, glicerol 10% (V/V) y poly [dl-dC] 20 ng. Las mezclas de reacción (20 µl) se incubaron en hielo durante 60 min y posteriormente se mezclaron con 5 µl de buffer de siembra (xileno cianol 0,25% (P/V); azul de bromofenol 0,25% (P/V); glicerol 30% (V/V)) y se sembraron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 6% [acriamida:bisacrilamida (29:1) 30% (P/V), 2 ml; TBE 5X, 0,5 ml; APS 10% (P/V) 80 µl; TEMED 20 µl; H₂O c.s.p 10 ml]. El gel se corrió en TBE 0.25X y glicerol 2% (V/V) durante 75 min a 100 v. Luego se realizó la transferencia a membranas de nylon mediante electrotransferencia húmeda durante 30 min en buffer SSC 20X (citrato de sodio 0,3 M; NaCl 3 M). Finalizada la transferencia, la membrana se colocó durante 15 min sobre un transiluminador de luz U.V., se lavó e incubó durante 30 min con una solución bloqueante provista en el kit comercial *Biotin Chromogenic Detection (Thermo Scientific)*. Posteriormente la membrana se incubó en una solución bloqueante con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (dilución 1/5000) durante 60 min. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó dos veces con solución bloqueante y luego se realizó la reacción

cromogénica mediante el buffer de detección compuesto por BCIP/NBT en las proporciones que indicadas por el *kit*. La reacción se dejó transcurrir en oscuridad y agitación hasta la aparición de las bandas inmunoreactivas.

50. Programas bioinformáticos utilizados

* Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas fueron obtenidas de la página web Phytozome V11.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) y de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

* El análisis de las secuencias de ADN y aminoácidos se realizó utilizando los diferentes módulos del programa Lasergene v. 5.0 (DNASTAR, Inc. Madison).

* La predicción de la localización subcelular y el análisis del péptido tránsito se realizó utilizando los algoritmos disponibles en las siguientes páginas web:

Predotar v1.03, (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>)

MitoProtII v1.101, (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>)

ChloroP 1.1 Server, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)

Resultados y Discusión

Capítulo I:

Identificación y caracterización de las isoformas Frataxina de maíz

Capítulo I: Identificación y caracterización de las isoformas Frataxina de maíz

1. Identificación y análisis *in silico* de las isoformas frataxina de maíz.

Debido a la importancia demostrada de frataxina en el metabolismo mitocondrial de levaduras humanas y plantas, se decidió ampliar su estudio en otras especies vegetales de interés agronómico. A partir de la secuencia codificante de frataxina de *Arabidopsis thaliana* (AtFH, At4g03240.1) se realizó la búsqueda de homólogos a dicho gen en la bases de datos de especies vegetales Phytozome (76). De este manera, identificamos por primera vez un organismo (maíz, *Zea mays*) con más de una secuencia codificante para frataxina. *Zea mays* presenta dos isoformas de proteínas frataxina, GRMZM2G062342 (codificada en el cromosoma 3) y GRMZM2G083755 (codificada en el cromosoma 1) y las denominaremos ZmFH42 y ZmFH55, respectivamente. ZmFH42 y ZmFH55 presentan un 44% y 45% de identidad de secuencia aminoacídica, respectivamente, comparada con AtFH; mientras que ambas isoformas presentan entre sí una identidad del 72%.

Luego de una búsqueda exhaustiva, encontramos que además otras especies vegetales como soja y sorgo presentan más de una isoforma de frataxina (Glyma19g29700.1 y Glyma03g00960.1; 007G212800.1 y 003G319100.1, respectivamente).

En la Figura 7A podemos observar el alineamiento de frataxinas de diferentes especies. Esta proteína se encuentra conservada en la mayoría de los organismos, desde bacterias y hongos hasta mamíferos y plantas. Notablemente no ha tenido cambios estructurales a través de la evolución, sugiriendo que puede cumplir una función similar en todos los organismos (46, 77).

In silico, Se determinó la estructura secundaria de ZmFH42 y ZmFH55 (Figura 7B). Se obtuvieron los modelos estructurales por homología utilizando el servidor T.I.T.O. (Tool for Incremental Threading Optimisation)(78) y se empleó la estructura 3D

programa ClustalW2 (80). La edición del alineamiento se realizó con el servidor ESript (81). B) Modelado estructural por homología de ZmFH42 y ZmFH55. Se utilizó como molde la estructura 3D de la frataxina humana PDB 1ekg.

2. Estudio de la función *in vivo* de ZmFH42 y ZmFH55 en *Saccharomyces cerevisiae*.

Ensayo de complementación: Sensibilidad frente al estrés oxidativo generado por H₂O₂

Previamente, en nuestro laboratorio se realizó el clonado de *ZmFH42* y *ZmFH55* en el plásmido de expresión en levaduras pYES3CT. Con estos vectores se llevó a cabo la transformación química en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DY150 y en la cepa mutante nula para frataxina, *Δyfh::his3* (Dy150) (47). Estos constructos presentan las secuencias de interés fusionadas el péptido tránsito de la subunidad IV de la citocromo oxidasa de levaduras para direccionar los péptidos respectivos hacia las mitocondrias. La expresión de los respectivos genes en el plásmido pYES3CT se encuentra bajo el control del promotor *GAL1*, inducible por galactosa, como se muestra en el esquema de la Figura 8.



Figura 8. Esquema de las construcciones empleadas para la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes (DY150) y células *knock out* para el gen frataxina (*Δyfh::his3*).

Las células transformantes, seleccionadas en medio mínimo por auxotrofia al aminoácido triptófano, se crecieron en un medio rico YP-rafinosa y se indujo la expresión de las proteínas con galactosa 2% (P/V). Luego, a 1 ml de cada una de las células, con una DO=1, se le realizó un tratamiento con H₂O₂ 2 mM a temperatura ambiente y en agitación constante, de una hora de duración. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas, se sembraron en placas YPgal, y se crecieron a 30°C durante 3 días.

La Figura 9 muestra el crecimiento de células de *Saccharomyces* luego del tratamiento mencionado más arriba. Las levaduras complementadas con ZmFH55 crecen hasta una dilución 10^{-3} , en cambio en el caso de las complementadas con ZmFH42 logran crecer hasta la dilución 10^{-2} . En ambos casos el crecimiento es mayor que el observado para las levaduras *knock out*, que apenas crecen a una densidad óptica de 1. Entonces, a partir de lo observado podemos concluir que las levaduras deficientes en frataxina son más sensibles a oxidantes, por ende son afectadas por el tratamiento con H_2O_2 . Este fenotipo se logra revertir cuando estas células son complementadas con las correspondientes frataxinas de maíz, de forma similar a lo observado previamente con la frataxina de *Arabidopsis* (64), demostrando su rol protector frente al estrés oxidativo.

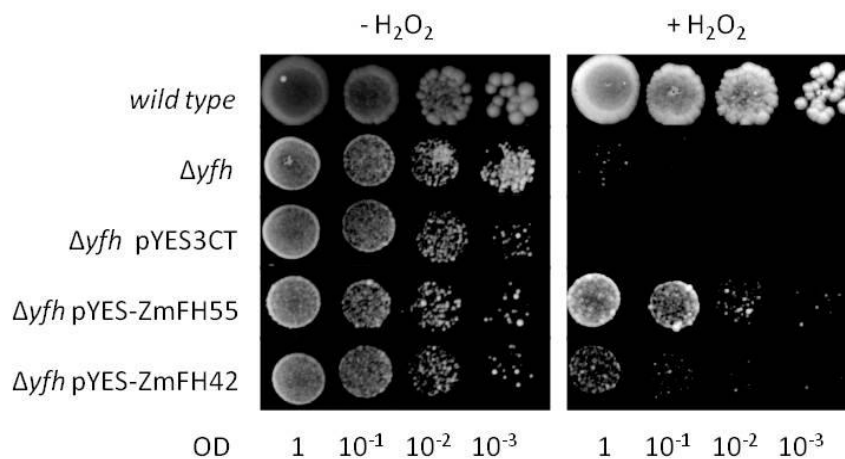


Figura 9. Prueba de recuperación frente al daño oxidativo generado por H_2O_2 en células de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes (DY150), células *knock out* para el gen frataxina (Δyfh) y células *knock out* complementadas con las isoformas frataxina de maíz (Δyfh pYES-ZmFH55 y Δyfh pYES-ZmFH42). Se observa el crecimiento en medio YPGal y en medio YPGal con 2mM H_2O_2 .

3. Análisis de la expresión de ZmFH42 y ZmFH55 en maíz.

Se determinaron los niveles de expresión de los genes frataxina en maíz mediante la técnica PCR en Tiempo Real. Para ello se crecieron maíces de la variedad B73 en invernadero. Se tomaron muestras de tejidos a distintos tiempos, se extrajeron

ARN por el método TRIzol® (invitrogen) y se sintetizó ADNc mediante reacción de transcripción reversa. Se emplearon cebadores específicos para ambas isoformas de maíz. El gen de *ACTINA* se utilizó como control interno y se calculó la expresión relativa de cada gen.

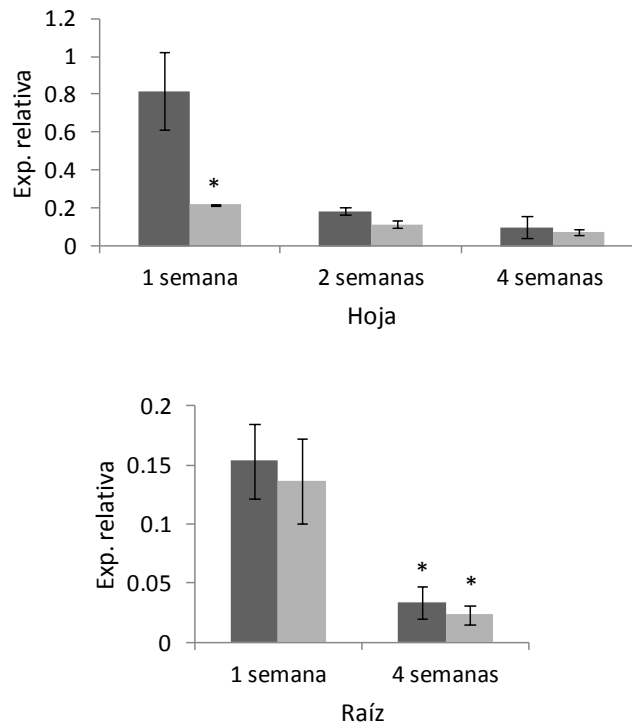


Figura 10. Análisis de los niveles de transcritos de las isoformas de maíz relativa a los niveles de actina en hoja y raíz de maíz. Las barras gris oscuro corresponden a la expresión de *ZmFH55*, mientras que las claras a *ZmFH42*.

A partir de lo presentado en la Figura 10 podemos determinar que efectivamente encontramos que se expresan ambas isoformas en maíz. Notablemente, hay variación significativa en la expresión de *ZmFH55* y *ZmFH42* en hojas jóvenes, observando una cantidad de *ZmFH55* 4 veces mayor que *ZmFH42*. En raíz observamos que ambos genes se expresan de mismo modo, y que luego de 4 semanas disminuye aproximadamente 3 veces la expresión de los mismos. En ambos tejidos las isoformas presentan un patrón similar de disminución de la expresión con el tiempo.

4. Localización de ZmFH42 y ZmFH55 en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* mediante microscopia confocal de fluorescencia.

Con el fin de evaluar la localización subcelular de las isoformas ZmFH, se realizaron análisis bioinformáticos a partir de las secuencias codificantes de ambas frataxinas. Estudios preliminares utilizando los programas bioinformáticos MITOPROT (82) y CHLOROP (83) predijeron que las diferentes isoformas ZmFH tendrían principalmente una localización mitocondrial, pero además indicaron una posible presencia en cloroplastos, la Tabla 5 muestra los resultados de las predicciones *in silico*.

	Mitocondria	Cloroplasto
ZmFH42		
Mitoprot	99,08%	
ChloroP		52,20%
Predotar	57%	9%
ZmFH55		
Mitoprot	96,27%	
ChloroP		56,6%
Predotar	87%	10%

Tabla 5. Predicciones de localización en mitocondrias y cloroplastos de ZmFH42 y ZmFH55, mediante programas los programas bioinformáticos Mitoprot, ChloroP y Predotar (82-84).

Diversos autores postularon que las mitocondrias y los cloroplastos de plantas tendrían ambos su propia maquinaria de ensamblaje de grupos Fe S, esto supondría la existencia de una proteína homóloga a frataxina en cloroplastos. (10). Recientemente, en nuestro laboratorio se demostró que AtFH estaría presente tanto en mitocondrias como cloroplastos, jugando un rol fundamental en la síntesis de centros Fe S en esta organela (22).

Entonces, con el fin de determinar la posible localización dual de ZmFH42 y ZmFH55 *in vivo*, se generaron líneas de *Arabidopsis* que expresan una fusión del extremo amino terminal de cada una de las frataxinas de maíz, predicha como péptido tránsito, con la proteína verde fluorescente EGFP. Para lograr esto, se diseñaron cebadores para amplificar por PCR la secuencia correspondiente y se empleó ADNc de hoja de maíz como molde para la reacción. Los productos de la amplificación fueron clonados en el vector pZP212, que permite la expresión en *Arabidopsis thaliana*, bajo control del promotor constitutivo CaMV 35S, y fusionados a la secuencia que codifica a la proteína verde fluorescente (GFP).

Con las construcciones anteriores se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* y luego plantas de *A. thaliana* salvajes mediante la técnica *floral dip*(70). Las semillas se cosecharon de 3 a 5 semanas después y fueron seleccionadas en placas con medio de cultivo suplementado con el antibiótico kanamicina. Una vez seleccionadas, las plántulas fueron pasadas a tierra para completar su desarrollo. Posteriormente, se realizó la digestión enzimática de la pared celular y la extracción de protoplastos a partir de hojas de plantas transgénicas y salvajes de 3-4 semanas empleando el protocolo de Yoo y col, 2007(72).

Los protoplastos obtenidos fueron incubados con un marcador fluorescente de mitocondrias comercial (*Mitotraker® Orange, Invitrogen*).

En la Figura 11 se muestran las imágenes obtenidas con un microscopio confocal invertido, empleando el objetivo 60X. La fluorescencia emitida por la clorofila, GFP y *Mitotraker®* fue registrada de la misma preparación de protoplastos seleccionando las longitudes de onda de excitación y emisión:

Excitación= 488 nm clorofila y GFP; 543 nm *Mitotraker®* y 633 nm clorofila.

Emisión= 515-530 nm (verde): GFP y clorofila; 585-640 (rojo): *Mitotraker®*, 665 nm (rojo lejano): clorofila.

Con los protoplastos provenientes de las plantas salvajes se ajustaron los parámetros para la obtención de las imágenes de modo de eliminar la señal verde de la clorofila. De esta manera, la señal observada en este rango de longitud de onda es sólo atribuible a GFP.

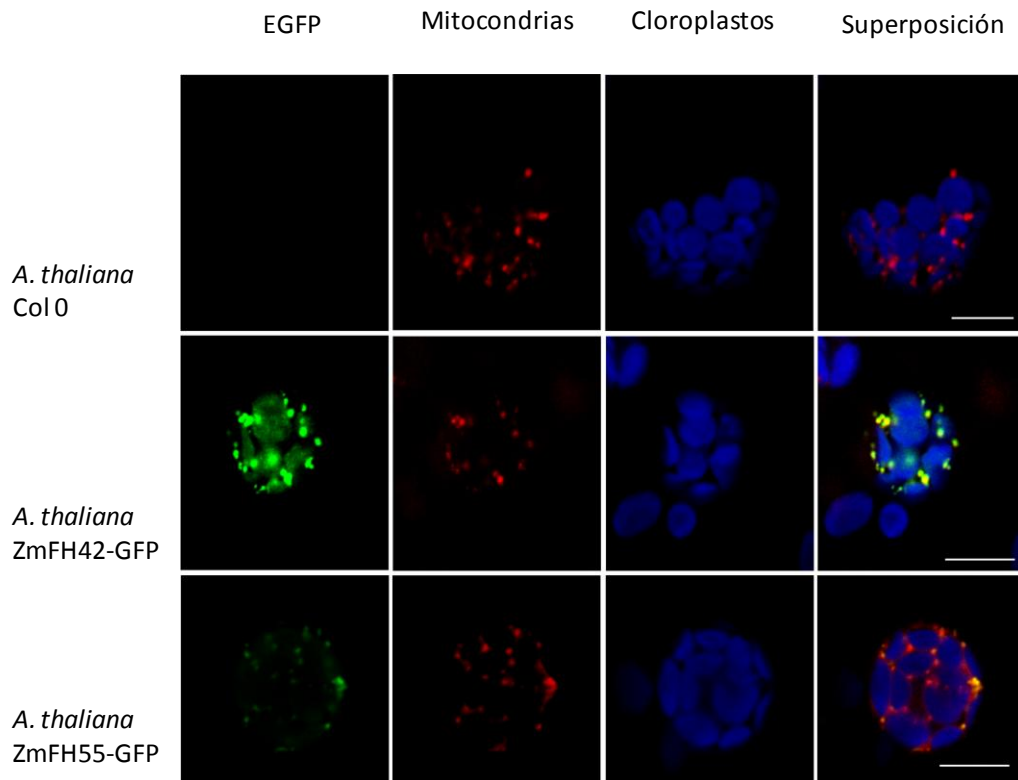


Figura 11. Localización subcelular de ZmFH42 y ZmFH55 en protoplastos de *Arabidopsis thaliana*. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de protoplastos de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la región codificante para el péptido tránsito de las frataxinas de maíz en fase a la secuencia de EGFP, bajo control del promotor CaMV 35S. Se observa la emisión de fluorescencia de GFP (emisión 515-530 nm), Marcador Mitotraker , Invitrogen (emisión 585-640 nm), autofluorescencia de la clorofila (emisión 665 nm) y la superposición de la fluorescencia de i) protoplastos de *A. thaliana* tipo salvaje Col0, ii) protoplastos ZmFH42-GFP y iii) protoplastos ZmFH55-GFP. Escala: 10 μ m.

En la Figura 11, podemos observar que la señal de fluorescencia de ZmFH55-GFP coincide con la señal de *Mitotraker*[®]; mientras que la señal de ZmFH42-GFP coincide tanto con la de *Mitotraker*[®] como con la de clorofila. Entonces a partir de estos resultados podemos sugerir que ZmFH55, en este sistema, se localizaría en mitocondrias y ZmFH42 estaría presente tanto en mitocondrias como en cloroplastos.

