

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**



**CENTRO DE ESTUDIOS FOTOSINTÉTICOS Y BIOQUÍMICOS  
TESIS DE DOCTORADO**



**“Biogénesis de proteínas Fe-S en mitocondrias de plantas”**

**Lic. Laura Leaden  
Rosario, Argentina**

**Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas**

**Director: Dr. Diego Gomez Casati**

**Co-directora: Dra. María Victoria Busi**

**2014**

# **Biogénesis de proteínas Fe-S en mitocondrias de plantas**

**Laura Leaden**

Licenciada en Biotecnología. 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 el Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOTBI), Departamento de Química Biológica, Área de Química Biológica dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de noviembre de 2009 y el 10 de febrero de 2014, bajo la dirección de la Dr. Diego Gomez Casati y la codirección de la Dra. Ma. Victoria Busi.

Director Dr. Diego Gomez Casati.....

Co-Directora Dra. María Victoria Busi.....

Jurado .....

Jurado.....

Jurado.....

Defendida.....

## **Agradecimientos**

A horas de que esta tesis se imprima, me siento a escribir los agradecimientos... algo en que no había pensado y que me parecía bastante lejano. La tesis ha sido un esfuerzo, pero me ha dado muchas satisfacciones y muchos momentos hermosos que siempre van a estar en mí. Muchas son las personas las cuáles quiero agradecer, muchas son las que han permitido crecer y formarme en este, mi trabajo, que me gusta tanto hacer.

En primer lugar quiero agradecer a mis jefes Vicky y Diego, por abrirme la puerta del laboratorio, por confiar en mí y darme la posibilidad de aprender y equivocarme, por permitirme ser parte de un grupo del cual estoy muy contenta de pertenecer.

A Ayelen, por haber participado activamente en la discusión de esta tesis. Por su paciencia, por su apoyo incondicional y por acompañarme en esta última parte del doctorado. MUCHAS GRACIAS!!!!

A todos mis compañeros del laboratorio, por las horas compartidas y la buena onda. Porque entre el trabajo, mates, café charlas académicas y a veces no tanto, todas las horas pasadas en su compañía han sido de mucho aprendizaje. Quiero agradecer en especial a Vale T, por ser mi gran compañera durante todos los años de doctorado y convertirse en mi amiga.

A mis amigas del alma, todas ellas, las que siempre están, por los años compartidos por las risas y los buenos momentos. Por ser parte de mi vida y por acompañarme siempre.

A todas aquellas personas que han pasado por mi vida, las que están y las que no, las que me han enseñado y las que han llenado mi vida de felicidad.

A mi familia, por ser la que está presente y que me apoya en todos los momentos de mi vida.

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:**

Maliandi MV, Busi MV, Turowski VR, **Leaden L**, Araya AA, Gomez-Casati DF (2011). The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants. *FEBS J.* 278(3):470-81

### **Manuscritos enviados**

**Leaden L**, Busi MV and Gomez-Casati DF. The mitochondrial proteins AtHscB and AtIsu1 involved in Fe-S cluster assembly interact with the Hsp70-type chaperon AtHscA2 and modulate its catalytic activity.

### **Manuscritos (en preparación)**

**Leaden L**, Pagani MA, Busi, MV, Gomez Casati D “Altered levels of AtHscB disrupts iron traslocation from roots to shoots”.

### **Trabajos presentados en congresos nacionales**

- Leaden L, Turowski V, Maliandi MV, Araya A, Busi MV y Gomez-Casati DF. Biogénesis de grupos Fe-S en plantas. *XI Congreso y XXIX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Rosario*, Rosario, 2009.

- Turowski VR, Carrillo M, Leaden L, Busi MV and Gomez-Casati DF. Characterization of frataxin homologs in plants. *XLVI Reunión SAIB*, Puerto Madryn, Argentina, 2010. *Biocell*, 34 PLP25

- Leaden L, Busi MV and Gomez-Casati DF. Role of AtHscB in plant iron metabolism. *XLVIII Reunión SAIB*, Mendoza, Argentina, 2012.

## **Trabajos presentados en congresos internacionales**

- Leaden L, Turowski V, Maliandi MV, Busi MV, Murgia I, Gomez-Casati DF. Increased expression of genes involved in Fe-S cluster biosynthesis in AtFH deficient plants. ***15th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants***. 26-30 June 2010, Budapest, Hungary.

- Leaden L, Martín M, Busi MV, Gomez Casati DF. Role of AtHscB in mitochondria iron metabolism in *A. thaliana* plants. ***8th International Conference for Plant Mitochondrial Biology***, Rosario, Argentine, 2013.

- Laura Leaden, María Victoria Busi and Diego Gomez-Casati. Biotechnology strategy for plant improved growth under iron limiting conditions. ***VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología REDBIO-Argentina 2013***, del 18 al 22 de Noviembre, Mar del Plata, Argentina.

## **INDICE**

Índice	I
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen	XIII

## **1. INTRODUCCIÓN**

1.1. Importancia biológica de los grupos Fe-S	1
1.2. Las proteínas con centros Fe-S	2
1.3. Biogénesis de los grupos Fe-S	2
1.3.1. Origen y evolución	5
1.3.2. Mecanismo general para el ensamblado de los grupos Fe-S	5
1.4. Biogénesis de grupos Fe-S en plantas	8
1.4.1. Biosíntesis de grupos Fe-S en el cloroplasto: Sistema SUF	8
1.4.2. Producción mitocondrial de grupos Fe-S: Sistema ISC	11
1.4.3. Biogénesis de grupos Fe-S en el citosol: Sistema CIA	14
1.5. Relación del ensamblado de los grupos Fe-S y el metabolismo del Fe	15
1.5.1. Incorporación del Fe en plantas	16
1.5.2. Transporte del Fe desde la raíz hacia las hojas	18
1.5.3. Regulación de la respuesta a deficiencia de Fe	19
1.5.4. Respuesta sistémica de las plantas a la deficiencia de Fe	20
1.6. Chaperonas y proteínas del tipo-J	21
1.6.1. Sistema especializado de chaperonas para la síntesis de los centros Fe-S	24

## **2. OBJETIVOS**

2. 1. Objetivo General	29
2. 2. Objetivos Específicos	29

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	30
---	----

3.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento	30
3.2.1. Líneas de plantas	30
3.2.2. Condiciones de crecimiento	31
3.3. Medios de cultivo	31
3.4. Soluciones buffer	32
3.5. Antibióticos y otros compuestos relacionados	32
3.6. Vectores y oligonucleótidos cebadores	32
3.7. Preparación y análisis de ADN plasmídico	35
3.7.1. Obtención de células competentes	35
3.7.2. Transformación de células competentes	36
3.7.3. Análisis de transformantes	37
3.7.4. Aislamiento de ADN plasmídico	37
3.7.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	37
3.7.6. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	37
3.8. Manipulación enzimática de ADN	38
3.8.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
3.8.2. Reacciones de digestión empleando enzimas	38
3.8.3. Reacción de ligación	38
3.9. Extracción de ARN total y obtención de ADNc	38
3.9.1. Extracción de ARN total	38
3.9.2. Cuantificación de ARN total	38
3.9.3. Obtención de ADN copia	39
3.10. Extracción y cuantificación de ADN genómico	39
3.11. Clonados	40
3.11.1. Clonados dependientes de ligasa	40
3.11.2. Clonados por recombinación (sistema Gateway)	40
3.11.3. Secuenciación del ADN	41
3.12. Construcción de vectores para expresión de proteínas en bacterias	41
3.13. Construcción de vectores binarios para expresión de proteínas en plantas	42
3.14. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	42
3.15. Ensayo de interacción entre AtHscB, AtIlu1 y AtHscA2	43
3.16. Medidas de Actividad ATPasa	43

3.16.1. Determinación de los parámetros cinéticos.	44
3.17. Transformación de plantas de <i>Arabidopsis</i> utilizando el método de infiltración por <i>floral dip</i>	45
3.18. Preparación y análisis de proteínas	45
3.18.1. Extracción de proteínas de material vegetal	45
3.18.2. Determinación del contenido proteico	46
3.18.3. Electroforesis de proteínas	46
3.18.4. Análisis por inmunodetección	46
3.19. Aislamiento de plantas homocigotas	47
3.19.1. Aislamiento de plantas insercionales homocigotas	47
3.19.2. Aislamiento de plantas sobreexpresantes homocigotas	47
3.20. Amplificaciones por PCR en tiempo real (QPCR)	48
3.21. Caracterización fenotípica de las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	48
3.21.1. Medidas del área foliar de las hojas de roseta	48
3.21.2. Medidas del número y longitud de las raíces secundarias	48
3.21.3. Cuantificación de clorofilas	49
3.22. Análisis de ferrosulfoproteínas en las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	49
3.22.1. Medida de la actividad enzimática de aconitasa, succinato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa	49
3.22.2. Medidas de respiración	50
3.23. Detección del contenido del Fe	50
3.23.1. Detección histoquímica del contenido de Fe en raíces	50
3.23.2 Detección espectrofotométrica del contenido de Fe total en raíces y hojas	51
3.24. Análisis de la actividad ferroquelato reductasa (FRO2)	51

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Capítulo I: Caracterización bioquímica de AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB mitocondriales de *Arabidopsis thaliana*

4.1.1. Expresión y purificación de AtHscB, AtHScA2 y AtIsu1	53
---	----

mitocondriales de <i>Arabidopsis</i>	
4.1.2. Interacción entre AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB	54
4.1.3. Efecto de AtIsu1 y AtHscB sobre la cinética de AtHscA2	56
4.1.4. Discusión del Capítulo I	59
<b>4.2 Capítulo II: Caracterización funcional de AtHscB <i>in vivo</i></b>	
4.2.1. Obtención de líneas sobre-expresantes y deficientes <i>AtHscB</i>	64
4.2.2. Estudio del fenotipo de las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	66
4.2.3. Estudio de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de los centros Fe-S.	68
4.2.4. Efecto de AtHscB sobre la actividad de las proteínas Fe-S mitocondriales	69
4.2.5 Efecto de AtHscB sobre el consumo de oxígeno en las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	73
4.2.6. Discusión del Capítulo II	75
<b>4.3. Capítulo III: Estudio de AtHscB y su relación con el metabolismo del Fe en plantas</b>	
4.3.1. Análisis de tolerancia a la deficiencia de Fe en las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	79
4.3.2. Acumulación de Fe en las raíces de <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	80
4.3.3. Transporte de hierro en la planta	83
4.3.4. Efecto de AtHscB sobre los genes de incorporación del Fe en plantas	84
4.3.5 Efecto de AtHscB sobre la actividad FRO2	86
4.3.6. Efecto de AtHscB sobre la señalización de la deficiencia de Fe hoja-raíz	87
4.3.7. Efecto de AtHscB en el transporte del Fe desde las raíces hacia las hojas	89
4.3.8 Discusión del capítulo III	96

<b>5. DISCUSIÓN GENERAL</b>	
<b>5.1. AtHscB afecta el metabolismo del Fe en <i>Arabidopsis</i></b>	
5.1.1. Efecto de la modificación de los niveles de AtHscB en <i>Arabidopsis</i>	103
5.1.2. Efecto de AtHscB sobre la actividad de las ferrosulfoproteínas	103
5.1.3. Efecto de AtHscB sobre la distribución y metabolismo del Fe	105
5.1.4. Efecto de AtHscB en el transporte del Fe desde las raíces hacia las hojas	108
5.1.5. AtHscB y la tolerancia a la deficiencia de Fe	115
<b>6. CONCLUSIONES</b>	116
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	118

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estequiometrías más frecuentes de los grupos Fe-S	1
Figura 2	Representación esquemática de los pasos básicos de la biosíntesis de los grupos Fe-S	6
Figura 3	Modelos propuestos para la síntesis de grupos Fe-S en plantas	9
Figura 4	Representación esquemática de la incorporación del Fe en raíces	17
Figura 5	Representación esquemática de los modelos inductivo y represivo	21
Figura 6	Estructura de la proteína J	22
Figura 7	Estructura de la proteína Hsp70	23
Figura 8	Modo de acción de la proteína Hsp70	24
Figura 9	Ciclo de HscA	25
Figura 10	Alineamiento de la secuencia aminoacídica de HscB en eucariotas y procariotas	27
Figura 11	Análisis por SDS-PAGE de la expresión de AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB en células de <i>E. coli</i>	53
Figura 12	Análisis mediante SDS-PAGE y <i>western blot</i> de la purificación de las proteínas AtHscB, AtIsu1 y AtHscA2	54
Figura 13	Análisis por SDS-PAGE 15% de la interacción entre AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB	55
Figura 14	Efecto de AtHscB y AtIsu1 sobre la actividad ATPasa de AtHscA2	57
Figura 15	Efecto de AtHscB y AtIsu1 sobre la actividad ATPasa de AtHscA2.	58
Figura 16	Análisis de líneas SALK 099684 ( <i>hscb1</i> ) y 020271 ( <i>hscb2</i> )	65
Figura 17	Análisis de expresión de <i>AtHscB</i>	66
Figura 18	Caracterización fenotípica de las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	67
Figura 19	mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de <i>AtNfs1</i> , <i>AtFH</i> , <i>AtIsu1</i> y <i>AtHscA2</i>	69
Figura 20	Análisis de la actividad de las enzimas aconitasa, SDH y MDH en las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i> .	72

Figura 21	Análisis de los niveles de expresión de los genes <i>Aco2</i> y <i>SDH2-1</i> en las líneas Col-0, <i>HSCB1</i> , <i>HSCB2</i> , <i>hscb1</i> y <i>hscb2</i>	73
Figura 22	Determinación del consumo de O <sub>2</sub> en plántulas Col-0, <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	74
Figura 23	Análisis del área foliar de las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	80
Figura 24	Determinación del contenido de Fe en las raíces de las líneas Col-0, <i>HSCB1</i> , <i>HSCB2</i> , <i>hscb1</i> y <i>hscb2</i>	81
Figura 25	Tinción de Perl's en raíces de plántulas Col-0, <i>HSCB1</i> , <i>HSCB2</i> , <i>hscb1</i> y <i>hscb2</i>	82
Figura 26	Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de <i>FRD3</i> y <i>NAS4</i> en las líneas Col-0, <i>HSCB1</i> , <i>HSCB2</i> , <i>hscb1</i> y <i>hscb2</i>	84
Figura 27	Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de <i>FRO2</i> e <i>IRT1</i>	85
Figura 28	Análisis de la actividad ferroquelato reductasa	86
Figura 29	Determinación espectrofotométrica de Fe total de las partes aéreas de las líneas <i>HSCB1</i> , <i>HSCB2</i> , <i>hscb1</i> y <i>hscb2</i>	87
Figura 30	Análisis de la actividad ferroquelato reductasa en raíces de plántulas Col-0, <i>HSCB1</i> , <i>HSCB2</i> , <i>hscb1</i> y <i>hscb2</i>	89
Figura 31	Análisis del contenido de Fe en las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i> en condiciones normales y luego de 48 hs de ausencia de Fe	91
Figura 32	Determinación de la actividad de las enzimas aconitasa y SDH y MDH en las raíces de las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i>	92
Figura 33	Análisis de la actividad de la enzima FRO2 en las raíces de las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i> crecidas bajo condiciones normales y sometidas a 48 hs de ausencia de Fe	93
Figura 34	Análisis de la actividad de las enzimas aconitasa, SDH y MDH en las hojas de las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i> crecidas bajo condiciones normales y sometidas a 48 hs de ausencia de Fe	94
Figura 35	Análisis de crecimiento foliar de las líneas <i>AtHscB-myc</i> y <i>athscb</i> sometidas a 5 días de ausencia de Fe	95
Figura 36	Representación esquemática del modelo de la regulación del transporte del Fe	111

Figura 37 Representación esquemática de los efectos de AtHscB en la regulación de la distribución del Fe en plantas 114

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Localización subcelular y función de Proteínas Fe-S en plantas superiores	4
Tabla 2	Proteínas implicadas en la biogénesis de centros Fe-S	7
Tabla 3	Proteínas involucradas en la síntesis de grupos Fe-S en cloroplastos de <i>Arabidopsis</i>	10
Tabla 4	Proteínas involucradas en la síntesis de grupos Fe-S en mitocondrias	13
Tabla 5	Proteínas responsables de la biogénesis citosólica de grupos Fe-S en <i>Arabidopsis</i>	15
Tabla 6	Antibióticos y compuestos relacionados	32
Tabla 7	Vectores comerciales y derivados de esta tesis	32
Tabla 8	Oligonucleótidos cebadores utilizados en esta tesis	34
Tabla 9	Parámetros cinéticos de AtHscA2 en presencia o ausencia de AtHscB y AtIsu1	58

---

## Abreviaturas

**A<sub>630</sub>**: absorbancia a 630 nm.

**ADN**: ácido desoxiribonucleico.

**ADNc**: ADN copia.

**ADNg**: ADN genómico.

**Amp**: ampicilina.

**ARN**: ácido ribonucleico.

**ARNm**: ácido ribonucleico mensajero.

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

**BSA**: seroalbúmina bobina.

**Cm**: cloranfenicol.

**CBB**: azul de Coomassie.

**c.s.p**: cantidad suficiente para.

**CTAB**: bromuro de cetil trimetil amonio.

**dNTPs**: deoxiribonucleótidos trifosfato.

**DMSO**: dimetilsulfóxido.

**DO<sub>600</sub>**: densidad óptica a 600 nm.

**DTT**: ditioneitol.

**EDTA**: etilendiamino-tetraacetato disódico.

**h**: horas.

**IPTG**: isopentil-tio-galactósido.

**Kan**: kanamicina.

**kDa**: kilodalton.

**LB**: medio de cultivo Luria Bertani.

**MES**: ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico.

**min**: minutos.

**mM**: milimolar.

**NBT**: nitro-blue tetrazolium.

**PAGE**: electroforesis en gel de poliacrilamida.

**PBS**: buffer fosfato de sodio.

**PCR**: reacción en cadena de la polimerasa.

**PMSF**: fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

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

**P/V**: peso en volumen.

**PVDF**: fluoruro de polivinilideno.

**r.p.m**: revoluciones por minuto.

**Seg**: segundos.

**SDS**: dodecilsulfato de sodio.

**TBE**: buffer Tris Borato con EDTA.

**TBST**: buffer Tris HCl con NaCl y Tween20.

**TCA**: ácido tricloracético.

**Tris**: Tris(hidroximetil)aminometano.

**U**: unidad de actividad enzimática.

**V/V**: volumen en volumen.

### Palabras, abreviaturas o expresiones tomadas de idiomas extranjeros

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

**Enhancers**: secuencia de ADN a la que se unen factores de transcripción para aumentar los niveles transcripcionales de los genes.

**Housekeeping**: genes o proteínas propias, característicos.

**in vitro** (latín, *dentro del vidrio*): se refiere a una o determinación experimental realizada en un tubo de ensayos, o en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

**in vivo** (latín, *dentro de lo vivo*): significa "que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo". Hace referencia a experimentos realizados a partir de tejidos, órganos o con organismos completos.

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

**knock-down**: mutación que reduce la expresión de un gen.

**knock-out**: mutación que anula la expresión de un gen.

**loop**: horquilla, cadenas polipeptídicas no estructuradas.

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

**pellet**: precipitado.

**Scaffold**: proteína molde.

**Stock**: almacenamiento o reserva.

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

**Tag**: apéndice utilizado para la purificación de proteínas.

**UTR** (*Untranslated Region* o *Untranslated Trailer*): hace referencia a las regiones no traducidas de los genes.

**Western blot**: ensayos de transferencia de proteínas a membranas de nitocelulosa reveladas por inmunodetección.

## Resumen

Los grupos Fe-S son pequeñas moléculas inorgánicas con capacidad redox que se cuentan 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 inorgánicas requiere de un proceso controlado debido a que los iones  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{S}^{-2}$  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 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. Se propone que los grupos Fe-S son liberados de Isu1, la proteína molde del sistema ISC, mediante la interacción de ésta con HscA, una chaperona de tipo Hsp70, en colaboración con la co-chaperona HscB, que estimula la función ATPasa de HscA. Dicha interacción provocaría un cambio conformacional de la proteína Isu1 y en consecuencia el centro Fe-S se liberaría de la proteína molde.

Diversos estudios realizados, han mostrado que las proteínas que componen la maquinaria de la biogénesis de los centros Fe-S se han conservado en todos los eucariotas. Sin embargo, la chaperona mitocondrial HscA especializada en la formación de centros Fe-S, no fue transferida o no fue mantenida en las eucariotas ancestrales. Los análisis realizados sobre las chaperonas involucradas en la formación de los centros Fe-S han sugerido que la función de HscA fue adoptada por las chaperonas mitocondriales de los diferentes organismos, que además de cumplir su rol en el plegamiento de proteínas, actúan también en la biogénesis de los centros Fe-S.

En *Arabidopsis thaliana*, la proteína molde AtIsu1 y la co-chaperona de tipo J AtHscB han sido halladas y estudiadas. La proteína AtIsu1 se expresa en todos los tejidos de *Arabidopsis* y puede reemplazar funcionalmente a la proteína homóloga Isu1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Plantas de *Arabidopsis* deficientes en AtHscB tienen disminuida la actividad aconitasa y succinato deshidrogenasa, indicando que ésta proteína podría estar involucrada en la formación de los centros Fe-S. Se sabe relativamente de las chaperonas mitocondriales de *Arabidopsis*. Los genes *AtHscA1* y *AtHscA2* surgieron por duplicación

génica y codifican para dos chaperonas mitocondriales que podrían estar involucradas en la biogénesis de centros Fe-S. Previamente, se ha demostrado que AtHscA1 puede reemplazar funcionalmente a Ssq1, la chaperona homóloga en *S. cerevisiae*, sugiriendo que AtHscA1 estaría involucrada en la biosíntesis de los centros Fe-S. Sin embargo, AtHscA2 no ha sido estudiada, y ésta última también podría participar en la vía de formación de los centros Fe-S.

Con el fin de avanzar en la caracterización de la co-chaperona de tipo J de *Arabidopsis thaliana*, los genes AtHscB, AtIsu1 y AtHscA2 se expresaron en un sistema heterólogo bacteriano. La posterior expresión y purificación nos permitió analizar la interacción entre estas proteínas. Además, pudimos determinar la actividad ATPasa de la proteína AtHscA2 y analizar si AtHscB y AtIsu1 eran capaces de modular dicha actividad. De esta primera parte de la tesis, se desprende que AtHscA2 interacciona con AtHscB y AtIsu1 y que dicha interacción modula la actividad ATPasa de la chaperona. Estos resultados indican que, al igual que AtHscA1, AtHscA2 también podría estar involucrada en la biogénesis de los centros Fe-S.

Con la intención de avanzar en la caracterización de AtHscB *in vivo*, en el segundo capítulo de esta tesis, se estudiaron plantas con ganancia y pérdida de función de dicho gen. Los resultados indican que ambos tipos de plantas presentan clorosis y menores áreas foliares que las plantas de tipo salvaje. Además, las plantas sobreexpresantes desarrollan raíces anómalas, con disminución significativa del número y largo de las raíces secundarias. La actividad de enzimas con centros [Fe-S] como aconitasa y succinato deshidrogenasa (SDH) es la esperable en raíces: ligeramente aumentada en las plantas sobreexpresantes (*AtHscB-myc*) y notoriamente disminuida en las mutantes deficientes (*athscb*). Sin embargo, en las hojas, tanto las plantas *AtHscB-myc* como las *athscb* presentan actividades aconitasa y SDH disminuidas. Por otra parte, el análisis de los niveles de los transcritos de aconitasa y SDH mostró un aumento en las hojas de las líneas *athscb* y una reducción de los mismos en las líneas *AtHscB-myc*, con respecto a las hojas de las líneas salvajes.

Estos resultados, junto con evidencias previas que indican que la síntesis de los centros Fe-S afecta al metabolismo del Fe, nos llevaron a estudiar, en el tercer capítulo de la presente tesis, la relación entre AtHscB y la incorporación, la distribución y la regulación del Fe. Se pudo confirmar que la sobreexpresión de AtHscB produce activación del sistema de incorporación de hierro, acumulación del metal en la raíz y reducción en las partes aéreas, mientras que las plantas deficientes presentan acumulación de hierro en las partes aéreas, a

pesar de tener niveles normales de captación de hierro. Además las tinciones de Perls parecen indicar que en las raíces de plantas *athscb* todo el hierro pasa a los haces vasculares, mientras que en las raíces de plantas *AtHscB-myc* el metal estaría atrapado en el espacio simplástico por fuera de las bandas casparianas. Teniendo en cuenta las anomalías en la distribución del hierro, se realizaron diversos experimentos para comprobar el correcto funcionamiento de los mecanismos de homeostasis del Fe. Así, se pudo verificar que la vía de respuesta a la deficiencia de hierro controlada por las partes aéreas opera correctamente, en todas las líneas en estudio. En consecuencia, finalmente, se propone la hipótesis y se aporta evidencia experimental, de que podría existir otro mecanismo regulatorio a nivel del transporte de Fe desde la raíz hacia las hojas, donde podría estar involucrado un sensor conteniendo centros Fe-S, que respondería al Fe acumulado dentro de la raíz. Con estos resultados, hipotetizamos que *AtHscB* podría estar regulando, directa o indirectamente el transporte del Fe desde las raíces hacia las hojas.

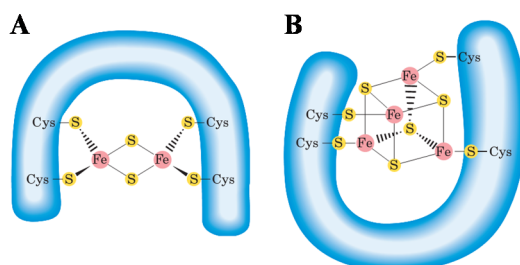
# **1. Introducción**

## 1.1. Importancia biológica de los grupos Fe-S

Los grupos hierro azufre (Fe-S) son pequeñas moléculas inorgánicas que se cuentan entre los cofactores más antiguos y ubicuos en la naturaleza (Beinert et al., 1997). Su importancia radica en la capacidad de óxido-reducción (redox) que reside en su composición química, una propiedad que ha sido extensamente explotada por todos los organismos vivos.

La “*Teoría del mundo de hierro-azufre*” formulada por Günter Wächtershäuser, propone que la vida temprana tuvo origen sobre la superficie de minerales de sulfuro de hierro, poniendo en evidencia el rol clave de estos elementos en el origen de la vida (Wächtershäuser, 1992). Sin lugar a duda, el hierro y el azufre representan dos de los elementos más importantes y versátiles de nuestro planeta, teniendo una gran relevancia biológica ya que forman parte de las enzimas Fe-S involucradas en las rutas metabólicas claves para mantener la vida en la tierra: la fijación de nitrógeno, la fotosíntesis y la respiración (Frazzon and Dean, 2003; Xu and Moller, 2011).

Los centros Fe-S comúnmente encontrados en la naturaleza presentan estructuras rómbicas [2Fe-2S] o cúbicas [4Fe-4S] (Balk and Lobreaux, 2005) y aunque son los más frecuentes, se han encontrado también formas de mayor complejidad estequiométrica como el grupo [8Fe-7S] en la enzima nitrogenasa (Gerber and Lill, 2002). Estos cofactores se unen a las cadenas polipeptídicas por medio de enlaces que se establecen entre los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteínas de las proteínas y los átomos de hierro del cofactor (Figura 1). Existen algunas excepciones como las proteínas [2Fe-2S] *Rieske*, que coordinan los átomos de hierro del cofactor con dos residuos de cisteína y dos de histidina (Rieske et al., 1964).



**Figura 1.** Estequiometrías más frecuentes de los grupos Fe-S. (A) Centro rómbico [2Fe-2S]. (B) Centro cúbico [4Fe-4S]. Tomada de Principios de Bioquímica (Lehninger et al., 1993).

## 1.2. Las proteínas con centros Fe-S

Las proteínas que utilizan como cofactor grupos Fe-S, denominadas ferrosulfoproteínas, están involucradas en diversos procesos celulares de importancia como la transferencia de electrones, la catálisis, la activación de sustratos, la regulación génica, el sensado del estado redox celular y las respuestas a estrés, entre otros (Raulfs et al., 2008). En plantas superiores, las ferrosulfoproteínas son más abundantes en las mitocondrias y cloroplastos, pero también se las encuentra en el citosol y el núcleo (Tabla 1). En los cloroplastos, las principales proteínas Fe-S son la ferredoxina, las proteínas *Rieske* del complejo citocromo *b<sub>6</sub>f* y las subunidades PsaA, PsaB y PsaC del fotosistema I (PSI) que juntas forman parte de la cadena de transferencia de electrones fotosintético. En el estroma, las principales proteínas Fe-S son la glutamato sintasa (GOGAT), la nitrito reductasa y las enzimas de la asimilación de azufre: sulfito reductasa y adenosina 5'fosfosulfato reductasa. Otras ferrosulfoproteínas abundantes son las aconitasas citosólicas y mitocondriales, y varias subunidades de los Complejos I, II y III en la membrana interna mitocondrial (Tabla 1). Basado en la prevalencia de proteínas Fe-S en el metabolismo de la planta, es probable que este cofactor sea uno de los mayores sumideros de hierro en estos organismos (Balk and Pilon).

## 1.3. Biogénesis de los grupos Fe-S

Debido a que el  $\text{Fe}^{+2/+3}$  y  $\text{S}^{-2}$  en sus formas libres son tóxicos para la célula, es necesario que la biosíntesis de los grupos Fe-S se lleve a cabo bajo un proceso controlado, mediado por proteínas específicas. En base a las evidencias bioquímicas y genéticas en bacterias y organismos eucariotas, se han descrito varios complejos proteicos asociados a la biosíntesis de grupos Fe-S. Estos incluyen los sistemas NIF, SUF, ISC y CIA (Balk and Pilon, 2011).

El sistema NIF (*N*itrogen *F*ixation) fue el primero en ser descrito en la bacteria fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* y está exclusivamente relacionado a la maduración de la enzima nitrogenasa, bajo un ambiente estrictamente anaeróbico (Zheng et al., 1993). El sistema SUF (*S*ulfur *U*tilization *F*actor), designado así por su rol en la movilización de sulfuro, se encuentra en numerosas bacterias, arqueas y cloroplastos de plantas pero está ausente en hongos y metazoos. Se postula que este sistema se encuentra

estrechamente relacionado con la formación de grupos Fe-S bajo condiciones de estrés oxidativo y/o deficiencia de hierro que dañan severamente a estos cofactores en el interior de las células (Takahashi and Tokumoto, 2002; Loiseau et al., 2003; Fontecave et al., 2005). El sistema ISC (*Iron-Sulfur Cluster*) representa el mecanismo ubicuo (*housekeeping*) para la maduración de las proteínas Fe-S en la mayoría de las células. Ha sido descrito en bacterias, hongos, insectos, plantas y animales. En eucariotas la maquinaria ISC está localizada en las mitocondrias, posiblemente debido al ambiente reductor provisto por estas organelas, condiciones que favorecen el ensamblado de estos cofactores (Kispal et al., 1999; Muhlenhoff and Lill, 2000). 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. Este sistema fue descrito por primera vez en levaduras pero también está presente en humanos y plantas. Hasta el momento el conocimiento acerca del CIA es relativamente escaso, pero se cree que no sería un sistema completo y dependería de algunos componentes de la mitocondria y del sistema ISC (Kispal et al., 1999; Balk and Pilon, 2011).

**Tabla 1: Localización subcelular y función de Proteínas Fe-S en plantas superiores**

Proteína	Función	Centro Fe-S	Localización <sup>a</sup>
AAO	Aldehído oxidasa. Síntesis ácido abscísico	[2Fe-2S]	Citosol
ACO	Aconitasa	[4Fe-4S]	Mitocondria, Citosol
ADN glicosilasa	Metabolismo del ADN	[4Fe-4S]	Núcleo
ADN helicasa	Metabolismo del ADN	[4Fe-4S]	Núcleo
ADN primasa	Metabolismo del ADN	[4Fe-4S]	Núcleo
ADX	Adrenodoxina. Ferredoxina mitocondrial	[2Fe-2S]	Mitocondria
APS reductasa	Adenosina 5'fosfosulfato reductasa. Asimilación de sulfito.	[4Fe-4S]	Plástido
ATASE	Amidofosforibosiltransferasa. Síntesis de purinas	[4Fe-4S]	Plástido
BIO2	Biotina sintasa	[2Fe-2S], [4Fe-4S]	Mitocondria
CAO	Clorofila a oxigenasa	[2Fe-2S] (tipo Rieske)	Plástido
CMO	Colina monooxigenasa. Síntesis de betaína	[2Fe-2S] (tipo Rieske)	Plástido
Cnx2	Síntesis de molibdeno	[4Fe-4S]	Mitocondria
DRE2	Transferencia de electrones	[2Fe-2S], [4Fe-4S]	Citosol
FD	Ferredoxina	[2Fe-2S]	Plástido
FTR	Ferredoxina-tioredoxina reductasa	[4Fe-4S]	Plástido
GLT1	Glutamato sintasa, NADH-GOGAT	[3Fe-4S], [4Fe-4S]	Plástido
HCF101	Ensamblado del Fotosistema I	[4Fe-4S]	Plástido
LIP1	Lipoato sintasa	[4Fe-4S]	Mitocondria, plástido
NAR1	Fe-Fe hidrogenasa	[4Fe-4S]	Citosol
NBP35	P-loop NTPasa	[4Fe-4S]	Citosol
NdhI, NdhK	Subunidades NAD(P)H-deshidrogenasa	[4Fe-4S]	Plástido
NIR1	Nitrito reductasa	[4Fe-4S]	Plástido
NTH1	Endonucleasa III	[4Fe-4S]	Núcleo
PAO	Feofórbido a oxigenasa. Degradación de clorofila	[2Fe-2S] (tipo Rieske)	Plástido
PetC	Subunidad complejo citocromo b <sub>6</sub> f	[2Fe-2S] (tipo Rieske)	Plástido
Proteína Rieske	Subunidad ubiquinol-citocromo C reductasa, CIII	[2Fe-2S] (tipo Rieske)	Mitocondria
PsaA, PsaB, PsaC	Subunidades Fotosistema I	[4Fe-4S]	Plástido
PSST, TYKY, 24 kDa, 51kDa, 75kDa	Subunidades NADH-ubiquinona oxidoreductasa, CI	[2Fe-2S], [4Fe-4S]	Mitocondria
RAD3	Helicasa. Reparación ADN	[4Fe-4S]	Núcleo
RNAP	ARN polimerasa I y III, subunidad D	[4Fe-4S]	Núcleo
SDH	Subunidad 2 Succinato deshidrogenasa CII	[2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S]	Mitocondria
SIR1	Sulfito reductasa	[4Fe-4S]	Plástido
SIRB	Sirohidroclorin ferroquelatasa. Síntesis de sirohemo	[2Fe-2S]	Plástido

<sup>a</sup> Proteínas Fe-S encontradas en diversas vías metabólicas en plantas, incluidas fotosíntesis, respiración, asimilación de nitrógeno y azufre, reparación al ADN y cofactores de biosíntesis. La mayoría de las proteínas Fe-S se encuentran en cloroplastos (plástidos) y mitocondria. Adaptado de (05Balk and Lobreaux, 2005) y (11Balk and Pilon, 2011).

### 1.3.1. Origen y evolución

La evolución en los mecanismos de biosíntesis de los grupos Fe-S refleja el cambio en la composición química de la atmósfera desde un origen primitivo anóxico a la producción de oxígeno con la aparición de las cianobacterias. En este contexto, la maquinaria NIF, estrictamente anóxica, habría sido la primera en surgir seguida por los sistemas ISC y SUF. Aunque es difícil establecer cuál fue el segundo mecanismo en aparecer, existen evidencias que apoyan la idea de que el sistema ISC, por ser anaeróbico aunque tolerante al oxígeno, habría surgido antes que el SUF que es aeróbico. Además en base a la similitud y características de secuencias, las proteínas que componen el ISC tienen mayor relación con las del NIF que las del SUF. Sin embargo, si el segundo sistema se originó a partir de las cianobacterias, debería ser tolerante al oxígeno como lo es el SUF (Xu and Moller, 2011).

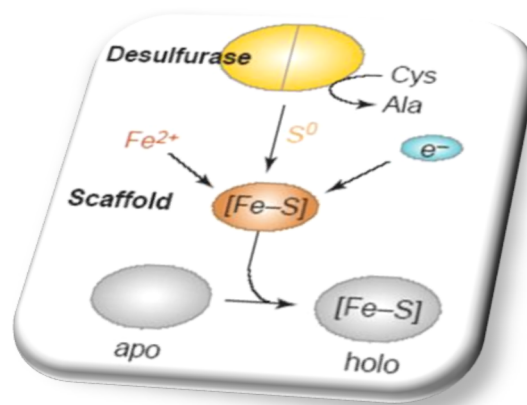
Los componentes de los sistemas de biosíntesis de grupos Fe-S eucarióticos derivan de sus homólogos bacterianos. En *Synechocystis* la biogénesis de estos cofactores es realizada por el sistema SUF, como consecuencia el cloroplasto en plantas y el apicoplasto en *Plasmodium*, que derivaron de estas cianobacterias por endosimbiosis, presentan un sistema SUF funcional. Del mismo modo, las mitocondrias eucariotas heredaron un sistema ISC de las protobacterias. En la actualidad, es difícil localizar el sistema de la CIA en este contexto evolutivo (Xu and Moller, 2011).

### 1.3.2. Mecanismo general para el ensamblado de los grupos Fe-S

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 (Figura 2). En la primer etapa, el azufre es movilizado desde una cisteína por la enzima cisteína desulfurasa dependiente de piridoxal 5' fosfato (PLP) denominadas NifS, SufS o IscS, según el sistema al cual pertenezcan. Esta reacción genera un persulfuro (S-SH) unido a un residuo de 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), reduciéndolo a  $S^{-2}$  y posteriormente se combina con el  $Fe^{+2}$  para formar el grupo Fe-S. Algunos pasos redox adicionales son necesarios para permitir la formación de grupos Fe-S con diferentes estequiometrías (2Fe-2S o 4Fe-4S). En la segunda etapa, el centro Fe-S es transferido a la apoproteína blanco donde se

une a residuos de cisteína. El proceso de transferencia además requiere de chaperonas y/o proteínas de transferencia que confieren especificidad (Balk and Pilon, 2011). Si bien el mecanismo descrito anteriormente es un esquema simplificado que se aplica a todos los sistemas de ensamblado conocidos (NIF, SUF e ISC), existen una gran cantidad de proteínas implicadas en este proceso (Tabla 2).

Cabe mencionar que un organismo puede contener más de un sistema para el ensamblado de los grupos Fe-S a la vez. Por ejemplo, *A. vinelandii* presenta los sistemas NIF e ISC; *Escherichia coli*, los sistemas ISC y SUF; *Plasmodium* y *Chlamydomonas* utilizan el sistema SUF en cloroplastos e ISC en mitocondrias; levaduras y humanos presentan los sistemas ISC en mitocondrias y CIA en citosol, mientras que las plantas, utilizan los sistemas SUF en cloroplastos, ISC en mitocondrias y CIA en el citosol (Balk and Pilon, 2011; Xu and Moller, 2011).