5. Localización subcelular de ZmFH42 y ZmFH55 en *Nicotiana benthamiana*

A partir de los resultados anteriores, podemos afirmar que ambas proteínas frataxina de maíz podrían presentar una localización en mitocondrial y una probable localización en cloroplastos. Para corroborar y reforzar estos resultados, empleando otro sistema disponible en nuestro laboratorio, se emplearon las construcciones de los péptidos tránsito fusionados a GFP en el vector de expresión en plantas pZP212 para realizar transformaciones transitorias en otra planta modelo: *Nicotiana benthamiana*. Se infiltraron plantas con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformados con los constructos antes mencionados, y se coinfiltraron con un marcador de localización mitocondrial. Al cabo de 7 a 10 días se observaron las hojas infiltradas por microscopía confocal de fluorescencia.

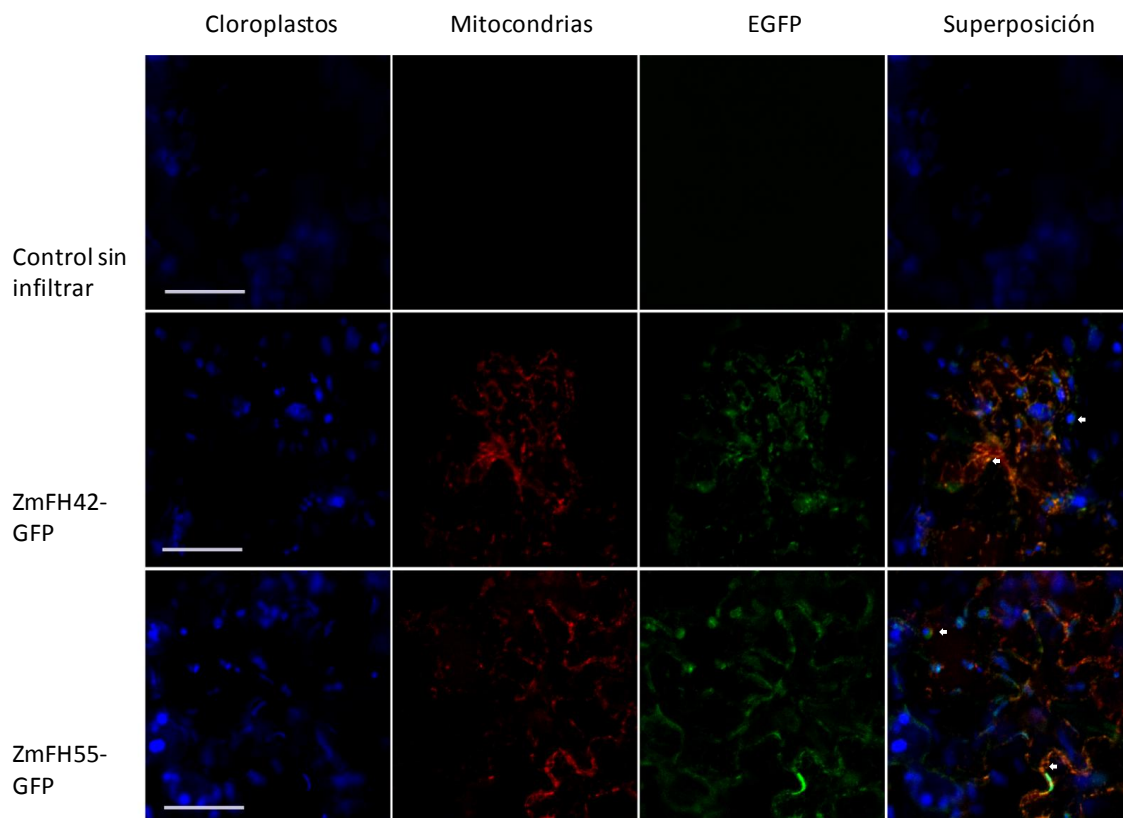


Figura 12. Localización subcelular de ZmFH42 y ZmFH44 en *Nicotiana benthamiana*. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de hojas de *Nicotiana benthamiana* tipo salvaje, infiltradas con pZP212.ZmFH42-GFP y con pZP212.ZmFH55-GFP. Se observa la emisión de

fluorescencia de EGFP (emisión 515-530 nm), Marcador de mitocondrias (emisión 585-640 nm), autofluorescencia de la clorofila (emisión 665 nm) y la superposición de la fluorescencia. Escala: 50 μ m.

Las imágenes que muestra la Figura 12 corresponden a las obtenidas con un microscopio confocal invertido de fluorescencia, empleando un aumento total de 60X. Con las hojas sin infiltrar se ajustaron los parámetros para la obtención de las imágenes de modo de eliminar la señal verde de la clorofila. De esta manera, la señal observada en este rango de longitud de onda es sólo atribuible a GFP.

La fluorescencia emitida por la clorofila, GFP y el marcador de mitocondrias fue registrada seleccionando las longitudes de onda de excitación y emisión:

Excitación: 488 nm, 543 nm y 633 nm.

Emisión: 515-530 nm, 585-640 nm y 665 nm.

Así, finalmente, a partir de los datos mostrados en la Figura 12 se puede determinar que la señal de fluorescencia de ptZmFH55-GFP y ptZmFH42-GFP colocan, en ambos casos, tanto con la de clorofila como con la del marcador de mitocondrias. Entonces a partir de estos resultados podemos sugerir que ZmFH55 y ZmFH42 podrían presentar localización dual en ambas organelas.

6. *Discusión Capítulo I*

La secuencia primaria de la frataxina posee aminoácidos altamente conservados a lo largo de la proteína que están presentes en todos los ortólogos, desde plantas hasta procariotas (Figura 7). Esta conservación de la secuencia primaria se ve reflejada en la estructura secundaria de todas las frataxinas que presentan un plegamiento similar. En este capítulo identificamos por primera vez más de una isoforma de frataxina en un organismo vegetal. Las proteínas de maíz, ZmFH42 y ZmFH55, poseen el dominio característico $\alpha\beta$ sandwich de la familia de frataxinas (Figura 7B). Se encontró que ambas isoformas están presentes en maíz, presentando una mayor expresión en tejidos jóvenes.

Está reportado que las levaduras deficientes en frataxina son sensibles al tratamiento con oxidantes (47). Por eso, se eligió este sistema heterólogo para evaluar la función *in vivo* de las proteínas predichas. La capacidad de recuperación frente al tratamiento con un agente oxidante como el H₂O₂ en levaduras *Δyfh* transformadas con ambas isoformas, nos permite determinar el rol protector de las frataxinas de maíz frente al daño oxidativo. Así como también nos permite afirmar que *ZmFH42* y *ZmFH55* codifican para proteínas funcionales.

Dadas las similitudes metabólicas requeridas en mitocondrias y cloroplastos no sorprende que muchas proteínas sean encontradas en ambas organelas, en muchos casos son proteínas parálogas codificadas por genes diferentes, sin embargo, hay muchos otros casos donde proteínas con idénticas secuencias son encontradas en sendas organelas, traducidas por el mismo gen. Este es el caso por ejemplo de las aminoacil ARNt sintetasas (85).

Los sistemas de importe de proteínas de cloroplastos y mitocondrias han evolucionado de manera independiente y no comparten homología. Sin embargo, ciertas proteínas son reconocidas por ambos sistemas (86). Las mitocondrias poseen dos complejos de proteínas llamados TOM y TIM, localizados en las membranas externas e internas, respectivamente, que juntos forman el canal de importe. Estos complejos generalmente reconocen secuencias N-terminales, que si bien no son secuencias consenso, en plantas son más largas que otros eucariotas, tienen una carga neta positiva (ricas en argininas y pobres en aminoácidos ácidos) y contiene algunos residuos anfipáticos (leucina y alanina) (87). Además, son particularmente ricas en serinas (7). Los cloroplastos poseen los complejos TOC y TIC, que difieren de los complejos de importe mitocondriales. Las señales de localización cloroplástica están poco definidas, son de aproximadamente 50 aminoácidos, ricos en serinas, y a diferencia de las señales mitocondriales no contienen muchos residuos cargados positivamente(88). Se propone que las proteínas de localización dual poseerían un péptido tránsito ambiguo, y que este doble direccionamiento celular comprendería una comunicación estricta entra ambas organelas.

En el trabajo desarrollado en este capítulo de tesis se pone en evidencia que las isoformas frataxinas de maíz poseerían una ubicación dual en mitocondrias y cloroplastos (Figura 11 y 12). La localización *in vivo* de ZmFH42 y ZmFH55 en mitocondrias confirma la ubicación subcelular sugerida para esta proteína de acuerdo a estudios de frataxinas homólogas. Por otra parte, el direccionamiento a cloroplastos representa una localización celular novedosa para frataxina que recientemente se ha descrito para AtFH (22). A partir del programa ATP (*ambiguos targeting predictor*(89)) se determinó que los *scores* de localización dual de ZmFH42 y ZmFH55 son 0,496 y 0,237, respectivamente. Valores mayores a 0,3 indican una probable localización ambigua. Esta mayor probabilidad de ZmFH42 de dirigirse a cloroplastos coincide con los resultados obtenidos de localización en protoplastos de *Arabidopsis thaliana* (Figura 11).

La doble localización de las isoformas frataxina de maíz refuerza lo recientemente demostrado por nuestro grupo que AtFH estaría presente en cloroplasto, y sería indispensable para su función(22). Además, esto apoyaría la evidencia de la existencia de una vía de síntesis de centros Fe S en cloroplastos, no sólo con componentes del sistema SUF sino también ISC, además un posible rol en el metabolismo de hemo.

Capítulo II:

Estudios bioquímicos y estructurales de
frataxinas de plantas

Capítulo II: Estudios bioquímicos y estructurales de frataxinas de plantas

1. Expresión y Purificación de ZmFH42 y ZmFH55 en *E. coli* en su forma madura.

Con el fin de avanzar en la caracterización de las frataxinas de maíz, se llevó a cabo la expresión de los genes *ZmFH42* y *ZmFH55* en un sistema heterólogo bacteriano. Para tal fin, a partir de ADNc de hoja de maíz, se clonó la secuencia de ADN que codifica para las proteínas ZmFH55 y ZmFH42 en sus formas maduras (ZmFH42m y ZmFH55m) en el vector pGEX4T1, incorporando la secuencia que codifica para la Glutación S Transferasa (GST) en la región N-terminal de las enzimas recombinantes.

ZmFH42m posee 130 aminoácidos y no contiene los primeros 70 residuos correspondientes al péptido tránsito predicho para el direccionamiento a mitocondria. El plásmido obtenido llamado pGEXZmFH42 se introdujo en la cepa de expresión *Escherichia coli* BL21(DE3) y se indujo la producción de la proteína recombinante por agregado de IPTG 1 mM. Luego de incubar 3 h a 37°C en presencia del inductor, se observó la acumulación de una especie proteica de la masa molecular esperada (alrededor de 40,4 kDa, fusionada a GST) en la fracción soluble. La naturaleza de ZmFH42 fue confirmada mediante ensayos de *western blot* utilizando anticuerpos comerciales a-GST. Se siguió el mismo procedimiento para la obtención de ZmFH55m, de 132 aminoácidos, sin los 72 residuos de para direccionamiento de la proteína a mitocondrias y se obtuvo el producto esperado fusionado a GST de 40,6 kDa.

Ambas proteínas se purificaron mediante la unión a una resina de Glutación Sepharosa. Luego se escindió GST de las proteínas de interés con tratamiento con la proteasa trombina. La Figura 13A muestra el análisis por SDS-PAGE de la inducción de las isoformas de frataxina de maíz fusionadas a GST, de GST sólo (26 kDa) y sus respectivos controles. La Figura 13B muestra los resultados de la purificación de ZmFH42m (14,4 kDa) y ZmFH55m (14,6 kDa).

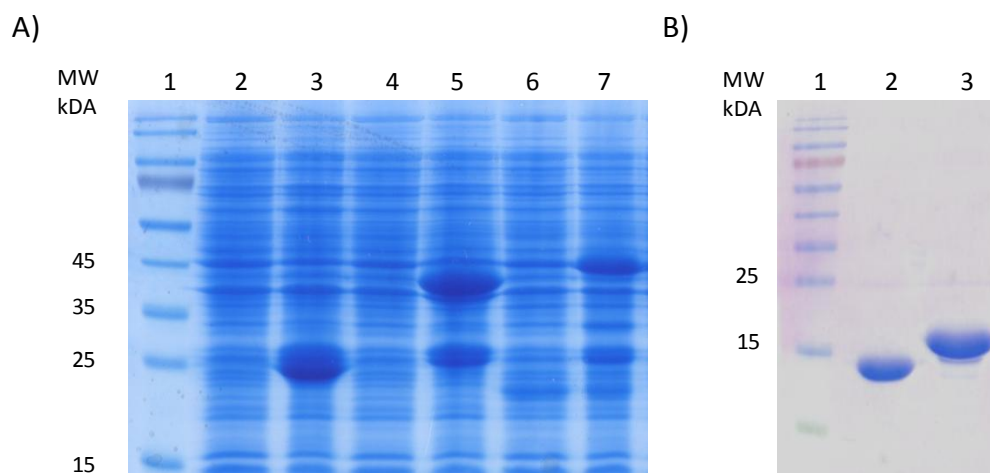


Figura 13. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de las proteínas ZmFH42m y ZmFH55m. **A)** Inducción de la síntesis de las isoformas frataxina de maíz, como proteínas de fusión a GST, en *E. coli* BL21. Calles: 1- marcador de masa molecular, 2- BL21 pGEX4T1 sin inducir, 3- BL21 pGEX4T1 inducida, 4- BL21 pGEXZmFH55 sin inducir, 5- BL21 pGEXZmFH55 inducida, 6- BL21 pGEXZmFH42 sin inducir, 7- BL21 pGEXZmFH42 inducida. **B)** Proteínas purificadas, sin GST. Calles 1- marcador de masa molecular, 2- ZmFH55m, 3- ZmFH42m.

2. Estudio de la actividad *in vitro* de ZmFH42 y ZmFh55. Ensayo de atenuación de la reacción de Fenton

Previamente, se informó que frataxina podría actuar como una proteína chaperona de hierro (90, 91), y de esta forma, su presencia podría atenuar el daño oxidativo por metales. Así, se llevó a cabo el ensayo de atenuación de la reacción de Fenton utilizando las proteínas ZmFH42 y ZmFH55, midiendo la inhibición de la producción de malondialdehído luego de la adición de ácido tiobarbitúrico como se describió previamente (Park et al., 2002).

Una mezcla de sulfato de amonio ferroso 15 μM y de 2-desoxiribosa 5mM fue incubada 30 min. a 25°C en Hepes-KOH 10 mM, pH 7, con las proteínas recombinantes y en ausencia de estas. Luego, se agregaron 100 μl de ácido fosfórico 4% (V/V) y ácido tiobarbitúrico 1% (P/V). Las muestras se incubaron por 10 min. a 100°C y 3 min. en hielo. Finalmente, se agregó 150 μl de SDS 10% (P/V) y se midió absorbancia a 532nm ($\epsilon=1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La concentración de proteína que se utilizó en este experimento estaba en exceso respecto al Fe y H_2O_2 (en ambos casos relación 2:1).

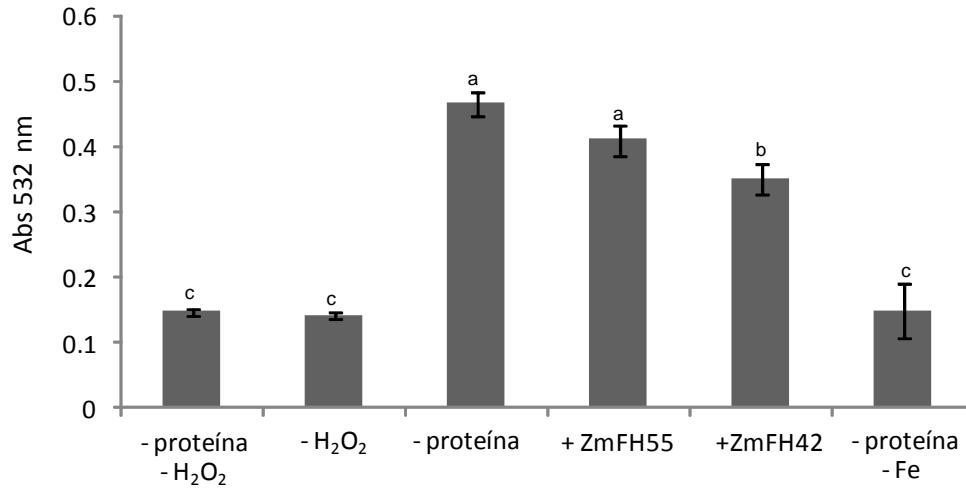


Figura 14. Ensayo de degradación oxidativa de la 2-desoxiribosa en presencia de ZmFH42m y ZmFH55m, con los respectivos controles. En ambos casos se observa una disminución del daño oxidativo mediado por Fe y H₂O₂.

La Figura 14 muestra que el agregado de ZmFH42m a la reacción disminuye la oxidación del azúcar producida por H₂O₂ en presencia de hierro ($p < 0,05$). ZmFH55m parece presentar el mismo efecto, pero la disminución no es estadísticamente significativa. Este resultado indica que al menos ZmFH42m es una proteína funcional, con capacidad protectora frente al daño oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno y metales, e involucrada en el mantenimiento del estado redox celular.

3. Determinación de la actividad ferroxidasa de ZmFH42m, ZmFh55m y AtFHm.

Con el objetivo de reforzar la evidencia de la posible actividad de frataxina en la homeostasis de hierro, se realizó un ensayo de actividad ferroxidasa de las proteínas recombinantes AtFHm, ZmFH42m y ZmFH55m. Para ello, se determinó la oxidación de una solución de Fe(II), mediante la formación de un complejo coloreado con el reactivo ferrozina (Sigma), cuyo máximo de absorción es de 562 nm.

En la Figura 15 podemos observar que las tres proteínas frataxina de plantas en estudio tienen actividad ferroxidasa. Los resultados muestran que en los tres casos se

observó una disminución de alrededor de 17% del Fe(II) en solución respecto al control.