**Figura 2.** Representación esquemática de los pasos básicos de la biosíntesis de los grupos Fe-S. Tomado de (Balk and Lobreaux, 2005)

Tabla 2. Proteínas implicadas en la biogénesis de grupos Fe-S

Función	<i>Bacteria</i>		<i>Plasmodium</i>		<i>Arabidopsis</i>		<i>Levadura</i>		<i>Humanos</i>	
	Nombre	Localización	Nombre	Localización	Nombre	Localización	Nombre	Localización	Nombre	Localización
<b>SUF</b> Transferencia de Fe-S	SufA	PFE1135w	Api	AtSufA	Clo					
Molde	SufB	SufB	Api	AtSufB	Clo					
Molde	SufC	PF14_0133	Api	AtSufC	Clo					
Molde	SufD	PF11_0044	Api	AtSufD	Clo					
Cisteína Desulfurasa	SufS	PF07_0068	Api	AtSufS	Clo					
Activador de SufS	SufE	PFB0270w	Api	AtSufE1	Clo, Mit					
Activador de SufS				AtSufE2	Clo					
Activador de SufS				AtSufE3	Clo					
Molde	NfuA	PF11050c	Api	AtNfu1	Clo					
Molde				AtNfu2	Clo					
Molde				AtNfu3	Clo					
Inserción de 4Fe-4S				HCF101	Clo					
Transferencia de 2Fe-2S				GrxS12	Clo					
Transferencia de 2Fe-2S				GrxS14	Clo					
Transferencia de 2Fe-2S				GrxS16	Clo					
Transferencia de 2Fe-2S				GrxC5	Clo					
<b>ISC</b> Regulador	IscR									
Molde	IscU	PF14_0518	Mit	AtIscU1	Mit, Cit	Isu1	Mit	ISCU	Mit, Cit	
Molde				AtIscU2	Mit	Isu2	Mit			
Molde				AtIscU3	Mit					
Cisteína Desulfurasa	IscS	MAL7P1	Mit	AtIscS	Mit	Nfs1	Mit, Cit	ISCS	Mit, Cit	
Transferencia de Fe-S	IscA	PFB0320c	Mit	AtIscA1	Mit	Isa1	Mit	ISCA1	Mit, Cit	
Transferencia de Fe-S		PFC1005c	Mit	AtIscA2	Mit	Isa2	Mit	ISCA1L	Mit	
Transferencia de Fe-S				AtIscA3	Mit			ISCA2	Mit	
Chaperona HSP70	HscA	PF11_0351	Mit	AtHscA1	Mit, Cit	Ssq1	Mit	HSPA9	Mit	
Chaperona HSP70				AtHscA2	Mit					
Co-chaperona	HscB	PF10985c	Mit	AtHscB	Mit, Cit	Jac1	Mit	HSCB	Mit	
Posible dador de Fe	CyaY			AtFH	Mit	Yfh1	Mit	FXN	Mit, Cit	
Transferencia de electrones	Fdx	PFL0705c	Mit	AtFdx	Mit	Yah1	Mit	FDX1	Mit	
Transferencia de electrones	FNR	PF11_0407	Mit	AtFdr	Mit	Arh1	Mit	FDXR	Mit	
Molde	NfuA	PF11835c	Mit	AtNfu4	Mit	Nfu1	Mit	NFU1	Mit, Cit	
Molde				AtNfu5	Mit					
Transferencia de Fe-S	Grx4	PFF0340	Mit	AtGrx4	Mit	Grx5	Mit	GLRX5	Mit	
Interacción con IscS		MAL13p1	Mit	AtIsd11	Mit	Isd11	Mit	ISD11	Mit, Cit	
Intercambio de nucleótido		PF11_0258	Mit	AtMge1a	Mit	Mge1	Mit	GrpE1	Mit	
Intercambio de nucleótido				AtMge1b	Mit			GrpE2	Mit	
Aminometiltransferasa				AtIba57	Mit	Iba57	Mit	C1orf69	Mit	
Transferencia/inserción de Fe-S				AtInd1	Mit	Ind1	Mit	Ind1	Mit	
Activador de IscS?				AtSufE	Mit, Clo					
<b>CIA</b> Molde		PF11_0296	Cit			Cfd1	Cit	NUBP2	Cit	
Molde		PF10525w	Cit	AtNbp35	Cit	Nbp35	Cit	NUBP1	Cit	
Transferencia de Fe-S				AtNar1	Cit	Nar1	Cit	NARF	Cit	
Transferencia de Fe-S				AtCia1a	Cit	Cia1	Cit	CIAO1	Cit	
Transferencia de Fe-S				AtCia1b	Cit					
Transferencia de electrones		MAL8P1	Cit	AtDre2	Cit	Dre2	Cit, Mit	CIAPIN1	Cit, Mit	

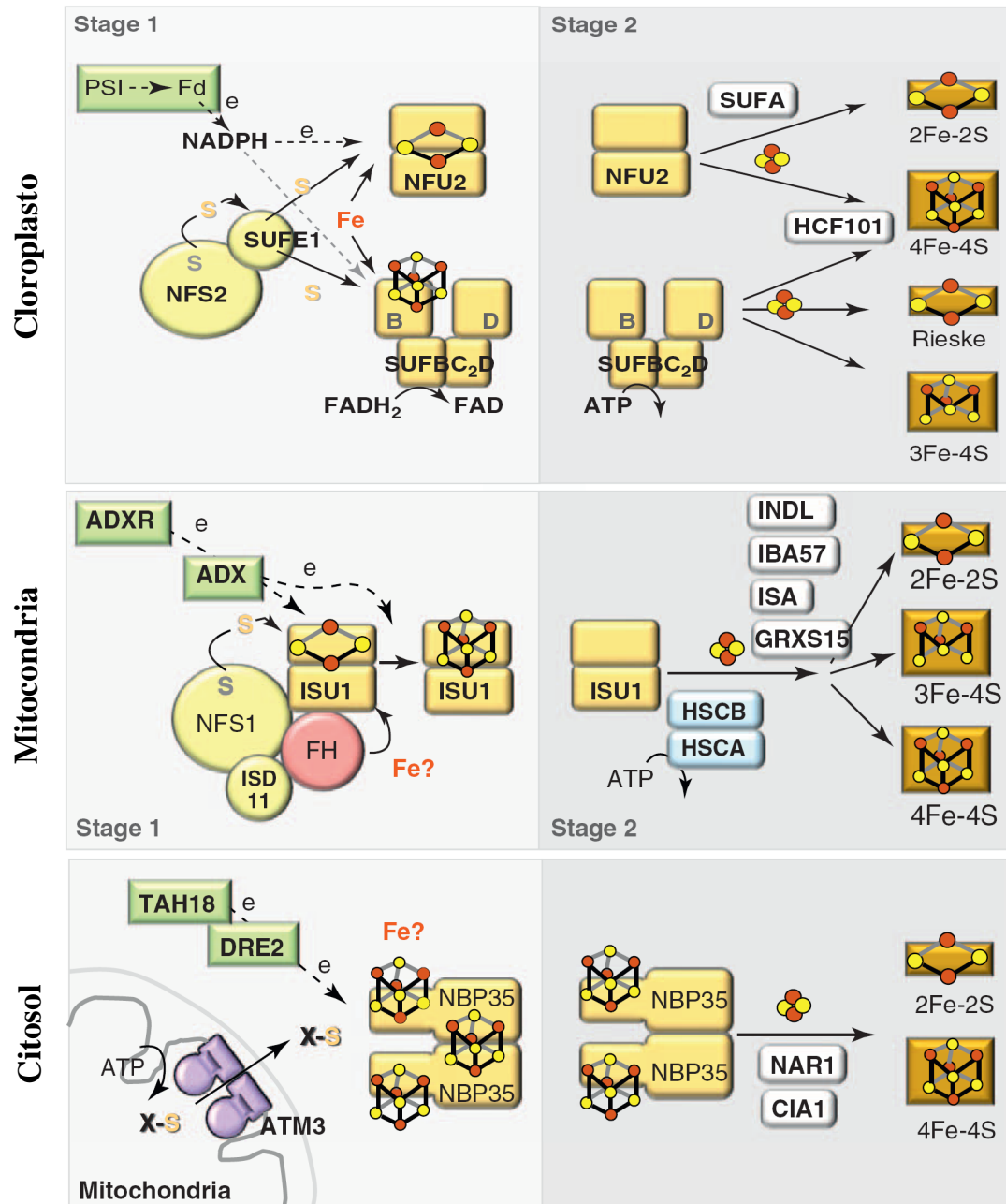
Ref: *SUF* (*sulfur utilization factor*), síntesis de grupos Fe-S en plástidos; *ISC* (*iron-sulfur cluster*), biogénesis mitocondrial de grupos Fe-S; *CIA* (*cytosolic iron-sulfur assembly*), complejo citosólico para la síntesis de proteínas Fe-S. Mit, mitocondria; Cit, citosol; Clo, cloroplasto; Api, apicoplasto. *Bacteria*, *Escherichia coli*; *Plasmodium*, *P. falciparum*; *Arabidopsis*, *A. thaliana*; *Levadura*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Humanos*, *Homo sapiens*. Adaptado de (Xu and Moller, 2011).

## 1.4. Biogénesis de grupos Fe-S en plantas

Las ferrosulfoproteínas vegetales se encuentran entre las primeras proteínas con centros Fe-S identificadas. El ensamblado postraduccional de estas proteínas se estudió incluso antes de que se describieran los mecanismos para la biosíntesis de estos cofactores (Pagani et al., 1984; Takahashi et al., 1986; Merchant and Dreyfuss, 1998). En la actualidad está claro que la biogénesis de los grupos Fe-S en plantas es un proceso complicado, no sólo porque la síntesis está separada espacialmente en diferentes compartimentos celulares sino también porque los mecanismos involucran más componentes que en las bacterias. Además, la regulación y la comunicación entre los sistemas parecen ser complejas y en su gran mayoría desconocidos (Xu and Moller, 2011). Como se mencionó anteriormente, de acuerdo con la teoría endosimbiótica, las mitocondrias se originaron a partir de las proteobacterias (en particular, *Rickettsiales*) y los cloroplastos de las cianobacterias, heredando los sistemas de producción de grupos Fe-S de sus antepasados. Debido a esto, cada organela contiene su propia maquinaria para la biosíntesis de grupos Fe-S (Balk and Lobreaux, 2005; Pilon et al., 2006; Balk and Pilon, 2011; Xu and Moller, 2011). Los cloroplastos tienen un sistema SUF completo similar al bacteriano, mientras que las mitocondrias presentan un sistema ISC (Figura 3) (Balk and Pilon, 2011; Xu and Moller, 2011). Además, como los cofactores Fe-S también son requeridos en el citosol y el núcleo, las plantas presentan un sistema citosólico similar al de levaduras denominado CIA (Figura 3) (Lill and Muhlenhoff, 2008; Xu and Moller, 2011).

### 1.4.1. Biosíntesis de grupos Fe-S en el cloroplasto: Sistema SUF

El ensamblado de los grupos Fe-S en cloroplastos de plantas es realizado por el sistema SUF (Figura 3). El primer componente identificado de esta vía fue la cisteína desulfurasa cloroplástica AtNfs2/CpNifS (Leon et al., 2002; Pilon-Smits et al., 2002). 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 y una reducción en la abundancia de todas las ferrosulfoproteínas analizadas. Sin embargo, las funciones mitocondriales no se encontraron afectadas sugiriendo que la síntesis de grupos Fe-S mitocondrial y cloroplástica serían independientes (Van Hoewyk et al., 2007).



**Figura 3. Modelos propuestos para la síntesis de grupos Fe-S en plantas.** El proceso puede ser dividido en dos etapas: 1) movilización del azufre (S) y unión a una proteína molde y 2) transferencia del Fe-S a la apoproteína. Los círculos amarillos representan las proteínas involucradas en la movilización del S y frataxina (FH), un posible dador de hierro, en rosa. Las proteínas molde se muestran como rectángulos naranja, los dadores de electrones como rectángulos verdes, las chaperonas celestes y ATM3 en violeta. En blanco se indican las proteínas con otras funciones y en marrón las proteínas Fe-S maduras. Los grupos Fe-S con distinta estequiometría están indicados como modelo bola -palo (sulfuro amarillo y hierro rojo). La transferencia de electrones está indicada como líneas punteadas. PSI, fotosistema I; Fd ferredoxina. Mediante estudios con mutantes de *Arabidopsis* se determinó la importancia fisiológica del correcto ensamble de grupos Fe-S con sus apoproteínas. El rol de SUFA, ISD11, INDL, IBA57, ISA, GRXS15 y CIA1 se adjudicó a partir de modelos por homología con ADRR y ADX de bacterias y levaduras. Tomada de (Balk and Pilon, 2011)

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 SUFB<sub>CD</sub> y las proteínas NFU1-3 (Figura 3 y Tabla 3) (Balk and Pilon, 2011). Las proteínas SUFB<sub>CD</sub> forman el complejo BC<sub>2</sub>D con homología estructural a la familia de proteínas no integrales ABC, propuesto como el principal *scaffold* de la maquinaria cloroplástica SUF (Takahashi et al., 1991). El otro tipo de *scaffold* en plantas, las proteínas NFU, presentan similitud de secuencia con la región C terminal de NifU de *Azotobacter vinelandii*, una proteína molde requerida para la maduración de la enzima nitrogenasa. De las cinco isoformas de NFU presentes en *Arabidopsis*, Nfu1, Nfu2 y Nfu3 son dirigidas hacia los cloroplastos, mientras que Nfu4 y Nfu5 tienen localización mitocondrial (Leon et al., 2003). La mutación en el gen *Nfu2* que codifica para la isoforma plastídica más abundante, produce plantas pequeñas con síntomas de clorosis, disminución en la actividad del fotosistema I y reducción en la abundancia de algunas proteínas Fe-S cloroplásticas, como la enzima con grupo [4Fe-4S] sulfito reductasa. Además, se ha demostrado que AtNfu2 recombinante es capaz de unir un grupo [2Fe-2S] y transferirlo *in vitro* a una apo-ferredoxina (Touraine et al., 2004; Yabe et al., 2004).

**Tabla 3. Proteínas involucradas en la síntesis de grupos Fe-S en cloroplastos de *Arabidopsis*.**

Nombre	Locus	Función
NFS2/CpNifS/CpSufS <sup>a,b</sup>	At1g08490	Cisteína desulfurasa
SUFE1 <sup>a,b</sup>	At4g26500	Activador de NFS2, NFS1
SUFE2	At1g67810	Activador de NFS2
SUFE3 <sup>a,b</sup>	At5g50210	Activador de NFS2
SUFB/NAP1 <sup>a</sup>	At4g04770	Molde ( <i>Scaffold</i> )
SUFC/NAP7 <sup>a,b</sup>	At3g10670	Molde ( <i>Scaffold</i> )
SUFD/NAP6 <sup>a,b</sup>	At1g32500	Molde ( <i>Scaffold</i> )
NFU1	At4g01940	Molde ( <i>Scaffold</i> )
NFU2/CnfU <sup>a</sup>	At5g49940	Molde ( <i>Scaffold</i> )
NFU3	At4g25910	Molde ( <i>Scaffold</i> )
SUFA/CpIscA <sup>a</sup>	At1g10500	Transferencia del grupo Fe-S
HCF101 <sup>a</sup>	At3g24430	Inserción de 4Fe-4S
GRXS14 <sup>a</sup>	At3g54900	Transferencia de 2Fe-2S
GRXS16	At2g38270	Transferencia de 2Fe-2S

<sup>a</sup>Proteínas cuya función se asignó a partir del análisis fenotípico de mutantes con pérdida de función.

<sup>b</sup>Proteínas esenciales para el desarrollo embrionario. Tomada de (11Balk and Pilon, 2011).

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 (Tabla 3). Todas estas proteínas son capaces de unir grupos Fe-S y transferirlos a apoproteínas, *in vitro*, sugiriendo que estarían involucradas en la liberación de los grupos Fe-S en cloroplasto (Lezhneva et al., 2004; Abdel-Ghany et al., 2005; Bandyopadhyay et al., 2008; Schwenkert et al., 2009).

A pesar de los avances hasta el momento se desconoce cuál sería la fuente de Fe para el sistema SUF en el cloroplasto. Originalmente se suponía que ferritina, por su capacidad de unir hierro, era la encargada de cumplir esta función. Un trabajo realizado recientemente 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 (Ravet et al., 2009; Balk and Pilon, 2011). Hasta el momento no se sabe cuál sería el componente involucrado en ceder los átomos de Fe en este sistema.

#### 1.4.2. Producción mitocondrial de grupos Fe-S: Sistema ISC

La biogénesis de los grupos Fe-S en mitocondrias de plantas es llevada a cabo por el sistema ISC (Figura 3). El primer paso de esta ruta biosintética en *Arabidopsis* está catalizado por la cisteína desulfurasa AtNfs1/AtIscS. 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 (Kushnir et al., 2001; Frazzon et al., 2007). 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 (Adam et al., 2006; Wiedemann et al., 2006; Pandey et al., 2012). El gen *Isd11* está muy conservado entre los eucariotas y no se encuentra en bacterias (Richards and van der Giezen, 2006). El genoma de *Arabidopsis* codifica para un posible homólogo a *Isd11*, pero hasta el momento no ha sido caracterizado (Richards and van der Giezen, 2006; Balk and Pilon, 2011).

Las cisteína desulfurasas pueden catalizar la formación de grupos Fe-S *in vitro* en presencia de hierro en forma ferrosa pero se cree que en las mitocondrias de levaduras,

humanos y plantas es frataxina quien cede los átomos de hierro (Balk and Pilon, 2011; Busi and Gomez-Casati, 2012). En *Arabidopsis* la proteína homóloga a la frataxina de humanos, AtFH (Figura 3 y Tabla 4), se expresa en raíces, hojas y flores, con mayores niveles en este último órgano (Busi et al., 2006). 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 (Busi et al., 2006; Vazzola et al., 2007).

Los genes que codifican para las proteínas molde del sistema ISC de *Arabidopsis* (*AtIscU1-3*) están relacionados con sus contrapartes bacterianas y eucariotas (Tabla 2). Estas proteínas pueden unir hierro *in vitro* y tienen un rol clave en la formación de los grupos Fe-S (Leon et al., 2005; Frazzon et al., 2007). 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 (Leon et al., 2005). Las tres proteínas AtIsu1-3 se localizan en las mitocondrias siendo AtIsu1 capaz de ensamblar grupos [2Fe-2S] en presencia de AtNfs1 *in vitro* (Tabla 4) (Kushnir et al., 2001; Frazzon et al., 2007).

En *Escherichia coli*, se demostró que la proteína IscU, la cisteína desulfurasa (IscS) y el homólogo a frataxina (CyaY), forman *in vitro* un complejo capaz de ensamblar [2Fe-2S] sobre IscU, así como también se informó la formación de un complejo similar en humanos compuesto por Nfs1-Isd11-FXN-IscU2 (Layer et al., 2006; Tsai and Barondeau, 2010). En *Arabidopsis*, existen evidencias de la interacción directa entre AtNfs1 con AtFH (Turowski et al., 2012), sugiriendo que en plantas, también podría formarse un complejo similar al de humanos.

La liberación de los grupos Fe-S desde las proteínas *scaffold* y su transferencia e incorporación a las apoproteínas es facilitada por los últimos componentes de la maquinaria de ensamblado ISC (Figura 3 y Tabla 4). Los grupos Fe-S son liberados de la proteína molde mediante la interacción de Isu1-2 con la chaperona Hsp70 Ssq1 (HscA) y la co-chaperona tipo Dnaj, Jac1 (HscB) que estimula la función ATPasa de HscA (Vickery and Cupp-Vickery, 2007; Xu et al., 2009; Balk and Pilon, 2011). En *Arabidopsis*, *AtHscB* se expresa de forma ubicua en toda la planta, pero los mayores niveles expresión se encuentran en anteras y tricomas. En plantas mutantes homocigotas para este gen la producción de semillas se

encuentra afectada y hay menor actividad catalítica de las enzimas mitocondriales con grupos Fe-S (Xu et al., 2009). 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 (Tabla 4). En el genoma de *Arabidopsis* existe un gen homólogo a *Grx5* de levaduras denominado *AtGrx15* (Balk and Pilon, 2011). *Grx5* tiene un rol central en el proceso de ensamblado de los grupos Fe-S a través de la interacción con las proteínas *scaffold* Isa1 e Isa2 (Kim et al., 2010). En levaduras mutantes la delección de *Grx5* provoca estrés oxidativo, acumulación de hierro y deficiencia en la biogénesis de grupos Fe-S (Rodríguez-Manzanares et al., 2002).

**Tabla 4. Proteínas involucradas en la síntesis de grupos Fe-S en mitocondrias**

Nombre	Locus	Función
NFS1/NifS <sup>a,b</sup>	At5g65720	Cisteína desulfurasa
ISD11 <sup>c</sup>	At5g61220	Interacción con NFS1?
SUFE1 <sup>a,b</sup>	At4g26500	Activador de NFS1?
ADXR/MFDR	At4g32360	Transferencia de electrones
ADX1/MDFX2	At4g21090	Transferencia de electrones
ADX2/MDFX1	At4g05450	Transferencia de electrones
ISU1/IscU1 <sup>a,b</sup>	At4g22220	Molde ( <i>Scaffold</i> )
ISU2/IscU2	At3g01020	Molde ( <i>Scaffold</i> )
ISU3/IscU3	At4g04080	Molde ( <i>Scaffold</i> )
FH <sup>a,b</sup>	At4g03240	Homólogo a frataxina, dador de hierro
NFU4/NFU-III	At3g20970	Posible molde ( <i>scaffold</i> )
NFU5/NFU-I	At1g51390	Posible molde ( <i>scaffold</i> )
HSCA1/mtHSC70-1	At4g37910	Tipo chaperona HSP70 ( <i>Heat shock protein</i> )
HSCA2/mtHSC70-5	At5g09590	Tipo chaperona HSP70
HSCB <sup>a,b</sup>	At5g06410	Co-chaperona
INDL <sup>a,b</sup>	At4g19540	Transferencia/inserción del grupo Fe-S
ISA <sup>c</sup>	At2g16710	Transferencia del grupo Fe-S
	At2g36260	Transferencia del grupo Fe-S
	At5g03905	Transferencia del grupo Fe-S
IBA57	At4g12130	Aminometiltransferasa
GRXS15	At3g15660	Glutaredoxina

<sup>a</sup>Proteínas cuya función se asignó a partir del análisis fenotípico de mutantes con pérdida de función.

<sup>b</sup>Proteínas esenciales para el desarrollo embrionario. <sup>c</sup> no caracterizada en plantas/algas. Tomada (Balk and Schaedler, 2014).

### 1.4.3. Biogénesis de grupos Fe-S en el citosol: Sistema CIA

El sistema para la biosíntesis de grupos hierro-azufre en el citosol CIA fue descrito por primera vez en levaduras (Tabla 2). Este mecanismo es esencial para la maduración de las proteínas Fe-S citosólicas y nucleares y se caracteriza por depender del sistema ISC mitocondrial (Xu and Moller, 2008). El modelo más aceptado sugiere que la mitocondria exporta hacia el citosol un compuesto aun no identificado, sintetizado por el sistema ISC, que es utilizado por la maquinaria de ensamblado citosólica CIA (Figura 3). La exportación está mediada por componentes de la maquinaria de ISC que involucra a la proteína Atm1, al transportador ABC de la membrana interna mitocondrial y a la sulfidril oxidasa Erv1, localizada en el espacio intermembrana. Posteriormente, los grupos Fe-S son ensamblados sobre las NTPasas P-loop, Cfd1 y Nbp35 que forman un complejo con función de *scaffold* en el citosol donde las proteínas Tah18 y Dre2 proveen el poder reductor (Bych et al., 2008; Netz et al., 2010). Finalmente los grupos Fe-S son transferidos a las apoproteínas por acción del complejo de transferencia CIA compuesto por Nar1, y las proteínas Cia1, Cia2 y Met 18. Nar1 es una [FeFe] hidrogenasa capaz de unir grupos Fe-S y Cia1 es una proteína del tipo WD40 que favorecería las interacciones proteína-proteína (Balk and Pilon, 2011; Xu and Moller, 2011; Luo et al., 2012). El genoma de *Arabidopsis* codifica para todos los componentes homólogos al sistema CIA de levaduras excepto por Cfd1 (Tabla 5), aunque solo unos pocos han sido caracterizados (Balk and Pilon, 2011). *Arabidopsis* posee tres genes que codifican para proteínas pertenecientes a la subfamilia B de transportadores tipo ABC (*ATP-binding cassette transporter*) denominadas ATM1, ATM2 y ATM3 con ubicación mitocondrial (Chen et al., 2007). El análisis fenotípico de plantas mutantes demostró que sólo AtATM3 es importante para el desarrollo de *Arabidopsis*. En efecto, plantas *atm3* (*knock-out*) presentaron menores niveles de actividad para las enzimas Fe-S citosólicas como la aconitasa [4Fe-4S], aldehído oxidasa y xantino deshidrogenasa (2Fe-2S- MoCo-FAD). Se ha propuesto que AtATM3 (STA1/ABCB25) formaría un homodímero localizado en la membrana mitocondrial interna y que translocaría un compuesto azufrado del sistema ISC (X-S, Figura 3) requerido para el ensamblado de los grupos Fe-S y el cofactor molibdeno en el citosol (Bernard et al., 2009). Notablemente las mutantes homocigotas en *ATM1* de levaduras o *ATM3* de *Arabidopsis* no son letales, sugiriendo que el/los componentes necesarios para la síntesis de los grupos Fe-S en el citosol pueden ser transportados, aunque con menor

eficiencia, por otras proteínas o atravesar la membrana en pequeñas cantidades por difusión (Balk and Pilon, 2011).

**Tabla 5. Proteínas responsables de la biogénesis citosólica de grupos Fe-S en *Arabidopsis***

Nombre	Locus	Función
ATM3/STA1/ABCB25 <sup>a,b</sup>	At5g58270	Transportador tipo ABC mitocondrial
ERV1	At1g49880	Sulfhidril oxidasa, esencial para la respiración.
TAH18/ATR3 <sup>a,b</sup>	At3g02280	Transferencia de electrones
DRE2/CIAPIN1	At5g18400	Transferencia de electrones
NBP35 <sup>a,b</sup>	At5g50960	Molde ( <i>Scaffold</i> )
NAR1/GOLLUM <sup>a,b</sup>	At4g16440	Tipo hidrogenasa [FeFe]
CIA1/emb1345 <sup>a,b</sup>	At2g26060	Armado de grupos Fe-S en el citosol
CIA2/AE7	At1g68310	
	At3g50845	
HSCA1	At4g37910	Tipo chaperona HSP70
HSCB	At5g06410	Co-chaperona

<sup>a</sup>Proteínas cuya función se asignó a partir del análisis fenotípico de mutantes con pérdida de función.

<sup>b</sup>Proteínas esenciales para el desarrollo embrionario. Tomada de (11Balk and Pilon, 2011).

## 1.5. Relación del ensamblado de los grupos Fe-S y el metabolismo del Fe

La demanda del cofactor Fe-S en las células fluctúa dependiendo de los niveles de la expresión las proteínas que unen Fe, las cuáles varían en los diferentes tejidos y estados desarrollo. Cuando el Fe se vuelve limitante dentro de la célula, las proteínas esenciales que contienen Fe son priorizadas y sus niveles mantenidos, mientras que disminuyen los niveles de las hemo y ferrosulfoproteínas no esenciales (Balk and Schaedler, 2014). Por ejemplo, en plantas superiores sometidas a deficiencia de Fe se degradan los grupos hemo y los centros Fe-S, con el fin de liberar y reutilizar el Fe para los requerimientos esenciales (Darbani et al., 2013).

El aumento de las especies reactivas del oxígeno, se relaciona con el desbalance del Fe dentro de las células, el cual podría ser debido a defectos de la formación de los centros Fe-S como a la deficiencia de Fe dentro de las mismas (Balk and Pilon, 2011; Vigani, 2012). El estado redox de las organelas puede ser monitoreado por la producción de ROS, el cual a su vez, está asociado a con cambios en la expresión génica nuclear (Apel and Hirt, 2004). La

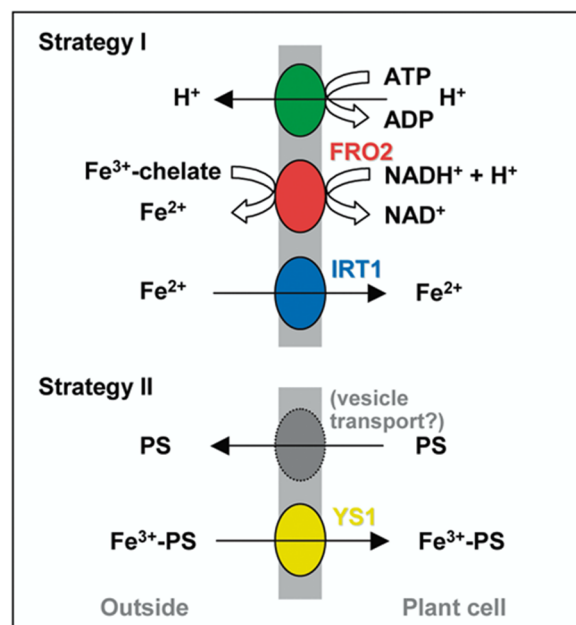
función de ROS en la señalización retrógrada ha sido cuestionada debido a su inespecificidad para actuar como molécula señal. Sin embargo, se postuló que ROS actuaría indirectamente generando péptidos específicos, que podrían actuar como señalizadores en la regulación retrógrada. Dichos péptidos derivarían en la ruptura proteolítica y el daño oxidativo de proteínas mitocondriales (Moller and Sweetlove, 2010). La degradación de estos compuestos, por el aumento de ROS en la célula, podría generar péptidos que contengan centros Fe-S oxidados, que podrían funcionar como moléculas señal de desbalance de Fe en plantas (Vigani, 2012).

En mamíferos y en levaduras, la regulación celular del Fe ocurre predominantemente a nivel post-transcripcional e implica proteínas que contienen centros Fe-S oxidados. En mamíferos, las maquinarias CIA e ISC son críticas para la regulación de la incorporación del Fe. Sin embargo en plantas, el mecanismo del sensado del Fe permanece desconocido (Balk and Schaedler, 2014).

### **1.5.1. Incorporación del Fe en plantas**

El hierro es un metal esencial para el crecimiento de las plantas, sin embargo, puede ser altamente tóxico dentro de la célula. Debido a esto, las plantas deben controlar la homeostasis del hierro, regulando así, la deficiencia como la sobrecarga de este metal (Morrissey and Guerinot, 2009). En un medio oxidante, la concentración de Fe soluble es baja; y el hierro presente en los suelos se encuentra formando quelatos férricos (Buckhout et al., 2009). Las plantas han desarrollado dos estrategias diferentes para captar el Fe de los suelos e incorporarlo a las células epidérmicas de la raíz. Las plantas gramíneas utilizan la estrategia II para la incorporación del Fe. Dicha estrategia, se basa en el quelado de los metales del suelo para luego incorporarlos en las células epidérmicas de la raíz. El Fe es quelado por fotosideróforos solubles con una alta afinidad a  $\text{Fe}^{3+}$ . Los fotosideróforos están formados por la familia de ácido mugineico (MA) que son sintetizados a partir de metionina y liberados desde la epidermis la raíz, quizás vía canales aniónicos o vesículas. El complejo Fe-PS es transportado dentro de la planta vía un transportador *yellow stripe1* (YS1). Las plantas dicotiledóneas y las monocotiledóneas no gramíneas utilizan la estrategia I para la incorporación del Fe. Dicha estrategia incluye la liberación de protones al medio por una proteína AHA que tiene actividad  $\text{H}^+$  ATPasa. La disminución del pH del suelo produce la

solubilización del hierro. La reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  es llevada a cabo por una ferroquelato reductasa dependiente de NADPH (FRO2). Los electrones son transferidos desde NADPH a través de cuatro grupos hemo, para así reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  que se encuentra en el suelo. La reducción del Fe, parece ser el paso limitante en la incorporación del Fe en *Arabidopsis*. La sobreexpresión de FRO2 en plantas de *Arabidopsis*, arroz y soja, ha aumentado su tolerancia a suelos deficientes de Fe (Connolly et al., 2003; Vasconcelos et al., 2006; Ishimaru et al., 2007). El  $\text{Fe}^{2+}$  resultante, es transportado dentro de las células epidérmicas de la raíz mediante el transportador de metales divalentes (IRT1) (Morrissey and Guerinot, 2009). IRT1 no es un transportador específico de Fe, ya que también puede transportar metales, como Zn, Mn, Cd, Co y Ni (Morrissey and Guerinot, 2009).



**Figura 4. Representación esquemática de la incorporación del Fe en raíces.** Las plantas dicotiledóneas utilizan la estrategia I, caracterizada por la inducción de FRO2, IRT1 y la  $\text{H}^+$  ATPasa a nivel de la membrana plasmática. Las plantas monocotiledóneas presentan el mecanismo de la estrategia II, caracterizado por la producción y la liberación de fotosideroforos en la rizósfera y la incorporación  $\text{Fe}^{3+}$ -PS. Tomado de (Hell and Stephan, 2003)

### 1.5.2. Transporte del Fe desde la raíz hacia las hojas

Una vez que el Fe entra de las células epidérmicas de la raíz, el Fe es complejado por compuestos orgánicos y de esta forma, dicho complejo, se moviliza a través de las conexiones intercelulares probablemente por difusión (Kim and Guerinot, 2007). La liberación del Fe dentro del xilema, requiere que el Fe sea transportado desde el simplasto hacia el espacio apoplástico, sin embargo, el mecanismo de la salida del Fe desde las células hacia el xilema no está claramente entendido. Se ha reportado que en las células del duodeno de mamíferos, una proteína codificada por el gen IRON REGULATED1 (*IREG1*) cumpliría el rol de transportador de Fe, desde las células epiteliales hacia la circulación sanguínea. En *Arabidopsis*, hay dos proteínas predichas por ser homólogas a *IREG1*: dichas proteínas fueron llamadas Ferroportinas (FPN1 y FPN2), y se encuentran localizadas en la membrana plasmática de la vasculatura de la raíz, sugiriendo un posible rol en la liberación del Fe al interior del xilema (Morrissey and Guerinot, 2009). Dentro del xilema, el Fe se encuentra como un complejo Fe-citrato, formando las especies  $[\text{FeCitratoOH}]^{-1}$  y  $[\text{FeCitrato}^2]^{-3}$ . La mutante de *Arabidopsis frd3* ha provisto la evidencia molecular que el citrato está involucrado en el transporte del Fe desde las raíces a la parte aérea de la planta (Roschztardt et al., 2011). El gen *FRD3* codifica para una proteína transmembrana perteneciente a la familia de liberación de multidroga y toxinas (MATE), que se expresa únicamente en la raíz de la planta. La mutante *frd3* presenta clorosis y una inducción constitutiva de los genes de la captación de Fe, provocando una mayor acumulación de Fe en las raíces de las mutantes *frd3*. Además, en exudados del xilema de la mutante *frd3* se ha encontrado reducido a la mitad el contenido de Fe, mientras que el contenido de citrato fue reducido significativamente en relación a la planta de tipo salvaje. (Rogers and Guerinot, 2002). Por lo expuesto anteriormente, ha sido propuesto que el citrato sería transportado hacia el xilema mediante el transportador *FRD3* (Rogers and Guerinot, 2002; Roschztardt et al., 2011). En el mecanismo del transporte de Fe desde el xilema hacia las hojas, se han encontrado componentes de la estrategia I. Varios genes *FRO* son expresados en tallos y también se ha observado que *IRT1* es expresado en la parte basal de las flores, sugiriendo su rol en la incorporación de Fe en tejidos aéreos (Vert et al., 2002). El transporte de Fe hacia los órganos reproductivos se produce a través del floema. La movilización del Fe que se produce desde las hojas en senescencia hacia las hojas jóvenes, es también vía floema. El pH en el floema es

mayor a 7, por este motivo el Fe necesita ser unido a moléculas orgánicas que actúen como quelantes para mantenerlo en forma soluble (Kim and Guerinot, 2007).

La nicotianamina (NA) es una molécula orgánica, la cual es sintetizada a partir de S-adenosyl L-metionina mediante la enzima nicotianamina sintasa (NAS). La molécula NA tiene alta afinidad por metales, incluyendo hierro (Briat et al., 2007). Se ha informado que plantas con niveles deficientes de NA, presentan una disminución del contenido de Fe en su parte aérea y las hojas jóvenes en crecimiento presentan clorosis. Debido a que las hojas jóvenes son alimentadas esencialmente por el floema, el efecto fenotípico que provoca la ausencia de NA sugiere que el NA sirve como un ligando para el transporte de hierro en el floema (Hell and Stephan, 2003). Se ha reportado, que la familia de transportadores *yellow stripe like* (YSL), que muestran similitud de secuencia con YS de maíz, estarían implicados en el transporte del complejo NA-Fe<sup>2+</sup> a través del floema (DiDonato et al., 2004) (Takahashi et al., 2003; Le Jean et al., 2005; Chu et al., 2010).

### 1.5.3. Regulación de la respuesta a deficiencia de Fe

La respuesta de las plantas a la deficiencia de hierro es controlada a través de una coordinada activación mitocondrial. Estudios de tomates mutantes en el gen *fer* llevaron a la identificación de LeFER, un factor de transcripción con estructura básica hélice-loop-hélice (bHLH), el cual controla la transcripción de los genes de incorporación de Fe (Ling et al., 2002). En *Arabidopsis*, su homólogo funcional es un factor de transcripción denominado FIT1 (Colangelo and Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004). El gen *FIT1* se expresa en la zona de diferenciación de la epidermis de la raíz y su cantidad se regula mediante proteólisis. Bajo condiciones normales de Fe FIT estaría inactiva y sería ubiquitinada y degradada vía proteosoma. Bajo deficiencia de Fe, FIT1 se estabilizaría para dar lugar a una proteína activa. La estabilización y la activación de FIT1, podría ser dada por cambios covalentes en la estructura de la proteína o por interacción de alguna proteína, que se exprese sólo bajo deficiencia de Fe. Recientemente, se ha reportado que FIT1 interacciona con otras proteínas, bHLH38 y bHLH39 probablemente formando heterodímeros, que contribuirían con la estabilización de FIT1 y mediarían los cambios en la expresión de diversos genes dependientes de Fe (Yuan et al., 2008). Plantas de *Arabidopsis* mutantes en *fit1*, no incrementan los niveles de expresión de *FRO2* y la actividad ferroquelato reductasa también

se encuentra disminuida (Colangelo and Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004). Sin embargo, la expresión de *IRT1* no es afectada en plantas mutantes *fit1*, mientras que la proteína IRT1 no es detectable (Colangelo and Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004). Estos resultados indican que el gen *FRO2* es regulado directamente por FIT1, mientras que un mecanismo dependiente de FIT controlaría la regulación post-transcripcional de IRT1 (Connolly et al., 2003; Colangelo and Guerinot, 2004). Se ha observado que plantas mutantes de *Arabidopsis* que sobreexpresan *FRO2*, sólo incrementan los niveles de expresión de dicho gen cuando las plantas son sometidas a deficiencia de Fe; indicando que *FRO2* también podría ser regulada por un mecanismo post-transcripcional (Connolly et al., 2003). El hecho que existan importantes genes inducidos bajo deficiencia de hierro, como *IRT1*, que sean independientes de FIT, sugiere la presencia de un mecanismo regulatorio adicional (Puig et al., 2007).

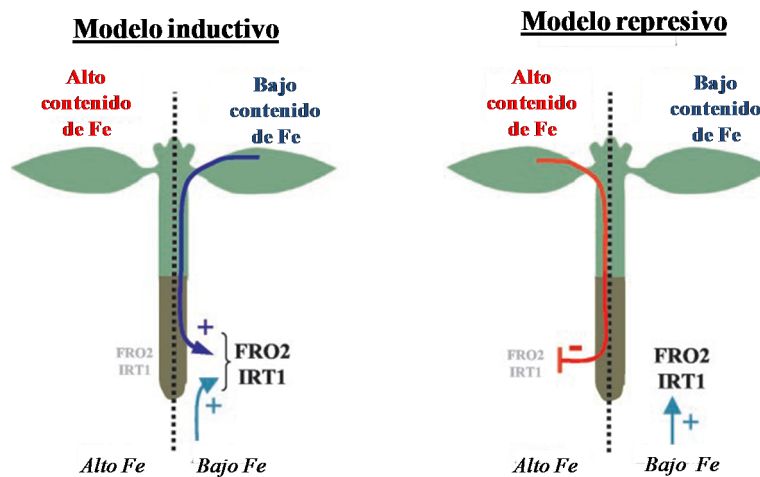
#### **1.5.4. Respuesta sistémica de las plantas a la deficiencia de Fe**

Debido al rol esencial que cumple el hierro dentro de las células de las plantas, los niveles del hierro dentro de las mismas, debe ser mantenido a un nivel óptimo para su funcionamiento. El mecanismo de incorporación del hierro en las plantas, debe alcanzar un equilibrio entre, incorporar hierro bajo condiciones de deficiencia de hierro y frenar la incorporación del mismo, en condiciones de exceso de hierro. Esto ha resultado en un mecanismo complejo de regulación del metabolismo del Fe en plantas (Darbani et al., 2013).

Como mencionamos anteriormente, la incorporación del Fe en plantas es regulada por mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, que provocan un incremento en su incorporación en condiciones de deficiencia (García-Mina et al., 2013). Evidencias experimentales sugieren la existencia de un sistema regulatorio hoja-raíz. El cuál dependería de la disponibilidad del Fe en las hojas para sus procesos metabólicos (Grusak and Pezeshgi, 1996; Vert et al., 2003). Las señales implicadas en el proceso de regulación hoja-raíz, no han sido claramente elucidadas. Probablemente, dicha regulación afecte la producción y/o translocación de señales activadoras o represivas enviadas desde la parte aérea de las plantas hacia la raíz (Schmidt, 2003).

Se han postulado dos modelos para la regulación de la señal sistémica. El modelo inductivo y el modelo represivo. El modelo inductivo se basa en que la señal es producida en las hojas en respuesta a la deficiencia de Fe, viaja a través del floema hacia la raíz resultando

en la activación de los genes de la incorporación del Fe. En este esquema, un alto contenido de Fe en las hojas podría prevenir la liberación de la señal y dichos genes podrían no ser expresados. Lo contrario sucede en el modelo represivo, en el los genes de incorporación del Fe de la raíz se expresan constitutivamente, excepto que el contenido de Fe en las hojas sea alto. En este caso, si los niveles de Fe en las hojas son suficientes, la señal podría prenderse y regular negativamente los genes de incorporación del Fe de la raíz; la ausencia de esta señal, se daría bajo deficiencia de Fe y podría desreprimir la expresión de los genes. Figura 5. Sin embargo, hasta el momento no se han dilucidado cuál de los dos modelos es funcional en plantas (Takahashi and Tokumoto, 2002).

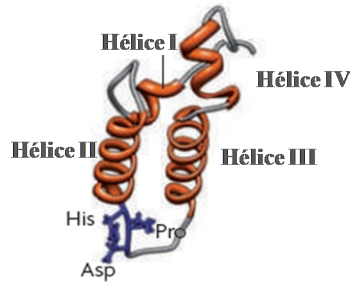


**Figura 5. Representación esquemática de los modelos inductivo y represivo.** En el modelo inductivo, la señal se dispara bajo deficiencia de Fe y activa los genes de incorporación del Fe de la raíz. En el modelo represivo, la señal se dispara en las hojas bajo condiciones normales de Fe reprimiendo los *FRO2* e *IRT1*. Tomado de (Vert et al., 2003)

## 1.6. Chaperonas y proteínas del tipo-J

Las proteínas J, por definición, contienen una región acídica conservada de 70 aminoácidos, denominada dominio J; en el cuál se puede encontrar un motivo conservado, constituido por los aminoácidos, histidina, prolina y aspártico (HPD). El motivo HPD se sitúa

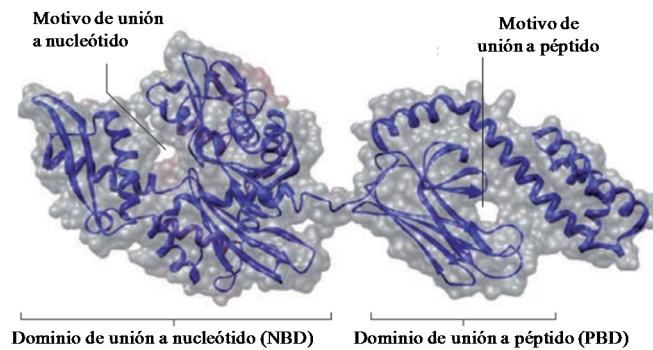
en un loop entre dos hélices alfa y es crítico para la función de la proteína. El dominio J tiene un rol crucial en la estimulación de la actividad ATPasa de las Hsp70s (Kampinga and Craig, 2010). Figura 6.



**Figura 6. Estructura de la proteína J.** La proteína J contiene cuatro hélices alfa formando un motivo super enrollado alrededor de un core hidrofóbico. El invariante tripeptido His, Pro, Asp (HPD) se encuentra localizado entre la hélice II y la hélice III. Dicho tripeptido es crucial para la estimulación de la actividad ATPasa *in vivo*. Tomado de (Kampinga and Craig, 2010).

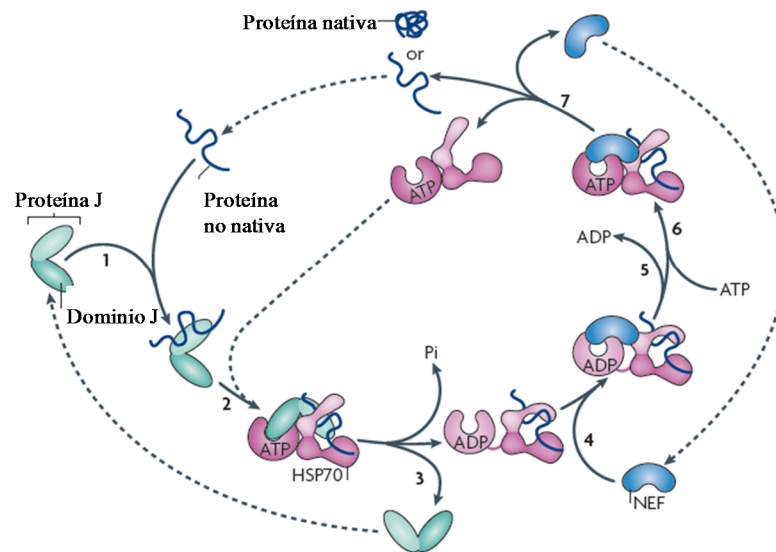
Las chaperonas Hsp70 tienen un rol en la respuesta de estrés. Se las ha encontrado involucradas en procesos como plegamiento de proteínas sintetizadas de *novo*, tráfico celular, translocación de proteínas a través de la membrana plasmática y control de proteínas regulatorias (Mayer and Bukau, 2005). La versatilidad de la función de las chaperonas Hsp70 no está dada por la diversificación de los genes de Hsp70, sino por la diversificación que se ha producido en las co-chaperonas de tipo J. Además, a diferencia de las Hsp70s, las proteínas de tipo J muestran diferencias en su secuencia y divergencia estructural, lo que condice con la hipótesis de que ellas son las que dirigen la función de la maquinaria de las Hsp70s (Craig et al., 2006; Hageman and Kampinga, 2009).

Las chaperonas Hsp70 han sido muy conservadas durante la evolución. Diferentes isoformas exhiben un alto grado de conservación de secuencia, sugiriendo que todas ellas tienen características estructurales similares. La región N-terminal, 45 kDa, comprende un dominio de unión a nucleótido (NBD), el cual tiene actividad ATPasa. Una corta región une el dominio N-terminal con el segmento C-terminal, 25 kDa, el cual contiene un dominio de unión a péptido (PBD). Figura 7.



**Figura 7. Estructura de la proteína Hsp70.** El dominio ATPasa (NBD) y el dominio de unión a péptido (PBD) se encuentran conectados por un péptido corto, flexible e hidrofóbico. Tomado de (Kampinga and Craig, 2010).

Las chaperonas son capaces de interactuar con un amplio rango de proteínas. El reconocimiento de éstas, es determinado por la especificidad intrínseca de la Hsp70 y por la co-chaperona de tipo J. La unión del sustrato a la Hsp70 es también nucleótido dependiente. El complejo Hsp70:ATP tiene baja afinidad por la proteína sustrato, por este motivo, la proteína J interacciona con la proteína no nativa y luego se une a la Hsp70, estimulando la actividad ATPasa y estabilizando la formación del complejo (Hsp70-proteína sustrato). En la disociación de la proteína sustrato de la Hsp70 interviene una proteína denominada NEF (factor de liberación del nucleótido) que permite un cambio en la conformación de la Hsp70 hacia una forma de baja afinidad por la proteína sustrato. Figura 8 (Vickery and Cupp-Vickery, 2007; Kampinga and Craig, 2010). La actividad ATPasa basal de las chaperonas Hsp70, usualmente es muy baja, pero podría aumentar más de 1000 veces en presencia del sustrato y de la co-chaperona. Esta regulación previene ciclos fútiles de la actividad ATPasa (Vickery and Cupp-Vickery, 2007).

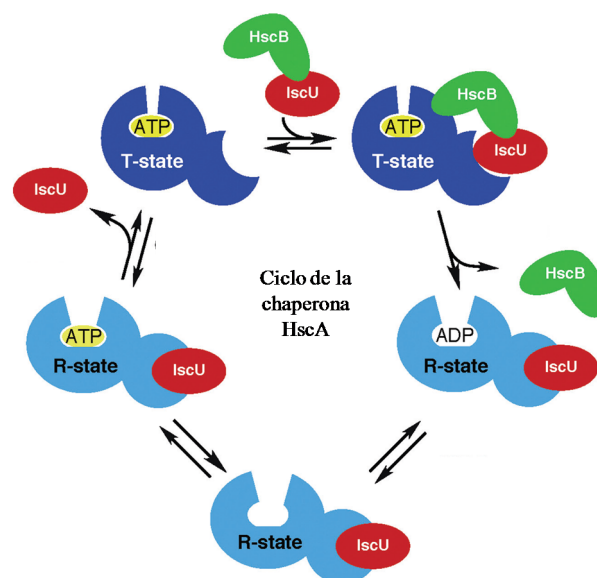


**Figura 8. Modo de acción de la proteína Hsp70.** 1) La proteína J interacciona con la proteína sustrato a través del dominio de unión al péptido (región C-terminal). 2) La proteína sustrato se une transitoriamente al sitio de unión al péptido de la Hsp70. La hidrólisis de ATP estimulada por ella misma y por la proteína J, causan un cambio conformacional en la Hsp70 que estabiliza la interacción con la proteína sustrato. 3) La proteína J abandona el complejo. 4) Un factor de intercambio de nucleótido (NEF) el cual tiene alta afinidad por la Hsp70-ADP une la Hsp70. 5 y 6) Se intercambia ATP por ADP 7) La proteína sustrato es liberada debido a la baja afinidad por la Hsp70-ATP. Si la proteína sustrato quedó mal plegada la proteína J la volverá a unir y el ciclo comenzará de nuevo. Tomado de (Kampinga and Craig, 2010).

### 1.6.1. Sistema especializado de chaperonas para la síntesis de centros Fe-S

Muchas Hsp70 presentan un amplio rango de especificidad adecuado con la necesidad de reconocer una variedad de proteínas diferentes. Inicialmente, se pensaba que las procariontes contenían una Hsp70, denominada DnaK (McKay, 1993). Sin embargo, luego, fue identificado un gen que codifica para una nueva Hsp70 homóloga a DnaK en *E. coli* (Seaton and Vickery, 1994). Se encontró que el gen *Hsp70* se expresaba constitutivamente en las células y no se producía su inducción por tratamiento térmico. El gen fue denominado *HscA* (*heat shock cognate*). La proteína predicha HscA, exhibe sólo el 40% de identidad de secuencia con la proteína DnaK y otras Hsp70s. El gen que se encuentra localizado corriente abajo del gen *HscA*, se lo denominó *HscB*, y codifica para una proteína de tipo J (Vickery and Cupp-Vickery, 2007).

La proteína HscB contiene un N-terminal conteniendo el dominio J (incluyendo el tripéptido HPD) y un dominio C-terminal que es más corto que los que se encuentran en otra co-chaperonas del dominio J (Urbina et al., 2002). El C-terminal de la proteína HscB ha perdido el dominio involucrado en interaccionar con las diferentes proteínas sustrato. Sin embargo, HscB presenta las propiedades bioquímicas similares a las proteínas J: unen una proteína sustrato y mediante la estimulación de la actividad ATPasa de las Hsp70, facilitan la unión entre ambas proteínas (Vickery and Cupp-Vickery, 2007). Debido a la pérdida de dicho dominio en el C-terminal, HscB sólo interacciona con una única proteína sustrato denominada IscU (Figura 9). Así, HscB no estaría involucrada en el plegamiento de proteínas, si no que en este caso, estaría involucrada en la biogénesis de los centros Fe-S (Craig et al., 2006).



**Figura 9. Ciclo de HscA.** La chaperona HscA se puede encontrar uniendo ATP (estado T) o ADP (estado R). IscU une indistintamente al estado R o T de HscA, mientras que HscB sólo interacciona con el estado T de HscA. Cuando HscB e IscU están presentes sinérgicamente estimulan la hidrólisis de ATP y en consecuencia, la conversión de HscA del estado T al estado R. Tomado de (Vickery and Cupp-Vickery, 2007).

Estudios de las propiedades bioquímicas de HscA y HscB en *E. coli* han revelado que HscA presenta una actividad ATPasa típica de las otras Hsp70s (Vickery et al., 1997; Silberg et al., 1998). La actividad ATPasa es estimulada de 4 a 6 veces por HscB, hecho que concuerda con la hipótesis del rol de HscB como co-chaperona regulatoria de HscA (Vickery et al., 1997). Células de *E. coli* mutantes en *HscA* o *HscB*, presentan una disminución en la actividad de las enzimas glutamato sintasa y succinato deshidrogenasa. Estos estudios

sugirieron que las proteínas HscA y HscB son necesarias para la eficiente formación y/o reparto de los centros hierro azufre a las proteínas aceptoras (Takahashi and Nakamura, 1999).

Diversos estudios realizados han mostrado, que las proteínas que componen la maquinaria de la biogénesis de los centros Fe-S, se han conservado en todas las eucariotas. Sin embargo, la chaperona mitocondrial (HscA) especializada en la formación de centros Fe-S, no fue transferida o no fue mantenida en las eucariotas ancestrales (Schilke et al., 2006). Los análisis realizados sobre las chaperonas involucradas en la formación de los centros Fe-S han sugerido, que la función de HscA fue adoptada por las chaperonas mitocondriales de los diferentes organismos, que además de cumplir su rol en el plegamiento de proteínas, actúan también en la biogénesis de los centros Fe-S (Uhrigshardt et al., 2010; Lill et al., 2012).

En plantas, la co-chaperona de tipo J (HscB) ha sido identificada y parcialmente caracterizada. La secuencia de HscB de plantas cuenta con un N-terminal que contiene el dominio J característico de todas las co-chaperonas, pero adyacente a este dominio se encuentra un dominio extra, conservado en casi todas las eucariotas y en algunas bacterias, el cual contiene dos módulos CXXC (Figura 10). En humanos, se ha observado que estos módulos son capaces de unir el zinc *in vitro*, resultando en una estructura tipo dedos de zinc (Bitto et al., 2008). La alta conservación de los módulos CXXC en la mayoría de las eucariotas, sugiere que estos módulos poseen una importante función (Uhrigshardt et al., 2010). Se ha sugerido que este motivo podría regular, mediante la unión a zinc u otros metales, la distribución de esta proteína entre el citosol y la mitocondria. En *Arabidopsis*, se ha reportado que AtHscB tiene doble localización (citosol-mitocondria) (Xu et al., 2009), hecho que apoya ésta teoría. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar la función específica de estos módulos.



AtHscA2 no ha sido estudiada, y ésta última también podría tener implicancias en la vía de formación de los centros Fe-S.

## **2. Objetivos**

## 2. 1. Objetivo General

Contribuir al conocimiento general sobre la formación de los grupos Fe-S en plantas superiores y avanzar en la caracterización bioquímica-funcional de las proteínas involucradas.

## 2.2. Objetivos específicos

Expresar y purificar la co-chaperona de tipo J (AtHscB), la proteína *scaffold* (AtIsu1) mitocondriales y la chaperona mitocondrial AtHscA2 de *Arabidopsis* en sistemas heterólogos (*Escherichia coli*). Caracterizar sus propiedades bioquímicas.

Analizar las posibles interacciones entre AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB. Evaluar el efecto de AtHscB y AtIsu1 sobre la actividad catalítica de AtHscA2.

Evaluar el rol de AtHscB en la biogénesis de los centros Fe-S *in vivo* y su participación en el metabolismo del Fe en plantas.

### **3. Materiales y Métodos**

### 3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

- ***E. coli* XL1-BLUE MRF'**:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac } [F' \text{ proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)}]$ . Stratagene®.
- ***E. coli* DH10 $\beta$** :  $F- \text{ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL } \Delta \text{ lacX74 } \Phi 80 \text{ lacZAM15 ara D139 } \Delta(\text{ara, leu})7697 \text{ mcrA } \Delta(\text{mrrhsdRMS-mcrBC}) \lambda-$  Invitrogen®.
- ***E. coli* DB3.1**:  $F- \text{ gyrA462 endA1 glnV44 } \Delta(\text{sr1-recA}) \text{ mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-)} \text{ ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 } \Delta \text{ leu mtl1}$  (Bernard and Couturier, 1992; Miki et al., 1992). Utilizadas para propagar vectores Gateway (Invitrogen®) conteniendo el gen tóxico *ccdB*.
- ***E. coli* BL21 (DE3)** [*E. coli* B F- *ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ Tetr gal (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Camr]*]. Utilizadas para la expresión de las proteínas.
- ***Agrobacterium tumefaciens* GV3101**: plásmido *Ti*: *pTiC58*; *chromo C58*; *opines: Nopalina*. Resistencia a rifampicina (genoma) y gentamicina (plásmido).

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 30 ó 37°C (según se indique) mientras que los de *A. tumefaciens* se crecieron a 28°C. Los cultivos en medio líquido se mantuvieron con agitación continua (150 rpm) y los medios sólidos se obtuvieron por adición de agar 1,5% (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 (DO<sub>600</sub>).

### 3.2. Material vegetal y condiciones de crecimiento

#### 3.2.1. Líneas de plantas

- ***Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0)**: plantas del tipo salvaje (Col-0). Utilizadas como control y para generar líneas transgénicas. Sin marcador de selección.
- ***AtHscB-myc***: líneas de *A. thaliana* transgénicas que expresan el gen *AtHscB* fusionado a un *tag* de purificación compuesto por 9 epítopes *myc*, 6 residuos de histidina, un sitio de clivaje para la proteasa 3C y 2 sitios de unión a IgG. Marcador de selección: gentamicina (50 µg/ml) (Rubio et al., 2005).

- ***athscb***: Las líneas con expresión reducida *AtHscB* (*knock down*), se obtuvieron de “*Arabidopsis Biological Resource Center*” (ABRC) dos líneas de plantas mutantes insercionales en el gen *AtHscB* (SALK 099684 y SALK 020271). Ambas líneas tienen la inserción del ADN-T en la región no traducida (5’UTR) por delante del codón ATG de inicio de la traducción.

### 3.2.2. Condiciones de crecimiento

Las semillas se esterilizaron con una solución de lavandina comercial al 5% (V/V) y Tween 20 al 0,05% (V/V) durante 15 min. Luego se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en tierra, en medio MS o *ATS* agar (ver punto 3.3) 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 transgénicas se seleccionaron durante 15 días en placas de *PreTi* con medio MS agar utilizando el antibiótico adecuado. Luego de este período las plantas resistentes al antibiótico se trasplantaron a macetas con tierra y perlita.

### 3.3. Medios de cultivo

**Medio LB** (Luria Bertani): 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 15 g/l de agar.

**Medio MS** (Murashige & Skoog): N° catálogo: M0404 (Sigma-Aldrich) (Murashige and Skoog, 1962).

**Medio *ATS***:  $\text{KNO}_3$  5mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,5 mM;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2mM;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,01  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  14  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  70  $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2  $\mu\text{M}$ ; NaCl 10  $\mu\text{M}$ ; y distintas concentraciones de Fe-EDTA 20, 50, 200 ó 500  $\mu\text{M}$  Fe. El medio se llevó a pH 5,8 con NaOH.

**Medio MS agar o ATS-agar:** medio MS o ATS con el agregado de agar 0,7% (P/V).

### 3.4. Soluciones buffer

**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.

### 3.5. Antibióticos y otros compuestos relacionados

Los antibióticos usados en la selección de clones positivos y plantas transgénicas así como algunos compuestos relacionados se detallan en la Tabla 6.

**Tabla 6. Antibióticos y compuestos relacionados.**

Compuesto	Concentración (stock)	Concentración final	
		Bacterias	Plantas
Ampicilina	100 mg/ml	100 $\mu$ g/ml	
Espectinomicina	50 mg/ml	100 $\mu$ g/ml	
Gentamicina	50 mg/ml	25 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml
Kanamicina	50 mg/ml	50 mg/ml	
Rifampicina	20 mg/ml	100 $\mu$ g/ml	
Isopropil $\beta$ -D-tiogalacto piranósido (IPTG)	1 M	1 mM	

### 3.6. Vectores y oligonucleótidos cebadores

**Tabla 7. Vectores comerciales y derivados de esta tesis**

Vector	Especificidades	Fuente
<b>pDONR<sup>TM</sup>221</b>	Kanamicina <sup>R</sup> . Vector de clonado. Sistema Gateway. Sitios de recombinación: <i>attP1</i> (bases 570-801) y <i>attP2</i> (bases 2754-2985)	Invitrogen
<b>pDEST<sup>TM</sup>17</b>	Ampicilina <sup>R</sup> . Vector de expresión en bacterias. Sistema Gateway. Sitios de recombinación: <i>attR1</i> (bases 140-264) y <i>attR2</i> (bases 1720-1844). Secuencia codificante para 6xHis <i>tag</i> (bases 113-130)	Invitrogen

<b>pGW-LLAtHscB</b>	Ampicilina <sup>R</sup> . Contiene 486 pb correspondientes al gen <i>AtHscB</i> entre los sitios <i>AttR1</i> y <i>AttR2</i> del vector pDEST 17. Vector de expresión en bacterias. Fusión a <i>tag</i> de histidinas.	Esta tesis
<b>pGEM-T Easy</b>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , 3015 pb, <i>ori</i> f1, <i>lacZ</i> (SMC), derivado de pGEM-5Zf(+), vector linealizado por corte con EcoRV y con timidinas agregadas en los extremos 3'.	Promega
<b>pGEM-T-AtIsu1</b>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pGEM-T Easy::ADNc <i>AtIsu1 Arabidopsis thaliana</i> .	Esta tesis
<b>pGEM-T-AtHscA2</b>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , pGEM-T Easy::ADNc <i>AtHscA2 Arabidopsis thaliana</i>	Esta tesis
<b>pET32c (+)</b>	<i>bla</i> <sup>+</sup> , 5899-5901 pb, <i>ori</i> f1, <i>lacI</i> , SMC, <i>ori</i> ColE1. Vector de expresión de proteínas recombinantes bajo el control del promotor y de las señales de iniciación de la traducción del bacteriófago T7, fusión a tiorredoxina y a hexa-Histidina (6xHis) para aumentar la solubilidad de la proteína de interés y permitir su fácil purificación.	Novagen
<b>pET32-LLAtIsu1</b>	Ampicilina <sup>R</sup> . Contiene 426 pb correspondientes al gen <i>AtIsu1</i> entre los sitios NdeI y Xho del vector pET-32c (+). Con codón de terminación que interrumpe la traducción del 6xHis <i>tag</i> en la región C-terminal de la proteína.	Esta tesis
<b>pET32-LAtHscA2</b>	Ampicilina <sup>R</sup> . Contiene 1515 pb correspondientes al gen <i>AtHscA2</i> entre los sitios NdeI y Xho del vector pET32c (+). Con codón de terminación que interrumpe la traducción del 6xHis <i>tag</i> en la región C-terminal de la proteína.	Esta tesis
<b>pC-TAPa (pLY436)</b>	Espectinomomicina <sup>R</sup> (bacterias) gentamicina <sup>R</sup> (plantas). Sistema Gateway. Promotor 2XCaMV35S. Terminador NOS. Fusión a <i>tag</i> de 2xIgG-BD, 3C, 6xHis y 9xmyc en la región C-terminal de la proteína. Expresión en plantas	Rubio y col. (2005)
<b>pAtHscB-myc</b>	Espectinomomicina <sup>R</sup> (bacterias) gentamicina <sup>R</sup> (plantas). Contiene 759 pb correspondientes al gen completo de <i>AtHscB</i> recombinado por los sitios <i>AttR1</i> y <i>AttR2</i> del vector pC-TAPa. Expresión en plantas. Fusión a <i>tag</i> de 9xmyc y 6xHis en la región C-terminal de la proteína. Expresión en plantas.	Esta tesis

Tabla 8. Oligonucleótidos cebadores utilizados en esta tesis

Nombre	Secuencia del oligonucleótido cebador	Uso	Gen
AtHscBb-gtw-fw	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTGTGCGACTATTTTCAGATTT 3'	Clonado de AtHscB madura	At5g06410
AtHscBb-gtw-rv	5'- GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGTGTGAGACCATTGAA 3'	Clonado de AtHscB madura	At5g06410
AtIsu1b-fw	5' AAACATATGCGAACCTACCATGAG 3'	Clonado de AtIsu1 madura	At4g22220
AtIsu1b-rv	5' TTTCTCGAGAGCCTGTGTGG 3'	Clonado de AtIsu1 madura	At4g22220
AtHsp70-2b-fw	5' CATATGAAAGAGACGGCCGAAGC 3'	Clonado de AtHscA2	At5g09590
AtHsp70-2b-rv	5' CTTTCAGCTTTTTCACCTCCTCGTACTC 3'	Clonado de AtHscA2m	At5g09590
AtHscB-myc-fw	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGAAGAAAACGAAGACG 3'	Clonado AtHscB-myc	At5g06410
AtHscB-myc-rv	5' GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTAGCTTCTTCAAATTTCTT 3'	Clonado AtHscB-myc	At5g06410
HscBtransgfw	5' TCGAAGCGTTTGAAAGCCAGAA 3'	Amplificación <i>AtHscB-myc</i>	
RtCtapa-rv	5' ACCACTAGTTCTAGAGCGGCC 3'	Amplificación <i>AtHscB-myc</i>	Vector pC-TAPa
*RtHscBfw	5' CGAGCAGTCTGCAAAGGTGACT 3'	Amplificación QPCR <i>AtHscB</i> y <i>AtHscB-myc</i>	
*RtHscBrv	5' TGCTTCTGATATGGCCTCTCTGAGT 3'	Amplificación QPCR <i>AtHscB</i> y <i>AtHscB-myc</i>	
Uphscb prom	5' TGTTCCTTAACAACGAAT 3'	Análisis <i>athscb</i> homocigotas	
Rvhscb-prom	5' TGCTGGAATCCACGAGACAACCTA 3'	Análisis <i>athscb</i> homocigotas	
Lba1	5' TGGTTCACGTAGTGGCCATCG 3'	Análisis <i>athscb</i> homocigotas	Borde izquierdo ADN-T
*act2F1	5' TGCTGAGGGAAGCAAGAATGGAAC 3'	Amplificación QPCR <i>ACT2</i>	At3G18780
*act2R1	5' TGCTGGAATCCACGAGACAACCTA 3'	Amplificación QPCR <i>ACT2</i>	At3G18780
*AtFH fw	5' TTAGCCAACCTCACAATTAATCACC 3'	Amplificación QPCR <i>AtFH</i>	At4G03240
*AtFH Rv	5' CACGGTCCCAGTCAAATCTAG 3'	Amplificación QPCR <i>AtFH</i>	At4G03240
*Nfs1fw	5' GGTGTGGTGTCTTTGTATGTG 3'	Amplificación QPCR <i>AtNfs1</i>	At5G65720

*Nfs1 Rv	5' TCTCTACCCCATTCAGCAAC 3'	Amplificación QPCR <i>AtNfs1</i>	At5G65720
*AtIsu1 fw	5' TTGTGGTTCAGCCATCGCTTCTT 3'	Amplificación QPCR <i>AtIsu1</i>	At4g22220
*AtIsu1 Rv	5' GTCCTCCGCCAACATACTGCAG 3'	Amplificación QPCR <i>AtIsu1</i>	At4g22220
*AtHsp70-2-fw	5' CAGATCACAATCCGATCCTCTG 3'	Amplificación QPCR <i>AtHscA2</i>	At5g09590
*AtHsp70-2-rv	5' CTGCCACAGCATCTTCAATCTC 3'	Amplificación QPCR <i>AtHscA2</i>	At5g09590
*FRO2-Fw	5' CCGCACATGACGAATCTTTGTGG 3'	Amplificación QPCR <i>FRO2</i>	At1g01580
*FRO2-Rv	5' CGAGGTTAATCCCATGCGCGT 3'	Amplificación QPCR <i>FRO2</i>	At1g01580
*FRD3-Fw	5' GCTACTATTGCTGGCGAGGACC 3'	Amplificación QPCR <i>FRD3</i>	At3g08040
*FRD3-Rv	5' CGAACAAGCCAGAATCGCCTGA 3'	Amplificación QPCR <i>FRD3</i>	At3g08040
*NAS4-Fw	5' GGCTTCGACGTTGTGTTCTT 3'	Amplificación QPCR <i>NAS4</i>	At1G56430
*NAS4-Rv	5' AGCAAAGCACCAGGAGACAT 3'	Amplificación QPCR <i>NAS4</i>	At1G56430

<sup>a</sup> Las secuencias subrayadas indican los siguientes sitios de restricción: NdeI (CATATG) y Xho (CTCGAG).

\* Oligonucleotidos utilizados para la técnica pcr en tiempo real.

### 3.7. Preparación y análisis de ADN plasmídico

#### 3.7.1. Obtención de células competentes

Células de *E. coli* de la cepa de interés (ver punto 3.1) 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 600 nm (OD600). 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; CaCl<sub>2</sub> 10mM; MnCl<sub>2</sub> 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; CaCl<sub>2</sub> 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. 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.

### 3.7.2. Transformación de células competentes

Las células de *E. coli* competentes (110 µl), (ver punto 3.7.1.), se transformaron por choque térmico con los plásmidos correspondientes utilizando protocolos de rutina (Sambrook and Russell, 2001). Brevemente, las células competentes fueron incubadas en presencia del plásmido correspondiente durante 30 min en hielo, posteriormente se colocaron a 45°C durante 45 s y se llevaron nuevamente al hielo durante 15 min. Luego de este período se agregó 1ml de LB líquido y se incubaron a 37°C con agitación durante 45 min. Finalmente, las bacterias se centrifugaron (5 min a 7000 r.p.m), 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.

La transformación de *A. tumefaciens* se realizó con una alícuota de 500 µl células competentes (ver punto 3.7.1.) que se incubaron con 1 µg de ADN plasmídico de modo sucesivo: 5 min en hielo, 5 min en N<sub>2</sub> (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 2000 × g 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.

### 3.7.3 Análisis de transformantes

El análisis de las colonias crecidas luego de la transformación se realizó mediante PCR de colonias. En este caso, se colocó directamente una colonia dentro de cada tubo de reacción junto al resto de los componentes del medio; el programa de temperaturas utilizado y el análisis de los productos fueron similares a los ya descritos.

Aquellas colonias en las que se pudo observar un producto de PCR del tamaño esperado, se utilizaron para inocular entre 3 y 10 ml de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado. Luego de la incubación a 37°C durante 16 h, se extrajo el ADN plasmídico. Posteriormente, se analizó este ADN digiriéndolo con endonucleasas de restricción que produjeran un patrón distintivo de fragmentos de ADN al correr el producto del corte en un gel de agarosa 0,8% (P/V).

### 3.7.4. 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.

### 3.7.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las moléculas de ADN con un tamaño comprendido entre 0,2 y 10 Kb se separaron en geles de agarosa 0,8% (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 TBE 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).

### 3.7.6. 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.

### **3.8. Manipulación enzimática de ADN**

#### **3.8.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Todas las reacciones de PCR realizadas se llevaron a cabo utilizando buffer de PCR 1X (Promega), dNTPs 0.4 mM, 0.4  $\mu$ M de cada oligonucleótido, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *Taq* ADN Polimerasa 1 U, H<sub>2</sub>O c.s.p. 25  $\mu$ 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 seg., (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.

#### **3.8.2. Reacciones de digestión empleando enzimas**

Las digestiones de ADN se llevaron a cabo a 37 °C durante 1 a 3 h, utilizando enzimas comerciales (Promega) y siguiendo las indicaciones recomendadas por los proveedores de las enzimas de restricción. El resultado de las digestiones se verificó mediante electroforesis de los productos en geles de agarosa 0,8% (p/v).

#### **3.8.3. Reacción de ligación**

Las reacciones de unión de los fragmentos aislados de ADN al vector pGEM-T-Easy, 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  $\mu$ l. La reacción se incubó a 16°C durante 18 h.

### **3.9. Extracción de ARN total y obtención de ADNc**

#### **3.9.1. Extracción de ARN total**

El ARN total de diferentes tejidos fue extraído usando el reactivo Trizol (Invitrogen), compuesto por una mezcla de fenol y tiocianato de guanidina. Cada muestra se homogeneizó con nitrógeno líquido, según la relación 50-100 mg de tejido: 1 ml de Trizol. Se agregó 200  $\mu$ l

de cloroformo y se agitó vigorosamente de forma manual durante 15 seg. La mezcla se dejó reposar durante 3 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 15 min a  $12000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . 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  $\mu\text{l}$  de alcohol isopropílico. Luego de agitar, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. El ARN se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, para la inactivación de ARNasas).

### 3.9.2. Cuantificación de ARN total

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

### 3.9.3. Obtención de ADN copia

El ADNc se obtuvo por transcripción reversa a partir de 5  $\mu\text{g}$  de ARN. La mezcla de reacción estaba compuesta por: 200 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV RT (Promega); 15  $\mu\text{g}$  de hexámeros *Random* pd(N) (Amersham Biosciences); 500  $\mu\text{M}$  de dNTPs; 1X buffer 5X M-MLV (Promega); 25 U Inhibidor de ARNasas (Promega);  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC c.s.p. 50  $\mu\text{l}$ . La reacción se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 1h.

### 3.10. Extracción y cuantificación de ADN genómico

El ADN genómico (ADNg) se extrajo a partir de 100 mg de hojas de *A. thaliana* que se trituró en presencia de  $\text{N}_2$  en microtubos. Posteriormente se agregó 300  $\mu\text{l}$  de buffer bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB), se trituró hasta lograr la completa homogeneización del tejido y se incubó a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13400 rpm durante 5 min, se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregó 300  $\mu\text{l}$  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  $7000 \times g$  por 10 min se lavó en etanol 70% (V/V) y se seco a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua destilada y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La cantidad de ADN total se determinó espectrofotométricamente a 260 nm (1 unidad de absorbancia equivale a 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ADN). La pureza de las muestras obtenidas se determinó mediante la relación de absorbancia 260 nm/280 nm.

### 3.11. Clonados

Las secuencias de ADN de interés se amplificaron a partir de ADNc mediante ensayos de PCR con oligonucleóticos específicos (Tabla 8) diseñados a partir de las secuencias disponibles en las base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>). El fragmento amplificado fue aislado y purificado según se describió en los puntos anteriores.

#### 3.11.1. Clonados dependientes de ligasa

Para los clonados tradicionales, los fragmentos amplificados y los vectores de interés, fueron digeridos con las enzimas de restricción adecuadas, purificados y ligados como se indica en los puntos 3.8.1, 3.8.2, 3.7.6 y 3.8.3. Posteriormente, con las ligaciones obtenidas se transformaron bacterias competentes XL1Blue y se seleccionaron en medio de LB agar con los antibióticos adecuados. Las colonias resistentes se analizaron por medio de PCR utilizando como molde 1  $\mu$ l de una colonia resuspendida en 10  $\mu$ l de agua destilada estéril. Aquellos clones que resultaron positivos, se inocularon en medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados para obtener ADN plasmídico (ver punto 3.7.4). Los plásmidos se analizaron por ensayos de PCR y restricción con las enzimas correspondientes. Las construcciones obtenidas se secuenciaron para analizar la fidelidad de las secuencias.

#### 3.11.2. Clonados por recombinación (sistema Gateway)

Para los clonados por el sistema de recombinación mediante la tecnología Gateway (Invitrogen), los fragmentos de ADN de interés se amplificaron mediante ensayos de PCR con oligonucleóticos específicos (ver punto 3.6) que incorporaron los sitios *attB1* y *attB2* en los extremos 5' y 3' de las secuencias. Los fragmentos de ADN conteniendo estas regiones (15-

150 ng) se recombinaron con los sitios *attP1* y *attP2* del vector de entrada pDONR221 (150 ng) en buffer TE utilizando la clonasa BP II (1 $\mu$ l) (Invitrogen®) en un volumen final de 5  $\mu$ l. La reacción se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y luego se trató con 1  $\mu$ l de proteinasa K durante 10 min a 37°C. Posteriormente, con el producto de recombinación, se transformaron bacterias competentes DH10 $\beta$  y las colonias se seleccionaron por resistencia a kanamicina en placas de medio LB agar. Luego de corroborar la presencia del inserto por PCR de colonias, los clones positivos se inocularon en medio LB líquido suplementado con kanamicina y se obtuvieron cultivos a partir de los cuales se realizó la extracción de ADN plasmídico. Los plásmidos fueron analizados mediante ensayos de PCR y restricción con las enzimas correspondientes. Una vez obtenido el vector pDONR221 con el inserto de interés se realizó un nuevo evento de recombinación con el vector de destino (pDEST17 para expresión en bacterias y pC-TAPa para expresión en plantas) utilizando la clonasa LR II (Invitrogen), siguiendo los mismos pasos y concentraciones que se detallaron para la primera recombinación. Nuevamente, se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH10 $\beta$  con el producto de recombinación y las colonias transformadas se seleccionaron por resistencia al antibiótico adecuado y PCR de colonia. Se obtuvo el ADN plasmídico de aquellas colonias que resultaron positivas y se secuenció para corroborar la fidelidad de las secuencias.