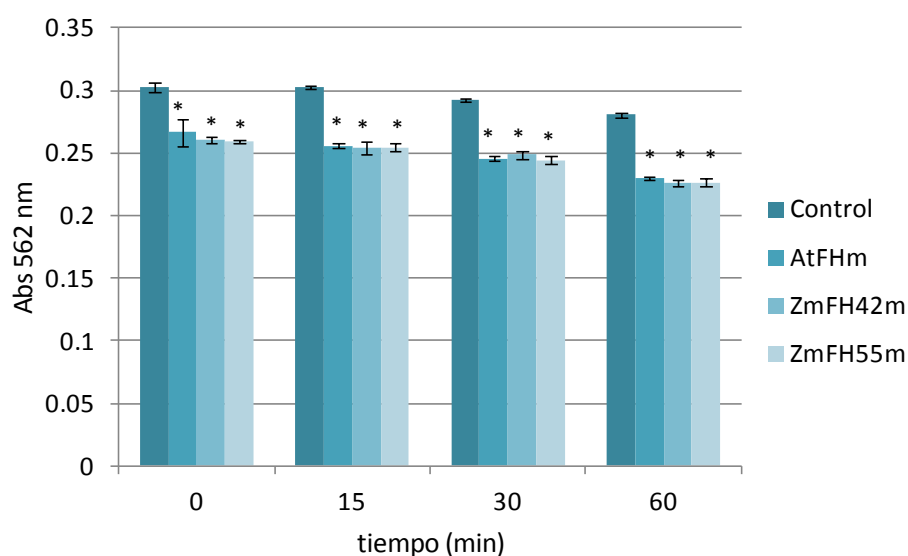


Figura 15. Actividad ferro-oxidasa de AtFHm, ZmFH42m y ZmFH55m, a distintos tiempos. Se midió absorbancia a 562 nm para detectar la formación del complejo Ferrozina-Fe(II). Cada medida se realizó por triplicado. Se observa actividad para las tres proteínas ensayadas.

4. Expresión y purificación de formas completas e intermedias de ZmFH42, ZmFH55 y AtFH en *E. coli*. Estudios por espectrometría de masas ESI-TOF-MS.

Para avanzar en la caracterización bioquímica de las FH de plantas, decidimos estudiar las proteínas completas de AtFH, ZmFH55 y ZmFH42, incluyendo sus extremos N-terminales que poseen la señal para la localización mitocondrial. Los homólogos eucariotas de FH son sintetizados en el citosol como precursores de mayor tamaño, y luego son escindidos al ingresar a mitocondrias para dar las proteínas en su forma maduras (32, 92). Sin embargo, muchos grupos de investigación también encontraron que frataxina puede sufrir un clivaje adicional en el extremo N-terminal (56, 93), e incluso algunos autores proponen una auto proteólisis de FH como un mecanismo mediante el cual se podría “activar” la función de la proteína. En el caso de la FH humana esta proteólisis estaría mediada por hierro (94)

Por otro lado, la acumulación de hierro en células que carecen de FH, ha determinado el rol de esta proteína como chaperona de hierro. Diversos trabajos publicados proponen que FH probablemente podría autoensamblarse y/o unirse a otras proteínas mitocondriales, formando grandes complejos proteicos. De esta forma, podría unir Fe, almacenándolo y formando el mineral ferrihidrita de modo similar al mecanismo observado para la proteína ferritina (95). Así, se propone que el extremo N-terminal posee un rol importante en la oligomerización, plegamiento y estabilidad de la FH (63).

Frente a este contexto, decidimos estudiar las secuencias completas de las frataxinas de plantas, con el fin de determinar si presentan algún tipo de procesamiento y/o oligomerización, similar a lo observado en sus homologas eucariotas.

Se clonaron en el plásmido pGEX4T1, las distintas versiones de las secuencias correspondientes a AtFH, ZmFH42 y ZmFH55 indicadas en la Figura 16, como fusión a la proteína GST. Además de las formas maduras de las proteínas (sin el péptido tránsito predicho de localización mitocondrial), se obtuvieron las construcciones de las secuencias completas (sc), incluyendo el extremo N- terminal entero, y versiones intermedias (sm) de las isoformas FH de maíz. Estas últimas corresponden a construcciones sin los aminoácidos en el extremo N- terminal, similares al del péptido tránsito predicho para AtFH, el cual es de menor tamaño que los correspondientes a las isoformas de maíz.

Con estos constructos se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3), se indujo la producción de las proteínas recombinantes con IPTG y éstas se purificaron mediante el protocolo descrito en Materiales y métodos.

La Figura 17 muestra el análisis por SDS-PAGE de las proteínas purificadas AtFH, ZmFH42 y ZmFH55 en sus diferentes versiones. Cabe destacar que ZmFH42sc no se pudo purificar en la fracción soluble. Se puede observar que las bandas proteicas obtenidas en algunos casos no se corresponden al tamaño esperado (Figura 16B). Por este motivo, estos constructos fueron analizados para determinar su masa molecular mediante espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-TOF-MS). En la

Figura 18 podemos encontrar los resultados obtenidos, que coinciden con los observados en los geles de poliacrilamida.

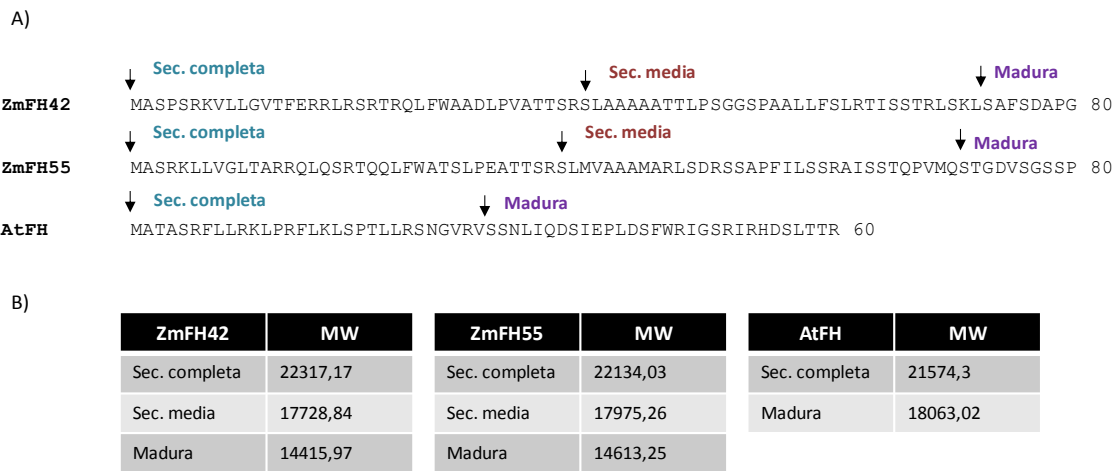


Figura 16. A) Esquema de los extremos N- terminales de los constructos de AtFH, ZmFH42 y ZmFH55. Las flechas indican el primer residuo aminoacídico para cada una de las proteínas recombinantes. En cada caso, la versión madura corresponde a la secuencia sin el péptido tránsito predicho de localización mitocondrial. La versión media de las isoformas de maíz surge del alineamiento con el péptido tránsito de AtFH, de menor tamaño molecular predicho que las proteínas de maíz. **B)** Tabla que muestra las masas moleculares teóricas (en Da) calculadas para cada una de las proteínas recombinantes

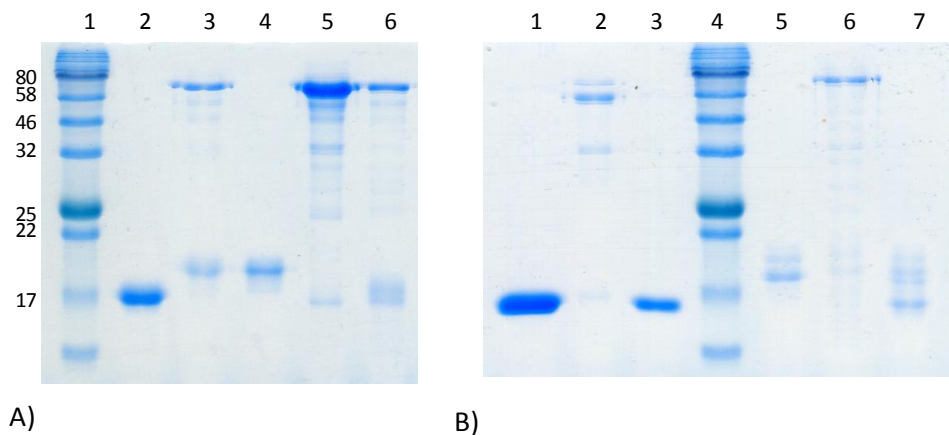
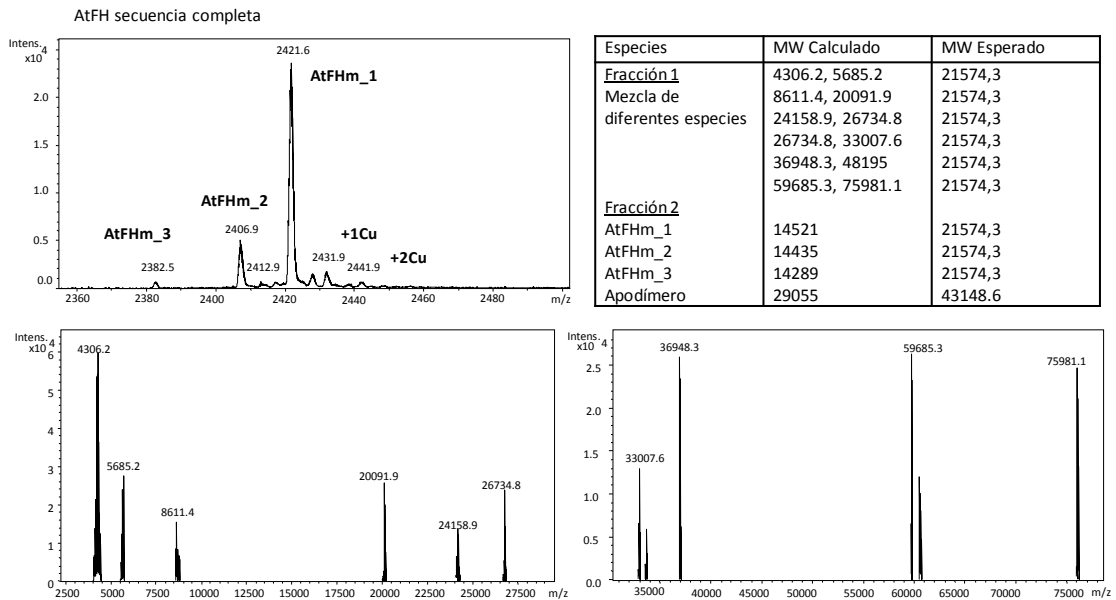
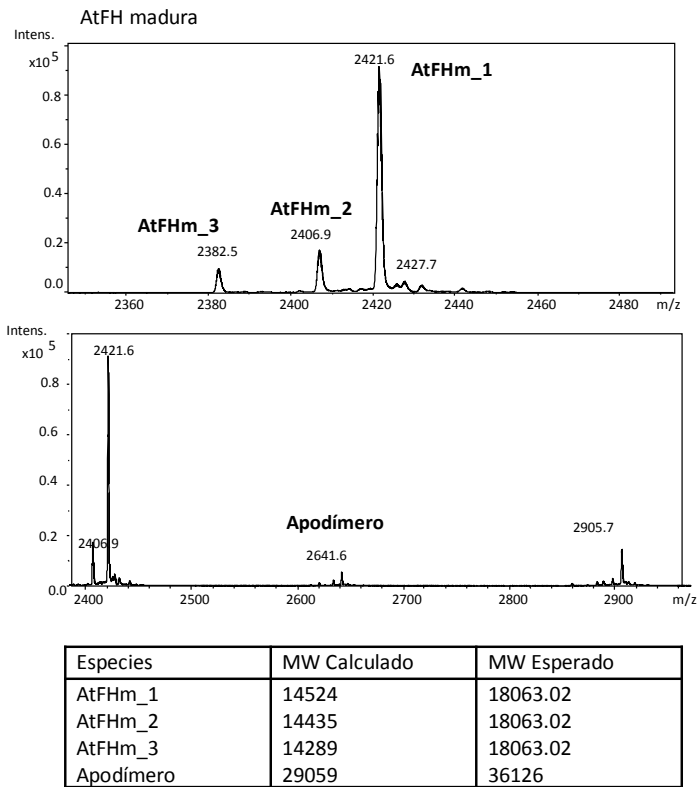
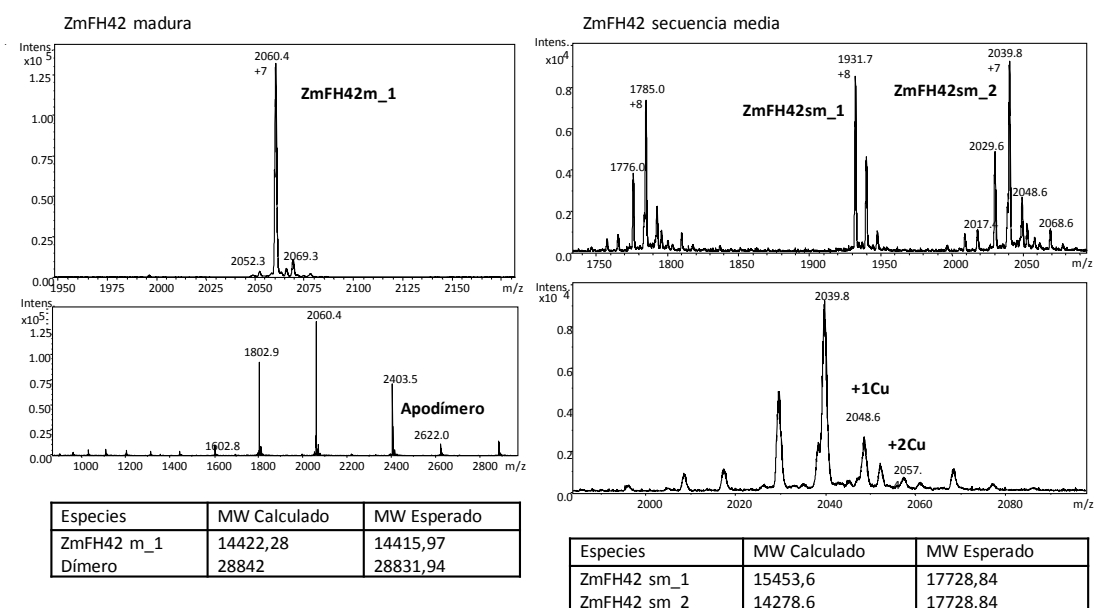


Figura 17. Análisis por SDS-PAGE de las proteínas recombinantes purificadas. A) Calles: 1- marcador de masa molecular (kDa), 2- ZmFH55m, 3-ZmFH55sm fracción 1 de la purificación, 4- ZmFH55sm fracción 2 de la purificación, 5-ZmFH55sc fracción 1 de la purificación, 6-ZmFH55sc fracción 2 de la purificación. B) Calles: 1- AtFHm, 2- AtFHsc fracción 1 de la purificación, 3- AtFHsc fracción 1 de la purificación, 4- Marcador de masa molecular (kDa), 5- ZmFH42m, 6- ZmFH42sm fracción 1 de la purificación, 7-ZmFH42sm fracción 2 de la purificación.

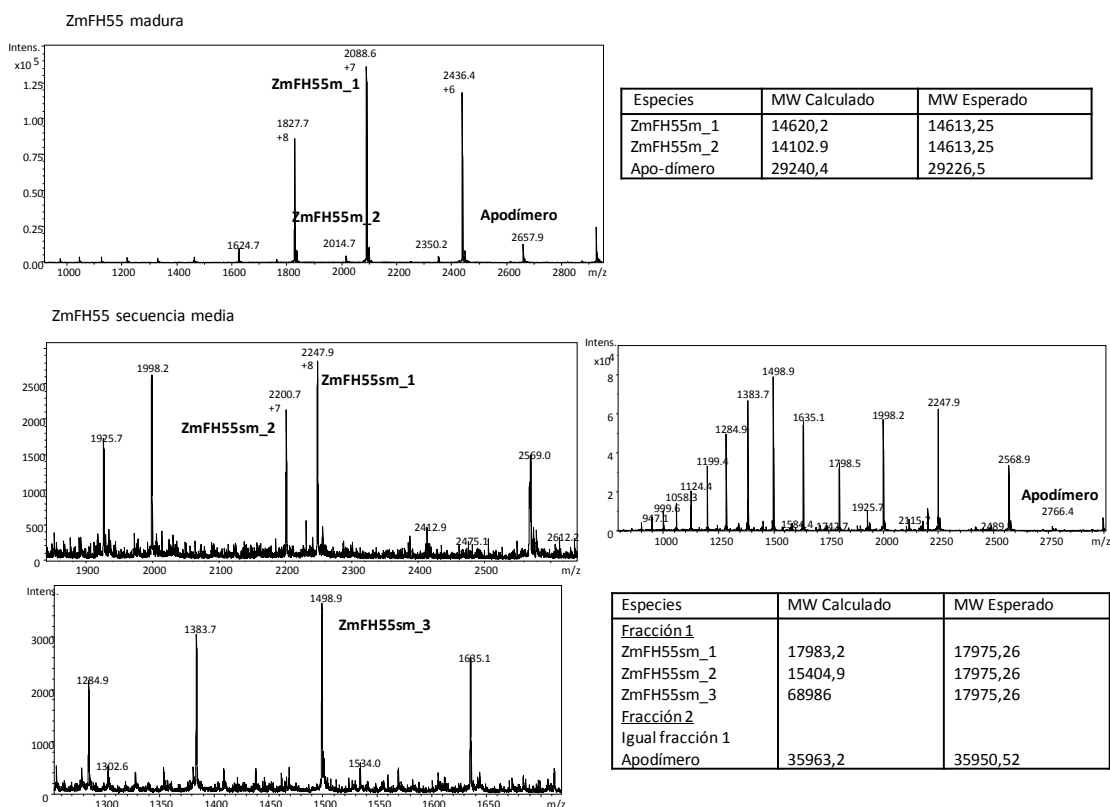
A)



B)



C)



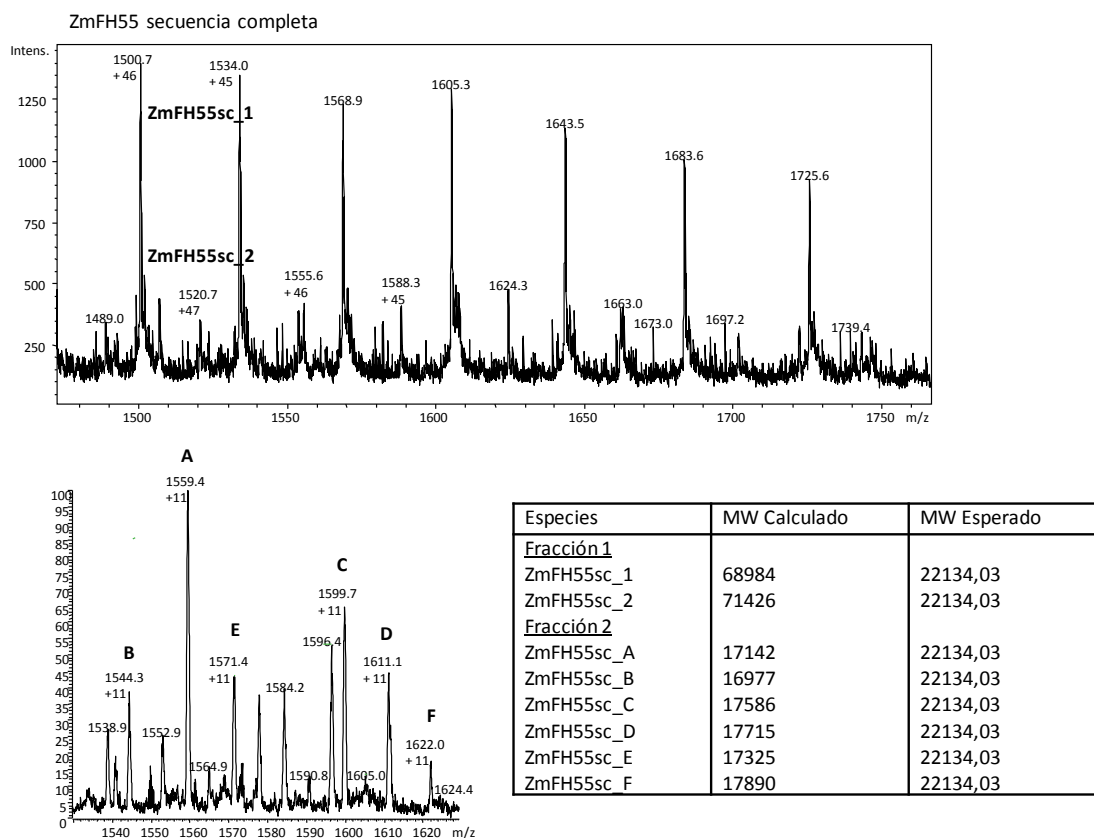


Figura 18. Estados de carga representativos de espectros ESI-MS realizados a pH 7 de las proteínas recombinantes **A)** AtFH y sus distintas versiones **B)** ZmFH42 y sus distintas versiones **C)** ZmFH55 y sus diferentes versiones. En cada caso se detalla en la tabla los valores de masa molecular esperados y calculados para cada una de las especies identificadas por muestra, y por cada fracción recolectada por FPLC.