### 3.11.3. Secuenciación del ADN

La secuenciación de las construcciones de ADN obtenidas fue realizada por la compañía “Macrogen” (Corea) empleando secuencias de nucleótidos específicas del vector y del gen como cebadores.

### 3.12. Construcción de vectores para expresión de proteínas en bacterias

El inserto correspondiente a la versión madura de *AtHscB*, sin la región que codifica para el péptido tránsito, se obtuvo mediante PCR a partir de ADNc utilizando el par de oligonucleótidos AtHscBb-gtw-fw y AtHscBb-gtw-rv o (Tabla 8). El clonado se realizó mediante el sistema de recombinación (Gateway). La construcción obtenida (pGW-LLAtHscB) codifica para la proteína madura AtHscB conteniendo un *tag* de 6 histidinas en la región N-terminal.

Los fragmentos correspondiente a la versiones maduras de *AtIsu1* y *AtHscA2*, sin la región que codifica para el péptido transito, se obtuvieron mediante PCR a partir de ADNc de flores de *Arabidopsis*, utilizando los oligonucleótidos AtIsu1b-fw-AtIsu1b-rv y AtHsp70-2b-fw-AtHsp70-2b-rw (Tabla 8). El clonado se realizó mediante el sistema tradicional en el vector de entrada pGEM-T Easy con el posterior sub-clonado en el vector de expresión pET32c(+). Las construcciones obtenidas denominadas pET32-LLAtIsu1 y pET32-LLAtHscA2 codifican para las proteínas maduras AtIsu1 y AtHscA2 conteniendo un *tag* de 6 histidinas en la región C-terminal.

### 3.13. Construcción de vectores binarios para expresión de proteínas en plantas.

La construcción pAtHscB-myc se clonó mediante el sistema de recombinación (Gateway) en el vector binario pC-TAPa. La secuencia que codifica para la proteína AtHscB se amplificó por PCR a partir de ADNc con los oligonucleótidos AtHscB-myc-fw y AtHscB-myc-rv (Tabla 8). El vector obtenido (pAtHscB-myc) permitió expresar la proteína AtHscB con péptido tránsito fusionada en su región carboxilo terminal al *tag* de purificación compuesto por dos copias del dominio de unión a inmunoglobulina de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (2xIgG-BD), un sitio de clivaje para la proteasa 3C de rinovirus humano (3C), seis histidinas (6xHis) y nueve epitopes myc (9xmyc).

### 3.14. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

Para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* se transformó la cepa de expresión BL21 (DE3) con los plásmidos correspondientes (pGW-LLAtHscB, pET32-LLAtIsu1 o pET32-LLAtHscA2) y las colonias portadoras de la construcción de interés se obtuvieron por selección en medio LB agar con los antibióticos adecuados (ampicilina 100 µg/ml). Posteriormente, a partir una colonia aislada se crecieron cultivos en medio LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes durante 16 h y se tomó una alícuota (dilución 1/100) que se inoculó en 500 ml de medio LB fresco en presencia de los antibióticos. Los cultivos se crecieron a 37°C hasta una DO<sub>600</sub> de 0,5 y se indujo la expresión de la proteína de interés con el agregado de IPTG 1 mM durante 18 h a 30°C con agitación. A diferentes tiempos de inducción alícuotas de células se cosecharon por centrifugación y conservaron a -20°C para su posterior análisis. Los extractos celulares se obtuvieron

resuspendiendo las células en 10 ml de Tris-HCl 20 mM pH 7,4 con el agregado de un inhibidor de proteasas (PMSF 1mM), se sonicaron en hielo, se centrifugaron nuevamente a 7000 x g durante 15 min a 4°C; y dependiendo de la proteína, se procedió a su purificación a partir de la fracción soluble.

Las diferentes proteínas (AtHscB, AtIsu1 y AtHscA2) se obtuvieron a partir de la fracción soluble de los extractos celulares de *E. coli* transformadas con los plásmidos pGW-LLAtHscB, pET32-LLAtIsu1 y pET32-LLAtHscA2. Las fracciones solubles, obtenidas luego del sonificado, se sembraron en una cromatografía de afinidad en columna de 1 ml cargadas con Ni<sup>+2</sup> como ligando (Hi Trap chelating HP, GE Healthcare Bio-Sciences. La columna se lavó con 20 ml de buffer A (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM; imidazol 20 mM, pH 7,4) y la proteína recombinante se eluyó por gradiente de imidazol (20-500 mM) en buffer A. La presencia de la proteína recombinante de interés se analizó mediante SDS-PAGE al 15% y ensayos de *western blot*. Las enzimas recombinantes purificadas se concentraron y conservaron a -80°C hasta su utilización.

### **3.15. Ensayo de interacción entre AtHscB, AtIsu1 y AtHscA2**

200 µg de proteína purificada (AtHscB, AtIsu1 o AtHscA2, solas o en combinación), fueron incubadas en buffer G conteniendo (10 mM Hepes, 100mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub> y 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 2 mM ATP, pH 8.0) por 10 min a 25°C. La mezcla resultante fue centrifugada usando concentrador de corte de bajo peso molecular (30 kDa Centricom™) para remover las proteínas no interactuantes. La fracción concentrada y la fracción que pasó a través de la membrana fueron colectadas y las proteínas contenidas en ellas fueron analizadas por SDS-PAGE seguida por tinción de *Coomasie Blue* (ver punto 3.18.3).

### **3.16. Medidas de Actividad ATPasa**

Las medidas de actividad ATPasa se realizaron por detección del fosfato inorgánico liberado en la mezcla de reacción por un método colorimétrico (Lanzetta et al., 1979) con modificaciones (Boshoff et al., 2004). Las reacciones comenzaron con el agregado de las proteínas y se incubaron 1 hora a 37°C en el buffer G. La liberación del fosfato inorgánico fue detectada espectrofotométricamente mediante el agregado del reactivo de color (0,04 % P/V Verde Malaquita, 1,5% P/V molibdato de amonio, 0,2 % V/V Tween-20 y 9% P/V ácido

ascórbico) y se incubó 1h a 25°C. Posteriormente, se cuantificó el incremento de la absorbancia a 630 nm y los valores fueron comparados con una curva de calibración utilizando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Los ensayos fueron corregidos haciendo los controles correspondientes de la degradación espontánea de ATP y estos fueron restados a los valores obtenidos de actividad. La actividad específica fue determinada como  $\mu\text{mol}$  por minuto por microgramo de proteína. Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1  $\mu\text{mol}$  de ADP por minuto a 37°C. Los valores de actividad informados, son el promedio de al menos tres repeticiones.

### 3.16.1. Determinación de los parámetros cinéticos.

La determinación de los parámetros cinéticos se realizó variando la concentración de ATP, manteniendo constantes y saturantes las concentraciones de los demás sustratos. Bajo estas condiciones, las velocidades iniciales observadas dependen de la concentración del sustrato variable de acuerdo a lo expresado en la ecuación de Michaelis-Menten.

Los datos obtenidos experimentalmente fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados (Brooks, 1992). Para la estimación de todos los parámetros cinéticos en el presente trabajo de Tesis se utilizaron simultáneamente los programas de ajuste y cálculo Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc.), SigmaPlot (Systat Software, Inc.) y Kinetic (Brooks, 1992). Los valores de actividad informados son el promedio de al menos tres determinaciones que difieren en menos del 20%. Los cambios en la absorbancia fueron lineales durante el tiempo del ensayo y la actividad proporcional a la cantidad de enzima utilizada.

Los parámetros cinéticos  $S_{0,5}$ , que se define como la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ) y la  $V_{\text{max}}$  se determinaron utilizando concentraciones (saturantes) del sustrato (ATP) y se calcularon utilizando las velocidades en estado estacionario ( $V_{\text{ss}}$ ) (Brooks, 1992).

Para determinar el efecto de las proteínas AtIsu1 y AtHscB sobre la actividad AtHscA2, en primer lugar se realizaron medidas de actividad de la enzima en ausencia de éstas. Posteriormente, se analizaron los efectos producidos en la actividad por el agregado al

medio de reacción de diferentes concentraciones de AtIsu1 y AtHscB, mientras que el sustrato ATP se agregó a concentración saturante, en todas las reacciones realizadas.

### **3.17. Transformación de plantas de *Arabidopsis* utilizando el método de infiltración por floral dip**

La transformación de plantas de *Arabidopsis* se realizó mediante la técnica de *floral dip* (Clough and Bent, 1998). Brevemente, se utilizaron plantas de *Arabidopsis* 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  $7000 \times g$  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 15 seg. 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.

### **3.18. Preparación y análisis de proteínas**

#### **3.18.1. Extracción de proteínas de material vegetal**

Los diferentes tejidos de *Arabidopsis* se cortaron en pequeños trozos, se congelaron en nitrógeno líquido y se trituraron con un émbolo hasta lograr un fino polvo. Luego se agregó un buffer de extracción (Tris-HCl 20 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM, pH 7,4) y se homogeneizó con ayuda del émbolo. Finalmente las muestras se centrifugaron a  $10000 \times g$  durante 10 min a 4°C y se conservó la fracción soluble.

### 3.18.2. Determinación del contenido proteico

La concentración de proteína total se determinó por el método de Bradford utilizando BSA como proteína testigo (Bradford, 1976).

### 3.18.3. 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) (Laemmli, 1970), utilizando un equipo Mini Protean II Cell (BioRad). La concentración de acrilamida en el gel de separación fue del 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; glicerol 5% (V/V); SDS 0,4% (P/V); 2-mercaptoetanol 2,88 mM y azul de bromofenol 0,02 % (P/V), pH 6,8. 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). Como marcador de masa molecular estándar se utilizó el MW Page Ruler Prestained (Fermentas).

### 3.18.4. Análisis por inmunodetección

Los extractos proteicos o proteínas purificadas se sometieron primero a una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y luego a una electrotransferencia utilizando la celda Bio-Rad Mini-Trans-Blot transfer (BioRad) (Bollag and Edelstein, 1991). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) durante 16 h a 4°C y a 30 V (voltaje constante) en presencia del siguiente buffer de transferencia: Tris-HCl 20 mM; glicina 150 mM; metanol 20 % (V/V), pH 8,0. Para evaluar la calidad de la transferencia las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con una solución de Rojo Ponceau (0,5 g de Rojo Ponceau; 1ml de ácido acético glacial; c.s.p. 100 ml) y se lavaron posteriormente con agua destilada. Las membranas se incubaron en una solución de bloqueo compuesta por BSA 3 % (P/V) en PBS 1X durante 1 h. Luego, se realizaron 2 lavados de 15 min en PBS 1X y se incubaron 1 h con el anticuerpo primario correspondiente. Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron: anticuerpos monoclonales a-His (Santa Cruz) o anticuerpos monoclonales a-myc (Santa Cruz). Luego de la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, las

membranas se lavaron 3 veces con una solución de BSA 2 % (P/V) en PBS 1X durante 15 min y se incubaron 1 h con anti-IgG de ratón o conejo conjugada con la enzima fosfatasa alcalina (Sigma). Finalmente, las membranas se lavaron 2 veces con PBS 1X durante 10 min y se incubaron 5 min con buffer sustrato conteniendo: Tris-HCl 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 9,5. La presencia de las bandas proteicas se reveló mediante el agregado de 66 µl de azul de nitrotetrazolio (NBT 50 mg/ml) y 33 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indoilfosfato (BCIP 50 mg/ml) en 10 ml de buffer sustrato (Promega). La reacción se desarrolló al resguardo de la luz hasta la aparición de bandas de color púrpura y se detuvo con lavados en PBS 1X.

### **3.19. Aislamiento de plantas homocigotas**

#### **3.19.1. Aislamiento de plantas mutantes insercionales homocigotas**

A fin de aislar plantas homocigotas de las mutantes insercionales *hscb1* y *hscb2*, se comprobó en primer lugar, la ubicación del inserto en el gen *AtHscB* mediante una reacción de PCR sobre ADNg y utilizando oligonucleótido *Lba1* (que se une específicamente al extremo izquierdo del ADN-T) y el oligonucleótido *Rvhscb-prom* que se une específicamente a la secuencia del gen *AtHscB*. Las plantas mutantes homocigotas fueron identificadas mediante PCR utilizando como molde ADNg y los oligonucleótidos, *Uphscb prom* y *Rvhscb prom*, diseñados específicamente para los sitios flanqueantes al lugar de inserción del ADN-T. El ADNg fue extraído a partir de hojas utilizando el método modificado de extracción con CTAB (Sambrook and Russell, 2001) (ver sección 3.10).

#### **3.19.2. Aislamiento de plantas mutantes sobreexpresantes homocigotas**

Las plantas *Arabidopsis* que sobre-expresan constitutivamente *AtHscB* fueron generadas a partir de la secuencia de ADN que codifica para la proteína *AtHscB* precursora (con péptido tránsito) que se clonó en el vector binario pC-TAPa (que contiene el sistema TAP *Tandem affinity purification*) (Rubio et al., 2005). El plásmido obtenido denominado p*AtHscB-myc* se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis* mediante la técnica de *floral dip*. La presencia de la construcción *AtHscB-myc* en las diferentes líneas de plantas se confirmó mediante PCR utilizando como molde ADNg y los oligonucleótidos *HscBtransgfw*

y RtCtapa-rv, diseñados específicamente para evitar la amplificación de la secuencia de *AtHscB* endógena.

### 3.20. Amplificaciones por PCR en tiempo real (QPCR)

La PCR en tiempo real se realizó utilizando como templado ADNc obtenido de líneas Col-0, *AtHscB-myc* o *athscb* según se describió en el punto 3.9.3. Las reacciones de amplificación se realizaron en placas de 96 pocillos cada una de las cuales contenía 20  $\mu$ l de medio de reacción [10 ng de ADNc; 500 nM de oligonucleótidos; 1X buffer Go Taq incoloro (Promega); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200  $\mu$ M dNTPs; 1X de Syber Green; 0,8 U de ADN polimerasa Go Taq (Promega); agua destilada c.s.p 20  $\mu$ l]. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (QPCR Systems, Stratagene) utilizando como controles interno el gen de  $\beta$ -ACTINA2. Para la cuantificación relativa se empleó el método de 2- $\Delta\Delta$ Ct (Pfaffl, 2001). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

## 3. 21 Caracterización fenotípica de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*

### 3.21.1. Medidas del área foliar de las hojas.

El estudio de crecimiento de las líneas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb*, se llevó a cabo utilizando las concentraciones de hierro 20 y 50  $\mu$ M. Para ello se utilizaron un n > 30 de cada línea, crecidas medio *ATS* agar. A los 15 días post-germinación, las plántulas se fotografiaron y se les midió el área de la roseta con el programa Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc.). Se consideró la concentración 50  $\mu$ M Fe como condición normal para la comparación con las concentraciones de hierro elegidas.

### 3.21.2. Medidas de la longitud de las raíces secundarias.

La longitud de las raíces laterales de las líneas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb*, se midió en 15 plántulas de 15 días post-germinación en MS-agar. Las plántulas se fotografiaron y se les midió la longitud de las raíces laterales con el programa Image-Pro Plus 6.0.

### 3.21.3. Cuantificación de clorofilas

Las clorofilas fueron extraídas a partir de hojas de las líneas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb*. El tejido se disgregó en 1 ml de acetona 80% y se dejó en oscuridad y agitación durante 16 h. Luego se centrifugó a 10000g por 5 min y se midió la absorbancia a 645 y 663 nm. El contenido de clorofila total se estimó con las siguientes ecuación: Clorofila Total ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $20.2 (A_{645}) + 8.02 (A_{663})$  (Lichtenthaler, 1987).

### 3.22. Análisis de ferrosulfoproteínas en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*

Las diferentes líneas fueron crecidas durante 13 días en medio MS-agar y luego fueron pasadas a placas de Petri conteniendo medio *ATS* (sin el agregado de Fe). Las plantas fueron sometidas a la ausencia de Fe durante 48h y posteriormente se separaron las raíces de las hojas y se realizó la extracción de proteínas totales. Como control, se utilizaron raíces y hojas de plantas *AtHscB-myc* y *athscb* y Col-0 crecidas durante 15 días en condiciones control (MS-agar).

#### 3.22.1. Medida de la actividad enzimática de aconitasa, succinato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa

La actividad aconitasa fue determinada utilizando proteínas totales de raíces y hojas de plántulas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb* crecidas durante 15 días en MS-agar o sometidas durante 48 h a deficiencia de Fe. El medio de reacción contenía: D-Isocitrato 20 mM y Tris-HCl 100 mM, pH 8, en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$ . Las determinaciones se llevaron a cabo mediante el aumento de la absorbancia a 240 nm a 25°C durante 2 min., a intervalos de 30 s. (Li et al., 1999). Los valores de actividad informada son el promedio, de al menos, tres repeticiones.

La actividad succinato deshidrogenasa fue determinada utilizando proteínas totales de raíces y hojas de plántulas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb* crecidas durante 15 días en MS-agar o sometidas durante 48 h a deficiencia de Fe. La actividad catalítica se determinó mediante el descenso de la absorbancia a 600 nm. El medio de reacción fue el siguiente: succinato 100 mM, diclorofenol indofenol (DCPIP) 0.5 mM, azida 40 mM, buffer fosfato 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM y BSA 0.5 mg/ml y mitocondria solubilizadas (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína total), en un volumen

final de 500  $\mu$ l. Las determinaciones se llevaron a cabo a 25°C durante 2 min., a intervalos de 30 s (Schirawski and Uden, 1998).

La actividad malato deshidrogenasa fue determinada utilizando proteínas totales de raíces y hojas de plántulas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb* crecidas durante 15 días en MS-agar o sometidas durante 48 h a deficiencia de Fe. La actividad catalítica fue cuantificada por el descenso de la absorbancia a 340 nm. El medio de reacción contenía: imidazol 50 mM pH 6.9, NADH 0.15 mM y ácido oxálico 1 mM en un volumen final de 500  $\mu$ l. Las determinaciones se llevaron a cabo a 25°C durante 1 min., a intervalos de 30 s (Trípodí and Podestá, 2003).

### **3.22.2. Medidas de respiración**

El consumo de oxígeno fue medido a 25°C usando una cámara de aire cerrada unida a un electrodo tipo Clark (Hansatech Leaf Disc Electrode Unit, Hansatech, UK). Entre 50 a 100 mg de plántulas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb* de 15 días (crecidas en MS-agar) fueron colocadas en la cámara en presencia del electrodo de oxígeno. La calibración se realizó mediante 2 puntos: para el límite superior se utilizó el pasaje de aire ambiental (21% O<sub>2</sub>) y el límite inferior se logró con el pasaje de N<sub>2</sub> (g) (0% O<sub>2</sub>) a través de la cámara. El consumo de oxígeno fue monitoreado durante 15 min. Los valores de consumo de O<sub>2</sub> informados son el promedio, de al menos, tres repeticiones.

### **3.23. Detección del contenido del Fe**

#### **3.23.1. Detección histoquímica del contenido de Fe en raíces**

Para la tinción se utilizaron plántulas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb* crecidas durante 15 días en placas MS-agar. Las plántulas fueron sumergidas en una solución 2% HCl V/V y 2% P/V ferrocianuro de potasio, aplicando vacío durante 5 min, y luego se las incubó durante media hora en esta solución. Posteriormente, las plantas se lavaron con agua destilada y después se las decoloró con 100% metanol (Meguro et al., 2007; Roschztardt et al., 2009). Las fotos se tomaron con el microscopio (Nikon TV Lens C-0.45x, Japan).

### 3.23.2 Detección espectrofotométrica del contenido de Fe total en raíces y hojas

La cuantificación del Fe total se realizó en las raíces y las partes aéreas de las líneas Col-0 *AtHscB-myc* y *athscb* crecidas durante 15 días en medio *ATS*-agar con el agregado 20 ó 50  $\mu\text{M}$  Fe. Las raíces de las diferentes líneas fueron separadas de la parte aérea se secaron durante dos días a 60°C (hasta peso constante), luego las plantas se mineralizaron con 500  $\mu\text{l}$   $\text{HNO}_3$  65% a 100°C durante tres horas lográndose así, la degradación total del tejido y la liberación total del Fe hemínico. Se tomaron 250  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se agregó 0,1M acetato de sodio, 100  $\mu\text{l}$  hidroxilamina 10% P/V, 350  $\mu\text{l}$  acetato de sodio 0,1M y 300  $\mu\text{l}$  fenantrolina 5 mM. Se incubó durante 10 min a 25°C hasta desarrollo de color y se midió absorbancia a 510 nm. La curva de calibración se realizó con el reactivo  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$  (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$ ) (Tamarit et al., 2006). Los valores del contenido de Fe informados son el promedio, de al menos, cuatro repeticiones independientes.

### 3.24. Análisis de la actividad ferroquelato reductasa (FRO2)

La actividad ferroquelato reductasa se ensayó en condiciones control o con diferentes tratamientos en plántulas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb*.

Tratamientos:

1) Para verificar que la actividad FRO2 se activa bajo deficiencia de Fe y estudiar como respondían las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, las plántulas fueron crecidas durante de 15 días de edad crecidas en medio *ATS*-agar con el agregado de 20 ó 50  $\mu\text{M}$  Fe. Se utilizaron n=8 plantas por ensayo, en tres repeticiones independientes.

2) La actividad FRO2 respondería a los niveles de Fe encontrado en las hojas. Para analizar la señalización hoja raíz, se midió la actividad FRO2 las hojas de las líneas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb* de 14 días de edad creciendo en medio MS-agar y se rociaron con una solución 50  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA. Luego de 24 h, se midió la actividad FRO2. Para este ensayo se utilizaron n=6 plantas por ensayo, en tres repeticiones independientes.

3) Para analizar el transporte del Fe desde la raíz hacia las hojas, las diferentes líneas fueron crecidas durante 13 días en medio MS-agar y luego fueron pasadas a placas de Petri conteniendo medio *ATS* (sin el agregado de Fe). Las plantas fueron sometidas a la ausencia de

Fe durante 48 h y posteriormente se realizó la medida de la actividad FRO2, utilizando el método explicado anteriormente. Plantas *AtHscB-myc* y *athscb* y Col-0 crecidas durante 15 días en condiciones control (MS-agar) fueron utilizadas como control.

Ensayo de actividad FRO2: Las raíces de las plantas fueron sumergidas durante 2 h en una solución conteniendo (200  $\mu\text{M}$   $\text{CaSO}_4$ ; 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}_2\text{Na-EDTA}$ , 1mM fenantrolina, 5mM MES pH5,5). Luego la absorbancia fue medida a 510 nm, utilizándose el reactivo  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$  (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$ ) para la curva de calibración (Yuan et al., 2008).

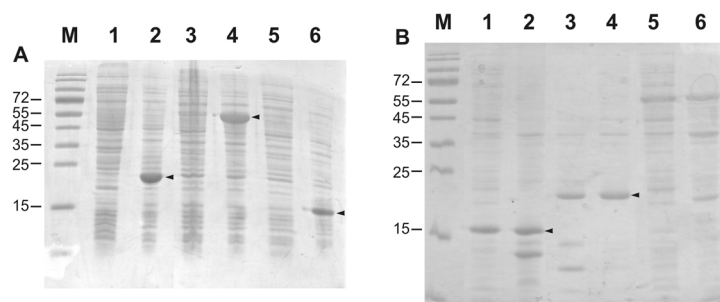
## **4. Resultados**

## **4.1. Capítulo I: Caracterización Bioquímica de AtHscB, AtIsu1 y AtHscA2**

#### 4.1.1. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes AtHscB, AtHscA2 y AtIsu1.

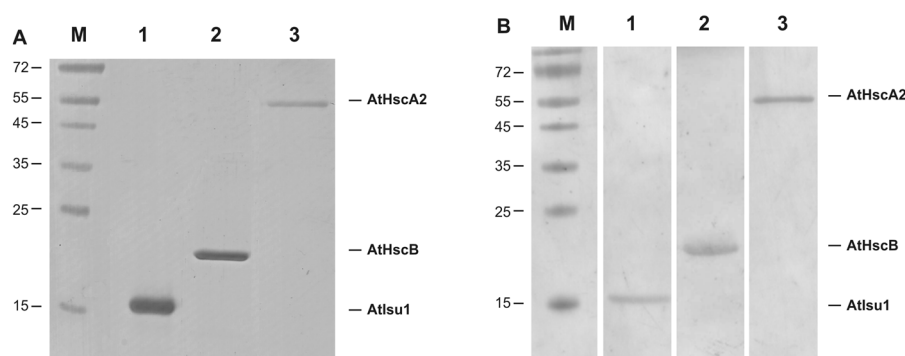
Con el fin de avanzar en la caracterización la co-chaperona de tipo J (AtHscB) de *Arabidopsis*, los genes *AtHscB*, *AtIsu1* y *AtHscA2* se expresaron en un sistema heterólogo bacteriano. La secuencia de ADN que codifica para la proteína madura AtHscB se clonó en el vector de expresión pDest17 (Sistema Gateway, Invitrogen) incorporando un hexámero de histidinas en la región amino terminal de la enzima recombinante. Por otro lado, las secuencias de ADN que codifican para la proteínas maduras (AtHscA2 y AtIsu1) se clonaron en el vector de expresión pET32c (Novagen) incorporando en este caso un hexámero de histidinas en el extremo carboxilo terminal.

Los plásmidos obtenidos se introdujeron en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), y la expresión de las proteínas recombinantes se indujo por el agregado de IPTG. Se tomaron muestras de células antes de la inducción y luego de 6 h del agregado del inductor. El análisis mediante SDS-PAGE, mostró la acumulación de las especies proteicas del tamaño esperado en las muestras de células inducidas (Figura 11A). Posteriormente, se analizaron las fracciones solubles e insolubles, en los tres casos pudo observarse que las proteínas recombinantes se acumulaban en la fracción soluble (Figura 11B). La naturaleza de las proteínas de interés fueron confirmadas mediante ensayos de *western blot* utilizando anticuerpos comerciales a-histidinas (Figura 12A).



**Figura 11. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB en células de *E. coli*.** A) Los extractos totales de células de *E. coli* BL21 (DE3) fueron analizados en un SDS-PAGE al 15% teñido con *Coomasie blue*. Calle 1, 3 y 5: proteínas totales sin inducir. Calles 2, 4 y 6: proteínas totales correspondientes a AtIsu1, AtHscA2 y AtHscB luego de 6 h de inducción con IPTG 1 mM. B) Las fracciones solubles e insolubles fueron analizadas. Calles 1, 3 y 5: proteínas de la fracción soluble y Calle 2, 4 y 6 fracción insoluble correspondientes a AtHscA2, AtHscB y AtIsu1.

Para obtener una óptima relación rendimiento/ pureza de las proteínas en estudio, se realizó el siguiente protocolo: se equilibró la columna de  $\text{Ni}^{2+}$  de 1 ml con 10 volúmenes del buffer de unión; la fracción soluble se sembró en la columna y realizamos lavados con 10 ml de buffer unión. Para eluir la proteína se utilizó un gradiente de 0-100% del buffer de elución. El análisis por SDS-PAGE de las proteínas purificadas reveló la presencia de bandas proteicas únicas de la masa molecular esperada en cada caso: 15,9 kDa (AtIsu1), 20,1 kDa (AtHscB) y 55 kDa (AtHscA2) (Figura 12B).



**Figura 12. Análisis mediante SDS-PAGE y *western blot* de la purificación de las proteínas AtHscB, AtIsu1 y AtHscA2.** A) SDS-PAGE al 15% de las fracciones purificadas mediante cromatografía de afinidad a  $\text{Ni}^{2+}$ , calle 1: AtIsu1, calle2: AtHscB y calle 3: AtHscA2. B) Ensayo de *western blot* de las fracciones solubles correspondientes a calle 1: AtIsu1, calle2: AtHscB y calle 3: AtHscA2 utilizando anticuerpos primarios a-His (Santa Cruz Biotechnology, Inc) y anticuerpos secundarios a-IgG de conejo (Sigma), conjugados a fosfatasa alcalina. Calle 4, 5 y 6: AtIsu1, AtHscB y AtHscA2.

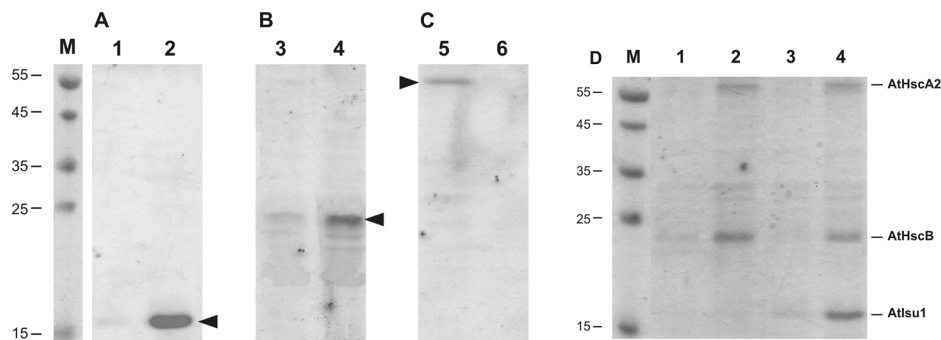
#### 4.1.2. Interacción entre AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB

Estudios recientes, han demostrado mediante ensayos de doble híbrido que la proteína AtHscB interacciona con AtIsu1 (Xu et al., 2009). Con el objetivo de evaluar la posible interacción entre las tres proteínas en estudio AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB, se realizó un ensayo *in vitro* utilizando concentradores de corte 30 kDa como se describe en Materiales y Métodos sección 3.15.

Como control, las proteínas AtHscA2, AtIsu1 o AtHscB fueron colocadas en un concentrador de corte de bajo peso molecular (30 kDa Centricon<sup>TM</sup>). Luego de la centrifugación, las muestras contenidas en la parte superior de la membrana (fracción

concentrada) y las muestras que pasaron a través de la membrana fueron analizadas. El análisis mediante SDS-PAGE reveló, cómo esperábamos, que AtHscA2 no pasó a través de la membrana, mientras que AtHscB y AtIsu1 fueron encontradas en la fracción que pasó a través de la membrana del concentrador (Figura 13A). Cuando AtHscB fue incubado con AtHscA2 en presencia de ATP, sólo una pequeña cantidad (aproximadamente 10%) de AtHscB pasó a través de la membrana, mientras que el 90% de la proteína fue encontrada en la fracción concentrada junto con AtHscA2 (Figura 13B), sugiriendo la interacción física entre ellas.

Por otra parte, también evaluamos si AtHscB y AtIsu1 podrían interactuar con AtHscA2. Después de incubar las tres proteínas por 10 min a 25°C, y la subsecuente centrifugación en el concentrador Centricon<sup>TM</sup> de corte 30 kDa, encontramos que más del 90% de AtIsu1 permanece con AtHscA2 y AtHscB (Figura 13D). Nuestros resultados sugieren que las tres proteínas podrían interactuar formando un complejo multiproteico.



**Figura 13. Análisis por SDS-PAGE 15% de la interacción entre AtHscA2, AtIsu1 y AtHscB.** A) Fracción concentrada (calle 1) y fracción que atravesó la membrana (calle 2) de AtIsu1. B) Fracción concentrada (calle 3) y fracción que atravesó la membrana (calle 4) de AtHscB. Fracción concentrada (calle 5) y fracción que atravesó la membrana (calle 6) de AtHscA2. D) La interacción entre AtHscB y AtHscA2 fue sembrada en Calle 1: fracción que paso a través de la membrana y calle2: fracción concentrada. Las calles 3 y 4 corresponden a la fracción que pasó a través de la membrana y a la fracción concentrada, respectivamente, del ensayo de interacción entre AtHscB AtIsu1 y AtHscA2. M: marcador de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas).

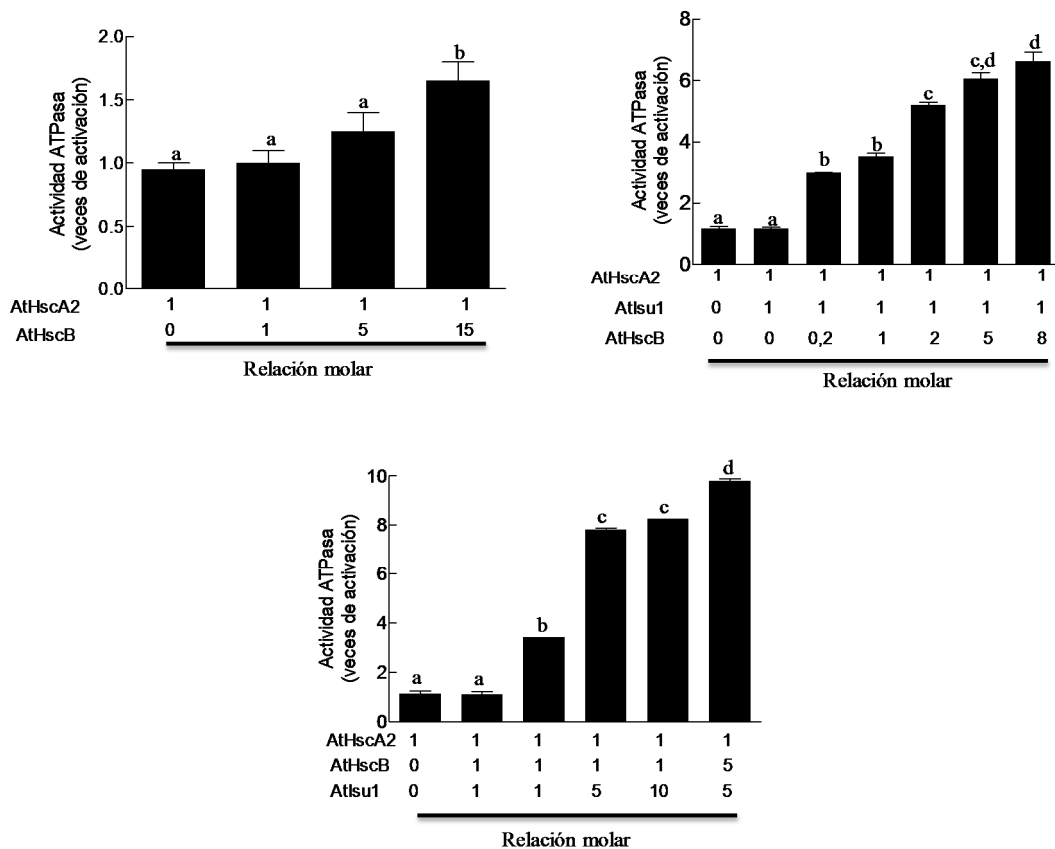
### 4.1.3. Efecto de AtIsu1 y AtHscB sobre la cinética de AtHscA2

Para evaluar si la interacción observada entre AtIsu1, AtHscB y AtHscA2 provoca un efecto sobre la actividad ATPasa de AtHscA2, se midió la hidrólisis de ATP en presencia y ausencia de AtHscB y AtIsu1. Las medidas de actividad ATPasa se realizaron por detección del fosfato inorgánico liberado en la mezcla de reacción por un método colorimétrico (Lanzetta et al., 1979).

Para analizar el efecto de AtHscB sobre la actividad ATPasa de AtHscA2, se realizaron medidas de la hidrólisis de ATP en presencia de diferentes concentraciones de AtHscB (Figura 14A). Los resultados mostraron que la actividad ATPasa no es activada por AtHscB cuando la relación estequiométrica AtHscA2:AtHscB fue 1:1 y 1:5. Sin embargo, cuando la relación estequiométrica entre ambas proteínas fue 1:15, la activación de la actividad ATPasa fue de aproximadamente 1,6 veces.

Luego, decidimos evaluar si la actividad ATPasa de la proteína recombinante AtHscA2 era afectada por AtIsu1 y AtHscB. Cuando evaluamos los efectos de las diferentes concentraciones de AtHscB cuando AtIsu1 permaneció constante (relación 1:1 con respecto a AtHscA2). La actividad ATPasa de AtHscA2 fue incrementada alrededor de 2.7 y 3.0 veces cuando la relación molar de AtHscA2:AtIsu1:AtHscB fue 1:1:0.2 y 1:1:1, respectivamente (Figura 14B). Cuando la concentración de AtHscB fue 2, 5 o 8 veces mayor, la actividad de AtHscA2 fue incrementada 5, 6,1 y 6 veces, respectivamente (Figura 14B)

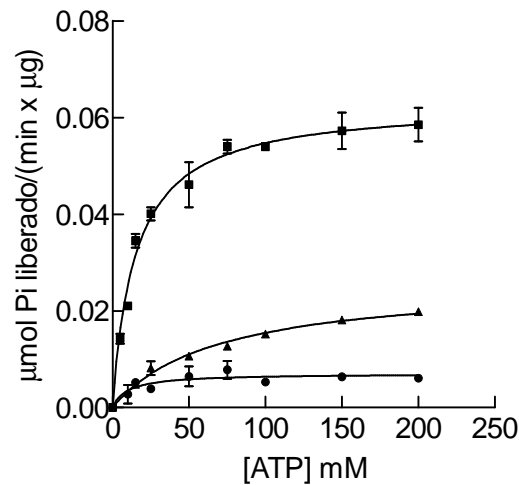
Cuando la concentración de AtHscB permaneció constante (relación molar 1:1 respecto a AtHscA2), observamos que la activación de AtHscA2 fue de 3,1, 5,5 y 5,4 veces cuando las relaciones molares de AtHscA2:AtHscB:AtIsu1 fueron 1:1:1, 1:1:5 y 1:1:10, respectivamente (Figura 14C). Estos resultados, sugieren que AtIsu1 y AtHscB podrían modular cooperativamente la actividad catalítica de AtHscA2.



**Figura 14. Efecto de AtHscB y AtIsu1 sobre la actividad ATPasa de AtHscA2.** A) La actividad de AtHscA2 se determinó en ausencia o presencia de diferentes relaciones molares de AtHscB. B) La actividad de AtHscA2 se determinó en presencia de relaciones equimolares 1:1 de AtHscB y AtHscA2 y en presencia de diferentes relaciones molares de AtIsu1 C) La actividad de AtHscA2 se determinó en presencia de diferentes relaciones molares de AtHscB, AtIsu1 y AtHscA2. Para todas las medidas de actividad ATPasa se realizaron utilizando (0,5  $\mu$ M AtHscA2) y empleando concentraciones saturantes de sustrato (500  $\mu$ M ATP). Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas. ( $P < 0,05$ )

Para analizar en mayor detalle el efecto de AtHscB y AtIsu1 sobre la actividad ATPasa de AtHscA2 y avanzar en la caracterización bioquímica de la enzima, se estudió el comportamiento cinético de la chaperona y se determinaron sus parámetros cinéticos,  $S_{0.5}$  y  $V_{max}$ . En ausencia de AtHscB y AtIsu1, la actividad catalítica de AtHscA2 presentó una cinética tipo Michaelis-Menten y el valor de  $S_{0.5}$  y  $V_{max}$  obtenidos fueron de  $38 \pm 0,3 \mu$ M y  $7,3 \pm 0,8$  mU/mg, respectivamente. (Figura 15). La presencia de concentraciones equimolares de AtHscB y AtIsu1, no produjo variaciones en la afinidad aparente por ATP, mientras que la  $V_{max}$  se incrementó de 3,2 veces y la eficiencia catalítica mostró un incremento de aproximadamente 28 veces. (Figura 15) Cuando los parámetros cinéticos fueron analizados en

presencia de la relación molar 1:5:5 de AtHscA2:AtHscB:AtIsu1 la afinidad aparente de AtHscA2 por ATP disminuyó 3,2 veces, pero la  $V_{max}$  sufrió un aumento de 8,8 veces con respecto a la obtenida con sólo AtHscA2. (Figura 14C y 15). Además los resultados muestran que la eficiencia de la actividad catalítica se incrementó 28 veces bajo estas condiciones. Figura 15, tabla 9.



**Figura 15: Efecto de AtHscB y AtIsu1 sobre la actividad ATPasa de AtHscA2.** La Hidrólisis de ATP se determinó utilizando 0,5  $\mu$ M AtHscA2 en ausencia de AtHscB y AtIsu1 (círculos negros) o en presencia de AtIsu1 y AtHscB en una relación molar 1:1:1 (triángulo) o una relación molar 1:5:5 (cuadrados) de AtHscA2:AtHscB:AtIsu1.

**Tabla 9. Parámetros cinéticos de AtHscA2 en presencia o ausencia de AtHscB y AtIsu1**

	$S_{0.5}$ ( $\mu$ M)	$nH$	$V_{max}$ (mU/mg)	$V_{max}/S_{0.5}$
AtHscA2	$38 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,8$	$0,19 \pm 0,04$
AtHscA2:AtIsu1:AtHscB (1:1:1)*	$42 \pm 4$	$1,1 \pm 0,2$	$21,3 \pm 1,6$	$0,50 \pm 0,08$
AtHscA2:AtIsu1:AtHscB (1:5:5)*	$12 \pm 2$	$1 \pm 0,1$	$64,2 \pm 4,3$	$5,33 \pm 1,25$

\*Relación molar

#### 4.1.4. Discusión del capítulo I

Al presente, el sistema de biogénesis de los centros Fe-S y su transferencia hacia apo-proteínas es poco conocido. Este es un proceso complejo y comprende diferentes proteínas encargadas de su correcta formación (Lill et al., 2012; Balk and Schaedler, 2014). El ensamble de los grupos Fe-S se produce sobre una proteína *scaffold* y luego los mismos transferidos a una apo-proteína (Balk and Schaedler, 2014). En este último paso participarían, una chaperona y co-chaperona mitocondriales, que se unirían a la proteína *scaffold* (Dutkiewicz et al., 2003; Andrew et al., 2006). La hidrólisis de ATP por parte de la chaperona, produciría un cambio estructural de la proteína *scaffold* que facilitaría la disociación y la transferencia del centro Fe-S hacia una apo-proteína (Andrew et al., 2006; Chandramouli and Johnson, 2006; Bonomi et al., 2008; Markley et al., 2013).

Los estudios que se han realizado hasta el momento, indican que todas las proteínas que componen la maquinaria de la biogénesis de los centros Fe-S en la bacteria ancestral, se han conservado en todos los eucariotas. Estudios realizados en *Arabidopsis* indican que la co-chaperona (AtHscB) y la proteína *scaffold* (AtIsu1), han sido conservadas en plantas. Xu y col., 2009 han demostrado que AtHscB puede reemplazar funcionalmente a Jac1 (Xu et al., 2009). Además, se ha demostrado que AtIsu1 puede complementar cepas de levaduras mutantes en Isu1 (Tone et al., 2004; Leon et al., 2005), sugiriendo que AtHscB y AtIsu1 han sido conservadas en plantas y que estarían involucradas en la biogénesis de los centros Fe-S (Tone et al., 2004; Leon et al., 2005; Xu et al., 2009).

Sin embargo, se postuló que la chaperona mitocondrial (HscA) especializada en la formación de centros Fe-S, no fue transferida o no fue mantenida en las eucariotas ancestrales (Schilke et al., 2006). Distintos análisis realizados sobre las chaperonas involucradas en la formación de los centros Fe-S han sugerido, que la función de HscA fue adoptada por las chaperonas mitocondriales de los diferentes organismos, que además de cumplir su rol en el plegamiento de proteínas, actúan también en la biogénesis de los centros Fe-S (Uhrigshardt et al., 2010; Lill et al., 2012).

A pesar de lo mencionado, diversos trabajos han reportado que en el ancestro común de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, la duplicación del gen que codifica para la Hsp70 mitocondrial generó una nueva chaperona especializada en la biogénesis de los centros Fe-S, que no es

ortóloga al gen que codifica para la chaperona bacteriana HscA. Las dos chaperonas descritas en *S. cerevisiae* son Ssc1 y su paraloga Ssq1 (Voisine et al., 2001; Schilke et al., 2006). Como mencionamos, Ssq1 es una Hsp70 mitocondrial especializada en la biogénesis de los centros Fe-S, mientras que Ssc1 es una Hsp70 multifuncional que está involucrada en procesos como translocación de proteínas a través de la membrana interna mitocondrial, plegamiento de proteínas y reactivación o degradación de proteínas expuestas a estrés (Schilke et al., 2006). A pesar de que Ssc1 es multifuncional, se ha reportado que esta proteína también ha retenido la capacidad para funcionar en la biogénesis de centros Fe-S (Voisine et al., 2001). Células de *S. cerevisiae* mutantes  $\Delta$ ssq1 presentan defectos en el crecimiento y reducción en la actividad de ferrosulfoproteínas, mientras que la sobreexpresión de Ssc1 parcialmente suprime este fenotipo (Voisine et al., 2001). Además, se ha comprobado que la actividad ATPasa de Ssc1 también es estimulada por Jac1, pero dicha estimulación es mucho menos eficiente que la estimulación observada en Ssq1, indicando que la interacción de Ssc1 con Jac1 es menos específica (Schilke et al., 2006; Puksza et al., 2010).

Como mencionamos anteriormente, las secuencias aminoácidas de todas las Hsp70 se encuentran conservadas en la naturaleza. Las diferentes isoformas exhiben un alto grado de conservación de secuencia, sugiriendo que todas ellas presentan características estructurales similares. La región N-terminal, comprende un dominio de unión a nucleótido (NBD), el cual tiene actividad ATPasa. Una corta región une el dominio N-terminal con el segmento C-terminal, el cual contiene un dominio de unión al péptido (PBD). Éste último dominio les permite interactuar con una dada proteína. Schilke et al (2006) han demostrado que los dominios PBD de Ssq1 de *S. cerevisiae* y *C. albicans* únicamente interacciona con el motivo PPVK de Isu1. Dicha interacción, es requerida para la funcionalidad de estas chaperonas en las células (Hoff et al., 2002; Dutkiewicz et al., 2004; Schilke et al., 2006), mientras que los dominios PBD de las proteínas Ssc1 de *C. albicans* y *S. cerevisiae*, reconocen el motivo PPVK de la proteína *scaffold* Isu1, pero además interacciona con motivos pertenecientes a diversas proteínas (Schilke et al., 2006). El estudio también fue realizado con dominios PBD de chaperonas provenientes de especies, que no contienen una chaperona mitocondrial específica en la formación de los centros Fe-S, tales como *Y. lipolytica* y humanos, los resultados mostraron que, dicho dominio se comporta como el dominio PBD de Ssc1 de *S. cerevisiae*, es decir, interacciona el motivo PPVK, y además, reconoce los motivos de diferentes proteínas. Estos resultados coinciden con la hipótesis de que, en especies que han

perdido Ssq1, Ssc1 estaría implicada en la biogénesis de los centros Fe-S (Schilke et al., 2006).

*Arabidopsis* tienen dos potenciales chaperonas mitocondriales que podrían estar involucradas en la biogénesis de centros Fe-S. *AtHscA1* y *AtHscA2* surgieron por duplicación génica y codifican para dos chaperonas mitocondriales (Huynen et al., 2001). Los transcriptos de *AtHscA1* fueron detectados a altos niveles en raíces, pero los niveles de los transcriptos de *AtHscA2* fueron muy bajos para resolver la expresión órgano-específica, indicando que los niveles de los transcriptos de *AtHscA2* son menos abundantes que los de *AtHscA1* (Sung et al., 2001).

Previamente se ha reportado que *AtHscA1* puede complementar la cepas mutantes  $\Delta$ *ssq1* de *S. cerevisiae* (Xu et al., 2009). Además, Xu et al (2009) también ha reportado que *AtHscB* puede interactuar con *AtIsu1*. Estos resultados coinciden con la interacción encontrada con las proteínas *Jac1/Isu1* de levaduras. Todos estos datos, sugieren que las interacciones *Jac1/Isu1* y *AtHscB/AtIsu1* juegan un rol importante en la biogénesis de los centros Fe-S.

Con el objetivo de caracterizar la segunda Hsp70 mitocondrial, *AtHscA2*, evaluamos en el laboratorio la posible interacción con *AtIsu1* y *AtHscB*. Nuestros resultados muestran que *AtHscB* y *AtHscA2* interactúan físicamente *in vitro*. Además, encontramos que *AtIsu1* también podría interactuar físicamente con *AtHscB* y *AtHscA2*. Estos resultados concuerdan con el modelo para levaduras, en dónde *Jac1* se une a la proteína *scaffold Isu1* mediante el dominio conservado, y luego, este complejo, reclutaría la chaperona (Dutkiewicz et al., 2003; Ciesielski et al., 2012).

Con el objetivo de investigar si la interacción entre *AtHscA2*, *AtHscB* y *AtIsu1* modula la actividad catalítica de *AtHscA2*. Se llevaron a cabo las medidas de actividad ATPasa de *AtHscA2* en presencia o ausencia de *AtHscB* y *AtIsu1*. En presencia de *AtHscB* mostró que dicha proteína es capaz de activar 1,9 veces la hidrólisis de ATP cuando la relación molar entre *AtHscA2:AtHscB* es 1:15, indicando que *AtHscB* por sí sola modula levemente la actividad catalítica de *AtHscA2*. Este resultado coincide con lo informado por Dutkiewicz y col. (2003), en dónde mostraron que son necesarias altas concentraciones de *Jac1* (relación molar 1:50 de *Ssq1:Jac1*) para aumentar la actividad catalítica de *Ssq1* 4,8 veces. Cuando se evaluó la hidrólisis de ATP en presencia de relaciones equimolares de

AtHscB y AtIsu1, se observó un aumento de 3,5 veces de la actividad ATPasa de AtHscA2, sugiriendo que AtHscB y AtIsu1 podrían modular la actividad catalítica de AtHscA2. Es importante destacar que la hidrólisis de ATP fue activada 2,9 veces cuando la relación molar entre AtHscA2:AtIsu1:AtHscB fue 1:1:0,2, sugiriendo la importancia de AtIsu1 en la modulación de la actividad catalítica de AtHscA2. El mayor aumento de la actividad de AtHscA2 fue de 10 veces, el cual fue logrado cuando la relación molar de AtIsu1 fue 5 veces mayor en relación a AtHscA2 y AtHscB (1:1:5 AtHscA2:AtHscB:AtIsu1). Estos resultados sugieren que AtHscB y AtIsu1 son proteínas claves en la modulación de la actividad catalítica de AtHscA2 y que, además, AtHscB y AtIsu1 actúan cooperativamente.

Como mencionamos anteriormente, las chaperonas de levaduras interactúan con el péptido LPPVK de Isu1 (Cupp-Vickery et al., 2004; Dutkiewicz et al., 2004; Schilke et al., 2006). Además, La hidrólisis de ATP de Ssq1 depende estrictamente de dicha interacción (Dutkiewicz et al., 2004). Nosotros encontramos que el motivo LPPVK se encuentra entre los aminoácidos 130 y 136 de la secuencia de AtIsu1, indicando que este motivo se encuentra conservado en plantas. De estos datos podemos asumir que el mecanismo de interacción entre AtIsu1 y AtHscA2 podría ser similar al encontrado entre Isu1/Ssq1 y que el aumento en la actividad de AtHscA2 observado en este trabajo podría depender de la interacción con el motivo LPPVK de AtIsu1.

Todos estos resultados sugieren que AtHscA2 interactuaría con AtHscB y AtIsu1 y que dicha interacción modularía la actividad catalítica de AtHscA2. Los resultados obtenidos en este capítulo de la tesis, coinciden con los obtenidos para sus homólogas en levaduras (Dutkiewicz et al., 2003; Andrew et al., 2006). Además, el modelo propuesto, en el cual Jac1 interactuaría con Isu1 para luego guiarla hacia Ssq1 (Dutkiewicz et al., 2003; Ciesielski et al., 2012), parece haber sido conservado en plantas.

Se ha planteado, que este modelo podría ser clave para la formación de los centros Fe-S en las especies que no contengan chaperonas específicas en la formación de dichos grupos (Andrew et al., 2006). Las Hsp70s multifuncionales, deben interactuar con diferentes proteínas substratos, así como con diferentes proteínas J. La interacción con las diferentes proteínas, les permite funcionar en diversos procesos, tales como importe y plegamiento de proteínas, y además, en la biogénesis de los centros Fe-S (Schilke et al., 2006). Por este motivo, la selección de un determinado substrato podría depender específicamente del

mecanismo de reclutamiento, en dónde, la interacción de la proteína J con un substrato, induciría el reclutamiento de la Hsp70 (Andrew et al., 2006).

Como mencionamos anteriormente, AtHscB y AtIsu1, han sido descritas como proteínas involucradas en la biogénesis de los centros Fe-S (Tone et al., 2004; Leon et al., 2005; Xu et al., 2009). Estudios previos, han mostrado que AtHscB y AtIsu1 modulan la actividad ATPasa de AtHscA1 y que además, esta última, es capaz de complementar a Ssq1, sugiriendo que AtHscA1 podría intervenir en el ensamble de los centros Fe-S (Xu et al., 2009). Sin embargo, este dato no es concluyente, debido a que, como mencionamos anteriormente, las chaperonas mitocondriales, a pesar de no ser específicas son capaces de cumplir el rol de Ssq1 (Schilke et al., 2006). En el presente capítulo, observamos que AtHscA2, también es capaz de interactuar con AtIsu1 y AtHscB y que su actividad también es modulada por dicha interacción.

Posiblemente en *Arabidopsis*, como en la mayoría de los organismos, no exista una chaperona específica para la biogénesis de los centros Fe-S. Sin embargo, en conjunto, estos resultados, nos permiten proponer que el rol del sistema chaperona/ co-chaperona en la maduración de los centros Fe-S en mitocondrias de plantas *Arabidopsis*, se encuentra conservado.

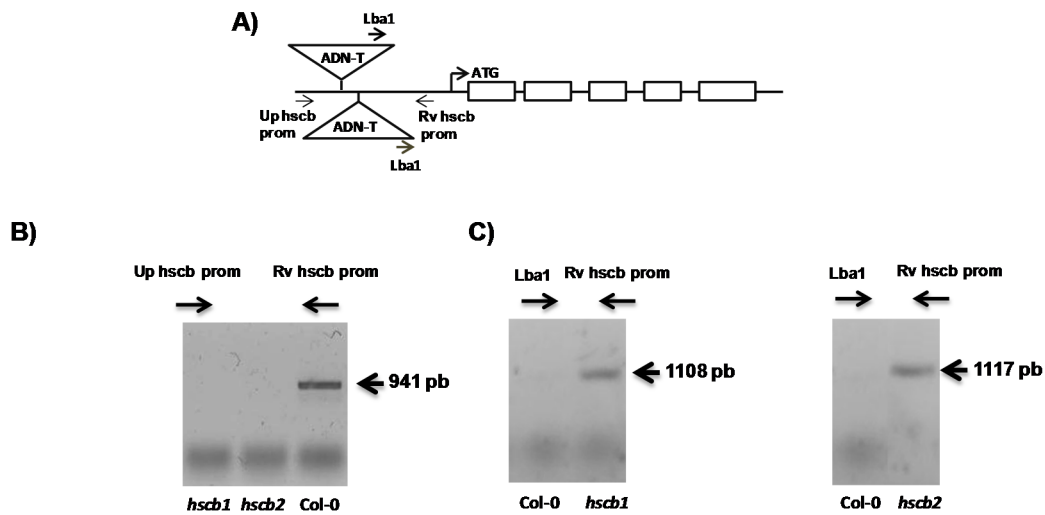
## **4.2. Capítulo II:**

### **Caracterización funcional de AtHscB *in vivo***

#### 4.2.1. Obtención de líneas sobreexpresantes y deficientes *AtHscB*

Para identificar el rol que cumple *AtHscB* *in vivo*, nos propusimos realizar pruebas de ganancia y pérdida de función de dicha proteína en plantas de *Arabidopsis*. Para las pruebas de pérdida de función contábamos con plantas mutantes deficientes por inserción de ADN-T en el promotor de *AtHscB* (At5g06410) y para las pruebas de ganancia de función generamos plantas que sobreexpresan *AtHscB* constitutivamente.

Las líneas con expresión reducida *AtHscB* (*knock down*), denominadas *athscb*, se obtuvieron de “*Arabidopsis Biological Resource Center*” (ABRC). Ambas líneas son mutantes por inserción de ADN-T, llamadas SALK 099684 (*hscb1*) y SALK 020271 (*hscb2*). Dichas líneas tienen la inserción del ADN-T en la región no traducida (5’UTR) por delante del codón ATG de inicio de la traducción (Figura 16A). Para confirmar si estas dos líneas efectivamente contenían la inserción del ADN-T en su genoma, se realizó un análisis por PCR utilizando el oligonucleótido Lba1 (que se une específicamente al extremo izquierdo del ADN-T) y un oligonucleótido que se une específicamente a la secuencia del gen *AtHscB*. La amplificación de la secuencia de ADN de 1108 pb en las líneas *hscb1* y 1117 pb en las líneas *hscb2*, confirma que el ADN-T se encuentra insertado adecuadamente en el gen *AtHscB* (Figura 16C). Las plantas mutantes homocigotas fueron identificadas mediante PCR utilizando como molde ADNg y oligonucleótidos específicos para los sitios flanqueantes al lugar de inserción del ADN-T. En este caso, la banda de ADN de 941 pb se obtuvo para la línea Col-0, mientras que no hubo amplificación en las líneas *athscb*. (Figura 16B).



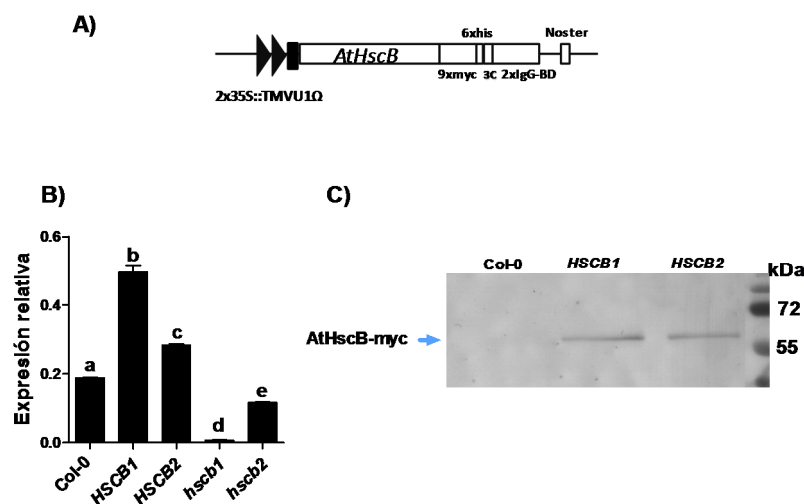
**Figura 16. Análisis de líneas SALK 099684 (*hscb1*) y 020271 (*hscb2*)** A) Diagrama de la inserción del ADN-T en las plantas mutantes *athscb*. Análisis de la inserción del ADN-T mediante el gel de agarosa al 1% P/V en las líneas SALK *hscb1* y *hscb2*. B) utilizando los oligonucleótidos Up hscb prom y Rv hscb prom C) utilizando los oligonucleótidos Lba1 y Rv hscb prom. El tamaño del ADN amplificado está indicado en cada figura.

Las plantas *Arabidopsis* que sobreexpresan constitutivamente AtHscB fueron generadas a partir de la secuencia de ADN que codifica para la proteína AtHscB (conteniendo la secuencia del péptido tránsito). Esta secuencia que se clonó en el vector binario pCTAPa (que contiene el sistema TAP *Tandem affinity purification*) (Rubio et al., 2005). El *tag* de purificación está compuesto por dos copias del dominio de unión a inmunoglobulina de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (2xIgG-BD), un sitio de clivaje para la proteasa 3C de rinovirus humano (3C), seis histidinas (6xHis) y nueve epitopes myc (9xmyc) (Figura 17A) (Rubio et al., 2005). El plásmido obtenido (pAtHscB-myc) se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis* mediante la técnica de *floral dip* (Clough and Bent, 1998). Las semillas portadoras de la construcción *AtHscB-myc* se seleccionaron con gentamicina, obteniéndose 10 líneas independientes. La presencia de la construcción *AtHscB-myc* en las diferentes líneas se confirmó mediante PCR utilizando como molde ADNg y oligonucleótidos diseñados específicamente para evitar la amplificación de la secuencia de *AtHscB* endógena.

Una vez obtenidas las líneas homocigotas *AtHscB-myc* y también las líneas homocigotas *athscb*, se procedió a realizar la extracción de ARN de todas las líneas en estudio y de plantas de tipo salvaje (Col-0) y posteriormente el ARN total fue sometido a transcripción reversa. El análisis de los niveles de expresión del gen endógeno *AtHscB* se

llevó a cabo mediante PCR en tiempo real (QPCR), utilizando la amplificación del gen  $\beta$ -*Actina2* (At1g01750) como control interno. De las plantas *AtHscB-myc* se eligieron dos líneas que presentaron diferentes niveles de expresión del transgén, y se las denominaron *HSCB1* y *HSCB2*. Mientras que, las líneas deficientes en *AtHscB*, se las denominó *hscb1* y *hscb2*, como se describió más arriba (Figura 17B).

La presencia de la proteína *AtHscB-myc* en las plantas sobreexpresantes se analizó mediante ensayos de *western blot* utilizando anticuerpos comerciales anti-myc. En la figura 17C se observa que las líneas *HSCB1* y *HSCB2* presentaron una banda inmunoreactiva de masa molecular aproximada de 64 kDa, que es el tamaño esperado para la proteína *AtHscB* unida al TAP de purificación. Esta banda no se encontró presente en plantas control (Col-0), confirmando que el gen *AtHscB-myc* se expresa y traduce correctamente en las dos líneas sobreexpresantes elegidas.

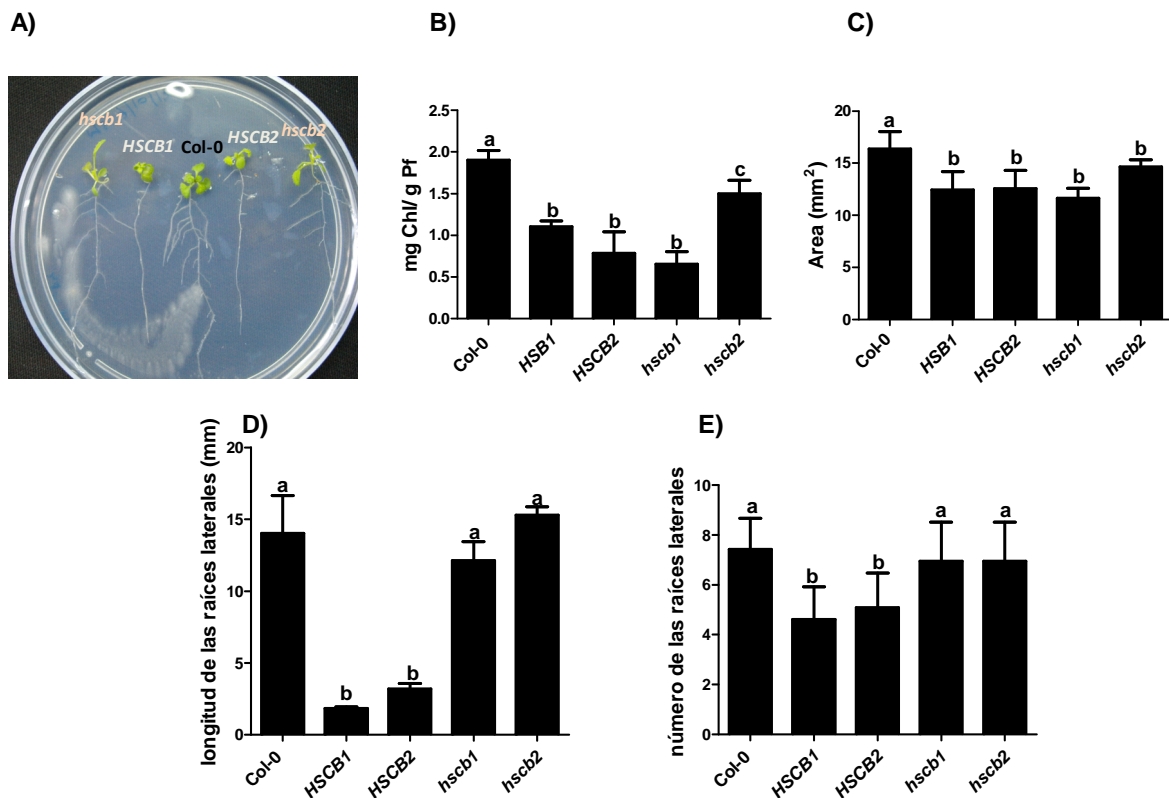


**Figura 17. Análisis de expresión de *AtHscB*.** A) Diagrama de la construcción *AtHscB-myc*. B) Expresión del gen endógeno *AtHscB* relativa al gen control *Act2* en las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ), Test *t*'student. C) Análisis por *western blot* de los niveles proteicos de *AtHscB-myc* en extractos de plántulas *HSCB1*, *HSCB2* y Col-0 crecidas durante 15 d.

#### 4.2.2. Estudio del fenotipo de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*

Con el objetivo de estudiar los efectos que podría causar la variación de los niveles de *AtHscB*, se decidió analizar el fenotipo de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*. La figura 18A

muestra que luego de 15 días de crecimiento, las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, presentaron clorosis y una disminución en el crecimiento foliar. Las medidas de clorofila total, mostraron una reducción del 43% y 59% en las líneas *HSCB1* y *HSCB2*, respectivamente, mientras que la disminución observada en las líneas *hscb1* y *hscb2* fue del 66% y 22%, respectivamente, respecto a los niveles encontrados en la línea Col-0 (Figura 18B). El área foliar de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* también mostró una disminución del 20% en relación a la línea salvaje (Figura 18C). Al estudiar el crecimiento de las raíces de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, observamos que la longitud de la raíz primaria de estas líneas no varió significativamente con respecto a la Col-0. Sin embargo, las líneas *AtHscB-myc* presentaron una reducción en el número y la longitud de sus raíces laterales, mientras que el número y la longitud de las raíces laterales de las líneas *athscb* fueron similares a las de la línea Col-0 (Figura 18D y 18E).

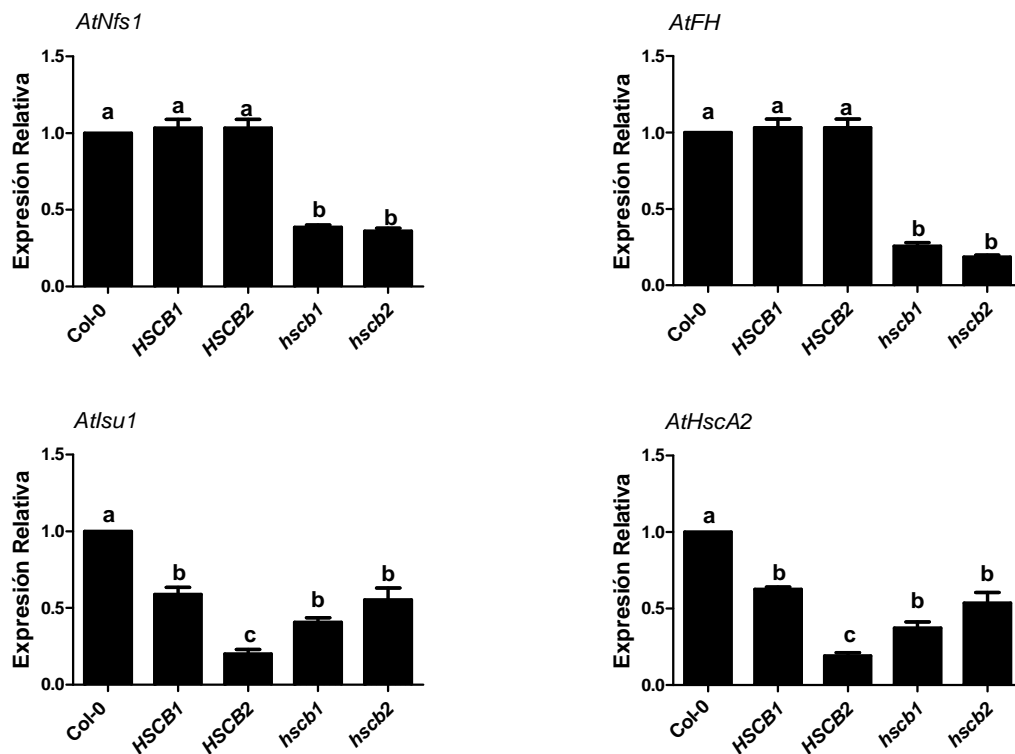


**Figura 18. Caracterización fenotípica de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*.** Las plántulas crecidas durante 15 días en medio MS fueron A) fotografiadas B) medidas del contenido de clorofilas, C) medidas del área de las

hojas de la roseta, D) promedio de la longitud y E) el número de las raíces laterales fue determinada. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ), test *t' student*.

#### 4.2.3. Estudio de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de centros Fe-S

Para estudiar si la expresión de los genes que participan en la síntesis de los centros Fe-S muestran alteraciones en sus niveles en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, se realizaron ensayos de QPCR para los genes *AtNfs1*, *AtFH*, *AtIsu1* y *AtHscA2*. La figura 19 muestra que la expresión de los genes *AtNfs1* y *AtFH* en las líneas *AtHscB-myc* (*HSCB1* y *HSCB2*) no varió significativamente con respecto a la Col-0, mientras que en las líneas *athscb* (*hscb1* y *hscb2*), se observó la disminución de alrededor de 6 y 8 veces de los niveles de los transcritos de *AtNfs1* y *AtFH*, respectivamente. El análisis de los genes *AtIsu1* y *AtHscA2*, mostró una disminución en ambas líneas estudiadas: la expresión de *AtIsu1* se redujo 4 y un 8 veces en las líneas *HSCB1* y *HSCB2*, mientras que en las líneas *hscb1* y *hscb2* la disminución observada fue del 6 y 4 veces, respectivamente. Los datos revelaron que el patrón de expresión de *AtHscA2* fue similar al encontrado en *AtIsu1* (Figura 19). Estos resultados sugieren que la disminución de AtHscB en plantas produce una disminución en la expresión de los genes que participan en la vía de síntesis de los centros Fe-S. Sin embargo, el aumento de AtHscB, sólo altera los niveles de los transcritos de *AtIsu1* y *AtHscA2*.



**Figura 19.** Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de *AtNfs1*, *AtFH*, *AtIps1* y *AtHscA2* en las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*. Para todos los genes estudiados, se toma como valor 1 (uno) su expresión en la línea Col-0. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ), test *t'* student.

#### 4.2.4. Efecto de AtHscB sobre la actividad de las proteínas Fe-S mitocondriales.

Las proteínas que usan los centros Fe-S como cofactor, son necesarias en diversos procesos cruciales para las células. Una de las funciones más importantes está relacionada con la transferencia de electrones en los complejos respiratorios mitocondriales y en el aparato fotosintético de cloroplastos (Balk and Lobreaux, 2005; Lill and Muhlenhoff, 2008). Las ferrosulfoproteínas, 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 de un centro Fe-S es oxidado o reducido dependiendo del microambiente en que se encuentre y el tipo de proteína a la cual esté unido (Beinert, 2000). Algunos ejemplos de proteínas Fe-S son los complejos respiratorios mitocondriales CI, CII y CIII; la aconitasa, presente en la matriz mitocondrial y relacionada con el ciclo de Krebs (Beinert et al., 1997), la nitrogenasa, relacionada con la fijación de  $N_2$

(Peters et al., 1995) la aldehído oxidasa, involucrada en la biosíntesis de ácido indolacético y ácido absísico (Andrade et al., 2000) y la ferredoxina que participa en el proceso fotosintético (Palmer and Sands, 1966).

El complejo respiratorio II, CII, cataliza la reducción de ubiquinona a ubiquinol. Este complejo multiproteico, también llamado succinato deshidrogenasa, está asociado a la membrana interna mitocondrial y además es un componente del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), catalizando la oxidación de succinato a fumarato (Lemire and Oyedotun, 2002; Yankovskaya et al., 2003).

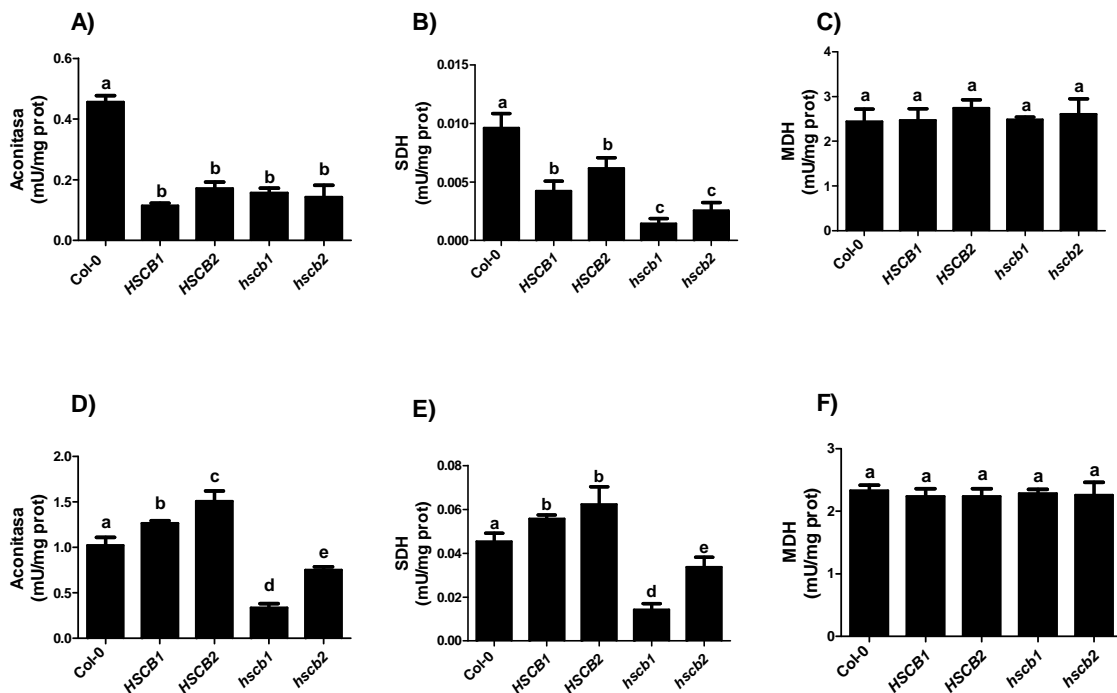
El CII ha sido caracterizado en bacterias, protozoos, hongos y animales y en todos ellos se ha encontrado que está compuesto por cuatro subunidades: una flavoproteína (SDH1), una subunidad Fe-S (SDH2), y dos subunidades de anclaje a membrana (SDH3 y SDH4) (Horsefield et al., 2004; Millar et al., 2004). El sitio de unión al succinato está formado por el polipéptido SDH1, el cual se une covalentemente al FAD, actuando como aceptor de protones en el paso inicial de la oxidación del succinato. Esta subunidad flavoproteica, interactúa con la subunidad Fe-S que contiene tres centros Fe-S no hemínicos, [2Fe-2S], [4Fe-4S] and [3Fe-4S], que actúan como conductores de electrones desde la flavoproteína hacia la membrana (Scheffler, 1998; Ackrell, 2000; Huttemann et al., 2008). Otra de las ferrosulfoproteínas encontrada en mitocondrias es la aconitasa, la cual participa en el TCA catalizando la conversión de citrato a isocitrato en la matriz mitocondrial. Esta proteína contiene un centro Fe-S del tipo [4Fe-4S] y la actividad de esta enzima depende exclusivamente de que dicho centro se encuentre en la forma cúbica [4Fe-4S] y no en otras formas como por ejemplo [3Fe-4S] (Beinert et al., 1996; Gardner, 2002). Se ha descrito que aconitasa interactúa con frataxina, y ésta última disminuye los niveles de oxidación que ocasionan la inactivación de la enzima. De esta forma, frataxina convierte la forma inactiva [3Fe-4S] de la aconitasa en la forma activa [4Fe-4S] de la proteína proveyendo un cuarto átomo de Fe para completar el *cluster*. Así, frataxina funcionaría como una chaperona de Fe, protegiendo el desensamblado del grupo [4Fe-4S] y promoviendo la reactivación de la enzima (Bulteau et al., 2004).

La disminución de los niveles de proteínas que participan en la síntesis de los centros Fe-S, ha sido asociada, a la reducción de la actividad de las ferrosulfoproteínas, aconitasa y SDH (Busi et al., 2006; Xu et al., 2009). Con la intención de analizar si la actividad de estas enzimas variaba en las líneas *athscb* y *AtHscB-myc*, se decidió realizar los

ensayos de las medidas de actividad de aconitasa y SDH en raíces y hojas de plántulas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* de 15 días de edad, tal como se describe en Materiales y Métodos (Sección 3.22.1). La figura 20A muestra que en las hojas de las líneas *HSCB1*, *HSCB2* y *hscb1*, la actividad aconitasa disminuyó aproximadamente un 60%, mientras que en la línea *hscb2* se redujo un 72%, con respecto a la línea Col-0. Al analizar la actividad SDH en las hojas de las líneas *athscb* y *AtHscB-myc*, se encontró una reducción de la misma de alrededor del 60% en las hojas de ambas líneas (Figura 20B).

Cuando la actividad de las enzimas aconitasa y SDH se midieron en las raíces de las líneas *athscb* se encontró una disminución del 60% respecto al control (Figura 20D y E). Sin embargo, en las raíces de la línea *HSCB1*, se observó un aumento del 20% en la actividad aconitasa y SDH, mientras que en las raíces de la línea *HSCB2* el incremento de la actividad de estas enzimas fue aproximadamente de un 40%, con respecto a la actividad encontrada en la línea Col-0 (Figura 20D y E). La actividad MDH fue medida en hojas y raíces como control de actividad de una proteína que no contiene centros Fe-S (Figura 20C y F).

La disminución de la actividad aconitasa y SDH en las hojas y las raíces de las líneas *athscb* podría indicar una alteración en la biogénesis de los centros Fe-S de dichas enzimas. Estos resultados sugieren que *AtHscB* podría estar involucrada en la síntesis de los centros Fe-S. Por el contrario, la actividad aconitasa y SDH en las raíces de las líneas *AtHscB-myc* fue diferente a la actividad de estas enzimas en sus hojas, sugiriendo que la síntesis de los centros Fe-S en las hojas de estas líneas podría estar inhibida, mientras que en las raíces la velocidad de ensamble de dicho cofactor se encontraría incrementada.