A partir de los resultados obtenidos por SDS-PAGE y ESI-TOF-MS, podemos indicar lo siguiente:

- ✘ La expresión y purificación *in vitro* de AtFHm permite obtener una proteína mayoritaria de 14,4 kDa, inferior al tamaño esperado de 18,1 kDa. Esto nos indicaría que AtFH podría presentar una auto-proteólisis similar a lo publicado para su homólogo humana.

En el caso AtFHsc, que corresponde a la secuencia codificante completa de frataxina de *Arabidopsis thaliana*, se obtiene un *pool* de especies de diferentes tamaños, que varían desde 4 a 75 kDa reforzando el rol del extremo N- terminal en la polimerización de la proteína, aunque se requerirán mas estudios para caracterizar el proceso.

✖ En el caso de ZmFH42m, se observa un producto mayoritario de tamaño esperado. También se puede identificar el dímero, en menor proporción.

La expresión y purificación de ZmFH42sm arroja dos productos de 14 y 15 kDa, menor al valor teórico 17.8 kDa, evidenciando también un proceso de auto proteólisis. Además, en este caso podemos identificar, en menor proporción, las especies con uno y dos átomos de cobre.

La proteína ZmFH42sc no pudo purificarse en forma soluble, por ende no se obtuvieron resultados de espectrometría de masas.

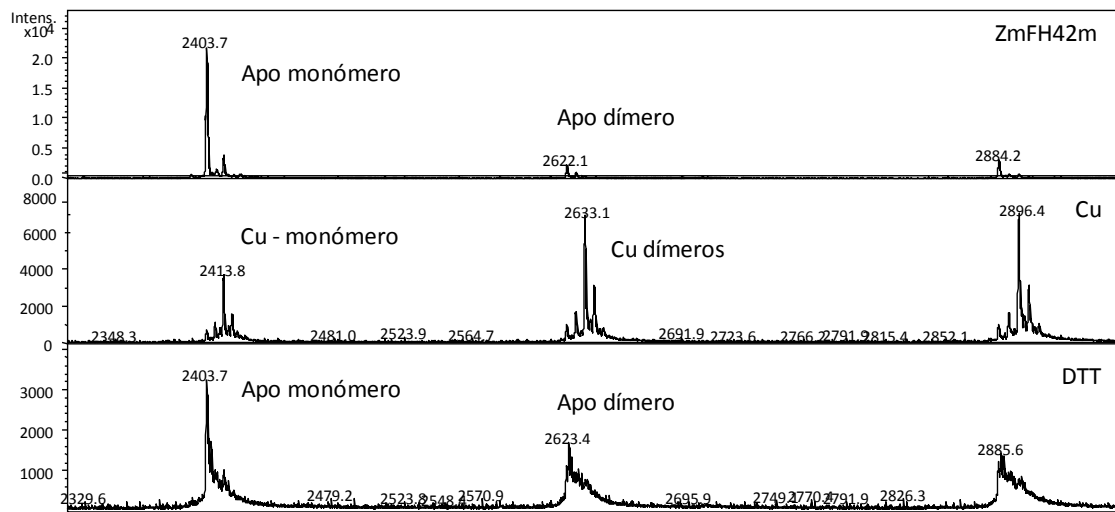
✖ El análisis de ZmFH55m arrojó la presencia de dos productos de aproximadamente 14,6 kDa, que correspondie a la masa molecular esperada. Lo mismo ocurre con ZmFH55sm, a diferencia de lo observado para ZmFH42sm. En este caso también se puede identificar una especie de alto peso molecular, 68,9 kDa, que podría corresponder a la especie tetramérica.

La expresión de ZmFH55sc resultó en una mezcla de especies de alrededor de 17 kDa, y dos de 68,9 y 71,4 kDa correspondientes a un posible tetrámero.

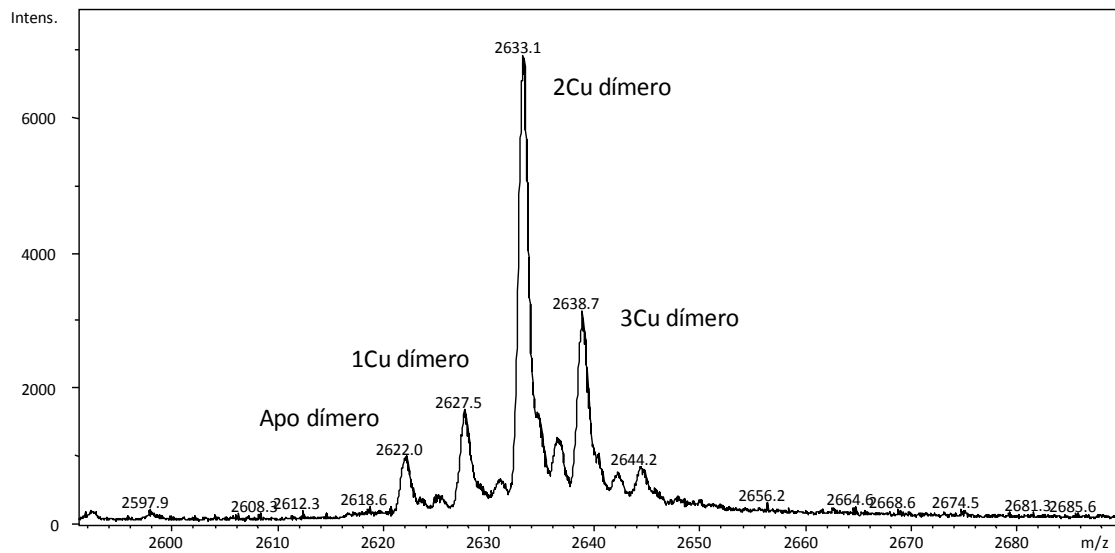
5. Ensayos de unión y dimerización de AtFHm, ZmFH42m y ZmFH55m con cobre.

Al analizar los espectros de ESI-MS se observó que muchas de las especies de frataxina se encontraban unidas a cobre. Entonces decidimos estudiar el efecto *in vitro* del cobre sobre esta proteína. Para realizar esto, se incubaron las proteínas recombinantes maduras (20 μ M) con una solución de sulfato de cobre (40 μ M), y en otro tubo además se agregó el agente reductor DTT en exceso (1,4 mM). Estas soluciones se analizaron mediante espectrometría de masas y se corroboró mediante electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturizantes (Figuras 19 y 20).

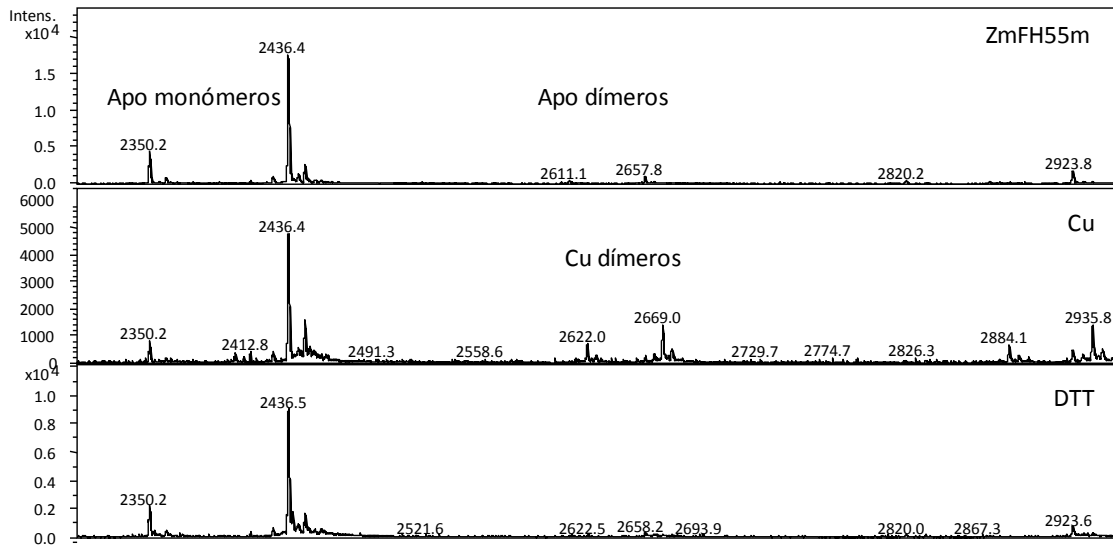
A)



B)



C)



D)

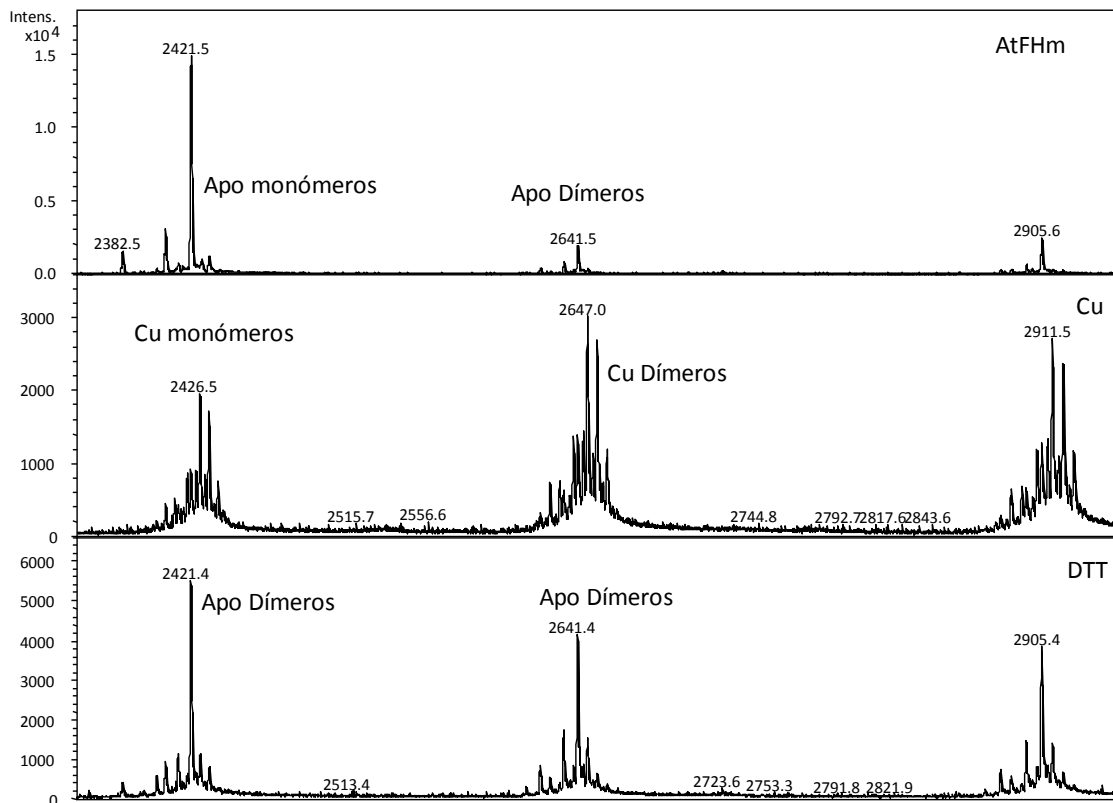


Figura 19. Espectros de ESI-MS realizados en presencia de las proteínas recombinantes solas, tratadas con Cu^{2+} o tratadas con Cu^{2+} y DTT. **A)** ZmFH42m **B)** ampliación del espectro de las especies diméricas formadas con cobre en el caso de ZmFH42m **C)** ZmFH55m **D)** AtFHm.

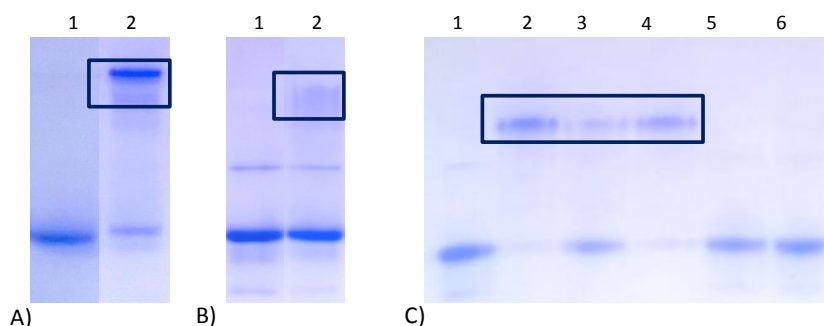


Figura 20. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes de ZmFH42m, ZmFH55m y AtFH. A) Calles: 1- ZmFH42m, 2-ZmFH42m + Cu^{2+} . B) Calles: 1- ZmFH55m, 2-ZmFH55m + Cu^{2+} . C) Calles: 1- AtFHm, 2-AtFHm + Cu^{2+} , 3- AtFHm + Cu^{2+} + DTT, 4- AtFHm + Cu^{2+} + DAHK (quelante de Cu), 5- AtFHm + Fe^{2+} , 6- AtFHm + Fe^{3+} . En los tres casos se puede observar la formación de dímeros luego del agregado de Cu, sin embargo este efecto es mucho menor en el caso de ZmFH55m. Además en la Figura C) podemos observar la disminución de dimerización con agregado de DTT, y la adición de un quelante de Cu^{2+} , DAHK, no disminuye la cantidad del dímero. El agregado de Fe en este caso, al igual que con las isoformas FH de maíz (no mostrado), no pareció afectar la capacidad de polimerización

Los resultados para la proteína ZmFH42m indicaron que la adición de Cu^{2+} favoreció la aparición de monómeros unidos a Cu, y notablemente, la formación de dímeros, siendo la especie mayoritaria la que posee dos átomos de cobre según puede observarse en la Figura 19A y 19B. En cambio, el agregado del agente reductor DTT a la mezcla anterior provocó la disminución de la cantidad de dímero, probablemente debido a la reducción del puente disulfuro entre la única cisteína de ambos monómeros, involucrada en su formación. Además, luego el agregado de DTT, las especies que fueron encontradas correspondieron al monómero y dímero sin metal.

Por el contrario, luego de la adición de cobre, ZmFH55m presentó una notable disminución en la formación de dímeros y especies unidas a Cu, respecto a la otra isoforma frataxina de maíz (Figura 19C). Esta marcada diferencia fue corroborada mediante electroforesis en condiciones nativas (Figura 20A y B).

Finalmente, AtFHm exhibió un comportamiento similar a ZmFH42m frente a la adición de Cu^{2+} y DTT (Figura 19D). En este caso el agregado de metal causó la formación de dímeros de las tres especies detectadas por masas mencionadas anteriormente, así como también, de monómeros con 1, 2 y tres átomos de cobre.

Finalmente decidimos ver por espectrometría de masas si era factible la formación de heterodímeros entre ambas isoformas frataxinas de maíz, luego de la adición de cobre. En el espectro de la Figura 21 podemos observar la presencia de picos que no estaban presentes cuando se analizaron ambas proteínas por separado. Teniendo en cuenta la masa molecular, podemos sugerir que corresponden a heterodímeros ZmFH42m-ZmFH55m.

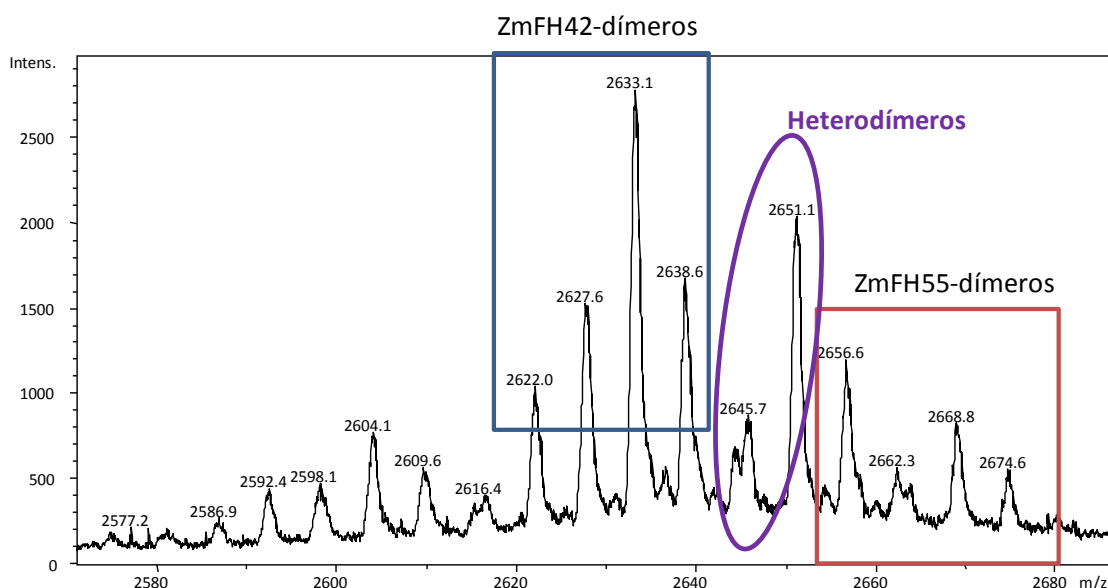


Figura 21. Espectros de ESI-MS (carga +11) realizados con ambas isoformas de maíz en la misma solución tratadas con Cu^{2+} . Asignación de picos de ZmFh42-dímeros: Apo (2622,0) 1Cu (2627,6), 2Cu (2633,1), 3Cu (2638,6). ZmFH55-dímeros: Apo (2656,6), 1Cu (2662,3), 2Cu (2668,8), 3Cu (2674,6). Heterodímeros: 1Cu (2645,7), 2 Cu (2651,1).