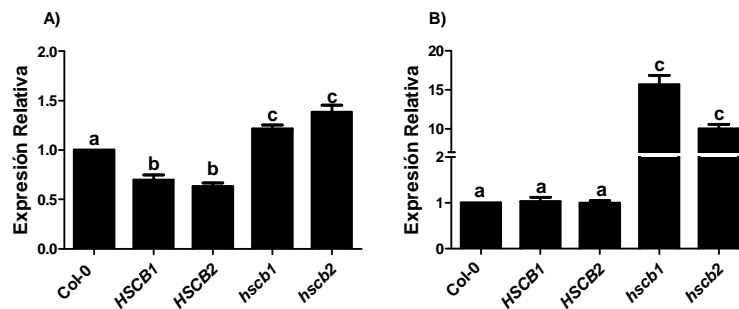


**Figura 20.** Análisis de la actividad de las enzimas aconitasa, SDH y MDH en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*. Determinación de la actividad enzimática de A) aconitasa, B) SDH y C) MDH en las hojas y en las raíces D) aconitasa, E) SDH y F) MDH de las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2* *hscb1* y *hscb2*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ), test *t*'student.

A partir de estos resultados nos propusimos analizar si la actividad obtenida de las enzimas aconitasa y SDH medidas en hojas de las líneas *AtHscB-myc* y *Athscb* se correspondía con los niveles de expresión. Se ha reportado que en plántulas, la isoforma mitocondrial de aconitasa representa la actividad dominante (Arnaud et al., 2007), por este motivo, analizamos la expresión del gen *Aco2* (isoforma mitocondrial) y también del gen *SDH2-1*. Para esto, se realizaron ensayos de QPCR a partir de ADNc obtenido de las plántulas Col-0, *athscb* y *AtHscB-myc*, crecidas durante 15 días. La figura 21A muestra que en las líneas *AtHscB-myc* la expresión de *Aco2* disminuyó aproximadamente unas 2 veces, mientras que en las líneas *athscb*, los niveles de transcritos de *Aco2* aumentaron unas 2,5 veces aproximadamente. El análisis del gen *SDH2-1* no mostró variaciones significativas en las líneas *AtHscB-myc*, mientras que en las líneas *athscb* se observó una inducción de más de 10 veces. Figura 21B.

Mientras la actividad aconitasa y SDH en las hojas de las líneas *AtHscB-myc* se condice con la expresión de sus genes, lo contrario sucede en las hojas de las líneas *athscb*, en

las cuáles, a pesar de la disminución de la actividad de dichas proteínas, se observó un aumento en los niveles de expresión de *Aco2* y *SDH2-1*. Estos resultados indican que la reducción de la actividad aconitasa y SDH observada en las líneas *AtHscB-myc*, podría deberse a una disminución en la expresión de los genes que codifican para dichas proteínas, mientras que en las líneas *athscb*, la síntesis de los centros Fe-S posiblemente sea defectuosa y se refleje en la disminución de la actividad las ferrosulfoproteínas estudiadas.



**Figura 21.** Análisis de los niveles de expresión de los genes A) *Aco2* y B) *SDH2-1* en las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*. Para *Aco* y *SDH2-1* se tomó como valor 1 (uno) la expresión de la línea Col-0. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ), test *t'* student.

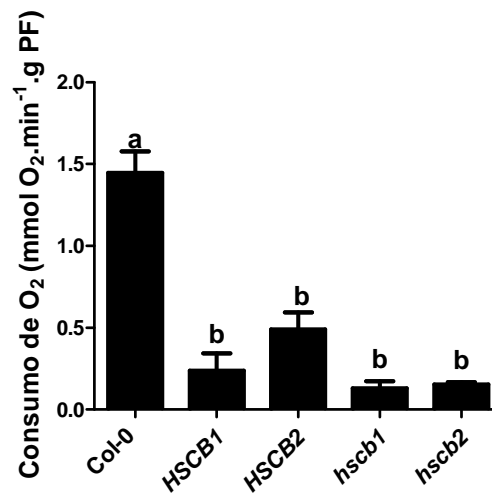
#### 4.2.5. Efecto de *AtHscB* sobre el consumo de oxígeno en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*.

En las mitocondrias se llevan a cabo procesos fundamentales para la vida celular, como la respiración a través de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna, que genera el gradiente electroquímico necesario para la producción de ATP (fosforilación oxidativa) y la oxidación de los ácidos tricarbóxicos.

La cadena de transporte de electrones respiratoria, que cataliza la transferencia de electrones desde NADH o FADH<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>, comprende el complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa), el complejo II (succinato dehidrogenasa), el complejo III (citocromo c reductasa) y el complejo IV (citocromo c oxidasa) (Peters et al., 2012). Debido a las hemo y ferrosulfoproteínas que componen los diferentes complejos respiratorios, dichos complejos requieren, al menos, 40 átomos de Fe para su buen funcionamiento (Vigani, 2012).

Los daños producidos en los centros Fe-S, afectan las ferrosulfoproteínas que integran los complejos respiratorios y, en consecuencia, la respiración de las plantas. Con el

objetivo de analizar si el aumento o la disminución de los niveles de AtHscB causaban cambios en la tasa de respiración, se decidió medir el consumo de O<sub>2</sub> en plántulas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb*. En todas las líneas, observamos una reducción del consumo de O<sub>2</sub> alrededor de un 70% en relación a las plantas Col-0 (Figura 22). Estos resultados sugieren que *athscb* y *AtHscB-myc*, presentan una alteración en la cadena de transporte respiratoria mitocondrial que podría ser producida por la disminución en la formación de centros Fe-S.



**Figura 22.** Determinación del consumo de O<sub>2</sub> en plántulas Col-0, *AtHscB-myc* y *athscb*. El consumo de oxígeno (μmol O<sub>2</sub> · g PF) fue medido en plántulas crecidas durante 15 días. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,01), test *t*'student.

#### 4.2.6. Discusión del capítulo II

Es conocido, que genes, cuyos productos proteicos participan en una misma función o vía metabólica, en general presentan elementos regulatorios comunes. El hecho de que muestren un patrón de expresión similar en varios tejidos y órganos, principalmente en aquellos relacionados con altos requerimientos energéticos, permite postular la existencia de una regulación conjunta. Con el objetivo de analizar si la variación en los niveles de AtHscB afectaba la expresión de los genes *AtNfs1*, *AtFH*, *AtIsu1*, *AtHscA2*, se realizaron ensayos de QPCR en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*. Los resultados mostraron que los niveles de todos los transcritos de los genes estudiados disminuyeron aproximadamente un 50% en las líneas *athscb*, sugiriendo que la reducción de los niveles proteicos de AtHscB en las células, provoca una disminución en la expresión de los genes que participan en la formación de los centros Fe-S.

Como mencionamos anteriormente, AtHscB participaría en la disociación del centro Fe-S de la proteína *scaffold* AtIsu1 (Xu et al., 2009; Lill et al., 2012). Podría plantearse, que probablemente, en las plantas *athscb* los centros Fe-S formados no puedan disociarse, o quizás la velocidad de disociación sea muy lenta. La inhibición de la síntesis de los centros Fe-S en estas plantas, podría provocar la disminución de la transcripción de los genes *AtNfs1*, *AtFH*, *AtIsu1*, *AtHscA2*. Los resultados observados, sugieren que, en este caso, los genes de la vía de la síntesis de centros Fe-S podrían tener una regulación conjunta.

En las líneas *AtHscB-myc*, tanto la proteína AtHscB-myc, como la AtHscB endógena, podrían estar actuando en la disociación de los centros Fe-S. Este hecho, podría provocar que la síntesis de los centros Fe-S fuera normal, y en consecuencia, la expresión de los genes que participan en su síntesis podría ser similar al de las plantas Col-0. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que los niveles de expresión de *AtNfs1* y *AtFH* no varían significativamente, mientras los niveles de *AtIsu1* y *AtHscA2*, disminuyen en relación al control. Indicando que, en este caso, sólo los genes que codifican para las proteínas que interaccionan con AtHscB reducirían su expresión. Mientras que los genes *AtFH* y *AtNfs1* serían regulados de manera diferente al observado en las líneas *athscb*.

En levaduras mutantes la delección de los genes *jac1* (homóloga a *AtHscB*), *ssq1* (homóloga a *AtHscA2*) y *yfh* (homóloga a frataxina de *Arabidopsis*) provoca estrés oxidativo, acumulación de hierro en mitocondrias y deficiencia en la biogénesis de grupos Fe-S, que se

refleja en la reducción de la actividad las enzimas aconitasa y succinato deshidrogenasa (Kim et al., 2001; Busi et al., 2006; Xu et al., 2009; Bernard et al., 2013). Por este motivo, la disminución en los niveles de proteínas involucradas en la formación de los centros Fe-S ha sido asociada a la reducción de la actividad de las ferrosulfoproteínas.

Previamente, en nuestro laboratorio, se ha identificado y caracterizado a frataxina, una chaperona de Fe, involucrada en la síntesis de centros Fe-S y grupos hemo (Busi et al., 2006; Maliandi et al., 2011). Las plantas deficientes en frataxina presentan una disminución de la actividad de las ferrosulfoproteínas, aconitasa y succinato deshidrogenasa (Busi et al., 2006). Resultados similares obtuvimos en las líneas *athscb*, observándose una disminución del 60% de la actividad biológica de las enzimas aconitasa y SDH. Cuando analizamos los niveles de expresión de los genes *Aco2* y *SDH2-1*, en las hojas de las líneas *athscb*, se observó un aumento de 2,5 y más de 10 veces, respectivamente, en los niveles de los transcritos. Estos resultados indican, que las líneas *athscb* podrían estar tratando de compensar la disminución de la actividad aconitasa y SDH, sin embargo, estas enzimas podrían tener afectada la estabilidad de su centro Fe-S, el cual es muy crucial para llevar a cabo su actividad biológica.

Los daños producidos en los centros Fe-S afectan las ferrosulfoproteínas que integran los complejos respiratorios y, en consecuencia, se observa la disminución de la respiración en las plantas (Vigani, 2012; Balk and Schaedler, 2014). Nosotros hemos demostrado que plantas deficientes en frataxina presentan una menor tasa respiratoria (Maliandi, 2009, Tesis Doctoral). En las líneas *athscb* también pudimos observar una disminución del 80% en el consumo de O<sub>2</sub>. El cuál podría estar relacionado con la disminución de la actividad de los complejos respiratorios debido a una reducción de las ferrosulfoproteínas que integran dichos complejos.

Al igual que la reducción en la actividad catalítica de aconitasa y SDH, la disminución en la tasa respiratoria observada en las líneas *athscb*, podría deberse a la deficiencia de la síntesis de los centros Fe-S. En conjunto, todos estos resultados sugieren que AtHscB estaría involucrada en la biosíntesis de dichos grupos.

A diferencia de las líneas *athscb*, las líneas *AtHscB-myc*, presentan un aumento en los niveles de proteína AtHscB. Este aumento, podría generar un incremento en la velocidad del ensamblado de los centros Fe-S, que podría afectar la actividad de las ferrosulfoproteínas. Con el objetivo de evaluar la actividad de las ferrosulfoproteínas en las líneas *AtHscB-myc* se

decidió analizar la actividad biológica de aconitasa y SDH en raíces y hojas. Los resultados mostraron que en las hojas de estas plántulas, la actividad de estas enzimas disminuyó un 70% con respecto a la Col-0. Cuando analizamos los niveles de expresión del gen *Aco2*, se observó una disminución de un 20% en las hojas de las líneas *AtHscB-myc*. La reducción de los niveles de los transcritos *Aco2*, podría reflejar la reducción de la actividad de las enzimas aconitasa, observada en las hojas de estas plantas. Los niveles de los transcritos de *SDH2-1* en las líneas *AtHscB-myc* no variaron significativamente con respecto a la Col-0, indicando que en hojas, la baja actividad SDH observada, podría deberse exclusivamente a daños en la mantención de su centro Fe-S. Lo contrario fue observado en las raíces de las líneas *AtHscB-myc*. Un aumento del 20% fue observado en la actividad de las enzimas aconitasa y SDH en las raíces de la línea *HSCB1*, mientras que el incremento para ambas enzimas en las raíces de las líneas *HSCB2* fue de aproximadamente del 40% con respecto a la Col-0. Estos resultados sugieren que en las raíces de las líneas *AtHscB-myc*, la formación de los centros Fe-S no se encuentra dañada, y probablemente, el ensamble de los centros Fe-S podría ser más eficiente que en las líneas Col-0.

La disminución de la actividad aconitasa y SDH en hojas de las líneas *AtHscB-myc*, podría deberse al aumento de los niveles de AtHscB. Un incremento en los niveles proteicos de AtHscB podría provocar que el complejo formado entre AtHscB, AtIsu1 y la chaperona, no logre transferir el centro Fe-S, debido a un mal plegamiento de la proteína AtHscB-myc. Sin embargo, podemos objetar, que en estas líneas el gen que codifica para la proteína AtHscB endógena, es funcional. Además, el aumento en de la actividad de las enzimas SDH y aconitasa en las raíces de estas líneas, sugieren que la proteína AtHscB-myc podría funcionar junto con la proteína AtHscB endógena.

Trabajos previos han mostrado que bajo deficiencia de Fe, la expresión del gen *Aco2* y en consecuencia la actividad aconitasa, disminuye en relación a la condición control (Arnaud et al., 2007). Además, se ha demostrado que la actividad SDH se reduce drásticamente en plantas de *Arabidopsis*, sometidas a deficiencia de Fe (Vigani et al., 2009). Podríamos hipotetizar que la disminución de la actividad de aconitasa y SDH en las hojas de las líneas *AtHscB-myc* podría ser debida a una reducción en el contenido de Fe en las hojas de estas líneas.

La disminución de la tasa respiratoria en plántulas enteras de las líneas *AtHscB-myc*, indicaría que los complejos respiratorios podrían encontrarse alterados en éstas líneas. Diferentes trabajos han mostrado que las ferrosulfoproteínas que componen los complejos I y II de la cadena respiratoria disminuyen en condiciones de deficiencia de Fe (Vigani et al., 2009; Rodríguez-Celma et al., 2011). En el presente trabajo, pudimos observar la disminución de la actividad del CII. En este caso, podría sugerirse que la disminución de los niveles respiratorios observados en estas líneas, se deberían al detrimento de los complejos respiratorios, posiblemente producido por una reducción en el ensamblaje de los centros Fe-S en las hojas de las líneas *AtHscB-myc*.

Se ha demostrado, que la disminución de la actividad de las ferrosulfoproteínas, podría provocar alteraciones en el metabolismo celular que afectarían el crecimiento vegetativo (Arnaud et al., 2007; Bernard et al., 2009; Balk and Schaedler, 2014). Nuestros resultados indican una reducción del 20% en el área foliar en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* en comparación a la línea salvaje. Este resultado podría atribuirse a la disminución la actividad aconitasa y succinato deshidrogenasa observada en estas líneas.

### **4.3. Capítulo III: Estudio de AtHscB y su relación con el metabolismo del Fe en plantas.**

#### 4.3.1. Análisis de tolerancia a la deficiencia de Fe en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*.

En diferentes organismos, tales como levaduras, mosca de la fruta y animales, existen evidencias de una íntima relación entre la formación de centros Fe-S y el metabolismo del Fe (Lill et al., 1999; Kim et al., 2001; Anderson et al., 2005; Lill and Muhlenhoff, 2008; Kaplan and Kaplan, 2009). Sin embargo, en plantas, no se han encontrado ferrosulfoproteínas involucradas en la regulación de tal metabolismo. (Arnaud et al., 2007; Darbani et al., 2013; Balk and Schaedler, 2014).

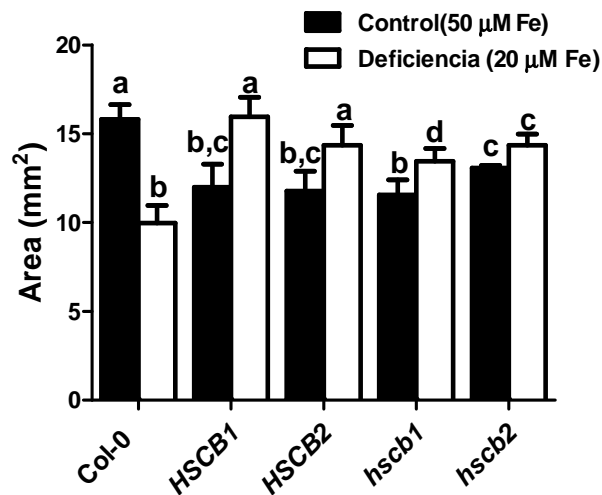
En el capítulo anterior planteamos que la disminución de las actividades aconitasa y SDH observada en las hojas de las líneas *AtHscB-myc*, podría deberse a la disminución del contenido de Fe en este órgano. Para investigar si las líneas *athscb* y *AtHscB-myc* presentan una alteración en el metabolismo del Fe, decidimos estudiar la tolerancia, el transporte, la incorporación y el contenido de Fe en las raíces y las hojas de estas líneas.

Para comenzar, estudiamos la tolerancia a la deficiencia de Fe en las líneas *AtHscB-myc* (*HSCB1* y *HSCB2*) y líneas *athscb* (*hscb1* y *hscb2*). En el capítulo 2 sección 4.2.2, observamos que las plántulas *AtHscB-myc* y *athscb* crecidas durante 15 días en MS-agar presentaban una disminución de aproximadamente 20% de su área foliar en relación a la línea Col-0. Para investigar la tolerancia al estrés por Fe en estas líneas, se procedió a realizar las medidas del área foliar de plántulas crecidas durante 15 días en condiciones de deficiencia (20  $\mu$ M Fe) o en la condición control (50  $\mu$ M Fe) de hierro. La Figura 23 muestra que el área foliar de las plantas Col-0, disminuyó un 35% cuando las plantas fueron sometidas a deficiencia de Fe, con respecto a la condición control.

El análisis del crecimiento del área foliar en líneas sobreexpresantes (*AtHscB-myc*) mostró un aumento del 30% en la línea *HSCB1* y del 20% en la línea *HSCB2* con respecto a la condición control, mientras que el área foliar en líneas con expresión disminuida de *AtHscB* (*athscb*) no varió significativamente cuando fueron sometidas a deficiencia de Fe. Este resultado indica que tanto las líneas *athscb* como las líneas *AtHscB-myc* son tolerantes a la deficiencia de Fe.

El dato que el área foliar de las líneas *AtHscB-myc* bajo condiciones de deficiencia de Fe sea similar al del área foliar de la línea Col-0 en condiciones normales de crecimiento

(Figura 23), y que en condiciones normales se comporten como las plantas tipo salvaje creciendo en déficit sugieren que las líneas sobreexpresantes están sufriendo estrés por exceso de Fe cuando son crecidas bajo condiciones normales de Fe. Las líneas *athscb* en condiciones de crecimiento con contenido normal de Fe también se comportan como las Col-0 crecidas en déficit del metal.

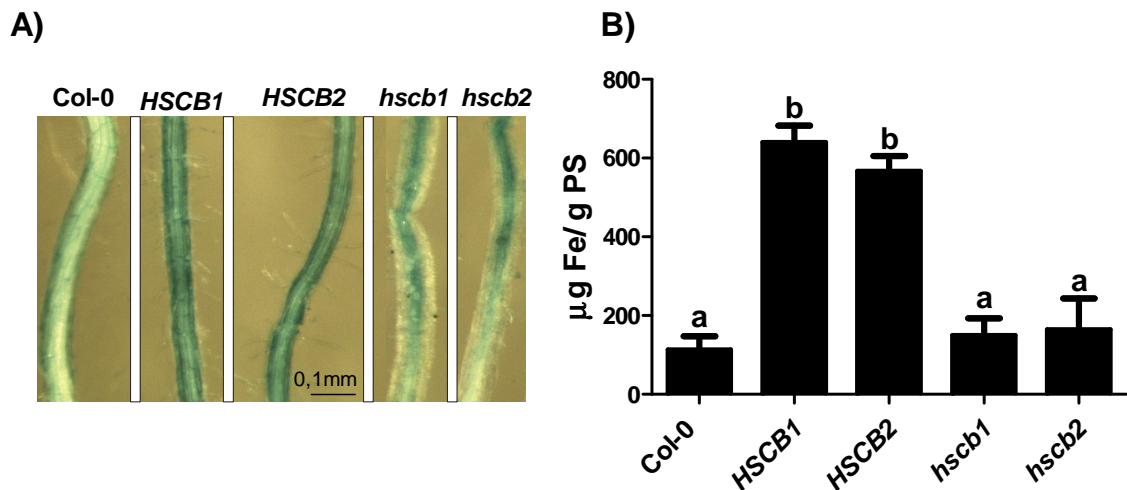


**Figura 23. Análisis del área foliar de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*.** Las plántulas fueron fotografiadas luego de 15 días de crecimiento en placas de MS en condiciones de deficiencia (20 µM Fe) y controles (50 µM Fe) de hierro. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

#### 4.3.2. Acumulación de Fe en las raíces de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*

Para evaluar si las líneas que expresan *AtHscB-myc* y las líneas mutantes *athscb* presentaban una alteración en la distribución del Fe, se decidió ensayar la tinción de Perl's. Dicha tinción permite identificar los depósitos de Fe en las plantas, donde el ión  $Fe^{3+}$  liberado reacciona con el ferricianuro de potasio formando un precipitado insoluble denominado *prussian blue*  $Fe_7(CN)_{18}(H_2O)_x$  (x de 14 a 16) (Meguro et al., 2007). Las plántulas de las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*, crecidas durante 15 días, fueron cosechadas y teñidas. Los resultados indican que las líneas que *AtHscB-myc* presentan un aumento en el contenido de Fe en raíces, en relación a las líneas mutantes *athscb* y las líneas Col-0 como puede observarse en la Figura 24A.

El Fe de las raíces también fue cuantificado por un método espectrofotométrico como se indica en Materiales y Métodos (sección 3.23.2). Luego de 15 días de crecimiento, las raíces de las plántulas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* fueron separadas de la parte aérea y el contenido de Fe de las raíces fue analizado. La Figura 24B muestra que el contenido de Fe en las raíces de las líneas *HSCB1* y *HSCB2* se encuentra incrementado en relación a la Col-0 entre 5 y 4 veces respectivamente, mientras que el contenido de Fe en las plantas mutantes *hscb1* y *hscb2* es similar al de las plantas Col-0.



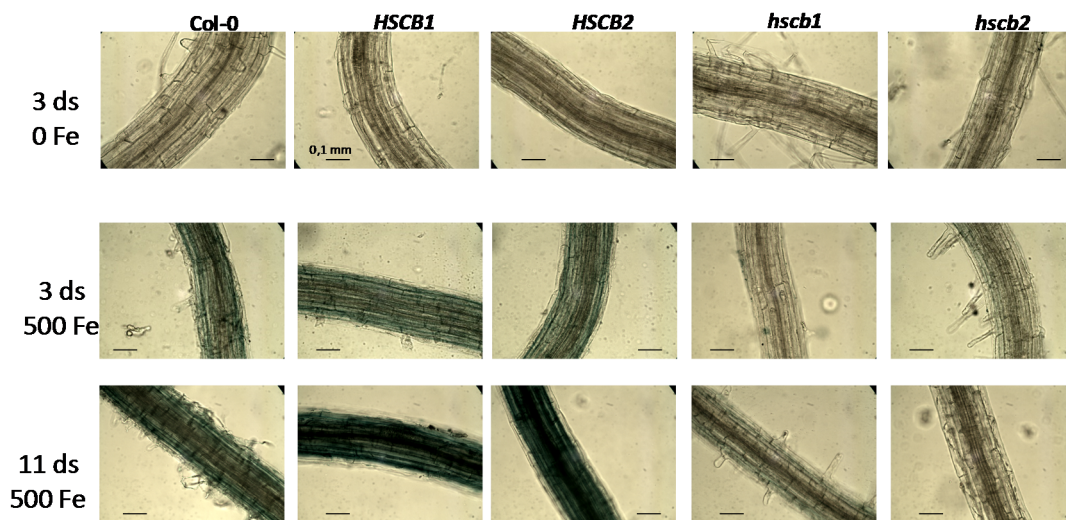
**Figura 24. Determinación del contenido de Fe en las raíces de las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*.** Las distintas líneas fueron crecidas en medio MS durante 15 días y luego las raíces fueron analizadas mediante A) tinción Perl's y B) cuantificación del Fe mediante un análisis espectrofotométrico. La barra corresponde a 0,1 mm. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

En los resultados presentados puede observarse una sobrecarga de hierro en la raíces de las plantas sobreexpresantes y si bien la imagen de la tinción indicaría idéntica situación en las plantas mutantes, la determinación del contenido de Fe por métodos químicos arroja otro resultado.

Resta analizar entonces si el aumento del contenido del Fe en las raíces de las plantas que *AtHscB-myc* se debe a una sobrecarga de Fe en sus semillas o a mayor captación desde el medio de crecimiento. Se realizó la tinción de Perl's en plántulas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* crecidas durante 3 días en placas de MS-agar sin el agregado de Fe. En ninguna

de las líneas estudiadas se observaron diferencias significativas, indicando que el aumento del contenido de Fe en las raíces de las plántulas *HSCB1* y *HSCB2* no es producido por una sobrecarga de Fe proveniente de las semillas (Figura 25).

Para analizar si las raíces de *HSCB1* y *HSCB2* presentan un aumento en la incorporación del Fe, se realizó la tinción de Perl's en plántulas germinadas en condiciones de exceso de Fe (500  $\mu$ M). A los tres días post-germinación, se observó que las líneas *HSCB1*, *HSCB2* y Col-0 presentaban una mayor acumulación de Fe en sus raíces en relación a las líneas *hscb1* y *hscb2*. Sin embargo, a los 11 días post-germinación, la acumulación del Fe en las raíces de las líneas *HSCB1* y *HSCB2* era mucho mayor al observado en la línea Col-0, mientras que las líneas *hscb1* y *hscb2* no presentaban una acumulación detectable en raíces (Figura 25). Estos resultados indican que las raíces de las líneas *AtHscB-myc* podrían tener una mayor incorporación de Fe, mientras que las líneas mutantes *athscb* tendrían incorporación disminuida. Otra posibilidad, no excluyente con la hipótesis anterior, es que la velocidad de transporte del hierro desde la raíz a las hojas este aumentada en las plantas mutantes *hscb* y disminuida en las líneas sobreexpresantes, indicando vaciamiento de la raíz en las mutantes e hiperacumulación en las sobreexpresantes.

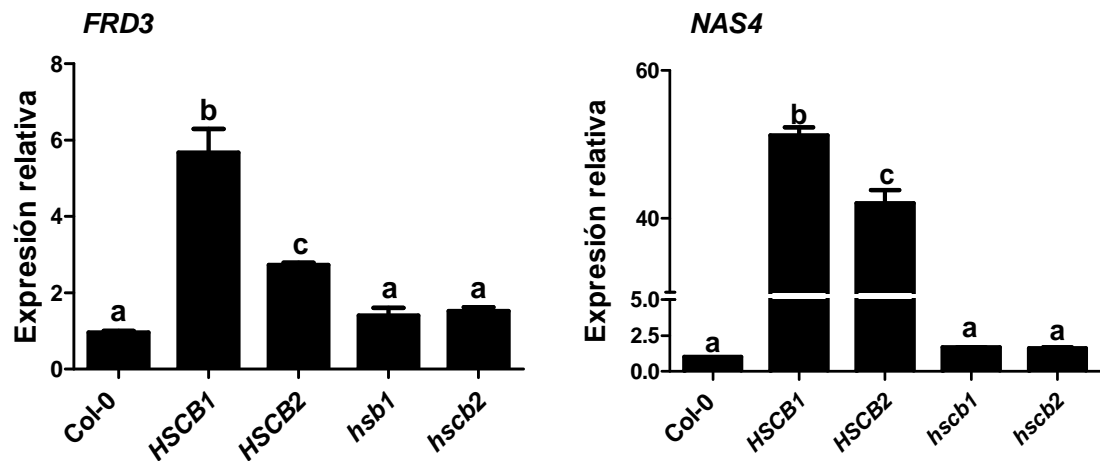


**Figura 25.** Tinción de Perl's en raíces de plántulas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*. Las raíces de las plántulas fueron cosechadas luego de 3 días de crecimiento en medio *ATS* sin el agregado de Fe y luego de 3 y 11 días de crecimiento en medio *ATS* con el agregado de 500  $\mu$ M Fe. Las barras corresponden a 0,1 mm.

#### 4.3.3. Transporte de hierro en la planta

Para explorar si el aumento del contenido de Fe en raíces de las líneas *AtHscB-myc* podría deberse a un defecto en el transporte del Fe desde la raíz hacia las hojas, decidimos estudiar la expresión del gen *FRD3*, que pertenece a la familia de genes transportadores de multidroga y compuestos tóxicos (MATE, *Multidrug And Toxin Efflux*) como así también el gen *NAS4*, que codifica para nicotianamina sintasa 4 (NAS4), dos transportadores conocidos de Fe en plantas (Roschztardt et al., 2011). Una vez transportado dentro de las células epidérmicas de la raíz, el  $Fe^{2+}$  puede ser unido por moléculas orgánicas presentes en las células. La nicotianamina (NA) es una molécula orgánica, la cual es sintetizada a partir de S-adenosyl L-metionina mediante la enzima nicotianamina sintasa (NAS). La molécula NA tiene alta afinidad por metales, incluyendo hierro (Briat et al., 2007). Se asume que, desde la epidermis de la raíz hacia el xilema, el hierro, sería transportado como complejo NA- $Fe^{2+}$ . Cuando el hierro es liberado dentro del xilema es oxidado a  $Fe^{3+}$  y éste es complejado con citrato formando las especies  $[Fe\text{ Citrato OH}]^{-1}$  y  $[Fe\text{ Citrato}_2]^{-3}$  (Lopez-Millan et al., 2000). El citrato sería transportado hacia el xilema mediante el transportador *FRD3* (Roschztardt et al., 2011). Los genes que codifican para las enzimas *FRD3* y *NAS4* se expresan en raíz y aumentan su expresión cuando la planta se encuentra creciendo en deficiencia de hierro (Klatte et al., 2009; Roschztardt et al., 2011).

Para analizar si las líneas estudiadas mostraban una variación en los niveles de expresión de los genes *NAS4* y *FRD3*, se determinaron sus niveles de transcritos mediante QPCR con oligonucleótidos específicos. Los resultados mostraron que en condiciones normales de crecimiento los niveles de expresión de *NAS4* y *FRD3* aumentaron aproximadamente 50 y 6 veces, respectivamente, en la línea *HSCB1* y 40 y 3 veces, respectivamente, en la línea *HSCB2* con respecto a la Col-0, mientras que los niveles de los transcritos de ambos genes en las líneas *hscb1* y *hscb2* no variaron significativamente en relación a la línea Col-0, como se muestra en la Figura 26.



**Figura 26.** Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de *FRD3* y *NAS4* en las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*. Para *FRD3* y *NAS4* se tomó como valor 1 (uno), la expresión del gen en la línea Col-0. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

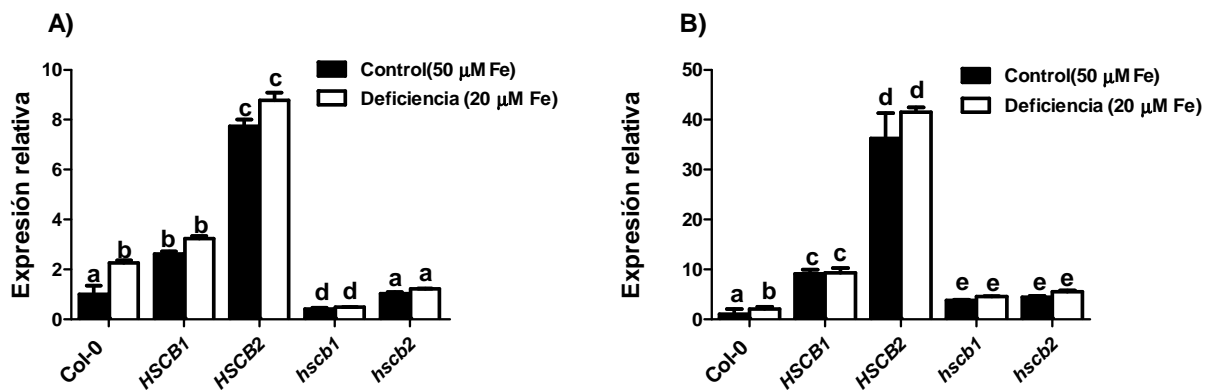
Tanto el citrato como la NA, son moléculas orgánicas que estarían involucradas en el transporte de hierro en plantas (Hell and Stephan, 2003; Morrissey and Guerinot, 2009). A pesar del aumento de los niveles de los transcritos *NAS4* y *FRD3*, las líneas que *AtHscB-myc*, presentan un aumento en el contenido de Fe en raíces, indicando que estas líneas tendrían dificultades en transportar el Fe de las raíces a las hojas.

#### 4.3.4. Efecto de *AtHscB* sobre los genes de incorporación del Fe en plantas.

El mecanismo de captación del Fe en plantas consta de una bomba de protones que acidifica el medio para solubilizar al Fe de los suelos, una proteína llamada ferroquelato reductasa (*FRO2*) que reduce el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , y un transportador de metales divalentes (*IRT1*). Dicho sistema de captación es regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional respondiendo a la deficiencia de Fe. Para analizar detalladamente si existen alteraciones en la de incorporación del Fe medimos mediante PCR en tiempo real los niveles de los transcritos de *IRT1* y *FRO2*, en condiciones normales y de deficiencia de Fe en las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*. Como esperábamos, cuando la línea Col-0 se sometió a deficiencia de Fe, los niveles de los transcritos de *FRO2* e *IRT1* aumentaron 2,5 y 2 veces, respectivamente, en relación a la condición control, demostrando que los niveles de expresión de *FRO2* e *IRT1* responden a condiciones de deficiencia de Fe. Figuras 27A y 27B.

Bajo condiciones normales de Fe, los niveles de los transcritos de *IRT1* y *FRO2* mostraron un aumento significativo para ambas líneas sobreexpresantes (superior a 5 veces) en relación a la línea Col-0. Cuando se realizó el análisis de los niveles de los transcritos de *IRT1* en las líneas *hscb1* y *hscb2* se encontró un aumento de aproximadamente 4 veces, respectivamente, en comparación a la línea Col-0 (Figura 27B) y por el contrario, no se observaron cambios (o una ligera disminución respecto a Col-0) en los niveles de los transcritos de *FRO2* en las líneas mutantes (ver Figura 27A).

Cuando los niveles de los transcritos *FRO2* e *IRT1* fueron analizados en plántulas de 15 días crecidas en condiciones de deficiencia de Fe, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes *FRO2* e *IRT1* para ninguna de las líneas en relación a la condición control. El aumento de la expresión de los genes de incorporación del Fe en las líneas *AtHscB-myc*, sugieren que estas líneas registrarían deficiencia de Fe a pesar de que las mismas se encuentren en condiciones normales de Fe. Por el contrario, las líneas mutantes *hscb1* y *hscb2* no serían capaces de detectar la deficiencia de Fe del medio, cuando el metal es insuficiente.

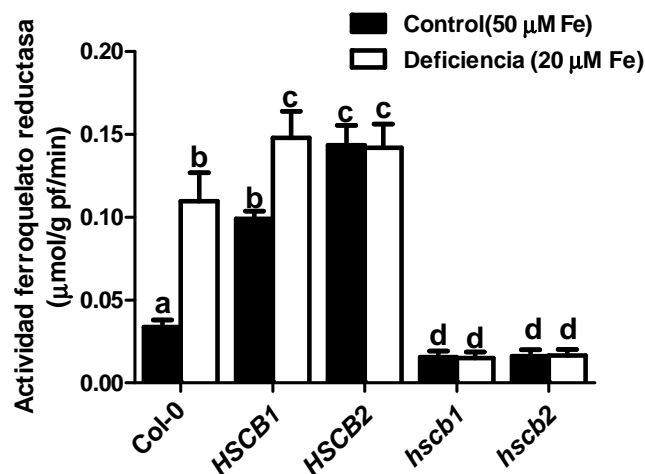


**Figura 27.** Análisis mediante PCR en tiempo real de los niveles de expresión de A) *FRO2* y B) *IRT1*. Las plántulas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* fueron crecidas durante 15 días en condiciones normales 50 μM Fe (barras negras) y de deficiencia 20 μM Fe (barras blancas). Para *FRO2* e *IRT1* se tomó como valor 1 (uno) la expresión del gen en la línea Col-0 en la condición control. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

#### 4.3.5. Efecto de AtHscB sobre la actividad FRO2

Para analizar si el aumento de los niveles de los transcritos de *FRO2* se correlacionan también con un aumento en los niveles de su actividad, se decidió medir la actividad ferroquelato reductasa, como se indica en la sección Materiales y Métodos (sección 3.24). Los resultados obtenidos mostraron que las plantas Col-0 creciendo en deficiencia de Fe, exhibieron un aumento de 3 veces de la actividad FRO2 en relación al escenario control. Esto demuestra que en condiciones de deficiencia de Fe, se incrementa la actividad FRO2 de las plantas Col-0.

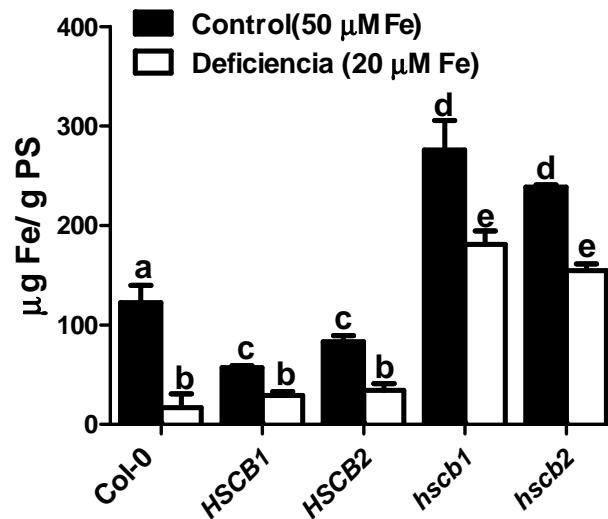
Cuando las diferentes líneas fueron crecidas en condiciones normales de Fe, la actividad FRO2 mostró un aumento de entre 3 y 4 veces para *HSCB1* y *HSCB2*, respectivamente, mientras que, en las líneas mutantes *athscb*, la actividad FRO2 se redujo a la mitad con respecto a la línea Col-0. En condiciones de deficiencia de Fe la actividad FRO2 se duplicó en las raíces de la línea *HSCB1* en relación a la condición control. Sin embargo, en las líneas *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* la actividad FRO2 no varió significativamente. Estos resultados concuerdan con los niveles de los transcritos de *FRO2* y sugieren que, tanto las líneas que sobre-expresan AtHscB como las mutantes *athscb* presentan alteraciones en el metabolismo del Fe (Figura 28).