Para caracterizar el fenómeno observado de dimerización de las frataxinas con cobre, se llevaron a cabo ensayos de titulación de soluciones de proteínas con cobre, siguiendo el cambio mediante la determinación de la intensidad de fluorescencia a 350 nm, excitando a 280 nm. El resultado que muestra la Figura 22 indica la extinción de la fluorescencia como consecuencia de la unión de Cu^{2+} , ligando no fluorescente. Luego del agregado de un quelante de este ión metálico en exceso, DAHK (péptido Asp-Ala-His-Lys), se puede observar cómo se recupera la fluorescencia (Figura XC). Sin

embargo, ésta recuperación no se observa hasta el valor inicial debido probablemente a una cuestión de tiempo de reacción y a que parte del cobre agregado se ha reducido a Cu^{1+} durante la formación del dímero.

Proponemos que el fenómeno de dimerización que presentan las frataxinas de plantas cuando son tratadas con Cu^{2+} ocurre mediante un proceso de oxidación de la única cisteína presente en cada proteína y una reducción del cobre. Para evidenciar la formación de Cu^{1+} se realizó un experimento en el cual se determinó la formación de este ión luego del agregado del quelante BTA (ácido batocuproindisulfónico), que forma el complejo $\text{BTA}_2\text{-Cu}^+$, cuyo máximo de absorción se encuentra a 480 nm. En la Figura 23 podemos observar una reducción significativa de cobre en el caso de ZmFH42m, mientras que no ocurre lo mismo con ZmFH55m. Esta capacidad menor de dimerizar de ZmFH55m de está de acuerdo con lo observado en los espectros de ESI-MS.

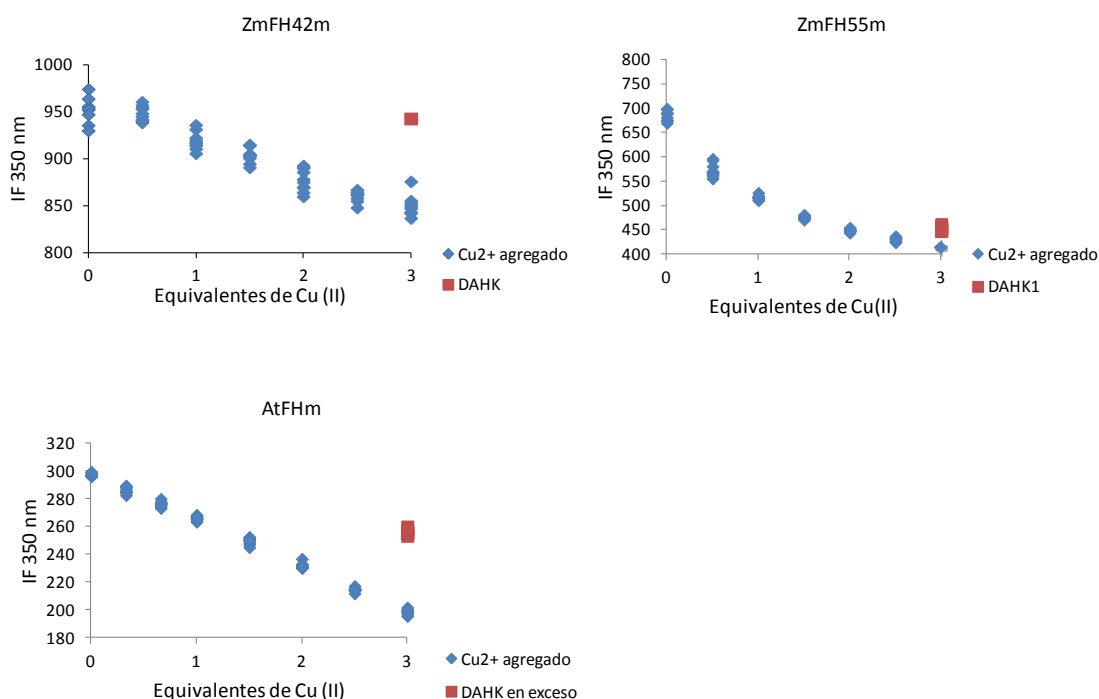


Figura 22. Titulación Espectrofluorométrica de AtFHm, ZmFH42m y ZmFH55m con Cu(II). Se determinó la disminución de la intensidad de fluorescencia a 350 nm con el agregado de Cu(II).

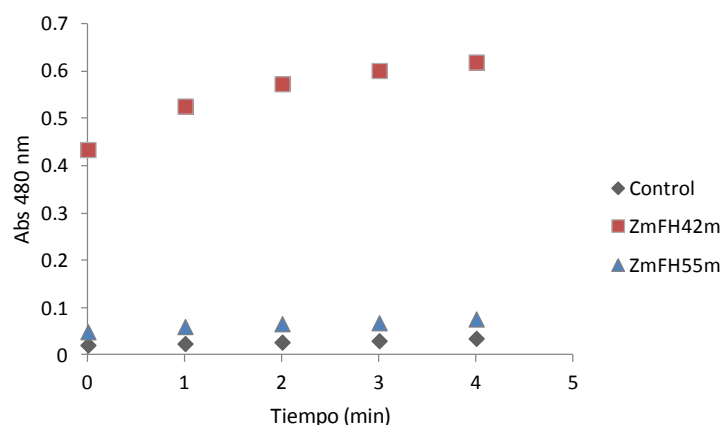


Figura 23. Determinación de Cu (I) en muestra con las isoformas maduras de frataxinas de maíz, luego de la oxidación de la proteína con el agregado de Cu(II) empleando el reactivo BTA (quelante de Cu (I)) con un máximo de absorción a 480 nm.

6. *Discusión Capítulo 2*

El hierro es un elemento esencial para las células, a pesar de su toxicidad. En presencia de oxígeno y a pH fisiológico, el Fe^{2+} es rápidamente oxidado a Fe^{3+} , el cual rápidamente produce $\text{Fe}(\text{OH})_3$ insoluble. Además la oxidación de Fe con O_2 produce el anión superóxido (O_2^-), que puede formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La reacción de este último con Fe^{2+} produce radicales hidroxilos (OH^\bullet), mediante la reacción de Fenton, que son altamente reactivos y tóxicos (96). Entonces, una de las cuestiones importantes que debe resolver la mitocondria es la de mantener el hierro en forma soluble y no tóxica, y biodisponible para las proteínas y vías metabólicas que lo requieran. Frataxina y sus homólogos han sido implicados en la homeostasis del Fe celular. Se ha demostrado la actividad ferroxidasa de frataxina de levaduras, mientras que frataxinas de varias especies han demostrado su capacidad de atenuar los daños de la reacción de Fenton (90, 91). En este trabajo se estudiaron estas características de las isoformas frataxina de maíz determinando que ambas isoformas poseen capacidad de oxidar el hierro y mantenerlo biodisponible en solución.

Frataxina y sus homólogos de especies eucariotas presentan variantes en la formación y el tipo de oligómeros que forman. Por ejemplo, en presencia de hierro ferroso la frataxina de levaduras (YFH) forma complejos que pueden alcanzar hasta 48 subunidades. En este caso sería el trímero la unidad a partir de la que se forman las especies de mayor tamaño (61). Sin embargo la capacidad de mantenerse funcional *in vivo* de una variante de YFH deficiente en la capacidad de oligomerización sugiere que el almacenamiento de hierro dependiente de este proceso no sería la función principal de esta proteína (97). En otro modelo, cuando se le agrega Fe^{2+} en condiciones anaeróbicas a CyaY (homólogo de frataxina de *E.coli*), se estimula la formación de tetrámeros, mientras que forma oligómeros de mayor tamaño en presencia de oxígeno(98, 99).

En el caso de frataxina humana (hFXN), se ha encontrado al menos unas 4 variantes de diferentes longitudes en sus extremos N-terminales. Alguna de estas variantes forman grandes multímeros (>600 kDa), sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en levaduras, los monómeros purificados de hFXN no forman oligómeros cuando se les adiciona de hierro (100), esto podría indicar que requiere de asistencia adicional para lograrlo. Además, se ha demostrado que la secuencia N- terminal de hFXN (residuos 58-76), si bien no está conservada durante la evolución, sería un elemento crítico en el ensamblaje de multímeros de alto peso molecular , y podría actuar como señal de reconocimiento y activación que desencadene la formación de oligómeros (63). También, diversos autores, mediante estudios *in vitro*, describieron la existencia de clivajes del extremo N- terminal de hFXN no esperados (18, 56, 77) Yoon y colaboradores proponen la autoproteólisis de frataxina dependiente de hierro como un mecanismo post traduccional mediante el cual se podría activar o adquirir nuevas funciones (94).

En este capítulo demostramos que AtFH y ZmFH42 poseerían ambas la capacidad de autoproteolizarse, ya que se identificó mediante espectrometría de masas productos proteicos de una masa molecular menor que la esperada. La purificación de ZmFH55sm arrojó la proteína de masa molecular esperada diferenciándose de la otra isoforma de maíz, sin embargo ZmFH55sc presentó autoclivaje.

Por otra parte, se caracterizaron productos de mayor masa molecular a la calculada cuando se clonaron las proteínas incluyendo la región N- terminal. Fueron identificados como tetrámeros para ZmFH55sm/sc y muchos productos diferentes para AtFHsc. Esto apoya lo manifestado anteriormente de que extremo amino terminal de la proteína es importante para la formación de oligómeros.

A partir de los resultados exhibidos, podemos afirmar que las frataxinas de maíz y *Arabidopsis thaliana* tienen la capacidad de oxidarse en presencia de Cu^{2+} , formando homodímeros. Además, se observó la formación de heterodímeros cuando ambas frataxinas de maíz se enfrentaron juntas a cobre.

Analizando los distintos casos presentes en la bibliografía que antes mencionamos, sumados a la falta de conservación de la secuencia de aminoácidos y longitud del extremo N- terminal de la familia de proteínas frataxina, podemos llegar a la conclusión que las propiedades de oligomerización de las frataxinas son distintas en cada especie, y que están afectadas por diferentes factores y condiciones del medio. Sin embargo, las proteínas de maíz (monocotiledónea) y *Arabidopsis* (dicotiledónea) presentaron el mismo comportamiento de dimerización con cobre, pese a estar alejadas evolutivamente, sugiriendo que esta sea una característica exclusiva de plantas, cuya función aún queda por dilucidar.

Capítulo III:

Estudios sobre la regulación de frataxina y su posible interacción con otras proteínas.

Capítulo III. Estudios sobre la regulación de frataxina y su posible interacción con otras proteínas.

1. Estudios de la región promotora de *AtFH* y su efecto en la regulación la expresión.

Análisis previos en nuestro laboratorio se centraron en determinar el patrón de expresión de *AtFH* y definir su región regulatoria. Además, considerando que la presencia de algunos intrones pueden modificar los niveles de expresión de ciertos genes en plantas (101), se estudió también el efecto del primer intrón de *AtFH* sobre su expresión.

La secuencia codificante para *AtFH* está localizada en el cromosoma 4 del genoma nuclear de *Arabidopsis thaliana*. Este gen está compuesto por 5 exones y 4 intrones flanqueados por las correspondientes regiones 5' y 3' no traducibles (UTR). Estudios *in silico* realizados en nuestro laboratorio, definieron la región regulatoria de *AtFH* desde el nucleótido ubicado 794 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de *AtFH* (-794 pb) hasta el nucleótido ubicado 349 pb corriente abajo del mismo (+349) (Figura 24A). Es importante destacar que esta región regulatoria abarca secuencias correspondientes al gen antepuesto a *AtFH*, regiones intergénicas, regiones no codificantes (5' UTR), el primer exón, el primer intrón y 28 pb del segundo exón de *AtFH*.

Previamente, los fragmentos conteniendo las diferentes regiones del promotor de *AtFH* (detalladas en la Figura 24B) se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico y se fusionaron al gen reportero *GUS*, utilizando el vector binario pBI101.3. Las construcciones obtenidas se utilizaron para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* Col 0. Las semillas transgénicas se seleccionaron con el antibiótico adecuado, obteniéndose entre 3 y 6 líneas independientes para cada construcción.

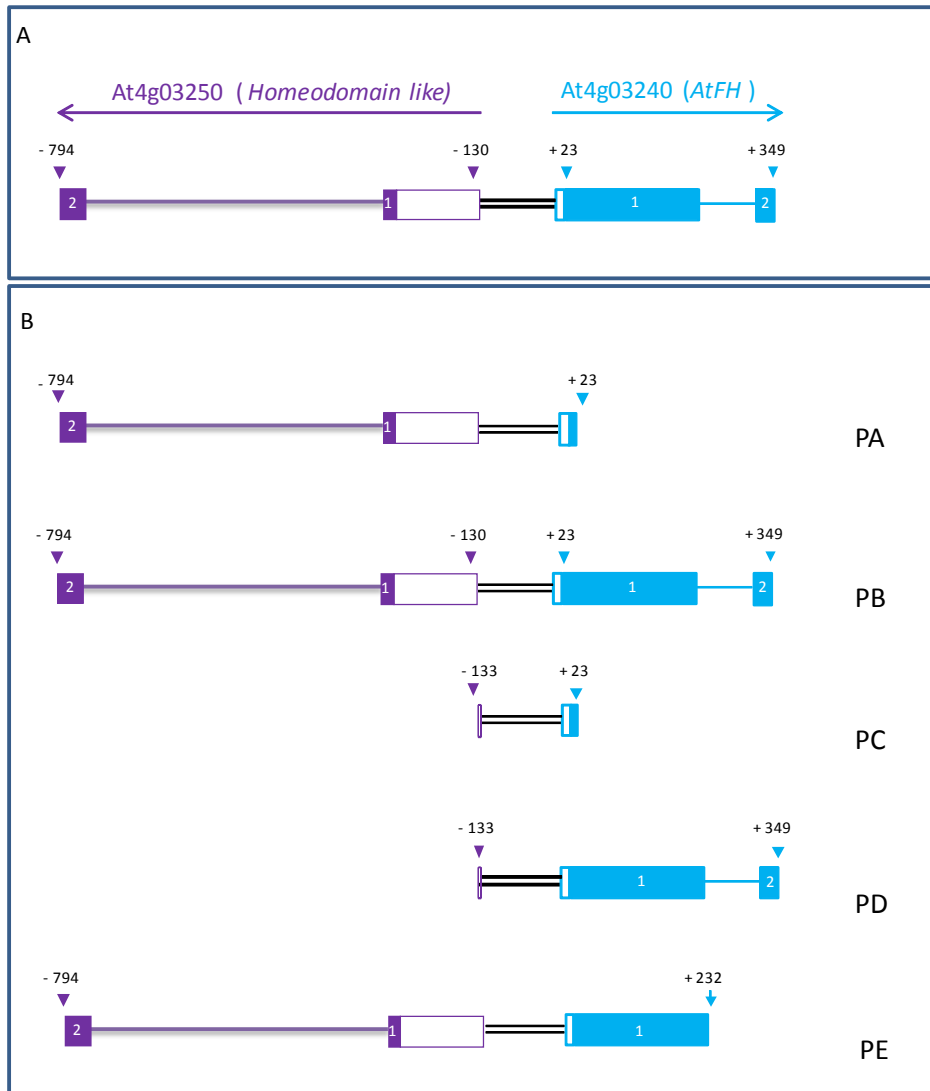


Figura 24. Esquema de la posible región promotora del gen *AtFH* utilizada para los análisis de expresión. **A)** identificación de las distintas regiones que componen la región promotora. Las flechas verticales indican la posición de las bases con respecto al sitio de inicio de la transcripción de *AtFH* (+1). **B)** Esquema de posibles regiones regulatorias del gen *AtFH*: PA (-794 a +23); PB (-794 a +349); PC (-133 a +23), PD (-133 a +349) y PE (-794 a +232).

Previamente en nuestro laboratorio se realizaron análisis histoquímicos de la expresión de GUS en plantas transformadas con las construcciones PA, PB, PC y PD. A partir de los resultados obtenidos se sugirió que las señales capaces de incrementar los niveles de expresión de GUS se ubicarían dentro de las secuencias correspondientes al primer exón, primer intrón y parte del segundo exón. Así, decidimos analizar el patrón de expresión de la construcción PE, indicada en la Figura 24B.

Los resultados arrojaron un incremento en la actividad β -glucuronidasa en todos los órganos y tejidos analizados cuando se trabajó con la región promotora completa, en presencia del primer exón y el primer intrón (construcción PB). Los cotiledones se presentaron una coloración GUS más intensa en los haces vasculares que en las láminas foliares (Figura 25-AII). Además, se pudo detectar una elevada actividad β -glucuronidasa en el primordio de las hojas verdaderas (Figura 25-AIII) y en el meristema apical de la raíz (Figura 25-AV). Cuando se analizaron flores de 30 días se observó la presencia de actividad GUS en prácticamente todas las piezas florales: gineceo, estambre, granos de polen y haces vasculares de sépalos y pétalos (Figura 25-2B). Durante las primeras etapas de desarrollo de fruto se observó una intensa coloración en todos los tejidos analizados: estilo, valvas, replum, septum, funículo, semillas y ginoforo (Figura 25-2C), mientras que a medida que las semillas maduran, la actividad β -glucuronidasa disminuye.

Por otra parte, como muestra la misma figura, las plantas transgénicas portadoras de la región promotora del gen *AtFH* sin el intrón (construcción PE) prácticamente no presentaron actividad β -glucuronidasa detectable por medio de la tinción histoquímica en todos los tejidos analizados, sólo se observó tinción en la raíz (Figura 25-BV), el cual mostró una tenue coloración azul. Este resultado indicaría que el primer intrón del gen de *AtFH* tiene un papel fundamental en la regulación de la expresión del gen.

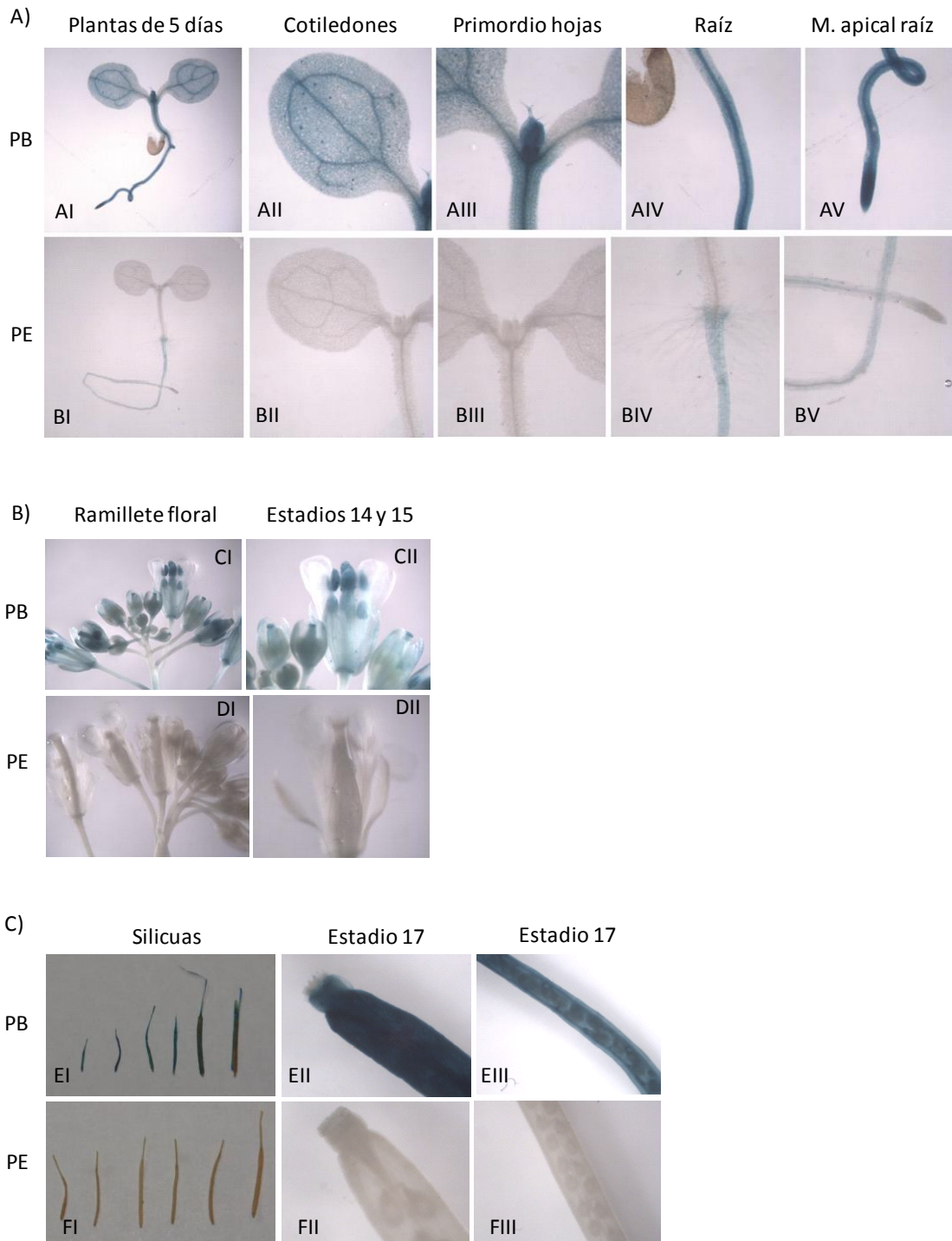


Figura 25. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con las posibles regiones promotoras de *AtFH* fusionadas al gen reportero *GUS*. *Paneles horizontales:* PB, plantas transformadas con la construcción PB (-794 a +349). PE, plantas transformadas con la construcción PE (-794 a +232). **A)** (I) planta entera de 5 días, aumento 1X. (II) cotiledón, aumento 3X. (III) Primordios de las hojas verdaderas, aumento 4X. (IV) Raíz, aumento 4X. **B)** (I) ramillete floral, (estadios 8 a 15) aumento 1X. (II) Flor madura, (estadios 14-15), aumento 3X. **C)** (I) Estadios 16 a 19 de desarrollo de las silicuas. (II) y (III) silicua estadio 17.

2. Análisis de elementos regulatorios en las regiones promotoras de *AtFH* y *AtNfs1*.

Es de esperar que genes cuyos productos proteicos participan en una misma vía metabólica presenten elementos regulatorios comunes. El hecho de que *AtFH* y *AtNfs1* (cisteína desulfurasa de *Arabidopsis thaliana*) presenten un patrón de expresión similar en varios tejidos y órganos (resultados previos no mostrados), nos permite postular la existencia de una regulación conjunta. Así, se analizaron las regiones promotoras de dichos genes con herramientas bioinformáticas; como la base de datos PLACE (102), que permitieron encontrar elementos regulatorios de plantas. Este análisis, entre otros resultados, mostró la presencia de dos elementos involucrados con la expresión de genes durante el desarrollo de semillas, como son los motivos ABRE y RY (103). Esto resultó de particular interés, debido a que hasta el momento no existe mucha información que indique la importancia de la biogénesis de grupos Fe-S durante este estadio de desarrollo. En la tabla 6 se muestran los motivos ABRE y RY encontrados en ambos promotores (104, 105).

Gen	Nombre	Elemento regulador	Función	Localización
<i>AtFH</i>	ABRE	ACGTG	Expresión semillas	-341, -92
	RY	CATG	Expresión semillas	-637, -102, +28
<i>AtNfs1</i>	ABRE	ACGTG	Expresión semillas	-47
	RY	CATG	Expresión semillas	334, -82, -34

Tabla 6. Tabla con los elementos regulatorios ABRE y RY encontrados en las regiones promotoras de *AtFH* y *AtNfs1*.

Para estudiar si los motivos ABRE y RY están involucrados en la regulación de la expresión de *AtFH* y *AtNfs1* se realizaron mutaciones en las secuencias de estos

elementos de los vectores que contienen las regiones promotoras de ambos genes, fusionadas al gen reportero GUS (Tabla 7).

Se ha propuesto que estos elementos regulatorios presentan una cooperación sinérgica cuando se encuentran cercanos (103, 106). Entonces, para realizar la mutagénesis sitio dirigida se eligieron los elementos regulatorios -102 (RY) y -92 (ABRE) en el gen *AtFH*, y -34 (RY) y -47 (ABRE) en *AtNfs1*, que se ubican próximos entre sí y están cercanos al sitio de inicio de la transcripción.

<i>AtFH</i> (secuencia -209 a -80)	Mutación
5' accggaacatgaggaaatacgtgaaccgggt 3'	--
5' accggaacatgaggaaatcattgaaccgggt 3'	ABRE
5' accggaaggatggaaatacgtgaaccgggt 3'	RY
5' accggaaggatggaaatcattgaaccgggt 3'	ABRE y RY
<i>AtNfs1</i> (secuencia -60 a -28)	Mutación
5' ttcagagacgaccacggtaccacgtcatgaaa 3' 3' aagtctctgctggtgcaatggtggcagtacttt 5'	--
5' ttcagagacgaccacggtaccacgtcatgaaa 3' 3' aagtctctgctggttacatggtggcagtacttt 5'	ABRE
5' ttcagagacgaccacggtaccacgtatccaaa 3' 3' aagtctctgctggtgcaatggtggcagtacttt 5'	RY
5' ttcagagacgaccacggtaccacgtatccaaa 3' 3' aagtctctgctggttacatggtggcagtacttt 5'	ABRE y RY

Tabla 7. Tabla con las secuencias de los promotores de *AtFH* y *AtNfs1* con los elementos regulatorios ABRE y RY mutados en cada caso.

Con las construcciones obtenidas de los promotores de ambos genes y sus correspondientes mutaciones en los elementos RY, ABRE y en los dos motivos, se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana*. Luego de crecer las plantas y recolectar las semillas, éstas se sembraron en placas que contenían el antibiótico kanamicina. Las

plantas transformantes obtenidas fueron sometidas a tinción histoquímica GUS, según lo detallado en Materiales y métodos.

Los resultados obtenidos en plántulas de 5 días y flores (Figura 26) indican que la ausencia de los motivos ABRE y RY seleccionados no provocan cambios en el patrón de expresión del gen *AtFH* en este estadio. Esto se puede deber principalmente a que se trata de motivos regulatorios relacionados a la expresión en semillas.

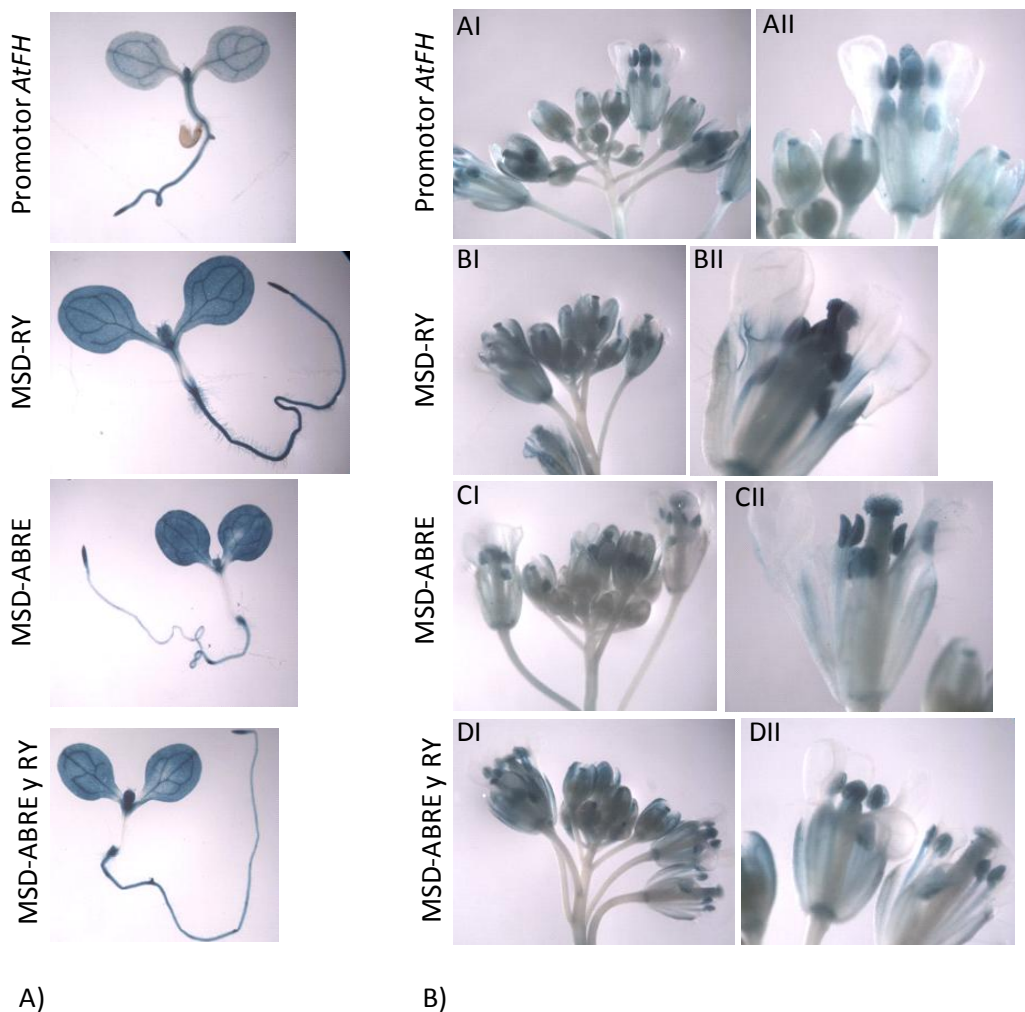


Figura 26. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa en plan de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el promotor de *AtFH* fusionado al gen reportero *GUS*. *Paneles horizontales:* Promotor *AtFH*, plantas transformadas con la construcción de la región promotora completa de *AtFH* (-794 a +349). MSD-RY, plantas transformadas con región promotora con motivo RY mutado. MSD-ABRE, plantas transformadas con promotor con motivo ABRE mutado. MSD-ABRE y RY, plantas transformadas con ambos elementos mutados. **A)** plántulas de 5 días. **B)** (I) ramillete floral, (estadios 8 a 15) aumento 1X. (II) Flor madura, (estadios 14-15), aumento 3X.

En contraste a los resultados anteriores, en la Figura 27 podemos observar una disminución en la actividad β -glucuronidasa en las silicuas de las plantas con los elementos reguladores mutados, respecto a las silicuas que expresan el promotor completo de *AtFH*. Los resultados mostraron una disminución de la tinción GUS en semillas, y notablemente, también en los restantes tejidos derivados del gineceo (estigma, estilo, valvas, septum, replum). Si bien es claramente distinguible la menor tinción GUS en estos tejidos, el efecto podría estar enmascarado por la presencia de otros motivos ABRE y RY en la secuencia del promotor. Cabe destacar que en el caso de las plantas transformadas con el promotor salvaje de *AtNfs1* y las correspondientes plantas con el promotor mutado se obtuvieron los mismos resultados que para el promotor del gen *AtFH* (Figura 28). Estos resultados sugieren que los elementos RY y ABRE estudiados participarían en la regulación de la expresión de los genes *AtFH* y *AtNfs1*.

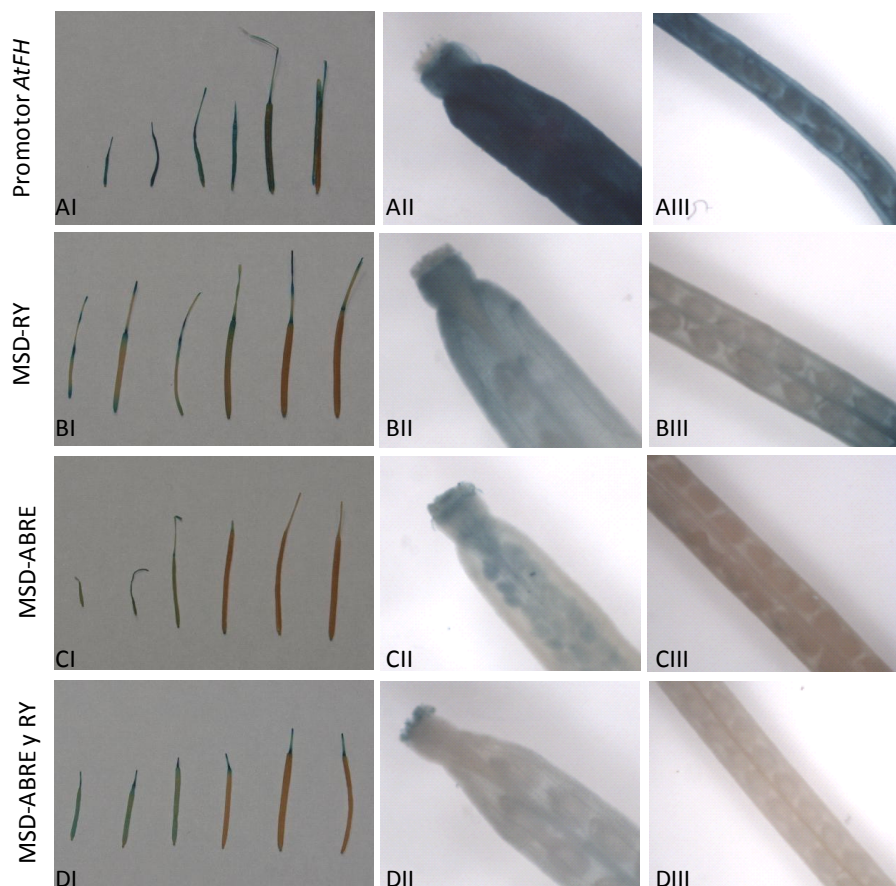


Figura 27. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el promotor de *AtFH* fusionado al gen reportero *GUS*. *Paneles horizontales:* Promotor *AtFH*, plantas transformadas con la construcción de la región

promotora completa de *AtFH* (-794 a +349). MSD-RY, plantas transformadas con región promotora con motivo RY mutado. MSD-ABRE, plantas transformadas con promotor con motivo ABRE mutado. MSD-ABRE y RY, plantas transformadas con ambos elementos mutados. (I) Estadios 16 a 19 de desarrollo de las silicuas. (II) y (III) silicua estadio 17, aumento 3X.

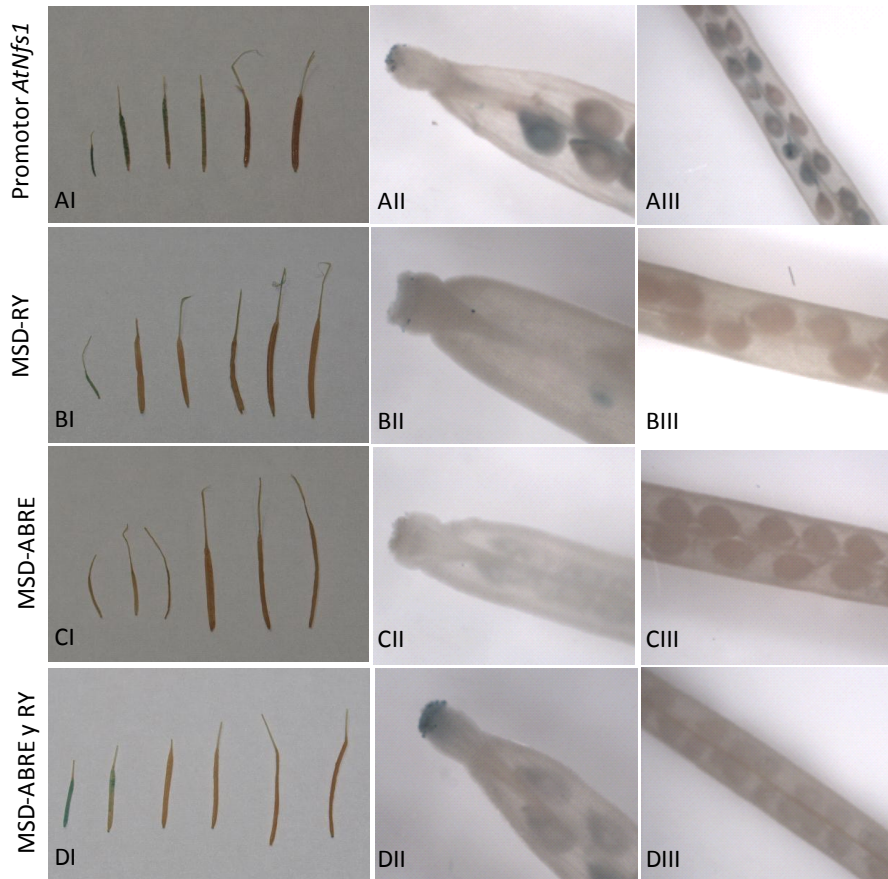


Figura 28. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa en plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el promotor de *AtNfs1* fusionado al gen reportero *GUS*. *Paneles horizontales:* Promotor *AtNfs1*, plantas transformadas con la construcción de la región promotora completa de *AtNfs1* (que se extiende desde el sitio -818 al +117). MSD-RY, plantas transformadas con región promotora con motivo RY mutado. MSD-ABRE, plantas transformadas con promotor con motivo ABRE mutado. MSD-ABRE y RY, plantas transformadas con ambos elementos mutados. (I) Estadios 16 a 19 de desarrollo de las silicuas. (II) y (III) silicua estadio 17, aumento 3X.