**Figura 28. Análisis de la actividad ferroquelato reductasa.** La actividad se midió en raíces de plántulas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* crecidas durante 15 días en medio ATS con 50 (barras negras) o 20 µM Fe (barras blancas). La actividad Ferroquelato reductasa es expresada en µmol/g peso fresco (pf)/ hora. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

#### 4.3.6. Efecto de AtHscB sobre la señalización de deficiencia de Fe

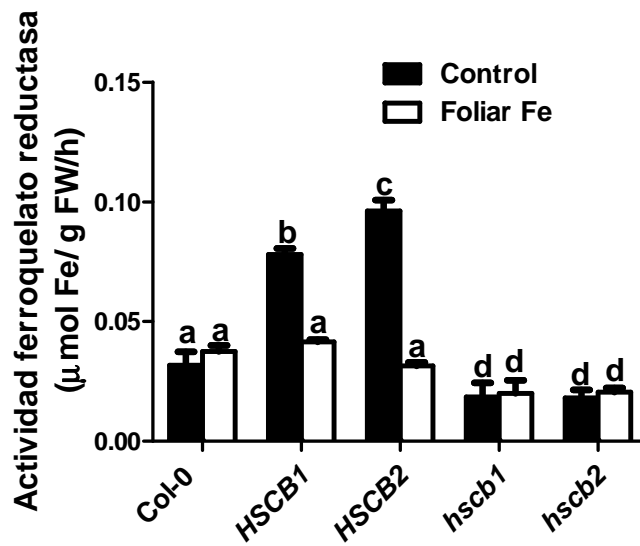
Debido a que el sistema de captación y el de la distribución del Fe se encuentran alterados en las líneas estudiadas, se decidió analizar el contenido de Fe en las partes aéreas de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*. Las medidas del contenido de Fe se realizaron mediante un método espectrofotométrico, como se indica en Materiales y Métodos (sección 3.23.2). La Figura 29 muestra que en condiciones normales de hierro, el contenido de este metal en la parte aérea de las líneas *HSCB1* y *HSCB2* se redujo aproximadamente 2 veces, mientras en las mutantes *hscb1* y *hscb2* se incrementó entre 2 y 3 veces en relación a la Col-0 (barras negras). También se analizó el contenido de Fe en las todas las líneas estudiadas creciendo en deficiencia del metal. La Figura 29 muestra que el contenido de Fe en la parte aérea de la línea Col-0 disminuyó 9 veces en relación a la condición control mientras que en la parte aérea de las líneas *AtHscB-myc*, *athscb* el contenido de Fe se redujo a la mitad (aproximadamente) con respecto a su condición control. Además, el contenido de Fe en las plantas sobreexpresantes es similar al de las plantas Col-0 cuando son crecidas en deficiencia, mientras que las mutantes presentaron diez veces más Fe que las Col-0 (barras blancas, Figura 29).



**Figura 29.** Determinación espectrofotométrica de Fe total de las partes aéreas de las líneas *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*. Las plántulas crecidas en medio ATS con 50 µM Fe (barras negras) o deficiencia 20 µM Fe (barras blancas) fueron cosechadas a los 15 días post-germinación. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

Se ha postulado que en *Arabidopsis* el sistema de captación del Fe en raíces depende de la demanda de este micronutriente en la parte aérea de la planta (Vert et al., 2003). La reducción del contenido de Fe en las hojas, produciría una señal que incrementa la actividad FRO2 en las raíces de *Arabidopsis* (Takahashi and Tokumoto, 2002; Lucena et al., 2006). Con el objetivo de analizar si las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* presentan alteraciones en la señalización hoja-raíz, se realizaron ensayos de actividad FRO2 en plantas, en las cuáles sus hojas habían sido rociadas con Fe (ver Materiales y métodos sección 3.24). Para realizar este ensayo las líneas Col-0 *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* se crecieron en MS-agar y a los 14 días post-germinación las plantas se dividieron en dos grupos: las hojas del primer grupo de plantas fueron rociadas con agua y las hojas del segundo grupo, con una solución de Fe-EDTA 50  $\mu$ M, y luego de 24 h, se realizaron las medidas de actividad FRO2 en raíz. Los resultados mostraron una disminución del 50% en la actividad FRO2 en las líneas *HSCB1* y *HSCB2*, mientras que las líneas Col-0, *hscb1* y *hscb2* no mostraron variaciones significativas con respecto a las hojas rociadas con agua. Figura 30.

Todos estos resultados sugieren que la activación constitutiva del mecanismo de incorporación del Fe observado en las líneas *AtHscB-myc*, es consecuencia del bajo contenido de Fe en las hojas de estas plantas. La disminución de la actividad FRO2 en las raíces de la línea *AtHscB-myc* cuando sus hojas fueron rociadas con Fe, sugiere que la comunicación hoja-raíz funciona en estas líneas de plantas. Como esperábamos, la actividad FRO2 en las líneas Col-0 y *athscb* no varió en ninguna de las dos condiciones (ver Figura 30).



**Figura 30. Análisis de la actividad ferroquelato reductasa en raíces de plántulas Col-0, HSCB1, HSCB2, hscb1 y hscb2.** Las plántulas fueron crecidas durante 14 días en medio MS y luego, sus hojas fueron rociadas con agua (barras negras) o con una solución 50  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA (barras blancas). La actividad Ferroquelato reductasa es expresada en  $\mu\text{mol/g}$  peso fresco (pf)/ hora. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

#### 4.3.7. Efecto de AtHscB en el transporte del Fe desde las raíces hacia las hojas

El hecho de que las líneas *athscb* mostraran altos contenidos de Fe en las hojas, mientras que las líneas *AtHscB-myc* presentaran altos contenidos de Fe en la raíz incluyendo, además, el aumento de la síntesis de los centros Fe-S en este tejido, hizo que planteáramos la posibilidad de la existencia de un sensor, que regule la distribución del Fe desde la raíz hacia las hojas. Dicho sensor contendría, al menos, un centro Fe-S como cofactor.

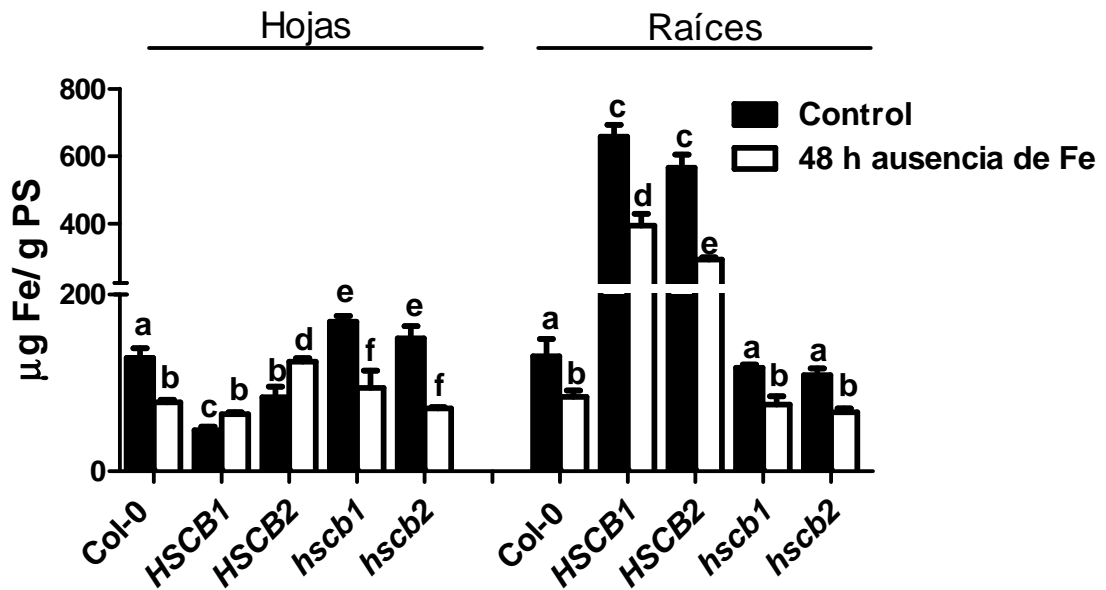
La hipótesis se basa en que si las plantas se encuentran en condiciones normales de Fe, el cofactor Fe-S de este sensor se va a encontrar en equilibrio entre su forma “completa”, que regularía negativamente el Fe que se transporta hacia las hojas, y su forma “incompleta”, que regularía positivamente el transporte de hierro hacia las partes aéreas. En el caso de las líneas *AtHscB-myc*, el sensor se encontraría siempre en su forma “completa” y, en consecuencia el Fe no puede ser transportado hacia la parte aérea. Cuando las plantas se someten a condiciones de deficiencia de Fe, el cofactor de dicho sensor, perdería un Fe, y por este motivo, se encontraría en su forma “incompleta” y, directa o indirectamente, permitiría el

aumento del flujo del Fe desde la raíz hacia las hojas. Este sería el caso de las líneas *athscb*, en donde la síntesis de los centros Fe-S se encuentra disminuida, y todo el Fe que se incorpora en las raíces es transportado hacia las hojas.

Para probar nuestra hipótesis, nos propusimos inhibir la formación de los centros Fe-S en las líneas *AtHscB-myc*, planteando que si la formación de los centros Fe-S disminuye, el Fe acumulado en las raíces de estas líneas podría pasar a sus hojas. Decidimos entonces crecer las diferentes líneas durante 13 días en condiciones control y luego la mitad de las plantas fueron sometidas a condiciones de ausencia de Fe (sin el agregado de Fe al medio) durante 48 h. Luego de este ensayo, tomamos 8 plantas de cada línea en las diferentes condiciones y medimos actividad FRO2. Las plantas restantes fueron separadas en raíces y partes aéreas y a cada muestra se les midió el contenido de Fe y las actividades de las enzimas aconitasa y SDH, en condiciones normales y sometidas a ausencia de Fe durante 48 h.

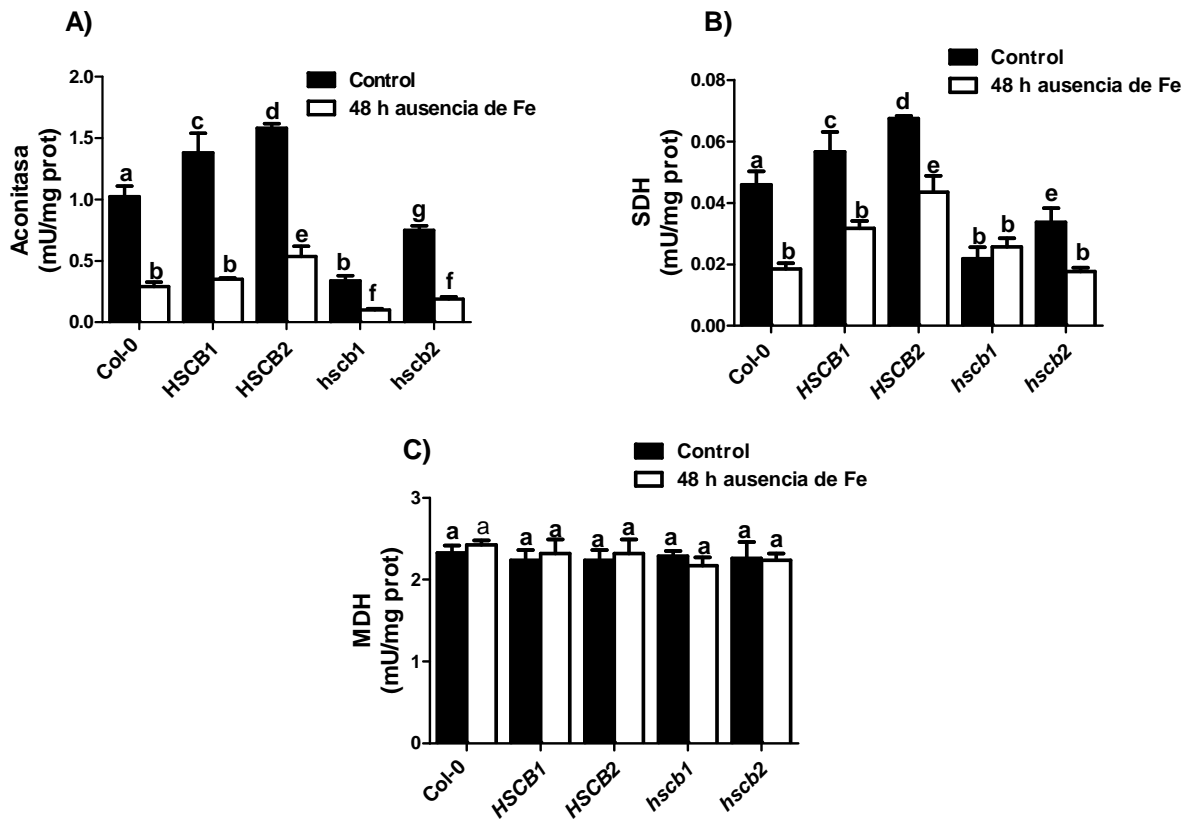
La línea Col-0 mostró una disminución del 40% en el contenido de Fe en las hojas luego de 48 hs en condiciones 0 Fe. Las líneas *athscb* se comportaron de manera similar a la Col-0, en donde la reducción del Fe en sus hojas fue de un 45% para *hscb1* y un 50% para *hscb2* con respecto a la condición control. Sin embargo, las hojas de las líneas *AtHscB-myc* presentaron un aumento del contenido del Fe del 30% para *HSCB1* y del 40% para *HSCB2*, en relación a la condición control (Figura 31A).

Las raíces de todas las líneas estudiadas disminuyeron el contenido de Fe cuando fueron sometidas a deficiencia de Fe durante 48 h. La línea Col-0, presentó una reducción del 40%, mientras que la reducción en las líneas *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* fue de aproximadamente un 60%, 70%, 30 y 50% respectivamente (Figura 31B).



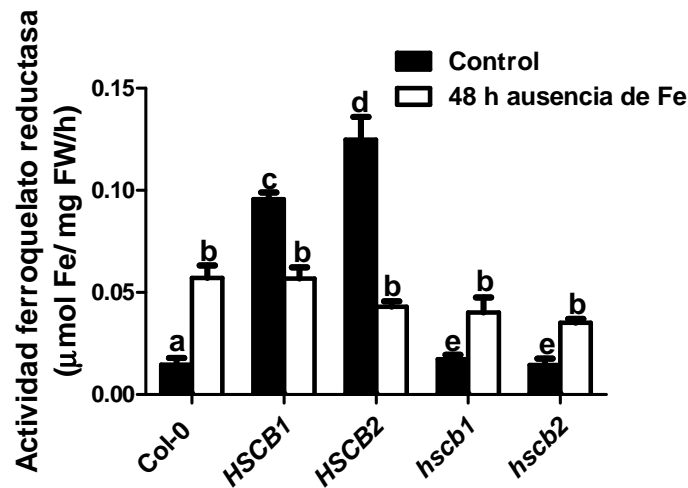
**Figura 31.** Análisis del contenido de Fe en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* en condiciones normales y luego de 48 hs de ausencia de Fe. Medida espectrofotométrica del contenido de Fe en A) hojas y B) raíces de las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1*, y *hscb2*. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

En las raíces de todas las líneas ensayadas las actividades de las enzimas aconitasa y SDH se redujeron cuando dichas líneas fueron sometidas a ausencia de Fe durante 48 h. La actividad aconitasa disminuyó un 60% en todas las líneas (Figura 32A), mientras que la actividad SDH se redujo un 50% en las raíces de la línea Col-0, y aproximadamente un 35% en las raíces de las líneas *AtHscB-myc*. La línea *hscb1* no varió significativamente la actividad de esta enzima con respecto a la condición control, mientras que en la línea *hscb2* se observó una disminución de la actividad de esta enzima de aproximadamente un 50% (Figura 32B). Estos resultados sugieren que todas las raíces de las líneas estudiadas, están sufriendo deficiencia de Fe y el reflejo de esto, es la reducción de las actividades de las enzimas aconitasa y SDH.



**Figura 32. Determinación de la actividad de las enzimas aconitasa y SDH y MDH en las raíces de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*.** Medidas de la actividad enzimática de A) aconitasa y B) SDH y como control C) MDH en las raíces de las líneas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* crecidas bajo condiciones normales y sometidas a 48 h de ausencia de Fe. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

Cuando analizamos la actividad FRO2, observamos un aumento de esta actividad en la línea Col-0 de 4 veces en comparación con la condición control. En las plantas *AtHscB-myc* dicha actividad se redujo aproximadamente a la mitad en ambas líneas, mientras que en las dos líneas *athscb*, se observó un aumento de aproximadamente 2 veces, respecto a la condición control. Estos resultados indicarían que el cambio de las líneas *AtHscB-myc* a condiciones de ausencia de Fe, permitiría el transporte de este ión desde la raíz hacia las hojas, y en consecuencia se produciría la desactivación de la actividad FRO2. Estas mismas condiciones, también permitirían que el Fe de las hojas de las líneas *athscb* disminuya y active el sistema de captación del Fe en sus raíces (Figura 33).



**Figura 33.** Análisis de la actividad de la enzima FRO2, en las raíces de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* crecidas bajo condiciones normales y sometidas a 48 hs de ausencia de Fe. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

Cuando medimos las actividades de las enzimas aconitasa y SDH, encontramos que en las hojas de la línea Col-0 dichas enzimas redujeron su actividad en un 30% y un 70% respectivamente, cuando fueron sometidas a 48 hs de ausencia de Fe con respecto a la condición control. Las líneas *athscb* se comportaron de manera similar a la Col-0, mostrando una disminución de un 50% de ambas actividades para las dos enzimas en las dos líneas. Sin embargo, en las líneas *AtHscB-myc* se obtuvo el resultado contrario: la actividad aconitasa aumentó entre un 20% y un 40% en las hojas de las líneas sobreexpresantes, (Figura 34A) mientras que la actividad SDH presentó resultados dispares. En la línea *HSCB1*, dicha actividad no varió significativamente, mientras que en la línea *HSCB2* se produjo un aumento del 20% de la actividad de esta enzima (Figura 34B). Las medidas de MDH fueron realizadas como control debido a que esta enzima no contiene centros Fe-S (Figura 34C).

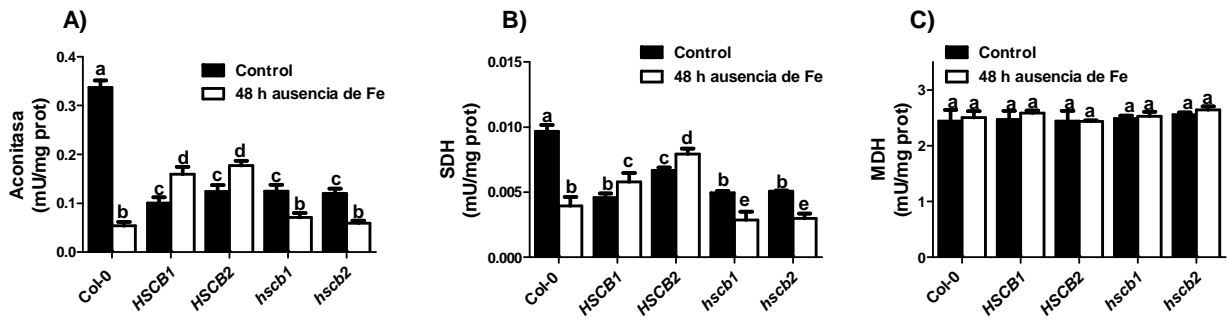
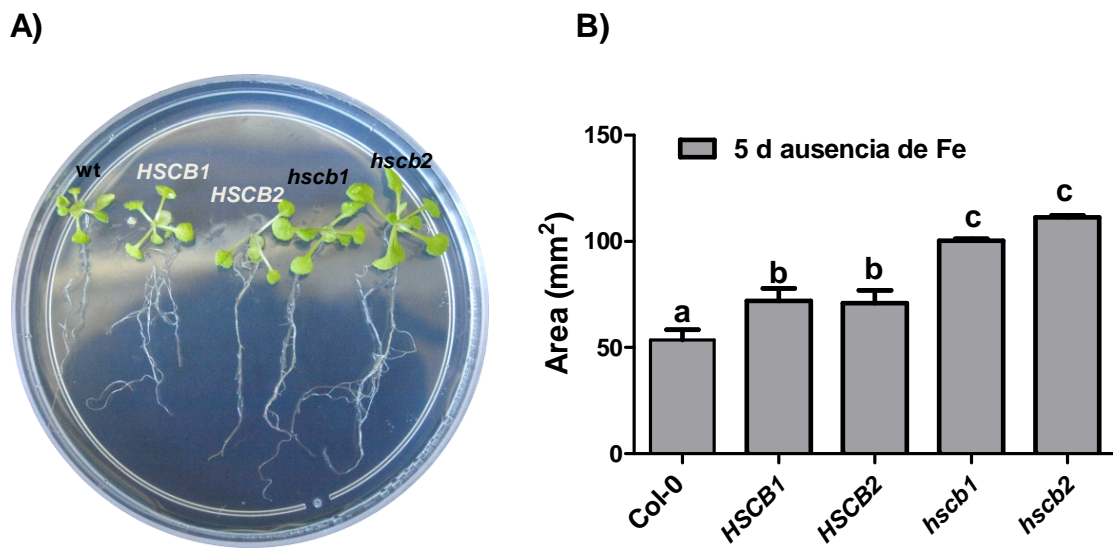


Figura 34. Análisis de la actividad de las enzimas, A) aconitasa, B) SDH y C) MDH en las hojas de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* crecidas bajo condiciones normales y sometidas a 48 hs de ausencia de Fe. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

El análisis del fenotipo de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, se llevó a cabo en las plantas que fueron crecidas en condiciones de suficiencia de hierro durante 13 días, y luego sometidas a 5 días de ausencia del metal. La Figura 34B muestra que luego de 5 días de crecimiento en déficit de Fe, las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, presentaron un aumento del crecimiento del 20 y del 50% en relación a la línea Col-0, respectivamente, cuantificado a través de la medida del área foliar. También se pudo observar un aumento en el número y la longitud de las raíces laterales de las líneas *AtHscB-myc*, mostrando un fenotipo más similar al de las líneas Col-0 y *athscb*. Estos resultados indicarían que tanto las líneas *AtHscB-myc* como las *athscb*, se desarrollan deficientemente en condiciones de suficiencia de hierro como consecuencias del exceso del metal en raíces y hojas, respectivamente. Cuando son transplantadas a condiciones de ausencia de hierro, pueden revertir esos defectos haciendo uso de sus elevadas reservas, mejorando así en performance a las Col 0, que no disponen de las mismas. Asimismo, se demuestra que el fenotipo anómalo de las raíces de las líneas *AtHscB-myc* es debido al exceso de hierro radicular, ya que cuando se logra transportar el metal a las partes aéreas, éstas muestran una morfología semejante a la de las plantas de tipo salvaje.



**Figura 35. Análisis de crecimiento foliar de las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* sometidas a 5 días de ausencia de Fe.** A) fenotipo del crecimiento luego 13 días en condiciones normales de Fe y de 5 días en ausencia de Fe. B) medidas del área foliar de las líneas *col-0*, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1*, y *hscb2*. Letras diferentes dentro de cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,01$ ).

#### 4.3.8. Discusión del capítulo III

La variación de los niveles de AtHscB en plantas de *Arabidopsis* provoca un desbalance en la distribución del Fe en las raíces y las partes aéreas. Tanto las líneas *AtHscB-myc* como las líneas *athscb*, presentaron un aumento del área foliar bajo condiciones de deficiencia de Fe, sugiriendo que este metal podría ser tóxico para estas plantas.

Mediante la tinción de Perl's y la cuantificación de Fe, se observó que las líneas que sobre-expresan AtHscB presentan altos niveles de Fe en sus raíces, sugiriendo que las líneas *AtHscB-myc* tienen alterada la distribución del Fe. Por el contrario, las líneas *athscb*, no presentan diferencias en el contenido de Fe en relación a las raíces de la Col-0.

Para comprobar si el mayor contenido de Fe en las líneas *AtHscB-myc* provenía de un aumento en el contenido de Fe en las semillas, se realizó la tinción de Perl's en plantas de 3 días crecidas en medio *ATS* sin el agregado de Fe. Los resultados mostraron que ninguna de las dos líneas contenía un visible exceso de Fe. Sin embargo, cuando crecimos las plantas durante 3 y 11 días, en condiciones de exceso de este metal, pudimos observar, que las raíces de las líneas *AtHscB-myc*, aumentaron el contenido de Fe, mientras que las líneas *athscb*, no variaron significativamente en relación a la condición control. Estos resultados sugieren, que las líneas *AtHscB-myc* presentan una mayor de captación del Fe en relación a las plantas Col-0, mientras que las líneas *athscb*, podrían estar captando Fe del medio a menor velocidad.

Para analizar si el aumento del contenido de Fe en las raíces de las líneas *AtHscB-myc*, podría ser debido a un daño en el transporte del Fe desde la raíz hacia las hojas, decidimos, estudiar los genes *FRD3* y *NAS4*. Ambos genes participan en el transporte del Fe a través del floema y del xilema, respectivamente. El gen *FRD3* codifica para una proteína que transporta citrato desde las células de la raíz hacia el xilema (Lopez-Millan et al., 2000; Roschztardt et al., 2011). El gen *NAS4* codifica para nicotianamina sintasa (NAS), la cual participa en la síntesis de nicotianamina (NA). Tanto el citrato como la NA, son moléculas orgánicas que estarían involucradas en el transporte de hierro en plantas (Hell and Stephan, 2003; Morrissey and Guerinot, 2009). A pesar del aumento de los niveles de los transcriptos *NAS4* y *FRD3*, observado en las líneas *AtHscB-myc*, sus raíces, presentan un aumento en el contenido de Fe, indicando que estas líneas tendrían dificultades en transportar el Fe de las raíces hacia las hojas. En las líneas *athscb*, tanto los niveles de Fe en raíces como los transcriptos de *FRD3* y *NAS4*, fueron similares a los de las plantas Col-0, sugiriendo que el transporte de Fe en las

raíces de *athscb* no se encontraría afectado. Diversos trabajos han demostrado que los genes *NAS4* y *FRD3* aumentan su expresión cuando las plantas de *Arabidopsis* son sometidas a deficiencia de Fe (Rogers and Guerinot, 2002; Curie and Briat, 2003; Klatter et al., 2009). El marcado aumento en los niveles de expresión de *NAS4* y *FRD3* observado en las líneas *AtHscB-myc*, podría indicar que estas plantas podrían estar respondiendo a señales de deficiencia de Fe, a pesar de que estén creciendo en condiciones normales de Fe.

Debido al aumento del contenido de Fe en las raíces de las líneas *AtHscB-myc*, decidimos estudiar los genes involucrados en la incorporación del Fe en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*. Como mencionamos anteriormente, el mecanismo de captación del Fe en dicotiledóneas, consta de una bomba de protones que acidifica el medio para solubilizar al Fe de los suelos, una proteína llamada ferroquelato reductasa (*FRO2*), que reduce el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  y un transportador de metales divalentes (*IRT1*).

Se ha reportado que plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan *FRO2* (*35S-FRO2*) no presentan un incremento del contenido Fe cuando crecen en condiciones normales de Fe, debido a que la estabilización de los transcritos de *FRO2* sólo sucede bajo condiciones de deficiencia de Fe, indicando que los niveles de los transcritos de *FRO2* son regulados a nivel post-transcripcional (Connolly et al., 2003). Bajo condiciones normales de Fe, se produce un aumento en los niveles de los transcritos de *FRO2* en las líneas *AtHscB-myc*, mientras que las líneas *athscb* no presentaron diferencias en la expresión de *FRO2* en relación a la línea Col-0. Estos resultados indicarían que, bajo condiciones normales de Fe, los transcritos de *FRO2* podrían estar estabilizados en las líneas *AtHscB-myc*, mientras que en la línea *athscb*, se comportarían de manera similar a la línea Col-0. Bajo condiciones de deficiencia de Fe, observamos un aumento en los niveles de los transcritos de *FRO2* en la línea Col-0, confirmando que el ARNm de *FRO2* aumenta bajo estas condiciones. Sin embargo, en las líneas *AtHscB-myc* y en las líneas *athscb* no se observaron cambios significativos de los niveles de los transcritos de *FRO2*, en relación a la condición control.

Para analizar si los niveles de los transcritos *FRO2* se relacionaban con la actividad de la proteína, se realizaron medidas de la actividad *FRO2* en condiciones normales y de deficiencia de Fe. Los resultados mostraron que, bajo condiciones normales de Fe, en las raíces de las líneas *AtHscB-myc*, dicha actividad aumentó 2,9 y 4,3 veces, mientras que en la línea *athscb* disminuyó a la mitad, en relación a la Col-0.

Bajo condiciones de deficiencia de Fe, la actividad FRO2 aumentó 3 veces en las raíces de la línea Col-0, indicando que ésta responde a deficiencia de Fe en plantas. Sin embargo, en las líneas *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2* la actividad FRO2 no varió significativamente en relación a la condición control, mientras que en la línea *HSCB1* aumentó 1,4 veces, equiparándose a la línea *HSCB2*. Todos estos resultados indican que las líneas que sobre-expresan AtHscB, registran deficiencia de Fe, incluso cuando crecen en condiciones normales de hierro, mientras que las líneas *athscb* no registran deficiencia de Fe a pesar de encontrarse bajo condiciones de baja concentración de Fe.

Previamente, se ha informado que la reducción del hierro férrico a ferroso es el paso limitante de la incorporación del Fe en las raíces de las plantas (Grusak et al., 1990; Connolly et al., 2003). Por este motivo, podríamos asociar el aumento de la actividad FRO2 con el incremento del contenido de Fe en las raíces de *AtHscB-myc*. Lo contrario sucedería con las líneas mutantes *athscb*, dado que estas plantas no aumentan la actividad de dicha proteína, el Fe se incorporaría lentamente en sus raíces, a pesar del aumento de la concentración del Fe en el medio de crecimiento.

Bajo condiciones normales de Fe, los niveles de expresión de *IRT1* en la línea *AtHscB-myc* se comportaron de manera similar al gen *FRO2*. Sin embargo, en las líneas *athscb*, los niveles de los transcritos del gen *IRT1* aumentaron 3,8 y 4,5 veces en relación a la línea Col-0. Se ha demostrado que el nivel de expresión de *IRT1* aumenta por deficiencia Fe, pero la regulación de este gen, es en parte desconocida. Probablemente, exista algún mecanismo que provoque el aumento de la expresión del gen *IRT1* en las líneas *athscb*. Un segundo mecanismo, regula de manera post-transcripcional a *IRT1*. Se ha descrito, que bajo condiciones normales de Fe, la proteína *IRT1* es degradada mediante ubiquitinación (Shin et al., 2013). Podría suceder que en las líneas *athscb* los niveles de expresión *IRT1* se encuentren aumentados, mientras que la proteína *IRT1* se encuentre disminuida por degradación o degradación. Bajo condiciones de deficiencia de Fe, los niveles de expresión de *IRT1* aumentaron 2 veces en la línea Col-0, demostrando que este gen aumenta bajo condiciones de deficiencia de Fe. Sin embargo, en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, no se observaron cambios significativos en la expresión de este gen.

Varias líneas mutantes de *Arabidopsis*, muestran un fenotipo similar a las líneas *AtHscB-myc*. Por ejemplo, líneas de *Arabidopsis* con expresión reducida en el gen *FRD3*, que codifica para la ya mencionada proteína que transportaría el citrato hacia el xilema (el

complejo citrato-Fe<sup>3+</sup> se transportaría a través del xilema) (Rogers and Guerinot, 2002), la línea de *Arabidopsis* mutante en el gen *Atopt3-2*, que presentan expresión reducida de AtOPT3 perteneciente a la familia de los transportadores de oligopeptidos (OPT), y que estaría involucrado en unir el Fe para así facilitar su transporte vía floema (Stacey et al., 2008) y la línea de *Arabidopsis* mutante en el gen *nas4x-1*, la cual no produce cantidades detectables de nicotianamina (dicho compuesto uniría al Fe y permitiría su transporte a través del floema)(Klatte et al., 2009). Todas estas líneas presentan activación constitutiva en la transcripción de los genes de incorporación del Fe bajo condiciones normales de crecimiento. Además, sus raíces acumulan grandes cantidades de Fe, sugiriendo que el contenido de Fe total en raíces no es un factor importante en la regulación de los genes de incorporación de dicho metal (Rogers and Guerinot, 2002; Stacey et al., 2008; Klatte et al., 2009; Garcia et al., 2013).

En plantas vasculares, es necesaria la comunicación entre los diferentes órganos de la planta para evitar desbalances en el transporte de nutrientes. Muchos trabajos publicados, han sugerido un rol clave de la parte aérea de las plantas en la respuesta a la deficiencia de Fe(Grusak and Pezeshgi, 1996; Schmidt et al., 2000; Takahashi and Tokumoto, 2002; Lucena et al., 2006; Garcia-Mina et al., 2013; Garcia et al., 2013). El modelo que ha sido propuesto, integra, señales represivas o señales inductivas. La parte aérea de las plantas podría enviar señales de inducción o represión a través del floema, dependiendo de su contenido de Fe y de esta manera regular la respuesta de deficiencia de Fe en raíces (Schmidt et al., 2000; Takahashi and Tokumoto, 2002). La hipótesis está basada en investigaciones en mutantes de arveja en los genes *brz* (bronze) o *dgl* (hojas degeneradas) que exhiben expresión constitutiva de la estrategia I y sobre acumulación de Fe en raíces y en hojas (Grusak et al., 1990). Estudios con injertos, en los cuales las partes aéreas de plantas salvajes fueron injertados en raíces mutantes *dgl* y viceversa, indican que existen señales derivadas de la parte aérea de la planta que controlarían la respuesta de la incorporación del Fe en las raíces (Grusak and Pezeshgi, 1996). Cuando las partes aéreas de las plantas salvaje fueron injertadas en raíces mutantes *brz*, las raíces recuperaron el fenotipo salvaje y la respuesta de incorporación de Fe sólo se expresó bajo condiciones de deficiencia de Fe (Grusak and Pezeshgi, 1996). Por el contrario, cuando las partes aéreas de las mutantes *brz* o *dgl* fueron injertadas sobre raíces de la línea salvaje, las raíces expresaron deficiencia de hierro constitutivamente. Estos

resultados, son consistentes con la idea de que la parte aérea de las plantas podría generar y controlar las señales de deficiencia de Fe (Vert et al., 2003; Lucena et al., 2006).

Con todos estos antecedentes, se decidió analizar si las líneas estudiadas, presentaban diferencias en el contenido de Fe en su parte aérea. Los resultados mostraron, que bajo condiciones normales de Fe, la parte aérea de las líneas *AtHscB-myc* presentó una disminución de aproximadamente de 4 veces en el contenido de Fe, mientras que la parte aérea de las líneas *athscb* mostró un aumento de 2 veces, en relación a la Col-0. Cuando las plantas fueron sometidas a deficiencia de Fe, se encontró una reducción de 9 veces del contenido de Fe de la parte aérea de la Col-0, mientras que en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, la reducción fue de la 2 y 3,5 veces, respectivamente, en comparación a la condición control. Es importante notar, que el contenido de Fe en la parte aérea de las plantas Col-0 sometidas a deficiencia de Fe, es similar al de las líneas *AtHscB-myc*, crecidas en una u otra condición, sugiriendo que el contenido de Fe en la parte aérea de las líneas *AtHscB-myc*, siempre sería deficiente. Con estos resultados podríamos proponer que la respuesta de deficiencia de Fe constitutiva observada en las líneas *AtHscB-myc* podría deberse al bajo contenido de Fe en su parte aérea. Esta hipótesis puede ser confirmada en las líneas *athscb*, ya que ellas presentan un alto contenido de Fe en su parte aérea y han perdido la capacidad de registrar deficiencia de Fe a pesar de crecer en muy bajas concentraciones del mismo.

Se ha publicado que el tratamiento foliar con una solución de Fe en diferentes líneas con expresión constitutiva del gen *FRO2* provoca la represión de dicho gen. Cuando las hojas de las líneas de *frd3-3* y *brz* fueron tratadas con Fe, se observó una represión de la expresión de *FRO2* y en consecuencia, una disminución de su actividad (García et al., 2013). Sin embargo, en las líneas mutantes *opt3-2* y *dgl* no se observó la represión de los niveles de los transcritos ni de la actividad *FRO2* ya que, probablemente, en estas plantas se encuentre afectado el transporte de la señal represiva a través del floema (García et al., 2013). Para analizar si *FRO2* respondía a señales provenientes de la parte aérea de las líneas *AtHscB-myc*, se realizaron medidas de actividad de dicha proteína en raíces de plántulas Col-0, *HSCB1*, *HSCB2*, *hscb1* y *hscb2*, cuyas hojas habían sido rociadas con 50  $\mu$ M Fe. Luego de 24 h del tratamiento, se observó una disminución de la actividad *FRO2* en la línea *HSCB1* y *HSCB2*, mientras que en las líneas Col-0 y *hscb1* y *hscb2* no se observaron diferencias significativas con respecto al control. Este resultado sugiere que el aumento constitutivo de la expresión del gen *FRO2* y en consecuencia, el incremento de su actividad, observada en las líneas *AtHscB-*

*myc* podría ser debida a los bajos niveles de Fe en sus hojas. Asimismo, confirma la integridad de la respuesta de señalización de deficiencia de hierro desde las hojas hacia la raíz en las plantas *AtHscB-myc*.

Para poder explicar lo que sucedía en las líneas *AtHscB-myc* y *athscb*, planteamos la hipótesis de la existencia de un sensor conteniendo, al menos, un centro Fe-S en la raíz. Dicho sensor regularía el flujo de Fe desde la raíz hacia las hojas. Cuando el hierro dentro de la raíz es excesivo, el cofactor Fe-S de este sensor estaría en su forma “completa” (4Fe-4S o 2Fe-2S) inhibiendo el transporte del Fe desde la raíz hacia las hojas, el cual quedaría acumulado en la raíz, mientras que bajo deficiencia de Fe el cofactor Fe-S del sensor perdería un hierro quedando en su forma “incompleta” (3Fe-4S o Fe-2S) y permitiría el paso del Fe desde la raíz hacia las hojas. Para probar esta hipótesis, crecimos las plantas en condiciones normales de Fe, y luego de 13 días las sometimos a ausencia de Fe por 48 h. Bajo estas condiciones de estudio, todas las líneas estudiadas mostraron una reducción de aproximadamente un 50% en el contenido de sus raíces y una disminución en la actividad de las enzimas aconitasa y SDH. Las líneas Col-0 y *athscb*, mostraron resultados similares: disminuyeron 40% el contenido de Fe en la parte aérea de las hojas, aumentaron aproximadamente 2,5 veces la actividad FRO2 en sus raíces y redujeron aproximadamente un 50% las actividades aconitasa y SDH. Estos resultados indican que la línea *athscb*, es capaz de activar el mecanismo de incorporación del Fe en raíces, cuando es depletada en el contenido de hierro de la parte aérea. Por el contrario, el Fe de las hojas de ambas líneas *AtHscB-myc* aumentó un 35% y un 65%, respectivamente, la actividad FRO2 disminuyó a la mitad y las actividades aconitasa y SDH se incrementó un 20% y un 40% en la línea *HSCB2*, mientras que en la línea *HSCB1*, la actividad aconitasa no varió significativamente con respecto a la condición control y la actividad de SDH aumentó un 20% en condiciones de ausencia de Fe. Estos resultados sugieren que el Fe que se encontraba acumulado en las raíces de las líneas *AtHscB-myc* puede haber sido transportado hacia la parte aérea, y este aumento en el contenido de Fe en la parte aérea, se tradujo en un aumento en la actividad de las enzimas con centros Fe-S, ya que se acrecentó la disponibilidad del sustrato metálico.

El hecho que tanto las líneas *AtHscB-myc* como *athscb*, crezcan mejor bajo condiciones de ausencia de Fe en relación a la línea Col-0, indicaría que para ambas líneas, el Fe que se encuentra en los medios normales de crecimiento podría resultarles tóxico.