3. Análisis *in vitro* de la funcionalidad de los motivos regulatorios RY. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) utilizando el factor de transcripción FUSCA3.

Debido a que *AtFH* y *AtNfs1* se expresan durante el desarrollo de la semilla y que ambos genes presentan los motivos regulatorios RY asociados a la expresión en este estadio de desarrollo, se estudió la funcionalidad de estos elementos regulatorios mediante ensayos de retardo en gel utilizando el factor de transcripción FUSCA3 (FUS3), que presenta la capacidad de reconocer y unirse a estos elementos (103, 106).

Previamente, en nuestro laboratorio se informó que el factor de transcripción bZIP53 es capaz de unirse *in vitro* a los elementos ABRE presente en las regiones promotoras de ambos genes en estudio, sin embargo, no existía información acerca de los factores que podían interactuar con los motivos RY.

Así, la expresión del factor de transcripción FUS3 recombinante se realizó empleando una construcción en el vector pGEX-2T realizada en el laboratorio del Dr. Vicente Carbajosa, Universidad Politécnica de Madrid, España. Este vector permite la expresión de FUS3 fusionada a GST en el extremo N- terminal, facilitando su purificación. En la Figura 29 se muestra el análisis de la inducción de la expresión de este factor de transcripción.

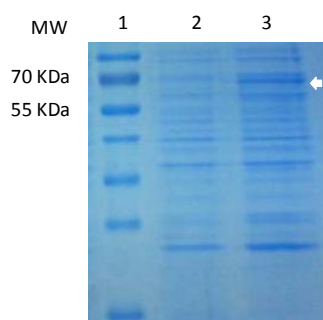


Figura 29. Análisis por SDS-PAGE de la inducción de la proteína FUS3. Calles 1- marcador de masa molecular (*Biorad*), 2- control BL21 pGEX-FUS3 sin inducir, 3- BL21 pGEX-FUS3 inducida 3 horas con IPTG 0,5 mM. La flecha indica la presencia de una banda de proteína de aproximadamente 62 KDa, correspondiente a la masa molecular esperada de la proteína FUS3-GST.

Se realizaron ensayos de retardo en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes para determinar si FUS3 es capaz de reconocer *in vitro* el motivo RY presente en las regiones promotoras de los genes *AtNfs1* y *AtFH*. Para ello se realizó el ensayo de unión utilizando sondas de oligonucleótidos marcados con biotina en las regiones 5' (75), las secuencias de las sondas biotiniladas contienen las mutaciones en RY indicadas en la Tabla 7. Luego, las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida nativo y electrotransferidas a membranas de nylon. Posteriormente, la membrana se incubó con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina y se reveló con los reactivos NBT y BCIP en solución alcalina. Para evaluar la especificidad de unión entre el factor de transcripción y el motivo RY, se realizó la competencia con la sonda sin biotina.

En la Figura 30A se muestran los resultados del ensayo de retardo en gel utilizando la sonda que contiene un fragmento del promotor de *AtNfs1* que contiene los elementos RY, mientras que la Figura 30B corresponde a los resultados empleando como sonda un fragmento del promotor de *AtFH*.

En ambos casos podemos observar que existe un retardo en la movilidad de la sonda biotinilada en presencia de FUS3-GST (Calle 2), que no se observa en los casos de sondas sin proteínas (calle 1) y con agregado de GST como control (calle 3). Al agregar cantidades decrecientes de sonda biotinilada respecto a sonda sin marcar se observa una disminución del retardo, indicando especificidad de la unión. Estos resultados indican que el factor de transcripción FUS3 es capaz de reconocer y unirse al motivo RY presente en las regiones promotoras de *AtNfs1* y *AtFH*, sugiriendo que dicho elemento regulatorio es funcional en ambos genes.

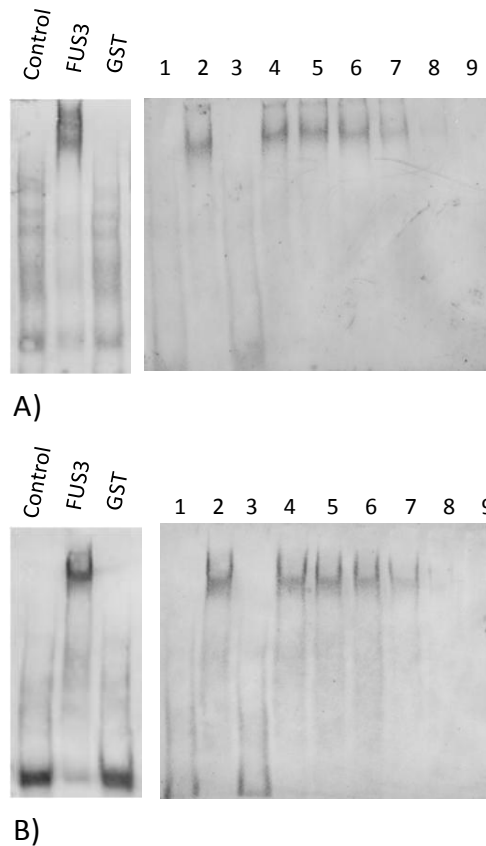


Figura 30. Ensayos de unión del factor FUS3 sobre las regiones promotoras de los genes *AtFH* y *AtNfs1*. **A)** Ensayos de retardo en gel de poliacrilamida nativo de la sonda biotinilada salvaje de *AtNfs1*. Se observa el retardo de la mezcla de reacción incubada con FUS3, se empleó GST purificada como control negativo del ensayo. Se realizó la competencia con la sonda fría, sin marcar, para chequear la especificidad de la unión. Calles: 1- Control negativo, 2- Incubación con FUS3, 3- Incubación con GST. Competencia con sonda sin marcar, relación sonda biotinilada-sonda fría: 4- 10:1, 5- 5:1, 6-3:1, 7- 1:3, 8-1:10, 9- 50:1. **B)** Ensayos de retardo en gel de poliacrilamida nativo de la sonda biotinilada salvaje de *AtFH*, realizado del mismo modo descripto para *AtNfs1*.

4. Discusión Capítulo III.

En este tercer capítulo se estudiaron las regiones promotoras y se identificaron elementos regulatorios del gen *AtFH* y de *AtNfs1*, que codifica para una cisteína desulfurasa mitocondrial involucrado en de la síntesis de centros Fe S en plantas.

Los patrones de expresión obtenidos en plantas transgénicas que expresan las regiones promotoras de *AtFH* fusionadas al gen reportero *GUS* concuerdan con la

distribución de transcritos informada en trabajos previos. Por ejemplo, ambos genes se expresan en raíz, hojas y flores de *Arabidopsis thaliana*, exhibiendo elevados niveles de transcritos en flor (24, 28, 64). Los resultados de la tinción histoquímica GUS indican que *AtFH* y *AtNfs1* se expresan en los haces vasculares de los cotiledones, en el primordio de hojas verdaderas y en el meristema apical de la raíz en plantas de 5 días, sugiriendo que ambos genes presentan una expresión preferencial en tejidos proliferativos. La expresión en tejidos con alta tasa de división celular se relaciona con lo informado para otros genes que codifican proteínas de localización mitocondrial como por ejemplo, algunas subunidades Fe-S de la succinato deshidrogenasa y del complejo I, así como también subunidades de la citocromo c oxidasa (107-110).

La actividad β -glucuronidasa en varios órganos y tejidos de plantas transformadas con la construcción completa del promotor de *AtFH* es notablemente alta, mientras que parece ser casi nula con la construcción PE (Figura 25). Esto indicaría el efecto positivo e indispensable de la secuencia correspondiente al primer intrón en la expresión del gen en estudio. Este aumento en la expresión podría estar asociado con un incremento en la acumulación del ARNm debido a la presencia de la región intrónica y/o a la existencia de secuencias del tipo activadores que podrían actuar asociadas a los elementos de expresión mínima para estos órganos y tejidos. El primer intrón parece ser fundamental en la regulación de la expresión de *AtFH*. Esto también se observa en otros organismos, por ejemplo, en humanos la deficiencia en frataxina que provoca la enfermedad Ataxia de Friedreich's está asociada a la expansión repetida y excesiva de la secuencia GAA ubicada en el primer intrón (33). Esta expansión intrónica provoca una conformación inusual en la heterocromatina dando una estructura de ADN triple hélice, que determina el silenciamiento y la subsecuente reducción de la expresión de frataxina (41).

El efecto positivo de los intrones en la expresión génica, llamado IME (intrón-mediated enhancement) (111) ha sido observado desde hace mucho tiempo en muchos eucariotas, incluidos animales, hongos y plantas (112-116), sin embargo su papel muchas veces está enmascarado por otros mecanismos de regulación génica más estudiados, como por ejemplo regulación de promotores y presencia de activadores y

modificaciones de la cromatina. Es conocido que algunos intrones pueden estimular la expresión de genes a través de elementos reguladores transcripcionalmente activos, mientras que otros parecieran incrementar la procesividad de la maquinaria de transcripción, aumentando la formación de ARNm completos y poliadenilados que pueden acumularse de modo más estable en las células (117-119). Además, algunos primeros intrones fueron relacionados con patrones específicos de expresión y varios otros con la expresión constitutiva en tejidos vegetativos, como ocurre en el caso de las profilinas de *Arabidopsis* (120). Los resultados planteados en esta tesis establecen un rol fundamental del primer intrón en la expresión génica *AtFH*, tanto en el incremento de los niveles de expresión así como en la expresión tejido específica.

La participación en la misma vía metabólica, así como también los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio de indican que *AtFH* y *AtNfs1* presentan el mismo patrón de expresión en la planta, sugieren una regulación común. El análisis bioinformático de las regiones promotoras de estos genes reveló la presencia de dos elementos regulatorios con importancia funcional para el control de la expresión génica durante la maduración de la semilla, ABRE y RY. Estos motivos están asociados a factores de transcripción como bZIP53 y FUS3 pertenecientes a las familias bZIP (*basic leucine zipper*) y B3 respectivamente (103, 121). En semillas de *Arabidopsis* se determinó que los motivos ABRE y RY están involucrados en la expresión de la subunidad 2-3 (*SDH2-3*) del complejo mitocondrial II que contiene un centro Fe-S (106). En el presente capítulo se estudió la funcionalidad de los motivos regulatorios RY presentes en los promotores de *AtFH* y *AtNfs1* mediante ensayos de retardo en la movilidad electroforética. Los resultados obtenidos demostraron que la proteína FUS3 es capaz de unirse *in vitro* a los elementos RY presente en las regiones promotoras de ambos genes en estudio. En análisis previos en el laboratorio se comprobó la unión de pZIP53 a sitios ABRE de ambos genes. Además, estos resultados se corroboraron *in vivo*, mediante los ensayos de la actividad β -glucuronidasa en plantas transgénicas, que expresan los promotores nativos y las versiones mutadas de los mismos. Por último, es importante destacar que la acción combinada entre los distintos motivos presentes en la secuencia promotora tanto de *AtFH*, como de *AtNfs1* actuarían sinérgicamente incrementando la expresión de este gen y generando un patrón de

expresión prácticamente ubicuo en todos los órganos y tejidos de *Arabidopsis*, sugiriendo un rol importante para estas proteínas en el desarrollo de la planta.

Conclusiones

Conclusiones

- Identificamos dos secuencias codificantes de frataxina en maíz, *ZmFH42* y *ZmFH55*. Se encontró que ambas se expresan en maíz, mayoritariamente en tejidos jóvenes. Estas isoformas son funcionales *in vivo* y estarían asociadas a la respuesta frente al estrés oxidativo.
- *ZmFH42* y *ZmFH55* presentan localización dual en mitocondrias y cloroplastos. Posiblemente se encuentren asociada a la maquinaria de biosíntesis y/o reparación de grupos Fe-S de ambas organelas, participando en los dos sistemas de síntesis Fe-S descritos para estas organelas; el sistema ISC y SUF.
- Con el objeto de caracterizar las isoformas frataxina de maíz a nivel bioquímico, se clonaron, expresaron y purificaron las proteínas *ZmFH42m* y *ZmFH55m*. Los estudios funcionales de ambas proteínas recombinantes mostraron que tienen la capacidad de atenuar la reacción de Fenton *in vitro*. Además, ambas isoformas frataxina de maíz, como así también *AtFH*, presentan actividad ferroxidasa. Los resultados nos permiten concluir que *AtFH* es una proteína funcional y que estaría involucrada en la homeostasis del Fe a través de la protección contra el daño oxidativo causado por este metal y que tendría un papel importante en el mantenimiento del estado redox celular.
- Estudios de la secuencia completa de las frataxinas de plantas indicaron que la región N-terminal de dichas proteínas determinan sus propiedades de oligomerización; observándose la existencia de un posible tetrámero. Además se observó la propiedad de formar dímeros en presencia de cobre, mostrando una notable diferencia entre ambas isoformas de maíz, ya que *ZmFH55* presenta un bajo nivel del dímero frente a este metal. También se determinó la capacidad de auto-clivaje de *ZmFH42*, *ZmFH55* y *AtFH*, observándose en el proceso de purificación de dichas proteínas especies de una masa molecular menor a la esperada.
- Los genes nucleares que codifican para las proteínas *AtNfs1* y *AtFH* se expresan preferencialmente en tejidos meristemáticos y en granos de polen. Este patrón de expresión es compartido con otros genes nucleares que codifican para

componentes de la cadena respiratoria, lo que sugiere una expresión coordinada de las proteínas involucradas en el metabolismo mitocondrial. En general, *AtNfs1* y *AtFH* presentan un patrón de expresión similar sugiriendo la existencia de una expresión coordinada que permite la presencia de ambas proteínas en los mismos órganos, tejidos y/o células. Esta expresión coordinada sería relevante para actuar conjuntamente en el primer paso de la síntesis de grupos Fe-S.

- La secuencia correspondiente al primer intrón de *AtFH* es fundamental para la expresión de este gen en todos los tejidos de la planta analizados. La acción de esta región con motivos presentes corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción tendrían un efecto sinérgico incrementando notablemente la expresión de *AtFH*.

- Los genes *AtNfs1* y *AtFH* también se expresan en semillas, principalmente en los primeros estadios. Esta expresión estaría asociada a la presencia de los elementos regulatorios ABRE y RY en la región promotora de ambos genes. La mutación de estos motivos en las regiones promotoras de *AtFH* y *AtNfs1* afectan notablemente la expresión. El motivo RY sería un elemento regulatorio funcional en las regiones promotoras de *AtNfs1* y *AtFH* dado que el factor de transcripción FUS3 es capaz de reconocerlos e unirse a ellos en ensayos *in vitro*.

Bibliografía

1. Muhlenhoff, U., and Lill, R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria, *Biochim Biophys Acta* 1459, 370-382.
2. Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
3. Mackenzie, S., and McIntosh, L. (1999) Higher plant mitochondria, *Plant Cell* 11, 571-586.
4. Lange, H., Kispal, G., and Lill, R. (1999) Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria, *J Biol Chem* 274, 18989-18996.
5. Nelson, D. L., Cox, M. M., and Lehninger, A. L. (2005) *Lehninger principles of biochemistry*, 4th ed., Freeman, New York.
6. Leaver, C. J., Hack, E., and Forde, B. G. (1983) Protein synthesis by isolated plant mitochondria, *Methods Enzymol* 97, 476-484.
7. Whelan, J., and Glaser, E. (1997) Protein import into plant mitochondria, *Plant Mol Biol* 33, 771-789.
8. Beinert, H., Holm, R. H., and Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures, *Science* 277, 653-659.
9. Gerber, J., and Lill, R. (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology, *Mitochondrion* 2, 71-86.
10. Balk, J., and Lobreaux, S. (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants, *Trends Plant Sci* 10, 324-331.
11. Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D., and Johnson, M. K. (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters, *Annu Rev Biochem* 74, 247-281.
12. Balk, J., and Pilon, M. (2011) Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants, *Trends Plant Sci* 16, 218-226.
13. Beinert, H. (2000) Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises, *J Biol Inorg Chem* 5, 2-15.

14. Rouault, T. A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease, *Nat Chem Biol* 2, 406-414.
15. Couturier, J., Touraine, B., Briat, J. F., Gaymard, F., and Rouhier, N. (2013) The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions, *Front Plant Sci* 4, 259.
16. Frazzon, A. P., Ramirez, M. V., Warek, U., Balk, J., Frazzon, J., Dean, D. R., and Winkel, B. S. (2007) Functional analysis of Arabidopsis genes involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly, *Plant Mol Biol* 64, 225-240.
17. Kispal, G., Csere, P., Prohl, C., and Lill, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins, *EMBO J* 18, 3981-3989.
18. Yoon, T., and Cowan, J. A. (2003) Iron-sulfur cluster biosynthesis. Characterization of frataxin as an iron donor for assembly of [2Fe-2S] clusters in ISU-type proteins, *J Am Chem Soc* 125, 6078-6084.
19. Balk, J., and Schaedler, T. A. (2014) Iron cofactor assembly in plants, *Annu Rev Plant Biol* 65, 125-153.
20. Leon, S., Touraine, B., Ribot, C., Briat, J. F., and Lobreaux, S. (2003) Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from Arabidopsis thaliana, *Biochem J* 371, 823-830.
21. Xu, X. M., and Moller, S. G. (2011) Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance, *Antioxid Redox Signal* 15, 271-307.
22. Turowski, V. R., Akin, C., Maliandi, M. V., Buchensky, C., Leaden, L., Peralta, D. A., Busi, M. V., Araya, A., and Gomez-Casati, D. F. (2015) Frataxin Is Localized to Both the Chloroplast and Mitochondrion and Is Involved in Chloroplast Fe-S Protein Function in Arabidopsis, *PLoS One* 10, e0141443.
23. Turowski, V. R., Busi, M. V., and Gomez-Casati, D. F. (2012) Structural and functional studies of the mitochondrial cysteine desulfurase from Arabidopsis thaliana, *Mol Plant* 5, 1001-1010.

24. Turowski, V. R. (2008) Estudios moleculares, bioquímicos y funcionales de AtNfs1, una cisteína desulfurasa mitocondrial de *Arabidopsis thaliana*, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.
25. Xu, X. M., and Moller, S. G. (2006) AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in *Arabidopsis*, *EMBO J* 25, 900-909.
26. Busi, M. V., and Gomez-Casati, D. F. (2012) Exploring frataxin function, *IUBMB Life* 64, 56-63.
27. Busi, M. V., Maliandi, M. V., Valdez, H., Clemente, M., Zabaleta, E. J., Araya, A., and Gomez-Casati, D. F. (2006) Deficiency of *Arabidopsis thaliana* frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress, *Plant J* 48, 873-882.
28. Vazzola, V., Losa, A., Soave, C., and Murgia, I. (2007) Knockout of frataxin gene causes embryo lethality in *Arabidopsis*, *FEBS Lett* 581, 667-672.
29. Leon, S., Touraine, B., Briat, J. F., and Lobreaux, S. (2005) Mitochondrial localization of *Arabidopsis thaliana* Isu Fe-S scaffold proteins, *FEBS Lett* 579, 1930-1934.
30. Bych, K., Netz, D. J., Vigani, G., Bill, E., Lill, R., Pierik, A. J., and Balk, J. (2008) The essential cytosolic iron-sulfur protein Nbp35 acts without Cfd1 partner in the green lineage, *J Biol Chem* 283, 35797-35804.
31. Gibson, T. J., Koonin, E. V., Musco, G., Pastore, A., and Bork, P. (1996) Friedreich's ataxia protein: phylogenetic evidence for mitochondrial dysfunction, *Trends Neurosci* 19, 465-468.
32. Koutnikova, H., Campuzano, V., Foury, F., Dolle, P., Cazzalini, O., and Koenig, M. (1997) Studies of human, mouse and yeast homologues indicate a mitochondrial function for frataxin, *Nat Genet* 16, 345-351.
33. Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M. D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P. I., Di Donato, S., Mandel, J. L., Coccozza, S., Koenig, M., and Pandolfo, M. (1996) Friedreich's

ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion, *Science* 271, 1423-1427.

34. Dolezal, P., Dancis, A., Lesuisse, E., Sutak, R., Hrdy, I., Embley, T. M., and Tachezy, J. (2007) Frataxin, a conserved mitochondrial protein, in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*, *Eukaryot Cell* 6, 1431-1438.
35. Muhlenhoff, U., Richhardt, N., Ristow, M., Kispal, G., and Lill, R. (2002) The yeast frataxin homolog Yfh1p plays a specific role in the maturation of cellular Fe/S proteins, *Hum Mol Genet* 11, 2025-2036.
36. Chen, O. S., Hemenway, S., and Kaplan, J. (2002) Inhibition of Fe-S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1p affects Fe-S cluster synthesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12321-12326.
37. Lesuisse, E., Santos, R., Matzanke, B. F., Knight, S. A., Camadro, J. M., and Dancis, A. (2003) Iron use for haeme synthesis is under control of the yeast frataxin homologue (Yfh1), *Hum Mol Genet* 12, 879-889.
38. Schoenfeld, R. A., Napoli, E., Wong, A., Zhan, S., Reutenauer, L., Morin, D., Buckpitt, A. R., Taroni, F., Lonnerdal, B., Ristow, M., Puccio, H., and Cortopassi, G. A. (2005) Frataxin deficiency alters heme pathway transcripts and decreases mitochondrial heme metabolites in mammalian cells, *Hum Mol Genet* 14, 3787-3799.
39. Becker, E., and Richardson, D. R. (2001) Frataxin: its role in iron metabolism and the pathogenesis of Friedreich's ataxia, *Int J Biochem Cell Biol* 33, 1-10.
40. Schapira, A. H. (1998) Human complex I defects in neurodegenerative diseases, *Biochim Biophys Acta* 1364, 261-270.
41. Sakamoto, N., Chastain, P. D., Parniewski, P., Ohshima, K., Pandolfo, M., Griffith, J. D., and Wells, R. D. Sticky DNA, *Molecular Cell* 3, 465-475.
42. Schmucker, S., and Puccio, H. (2010) Understanding the molecular mechanisms of Friedreich's ataxia to develop therapeutic approaches, *Hum Mol Genet* 19, R103-110.
43. Lodi, R., Cooper, J. M., Bradley, J. L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D. J., and Schapira, A. H. V. (1999) Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in

- patients with Friedreich ataxia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11492-11495.
44. Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., Jiralerspong, S., Trottier, Y., Kish, S. J., Faucheux, B., Trouillas, P., Authier, F. J., Durr, A., Mandel, J. L., Vescovi, A., Pandolfo, M., and Koenig, M. (1997) Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes, *Hum Mol Genet* 6, 1771-1780.
 45. Marmolino, D. (2011) Friedreich's ataxia: past, present and future, *Brain Res Rev* 67, 311-330.
 46. Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y. I., Ristow, M., and Shoelson, S. E. (2000) Crystal structure of human frataxin, *J Biol Chem* 275, 30753-30756.
 47. Babcock, M., de Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., Montermini, L., Pandolfo, M., and Kaplan, J. (1997) Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin, *Science* 276, 1709-1712.
 48. Ristow, M., Pfister, M. F., Yee, A. J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C. Y., Ueki, K., Michael, M. D., 2nd, Lowell, B. B., and Kahn, C. R. (2000) Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12239-12243.
 49. Isaya, G., O'Neill, H. A., Gakh, O., Park, S., Mantcheva, R., and Mooney, S. M. (2004) Functional studies of frataxin, *Acta Paediatr Suppl* 93, 68-71; discussion 72-63.
 50. Wilson, R. B., and Roof, D. M. (1997) Respiratory deficiency due to loss of mitochondrial DNA in yeast lacking the frataxin homologue, *Nat Genet* 16, 352-357.
 51. Huynen, M. A., Snel, B., Bork, P., and Gibson, T. J. (2001) The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly, *Hum Mol Genet* 10, 2463-2468.

52. Bulteau, A. L., O'Neill, H. A., Kennedy, M. C., Ikeda-Saito, M., Isaya, G., and Szweda, L. I. (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity, *Science* 305, 242-245.
53. Zhang, Y., Lyver, E. R., Knight, S. A., Lesuisse, E., and Dancis, A. (2005) Frataxin and mitochondrial carrier proteins, Mrs3p and Mrs4p, cooperate in providing iron for heme synthesis, *J Biol Chem* 280, 19794-19807.
54. Branda, S. S., Yang, Z. Y., Chew, A., and Isaya, G. (1999) Mitochondrial intermediate peptidase and the yeast frataxin homolog together maintain mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Hum Mol Genet* 8, 1099-1110.
55. Schmucker, S., Argentini, M., Carelle-Calmels, N., Martelli, A., and Puccio, H. (2008) The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin, *Hum Mol Genet* 17, 3521-3531.
56. Cavadini, P., Adamec, J., Taroni, F., Gakh, O., and Isaya, G. (2000) Two-step Processing of Human Frataxin by Mitochondrial Processing Peptidase: PRECURSOR AND INTERMEDIATE FORMS ARE CLEAVED AT DIFFERENT RATES, *Journal of Biological Chemistry* 275, 41469-41475.
57. Gakh, O., Bedekovics, T., Duncan, S. F., Smith, D. Y. t., Berkholz, D. S., and Isaya, G. (2010) Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly, *J Biol Chem* 285, 38486-38501.
58. Cook, J. D., Bencze, K. Z., Jankovic, A. D., Crater, A. K., Busch, C. N., Bradley, P. B., Stemmler, A. J., Spaller, M. R., and Stemmler, T. L. (2006) Monomeric yeast frataxin is an iron-binding protein, *Biochemistry* 45, 7767-7777.
59. Adinolfi, S., Iannuzzi, C., Prischi, F., Pastore, C., Iametti, S., Martin, S. R., Bonomi, F., and Pastore, A. (2009) Bacterial frataxin CyaY is the gatekeeper of iron-sulfur cluster formation catalyzed by IscS, *Nat Struct Mol Biol* 16, 390-396.
60. Gakh, O., Adamec, J., Gacy, A. M., Twesten, R. D., Owen, W. G., and Isaya, G. (2002) Physical evidence that yeast frataxin is an iron storage protein, *Biochemistry* 41, 6798-6804.

61. Park, S., Gakh, O., O'Neill, H. A., Mangravita, A., Nichol, H., Ferreira, G. C., and Isaya, G. (2003) Yeast frataxin sequentially chaperones and stores iron by coupling protein assembly with iron oxidation, *J Biol Chem* 278, 31340-31351.
62. O'Neill, H. A., Gakh, O., Park, S., Cui, J., Mooney, S. M., Sampson, M., Ferreira, G. C., and Isaya, G. (2005) Assembly of human frataxin is a mechanism for detoxifying redox-active iron, *Biochemistry* 44, 537-545.
63. Faraj, S. E., Venturutti, L., Roman, E. A., Marino-Buslje, C. B., Mignone, A., Tosatto, S. C., Delfino, J. M., and Santos, J. (2013) The role of the N-terminal tail for the oligomerization, folding and stability of human frataxin, *FEBS Open Bio* 3, 310-320.
64. Busi, M. V., Zabaleta, E. J., Araya, A., and Gomez-Casati, D. F. (2004) Functional and molecular characterization of the frataxin homolog from *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett* 576, 141-144.
65. Martin, M., Colman, M. J., Gomez-Casati, D. F., Lamattina, L., and Zabaleta, E. J. (2009) Nitric oxide accumulation is required to protect against iron-mediated oxidative stress in frataxin-deficient *Arabidopsis* plants, *FEBS Lett* 583, 542-548.
66. Maliandi, M. V., Busi, M. V., Turowski, V. R., Leaden, L., Araya, A., and Gomez-Casati, D. F. (2011) The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants, *FEBS J* 278, 470-481.
67. Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures, *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
68. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
69. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248-254.
70. Clough, S. J., and Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *Plant J* 16, 735-743.

71. Guthrie, c., Fink, Gerald R. (2002) *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part B*, Vol. 350, Academic Press.
72. Yoo, S. D., Cho, Y. H., and Sheen, J. (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis, *Nat Protoc* 2, 1565-1572.
73. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25, 402-408.
74. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., and Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *The EMBO Journal* 6, 3901-3907.
75. Ludwig, L. B., Hughes, B. J., and Schwartz, S. A. (1995) Biotinylated probes in the electrophoretic mobility shift assay to examine specific dsDNA, ssDNA or RNA-protein interactions, *Nucleic Acids Res* 23, 3792-3793.
76. Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., and Rokhsar, D. S. (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, *Nucleic Acids Res* 40, D1178-1186.
77. Musco, G., Stier, G., Kolmerer, B., Adinolfi, S., Martin, S., Frenkiel, T., Gibson, T., and Pastore, A. (2000) Towards a structural understanding of Friedreich's ataxia: the solution structure of frataxin, *Structure* 8, 695-707.
78. Labesse, G., and Mornon, J. (1998) Incremental threading optimization (TITO) to help alignment and modelling of remote homologues, *Bioinformatics* 14, 206-211.
79. Luthy, R., Bowie, J. U., and Eisenberg, D. (1992) Assessment of protein models with three-dimensional profiles, *Nature* 356, 83-85.
80. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23, 2947-2948.

81. Robert, X., and Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server, *Nucleic Acids Research* 42, W320-W324.
82. Claros, M. G., and Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences, *Eur J Biochem* 241, 779-786.
83. Emanuelsson, O., Nielsen, H., and von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites, *Protein Sci* 8, 978-984.
84. Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences, *Proteomics* 4, 1581-1590.
85. Duchene, A. M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N. M., Zaepfel, M., Marechal-Drouard, L., and Small, I. D. (2005) Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16484-16489.
86. Peeters, N., and Small, I. (2001) Dual targeting to mitochondria and chloroplasts, *Biochim Biophys Acta* 1541, 54-63.
87. von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R. G. (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides, *European Journal of Biochemistry* 180, 535-545.
88. (1991) Chloroplast transit peptides the perfect random coil?, *FEBS Letters* 278, 1-3.
89. Mitschke, J., Fuss, J., Blum, T., Höglund, A., Reski, R., Kohlbacher, O., and Rensing, S. A. (2009) Prediction of dual protein targeting to plant organelles, *New Phytologist* 183, 224-236.
90. Maliandi, M. V., Busi, M. V., Clemente, M., Zabaleta, E. J., Araya, A., and Gomez-Casati, D. F. (2007) Expression and one-step purification of recombinant *Arabidopsis thaliana* frataxin homolog (AtFH), *Protein Expr Purif* 51, 157-161.
91. Park, S., Gakh, O., Mooney, S. M., and Isaya, G. (2002) The ferroxidase activity of yeast frataxin, *J Biol Chem* 277, 38589-38595.

92. Branda, S. S., Cavadini, P., Adamec, J., Kalousek, F., Taroni, F., and Isaya, G. (1999) Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase, *J Biol Chem* 274, 22763-22769.
93. Patel, P. I., and Isaya, G. (2001) Friedreich Ataxia: From GAA Triplet–Repeat Expansion to Frataxin Deficiency, *American Journal of Human Genetics* 69, 15-24.
94. Yoon, T., Dizin, E., and Cowan, J. A. (2007) N-terminal iron-mediated self-cleavage of human frataxin: regulation of iron binding and complex formation with target proteins, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12, 535-542.
95. Chasteen, N. D., and Harrison, P. M. (1999) Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage, *Journal of Structural Biology* 126, 182-194.
96. Andrews, S. C., Robinson, A. K., and Rodríguez-Quñones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis, *FEMS Microbiology Reviews* 27, 215-237.
97. Aloria, K., Schilke, B., Andrew, A., and Craig, E. A. (2004) Iron-induced oligomerization of yeast frataxin homologue Yfh1 is dispensable in vivo, *EMBO Rep* 5, 1096-1101.
98. Bou-Abdallah, F., Adinolfi, S., Pastore, A., Laue, T. M., and Dennis Chasteen, N. (2004) Iron binding and oxidation kinetics in frataxin CyaY of Escherichia coli, *J Mol Biol* 341, 605-615.
99. Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y., and Fontecave, M. (2006) Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of Escherichia coli CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU, *J Biol Chem* 281, 16256-16263.
100. Cavadini, P., O'Neill, H. A., Benada, O., and Isaya, G. (2002) Assembly and iron-binding properties of human frataxin, the protein deficient in Friedreich ataxia, *Hum Mol Genet* 11, 217-227.
101. Jeong, Y. M., Mun, J. H., Lee, I., Woo, J. C., Hong, C. B., and Kim, S. G. (2006) Distinct roles of the first introns on the expression of *Arabidopsis* profilin gene family members, *Plant Physiol* 140, 196-209.

102. Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999, *Nucleic Acids Res* 27, 297-300.
103. Vicente-Carbajosa, J., and Carbonero, P. (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state, *Int J Dev Biol* 49, 645-651.
104. Nakashima, K., Fujita, Y., Katsura, K., Maruyama, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis, *Plant Mol Biol* 60, 51-68.
105. Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2003) ABA action and interactions in seeds, *Trends Plant Sci* 8, 213-217.
106. Roschzttardtz, H., Fuentes, I., Vasquez, M., Corvalan, C., Leon, G., Gomez, I., Araya, A., Holuigue, L., Vicente-Carbajosa, J., and Jordana, X. (2009) A nuclear gene encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II is regulated by B3 domain transcription factors during seed development in Arabidopsis, *Plant Physiol* 150, 84-95.
107. Elorza, A., Leon, G., Gomez, I., Mouras, A., Holuigue, L., Araya, A., and Jordana, X. (2004) Nuclear SDH2-1 and SDH2-2 genes, encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II in Arabidopsis, have distinct cell-specific expression patterns and promoter activities, *Plant Physiol* 136, 4072-4087.
108. Schmidt-Bleek, K., Heiser, V., Thieck, O., Brennicke, A., and Grohmann, L. (1997) The 28.5-kDa iron-sulfur protein of mitochondrial complex I is encoded in the nucleus in plants, *Mol Gen Genet* 253, 448-454.
109. Welchen, E., Chan, R. L., and Gonzalez, D. H. (2004) The promoter of the Arabidopsis nuclear gene COX5b-1, encoding subunit 5b of the mitochondrial cytochrome c oxidase, directs tissue-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements, *J Exp Bot* 55, 1997-2004.
110. Welchen, E., and Gonzalez, D. H. (2005) Differential expression of the Arabidopsis cytochrome c genes Cyt1 and Cyt2. Evidence for the

- involvement of TCP-domain protein-binding elements in anther- and meristem-specific expression of the *Cytc-1* gene, *Plant Physiol* 139, 88-100.
111. Mascarenhas, D., Mettler, I. J., Pierce, D. A., and Lowe, H. W. (1990) Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize, *Plant Mol Biol* 15, 913-920.
 112. Buchman, A. R., and Berg, P. (1988) Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression, *Mol Cell Biol* 8, 4395-4405.
 113. Duncker, B. P., Davies, P. L., and Walker, V. K. (1997) Introns boost transgene expression in *Drosophila melanogaster*, *Mol Gen Genet* 254, 291-296.
 114. Okkema, P. G., Harrison, S. W., Plunger, V., Aryana, A., and Fire, A. (1993) Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics* 135, 385-404.
 115. Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Avarbock, M. R., Allen, D. D., and Brinster, R. L. (1991) Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 478-482.
 116. Xu, J., and Gong, Z. Z. (2003) Intron requirement for AFP gene expression in *Trichoderma viride*, *Microbiology* 149, 3093-3097.
 117. Curi, G. C., Chan, R. L., and Gonzalez, D. H. (2005) The leader intron of *Arabidopsis thaliana* genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5c promotes high-level expression by increasing transcript abundance and translation efficiency, *J Exp Bot* 56, 2563-2571.
 118. Gidekel, M., Jimenez, B., and Herrera-Estrella, L. (1996) The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 1 beta contains an enhancer-like element, *Gene* 170, 201-206.
 119. Rose, A. B., Elfersi, T., Parra, G., and Korf, I. (2008) Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression, *Plant Cell* 20, 543-551.
 120. Jeong, Y.-M., Mun, J.-H., Lee, I., Woo, J. C., Hong, C. B., and Kim, S.-G. (2006) Distinct Roles of the First Introns on the Expression of *Arabidopsis* Profilin Gene Family Members, *Plant Physiology* 140, 196-209.

121. Alonso, R., Onate-Sanchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., Vicente-Carbajosa, J., and Droge-Laser, W. (2009) A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation, *Plant Cell* 21, 1747-1761.