En conjunto, todos estos resultados indican que además de la regulación de la incorporación del Fe en las raíces controlada por la parte aérea de las plantas, podría existir otra regulación a nivel del transporte de Fe desde la raíz hacia las hojas. En este nuevo mecanismo regulatorio, podría estar involucrado un sensor conteniendo centros Fe-S que respondería al Fe acumulado dentro de la raíz.

## **5. Discusión General**

## 5.1. AtHscB afecta el metabolismo de Fe en *Arabidopsis*

### 5.1.1. Efecto de la modificación de los niveles de AtHscB en *Arabidopsis*

Hasta el momento, pocos trabajos han informado sobre el gen *AtHscB* y la función que cumple en la formación de los centros Fe-S. En nuestro trabajo, planteamos estudiar la función de esta proteína *in vivo*, utilizando plantas con ganancia y pérdida de función de AtHscB. Los resultados mostrados en la presente tesis, revelaron que la variación en los niveles de esta proteína, además de afectar la biosíntesis de los centros Fe-S, también produce una alteración en la distribución del Fe en plantas. Diversos trabajos han reportado que en diferentes organismos, proteínas con centros Fe-S, son utilizadas como proteínas sensoras de deficiencia de Fe, (Rutherford et al., 2005; Arnaud et al., 2007; Lill, 2009) sin embargo, en plantas, la regulación del metabolismo del Fe es poco conocida y, hasta el momento, no existen estudios que indiquen que las ferrosulfoproteínas participen en dicha regulación (Balk and Schaedler, 2014). Con los resultados obtenidos en este trabajo, se podría postular que en plantas, al igual que en mamíferos y levaduras, podría existir una estrecha relación entre la regulación del metabolismo del Fe y el ensamblado de los centros Fe-S.

### 5.1.2. Efecto de AtHscB sobre la actividad de las ferrosulfoproteínas

Con el objetivo de estudiar la función de *AtHscB in vivo*, se caracterizaron dos líneas con expresión disminuida AtHscB, denominadas *hscb1* y *hscb2*. Debido a que ambas líneas mostraron el mismo comportamiento y con intención de simplificar la discusión las denominaremos *athscb*.

Las líneas deficientes, *athscb*, presentan disminuida la expresión del gen que codifica para AtHscB. Dicha proteína estaría involucrada en la biogénesis de centros Fe-S y, en consecuencia, estas líneas de plantas tendrían afectada la vía de formación de dichos grupos. En las raíces y hojas de estas líneas se observó la reducción del 60 % de la actividad aconitasa y de la succinato deshidrogenasa. Para determinar si los niveles de expresión de los genes que codifican para aconitasa y la succinato deshidrogenasa, se correspondían con la actividad de dichas proteínas, realizamos medidas de QPCR en las hojas de las líneas *athscb*.

Se ha descrito que en plántulas la isoforma mitocondrial de aconitasa representa la actividad dominante (Arnaud et al., 2007), y por este motivo, analizamos la expresión del gen *Aco2* (isoforma mitocondrial), mientras que para la succinato deshidrogenasa, analizamos el gen que codifica para la subunidad *SDH2-1* que es la que contiene tres centros Fe-S. Los datos mostrados indican un aumento de 2,5 y más de 10 veces en los niveles de ARNm de *Aco2* y *SDH2-1*, respectivamente, en las hojas de las plantas deficientes *athscb*; sin embargo, no se corresponde con un aumento en la actividad enzimática de aconitasa y succinato deshidrogenasa. A partir de estos datos se puede postular que AtHscB podría tener un rol en ensamblado de los centros Fe-S a las apoproteínas de plantas.

Con el objetivo de fortalecer los datos obtenidos con las líneas con pérdida de función, generamos líneas con ganancia de función. Dos líneas sobreexpresantes AtHscB fueron analizadas *HSCB1* y *HSCB2*. Como ambas líneas tienen el mismo patrón de comportamiento y con intención de simplificar la discusión las denominaremos *AtHscB-myc*.

Las líneas *AtHscB-myc*, tienen un exceso de AtHscB, que pensamos, podría aumentar la velocidad de síntesis de centros Fe-S y así incrementar la actividad de las ferrosulfoproteínas. Al analizar la actividad catalítica de las enzimas aconitasa y succinato deshidrogenasa en las raíces de estas líneas, observamos un aumento de 30 % en las actividades de dichas enzimas. Este resultado sugiere que el incremento en los niveles de AtHscB, podría estabilizar los centros Fe-S de las ferrosulfoproteínas aconitasa y succinato deshidrogenasa, permitiendo un aumento en su actividad catalítica.

Por el contrario, en las hojas de las líneas *AtHscB-myc*, observamos una disminución de 60% en la actividad de las enzimas aconitasa y en la succinato deshidrogenasa. El análisis de los niveles de expresión del gen *Aco2*, en las hojas de las líneas sobreexpresantes mostró una disminución de 2 veces, mientras que los niveles de los transcritos del gen *SDH2-1* fueron similares a los de la línea Col-0. Este resultado indica que la reducción de la actividad aconitasa podría ser un reflejo de la disminución de los niveles de los transcritos *Aco2*, mientras que la disminución observada en la actividad de la succinato deshidrogenasa, no se debería a una diferencia de expresión del gen *SDH2-1*.

El resultado observado en las hojas de las líneas *AtHscB-myc* podría estar relacionado con el contenido de Fe en este tejido. Trabajos previos han mostrado que bajo deficiencia de Fe, la expresión del gen *Aco2*, disminuye en relación a la condición control (Arnaud et al., 2007). También se ha observado que, bajo estas condiciones, la enzima aconitasa y las

ferrosulfoproteínas que conforman el complejo I y el complejo II de la cadena respiratoria, se degradan para reutilizar el Fe para otras funciones (Vigani et al., 2013).

La deficiencia de Fe afecta la cadena respiratoria limitando las enzimas que contienen Fe e induciendo las enzimas alternativas (Vigani, 2012) Se ha demostrado que la cadena de electrones de las plantas, involucra oxidoreductasas alternativas, además de los complejos I, II, III y IV. Como consecuencia, el transporte de electrones de la cadena respiratoria puede bifurcarse en plantas. Las enzimas que catalizan las rutas alternativas son NADP(H) deshidrogenasas tipo II y la oxidasa alternativa (AOX), las primeras pueden sobrepasar el complejo I y AOX puede sobrepasar el complejo III y IV (Rasmusson et al., 2008). La disminución de la actividad del complejo I y complejo II en ausencia de Fe, es compensada por la activación de la NADPH deshidrogenasa alternativa. Esta regulación permite satisfacer parcialmente la demanda de energía de la célula (Vigani and Zocchi, 2010).

En la presente tesis, pudimos determinar una disminución de, aproximadamente, 4,5 veces en los niveles de Fe en la parte aérea de las líneas *AtHscB-myc*, indicando que las hojas de estas plantas presentan deficiencia de este metal. Con estos datos, podríamos sugerir que la deficiencia de Fe en la parte aérea de las líneas *AtHscB-myc*, provocaría la reducción de la actividad aconitasa y de las ferrosulfoproteínas que conforman los complejos I y II que integran la cadena respiratoria, limitando su actividad en la cadena de transporte de electrones y, en consecuencia, disminuyendo el consumo de O<sub>2</sub> de estas líneas.

### **5.1.3. Efecto de AtHscB sobre la distribución y metabolismo del Fe**

El contenido de Fe de las hojas y las raíces de las líneas *athscb* y *AtHscB-myc* fue medido cualitativamente mediante tinción de Perls y cuantitativamente mediante un método espectrofotométrico. Pudimos observar que el contenido de Fe de las raíces de las líneas *athscb* era similar al de la línea Col-0, sin embargo, los niveles de este metal en sus hojas se encontró incrementado 2 veces en relación las plantas Col-0. Al analizar las líneas *AtHscB-myc* observamos un aumento de 5 veces en los niveles de Fe en raíces, mientras que sus hojas presentaron una reducción de 4,5 veces, en comparación a las plantas Col-0. Estos resultados muestran claramente, que tanto la línea *athscb* como la línea *AtHscB-myc* presentan un desbalance en la distribución del Fe.

El aumento del contenido de Fe en la parte aérea de las líneas *athscb* indicaría que todo el Fe incorporado en las células de las raíces podría ser movilizado hacia las hojas, indicando que estas líneas tendrían aumentada la velocidad del transporte hacia la parte aérea de la planta. El Fe de la parte aérea presente en las plantas *athscb* podría ser almacenado como reserva en las vacuolas, o también ser utilizado en vías metabólicas que necesiten este metal para cumplir su función (Kim et al., 2001; Bernard et al., 2009). El exceso de Fe de las hojas de estas plantas también podría estar regulando los genes de incorporación del Fe en las raíces. Previamente, se ha reportado que la expresión de los genes de incorporación del Fe es afectada por el contenido de dicho metal en la parte aérea de las plantas (Schmidt, 2003; Vert et al., 2003). Se han postulado dos modelos para la regulación de la incorporación del Fe en raíces. El modelo inductivo se basa en que la señal es producida en las hojas en respuesta a la deficiencia de Fe de las mismas, la señal se movilizaría a través del floema hacia la raíz resultando en la activación de los genes de la incorporación del Fe. Lo contrario sucede en el modelo represivo en el cuál los genes de incorporación del Fe de la raíz se expresan constitutivamente, excepto que el contenido de Fe en las hojas sea alto (Vert et al., 2003).

El mecanismo de incorporación del Fe en plantas dicotiledóneas, consta de una bomba de protones, que acidifica el medio para solubilizar al Fe del suelo, una proteína FRO2, que reduce el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  y un transportador de metales divalentes (IRT1). Diversos trabajos han descrito que la actividad FRO2 se incrementa bajo condiciones de deficiencia de Fe en plantas (Connolly et al., 2003; Yuan et al., 2008; Long et al., 2010). Al analizar la actividad FRO2 en las raíces de las líneas Col-0 sometidas a deficiencia de Fe, observamos que dicha actividad se incrementó 3 veces, indicando que efectivamente, FRO2 aumenta su actividad bajo estas condiciones.

Cuando la actividad FRO2 fue ensayada en las raíces de las plantas *athscb*, encontramos que dicha actividad disminuyó a la mitad en relación a la línea Col-0. Bajo deficiencia de Fe, la actividad FRO2 en las raíces de las líneas *athscb* no varió significativamente con respecto a la condición control. Este resultado se condice con los diferentes trabajos que han descrito que el contenido de Fe de la parte aérea de las plantas podría regular la incorporación de dicho metal en sus raíces. Así, la disminución de la actividad FRO2 encontrada en las líneas *athscb* podría ser consecuencia de los altos niveles de Fe observados en sus hojas (Figura 36).

La disminución de la actividad FRO2 en las células epidérmicas de la raíz de *athscb*, estaría indicando que estas plantas tendrían disminuida la velocidad de incorporación del Fe en sus raíces. Sin embargo, estas plantas presentan niveles de Fe similar al de la línea Col-0 en raíces y un exceso de Fe en sus hojas, indicando que este metal estaría siendo incorporado por algún otro mecanismo. Un posible escenario de la incorporación del Fe en la raíz, implica la movilización del Fe (III) quelado por los compuestos fenólicos (Barrett-Lennard et al., 1983). Dichos compuestos, son exudados desde las raíces en respuesta a deficiencia de Fe, en plantas dicotiledóneas (Barrett-Lennard et al., 1983; Grusak et al., 1990). Se ha especulado que el Fe (III) quelado por los compuestos fenólicos, podría ser reducido por FRO2, y su subsecuente incorporación mediante IRT1 a las células epidérmicas de la raíz. Alternativamente, en analogía a la estrategia basada con los fitosideróforos, (estrategia II de incorporación del hierro, introducción sección 1.5.1.) el hierro unido a compuestos fenólicos, podría ser transportado por algún otro transportador sin previa reducción (Rodríguez-Celma and Schmidt, 2013).

Las líneas *AtHscB-myc* tendrían dañado el transporte del Fe raíz-hoja. Lamentablemente, se sabe muy poco sobre éste transporte en plantas. Se ha reportado que el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -citrato se moviliza hacia las hojas a través del xilema y el citrato sería transportado desde las células de la raíz hacia el xilema, por FRD3 (Durrett et al., 2007; Roschzttardtz et al., 2011). La expresión de este gen se incrementó más de un 100% en las líneas *AtHscB-myc*, sin embargo, estas plantas no son capaces de transportar el Fe hacia las hojas, sugiriendo que quizás tendrían alteradas proteínas hasta ahora desconocidas que estarían involucradas en el transporte del Fe raíz-hoja.

El Fe que es incorporado en las líneas *AtHscB-myc* quedaría atrapado en las raíces, provocando la reducción del contenido de Fe de sus hojas. Cuando las plantas fueron crecidas bajo condiciones normales de Fe, la actividad FRO2 se incrementó significativamente en las raíces de las líneas *AtHscB-myc*; y bajo condiciones de deficiencia de Fe la actividad FRO2 permaneció aumentada en relación a las plantas salvajes. Figura 36. Este resultado se condice con los modelos planteados para la regulación del contenido de Fe. La disminución del Fe en las hojas, provocaría el aumento de la actividad FRO2 en las raíces de estas líneas.

#### 5.1.4. Efecto de AtHscB en el transporte del Fe desde las raíces hacia las hojas

Como mencionamos anteriormente, la incorporación del Fe en plantas estaría regulada por los niveles de Fe en las hojas (Vert et al., 2003). Estudios Previos, han demostrado que el tratamiento foliar con una solución de Fe, en diferentes líneas con expresión constitutiva del gen FRO2, mostraron la represión de dicho gen. Por ejemplo, cuando las hojas de la línea de *frd3-3* (*FRD3-3* codifica para una proteína que transportaría el citrato hacia el xilema), fueron tratadas con Fe, se observó una represión de la actividad FRO2 (Garcia et al., 2013). Sin embargo, en la línea mutante *opt3-2* (*AtOPT3* pertenece a la familia de los transportadores de oligopeptidos (OPT), y estaría involucrado en unir el Fe para así facilitar su transporte vía floema), no se observó la represión de la actividad FRO2. Posiblemente en estas plantas se encuentre afectado el transporte de la señal represiva a través del floema (Garcia et al., 2013).

El agregado exógeno de Fe en las hojas de las líneas *AtHscB-myc* produce la disminución de la actividad FRO2, sugiriendo que las hojas de estas líneas son capaces de generar señales represivas que regulen de manera negativa los genes de incorporación del Fe en sus raíces. Las líneas *athscb*, que siempre presentan altos contenidos de Fe en sus hojas, tienen disminuida la actividad FRO2, indicando que estas plantas tampoco presentarían alteraciones en la señalización hoja-raíz para regular la captación del Fe en sus raíces.

Estos resultados sugieren que la disminución de la actividad FRO2 observada en las plantas *AtHscB-myc* es debida a la disminución del contenido de Fe sus hojas, Este fenotipo fue revertido cuando a las hojas de estas líneas se las roció con una solución de Fe 50  $\mu$ M, indicando que las mismas son capaces de generar señales que regulen la captación del Fe en sus raíces. Las líneas *athscb*, presentan altos niveles de este metal en sus hojas y la actividad FRO2 siempre se encontró disminuida en relación a las plantas Col-0, sugiriendo que la incorporación del Fe estaría disminuida en estas plantas. Estos resultados indican que al igual que la línea *frd3-3*, tanto las hojas de las líneas *athscb* como de las líneas *AtHscB-myc* son capaces de enviar señales a través del floema para regular la incorporación del Fe en la raíz.

Diferentes organismos, tales como, levaduras, moscas de la fruta y células animales, que presentan alterada la biosíntesis de los centros Fe-S exhiben alteraciones en la distribución intracelular del Fe y una desregulación en los genes involucrados en la incorporación de este metal, indicando la existencia de una íntima conexión entre el metabolismo del Fe y la síntesis de los centros Fe-S (Kispal et al., 1999; Kim et al., 2001;

Anderson et al., 2005; Lill and Muhlenhoff, 2008; Kaplan and Kaplan, 2009). Los mecanismos de las vías regulatorias en levaduras y mamíferos han sido dilucidados y aunque ellas son muy diferentes entre sí, ambas vías involucran la biogénesis de los centros Fe-S (Lill, 2009).

En mamíferos, una aconitasa citosólica funcionaría como sensor del Fe. Cuando los niveles de Fe son altos, el centro Fe-S de la proteína se encuentra en su forma [4Fe-4S] y dicha proteína tiene efectivamente actividad aconitasa. Cuando los niveles de Fe en la célula son bajos, el centro Fe-S pierde un Fe y la aconitasa cambia su conformación. Esta nueva conformación, es conocida como proteína reguladora del Fe (IRP1) que es capaz de reconocer y unir diferentes moléculas de ARN conocidos como elementos de respuesta al Fe. Se ha demostrado que, si IRP1 se sitúa en el extremo 5' de dichos elementos, bloquea su traducción, mientras que si se sitúa en el extremo 3', el ARN se estabiliza y se traduce. De esta manera, IRP1 regularía el metabolismo del Fe a través de estabilizar y/o desestabilizar los elementos de respuesta al Fe (Anderson et al., 2012).

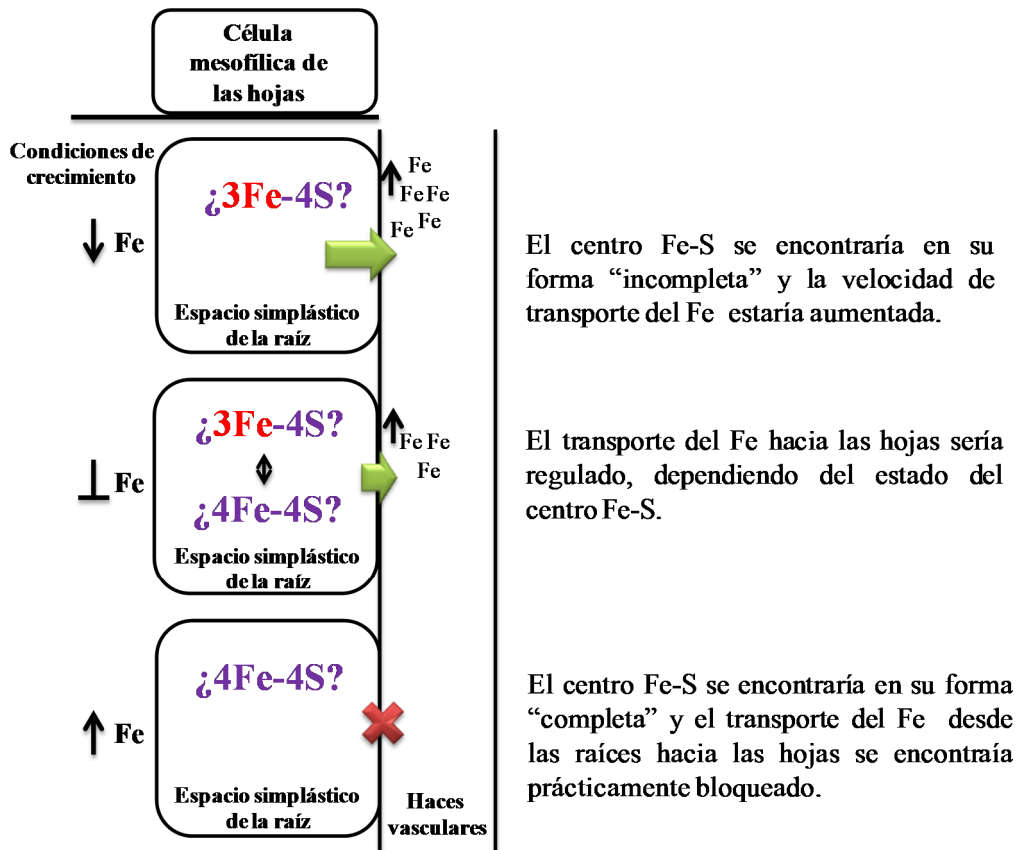
En levaduras, la incorporación y la distribución intracelular del Fe son reguladas por un mecanismo que involucra los factores de transcripción Aft1 y Aft2. Aft1 contiene un centro Fe-S, en su forma [2Fe-2S]. Cuando los niveles de Fe son normales, Aft1 se encuentra en el citosol. Sin embargo, en ausencia de Fe, el centro Fe-S de dicha proteína pierde un Fe y Aft1 se trasloca al núcleo y activa genes de la incorporación y transportadores de Fe (Rutherford et al., 2005). Ninguno de los dos mecanismos mencionados han sido encontrados en plantas y hasta el momento no se ha observado ninguna proteína que cumpla el rol de sensor de Fe (Balk and Schaedler, 2014). Sin embargo, no podemos descartar que en plantas no exista alguna proteína con centros Fe-S que esté involucrada en la regulación del metabolismo del Fe.

Nuestros resultados indican que las plantas *athscb* y *AtHscB-myc* presentan una distribución anormal del Fe entre la raíz y la parte aérea. Además, las raíces de las líneas *athscb* presentaron una disminución en la actividad aconitasa y SDH, mientras que las raíces de las líneas *AtHscB-myc* mostraron un aumento en dicha actividad. Hecho que sugiere que las raíces de las líneas deficientes (*athscb*) presentarían una reducción la síntesis de los grupos Fe-S, mientras que las líneas sobreexpresantes tendrían aumentada dicha síntesis. Con todos estos resultados y antecedentes, y además, teniendo en cuenta que la proteína AtHscB cumpliría su función en la biosíntesis de centros Fe-S, propusimos que el transporte del Fe

---

desde la raíz hacia las hojas podría ser regulado en la raíz, por alguna proteína conteniendo al menos un cofactor Fe-S.

El modelo planteado depende de las condiciones de crecimiento de las plantas. Si las plantas se encuentran creciendo bajo condiciones de deficiencia de Fe, dicho sensor se encontraría en su forma “incompleta” [3Fe-4S] y directamente o indirectamente, regularía la velocidad de transporte del Fe, aumentando su movilidad desde las raíces hacia las hojas (Figura 35). Este sería el caso de las plantas *athscb*, en las cuáles, los niveles de Fe de sus hojas es mucho mayor al de las líneas Col-0, probablemente, debido a una mayor velocidad de movilización raíz-hoja de dicho metal. Bajo condiciones normales de Fe, el centro Fe-S de dicho sensor se encontraría en un equilibrio entre [4Fe-4S] y [3Fe-4S], y en consecuencia la velocidad del transporte del Fe sería normal. Figura 35. Mientras que en condiciones de exceso de Fe, dicho sensor registraría el exceso de Fe encontrándose en su forma “completa” [4Fe-4S] y limitaría la velocidad de transporte de dicho metal (Figura 35). El ejemplo de este caso sería las líneas *AtHscB-myc*, las cuáles bajo condiciones normales de Fe, presentan bajos niveles de Fe en sus hojas y altos niveles de Fe en sus raíces. Este sería el caso de que el centro Fe-S se encontraría en su forma siempre completa y limitaría el transporte del Fe hacia las hojas.



**Figura 36. Representación esquemática del modelo de la regulación del transporte del Fe.** La velocidad de transporte del Fe desde las raíces hacia la parte aérea de las plantas, dependería de una proteína conteniendo, al menos un centro Fe-S y del estado de oxidación del mismo. Así, **bajo** condiciones de deficiencia de Fe, el centro Fe-S del sensor se encontraría en su forma [3Fe-4S] y regularía la velocidad de transporte del Fe, aumentando su movilidad desde las raíces hacia las hojas. Bajo condiciones normales de Fe, el centro Fe-S de dicho sensor se encontraría en un equilibrio entre las formas [4Fe-4S] y [3Fe-4S], y en consecuencia la velocidad del transporte del Fe sería normal. Mientras que en condiciones de exceso de Fe, dicho sensor registraría el exceso de Fe encontrándose en su forma [4Fe-4S] y limitaría la velocidad de transporte de dicho metal desde las raíces hacia las hojas.

Con la intención de determinar si el modelo planteado era posible, pensamos que si en las raíces de las líneas *AtHscB-myc* la síntesis de centros Fe-S se inhibía, el cofactor Fe-S del hipotético sensor perdería un Fe y de esta forma permitiría que el Fe acumulado en la raíz se transporte hacia las hojas. Para ello, decidimos someter las diferentes líneas de plantas estudiadas a 48 h de ausencia de Fe, para así lograr reducir la síntesis de centros Fe-S en las líneas *AtHscB-myc*.

Cuando las plantas se sometieron a ausencia de Fe por 48 h, encontramos que en las hojas de las líneas *athscb*, los niveles de Fe y las actividades de las enzimas aconitasa y succinato deshidrogenasa disminuyeron; 45%, 48% y 50%, respectivamente mientras que la actividad FRO2 se incrementó 2 veces, alcanzando los niveles encontrados en plantas tipo salvaje en ausencia de Fe. Estos resultados indican que luego de 48 h de ausencia de Fe, las plantas *athscb* logran activar el mecanismo de incorporación de Fe en sus raíces. El aumento de la actividad FRO2 se condice con la disminución de los niveles de Fe en las hojas de las plantas *athscb*, sugiriendo que la parte aérea de estas líneas estaría controlando los genes de incorporación de Fe en la raíz.

Luego de 48h en ausencia de Fe, en las hojas de las líneas *AtHscB-myc* se incrementó un 35% el contenido de Fe y se recuperó un 30% de la actividad aconitasa y un 20% la actividad succinato deshidrogenasa. Este resultado indica que el Fe que se encontraba atrapado en las raíces de las líneas *AtHscB-myc* pudo transportarse desde sus raíces hacia sus hojas. Probablemente, el incremento de la actividad aconitasa y SDH en las hojas de las plantas sobreexpresantes sea consecuencia del aumento de los niveles de Fe.

Cuando la actividad FRO2 fue medida en las raíces de las líneas sobreexpresantes, se observó una disminución de un 50% en relación a la condición control. Como mencionamos anteriormente, la incorporación de Fe en raíces sería regulada por la parte aérea de las plantas. Así, la reducción de la actividad FRO2 observada en las raíces *AtHscB-myc* podría ser consecuencia del aumento del contenido de Fe en sus hojas.

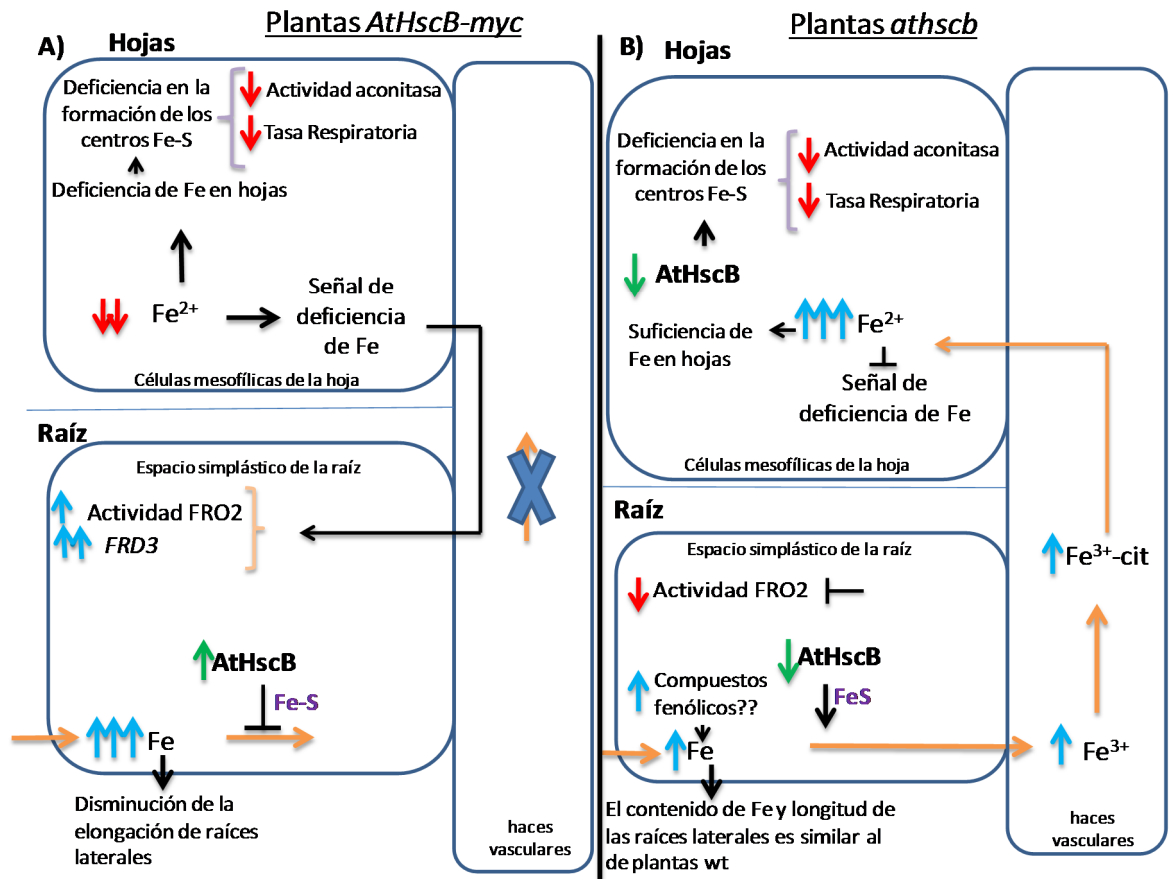
En base a todos los resultados obtenidos, podemos sugerir que tanto en las líneas *athscb* como en las líneas *AtHscB-myc*, la incorporación del Fe en raíces sería regulada por los niveles de Fe de sus hojas. Sin embargo, el transporte desde la raíz hacia las hojas sería regulada de una manera diferente, que no dependería del contenido de Fe de las hojas. Con la intención de explicar el fenotipo de las plantas sobreexpresantes y deficientes *AtHscB*, planteamos la existencia de un sensor que podría regular la velocidad del transporte del Fe, desde la raíz hacia las hojas. Dicho sensor contendría al menos un centro Fe-S y dependiendo de su estado de oxidación regularía la movilización de dicho metal.

Al someter las plantas *AtHscB-myc* a ausencia de Fe durante 48 h, el Fe atrapado en la raíz fue transportado hacia la parte aérea de estas plantas. Además, pudimos observar la recuperación de la actividad aconitasa y succinato deshidrogenasa y la reducción de la actividad FRO2. Con este resultado podríamos sugerir que, al igual que en mamíferos y

levaduras, podría existir un sensor que regule la velocidad de transporte desde la raíz hacia las hojas. Sugiriendo que en plantas existiría una estrecha relación entre el ensamblado de los centros Fe-S y la regulación del metabolismo del Fe.

En el capítulo 2, observamos que las líneas *AtHscB-myc* muestran alteraciones en la longitud de las raíces laterales cuando crecen en condiciones normales de Fe. Giehl et al (2012), mostraron que el crecimiento de las raíces laterales depende de la concentración del Fe y de la hormona auxina en las raíces. Cuando las plantas son sometidas a deficiencia de Fe, las raíces laterales incrementan su longitud, permitiendo aumentar las posibilidades de encontrar Fe en el suelo donde están creciendo (Giehl et al., 2012). Las plantas *AtHscB-myc*, presentan una reducción en la longitud de las raíces laterales, sugiriendo que las raíces de estas plantas podrían estar registrando la sobrecarga de Fe; sin embargo, el Fe no puede ser transportado hacia la parte aérea. Estos resultados sugieren que en estas plantas podría producirse un desacople en la comunicación entre sus raíces y sus parte aéreas. Por el contrario, las líneas *athscb*, no presentan diferencias significativas en la longitud de las raíces laterales con respecto a la Col-0, hecho que concuerda con la similitud del contenido de Fe encontrado en las raíces de estas plantas.

Cuando las líneas *athscb* fueron sometidas a 5 días de ausencia de Fe, se observó un aumento en el área foliar del 50%, mientras que las raíces laterales fueron similares a las de la línea Col-0. En las plantas *AtHscB-myc* se observó un incremento del 20% en el área foliar, y además las raíces laterales se tornaron similares a las de la línea Col-0. Este resultado sugeriría que tanto las líneas *athscb* como las *AtHscB-myc* son más tolerantes a crecer bajo condiciones de deficiencia de Fe que las plantas de tipo salvaje.



**Figura 37. Representación esquemática de los efectos de AtHscB en la regulación de la distribución del Fe en plantas.** A) Línea *AthscB-myc*. El aumento en los niveles de proteína AtHscB generaría un daño en el transporte del Fe raíz-hoja. La deficiencia del Fe en hojas, produciría la señal de deficiencia de Fe y la disminución en la síntesis de los centros Fe-S, afectando la actividad aconitasa y tasa respiratoria. La señal enviada desde la parte aérea, induciría el aumento de la actividad FRO2 provocando un incremento en el contenido de Fe en raíces, que afectaría la longitud de las raíces laterales. B) Líneas *athscb*. La disminución de los niveles de AtHscB, conlleva una disminución en la síntesis de los centros Fe-S, afectando la actividad aconitasa y el consumo de O<sub>2</sub>. El aumento del contenido en la parte aérea, podría ser por un incremento en la velocidad de transporte del Fe desde la raíz hacia las hojas. El aumento del contenido en la parte aérea, induciría la reducción de la actividad FRO2.

### 5.1.5. AtHscB y la tolerancia a la deficiencia de Fe

Finalmente, es importante destacar la tolerancia a la deficiencia y al incremento de Fe en las plantas *athscb* y *AtHscB-myc*. La baja bio-disponibilidad del Fe en los suelos de los cultivos, limita el crecimiento y los valores nutricionales de muchas variedades de plantas. Esto representa un serio problema en la agricultura y en la salud humana (Grotz and Guerinot, 2002; Puig et al., 2007). Múltiples estrategias han sido ensayadas para mejorar la incorporación y la acumulación del Fe en plantas. Se ha demostrado que la sobre-expresión de las ferroquelato reductasas de membrana plasmática (FRE1 y FRE2) de *S. cerevisiae* en plantas de tabaco, provoca un aumento de la tolerancia a la clorosis inducida por la deficiencia de Fe y un aumento del 50% en el contenido de Fe en las hojas de esta línea bajo condiciones normales y de deficiencia de Fe (Samuelsen et al., 1998). De manera similar, la sobre-expresión de FRO2 de *Arabidopsis* mejora el crecimiento bajo condiciones limitantes de Fe, pero en este caso, dichas líneas no aumentan significativamente el contenido de Fe (Connolly et al., 2003). Ambas líneas estudiadas, presentan tolerancia al crecimiento en condiciones limitantes de Fe y un aumento en el contenido de dicho metal en sus diferentes tejidos, tanto en condiciones normales como en de deficiencia de Fe. Estas características podrían ser útiles para mejorar la eficiencia del uso del Fe en la agricultura.

## **6. Conclusiones**

---

## Conclusiones

✚ AtHscB participaría en la biogénesis de los centros Fe-S *in vitro*:

✚ AtHscB interactúa físicamente con AtIsu1 y AtHscA2. Dicha interacción, modularía la actividad ATPasa de la AtHscA2. Previamente, se reportó que AtHscA1 también sería modulada por AtIsu1 y AtHscB (Xu et al., 2009). Estos resultados sugieren que *Arabidopsis*, no poseería una chaperona específica de la síntesis de centros Fe-S.

✚ AtHscB participaría en la biogénesis de los centros Fe-S *in vivo*:

✚ Las líneas deficientes en AtHscB, presentan la disminución de la actividad Aconitasa, SDH y el consumo de O<sub>2</sub>.

✚ Las plantas *AtHscB-myc*, también presentan una disminución de la actividad aconitasa, SDH y la tasa respiratoria. Estos resultados podrían deberse a la deficiencia de Fe en las hojas de éstas líneas, mientras que en las raíces la actividad de Aco y SDH se encuentra aumentada.

✚ Las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* tienen alterada la distribución del Fe en sus tejidos:

✚ Las líneas *athscb* presentaron un aumento en el contenido de Fe en sus hojas, tanto en condiciones normales como bajo deficiencia de Fe. Indicando que todo el Fe que entra a la raíz viaja hacia sus hojas.

✚ Las plantas *AtHscB-myc* presentaron alteración en el transporte de Fe desde las raíces hacia las hojas, provocando un exceso de Fe en raíces y una reducción del contenido de Fe en hojas, tanto en condiciones normales como bajo deficiencia de Fe.

---

✚ Las líneas *AtHscB-myc* y *athscb* no presentan alterado la comunicación hoja raíz:

✚ La deficiencia de Fe en las hojas de las plantas *AtHscB-myc* induce el incremento de la actividad FRO2 bajo condiciones normales y de deficiencia de Fe. El agregado exógeno de Fe en las hojas de las plantas *AtHscB-myc*, produce la disminución de la actividad FRO2. En las líneas *athscb*, el aumento del contenido de Fe en sus hojas, mantiene reducido los niveles de FRO2 incluso cuando se encuentran bajo condiciones de deficiencia de Fe, sugiriendo que ninguna de las líneas estudiadas, tienen alterada la señalización hoja-raíz para regular la incorporación del Fe.

✚ La línea *AtHscB-myc* presenta un desacople de la comunicación raíz-hoja:

✚ Las raíces de las plantas *AtHscB-myc*, podrían estar registrando el exceso de Fe, y reducir la longitud de sus raíces laterales. Pero el transporte del Fe no se produce en estas plantas, induciendo el incremento del acumulo de Fe en sus raíces y los niveles de ROS.

✚ Los resultados mostrados en la presente tesis, mostraron que la variación en los niveles de AtHscB, además de afectar la biosíntesis de los centros Fe-S, también produce un desbalance en la distribución del Fe en plantas. Estos resultados sugieren que probablemente, exista en las raíces de las plantas una ferrosulfoproteína involucrada en la regulación de la transporte raíz-hoja de este metal.

## **7. Referencias**

---

## Referencias

- Abdel-Ghany SE, Ye H, Garifullina GF, Zhang L, Pilon-Smits EA, Pilon M** (2005) Iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. Involvement of the scaffold protein CplscA. *Plant Physiol* **138**: 161-172
- Ackrell BA** (2000) Progress in understanding structure-function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS Lett* **466**: 1-5
- Adam AC, Bornhovd C, Prokisch H, Neupert W, Hell K** (2006) The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO J* **25**: 174-183
- Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA** (2012) Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1468-1483
- Anderson PR, Kirby K, Hilliker AJ, Phillips JP** (2005) RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, frataxin, in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* **14**: 3397-3405
- Andrade SL, Brondino CD, Feio MJ, Moura I, Moura JJ** (2000) Aldehyde oxidoreductase activity in *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491 EPR assignment of the proximal [2Fe-2S] cluster to the Mo site. *Eur J Biochem* **267**: 2054-2061
- Andrew AJ, Dutkiewicz R, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J** (2006) Characterization of the interaction between the J-protein Jac1p and the scaffold for Fe-S cluster biogenesis, Isu1p. *J Biol Chem* **281**: 14580-14587
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-399
- Arnaud N, Ravet K, Borlotti A, Touraine B, Boucherez J, Fizames C, Briat JF, Cellier F, Gaymard F** (2007) The iron-responsive element (IRE)/iron-regulatory protein 1 (IRP1)-cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochem J* **405**: 523-531
- Balk J, Lobreaux S** (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 324-331
- Balk J, Pilon M** (2011) Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci* **16**: 218-226
- Balk J, Schaedler TA** (2014) Iron cofactor assembly in plants. *Annu Rev Plant Biol* **65**: 125-153
- Bandyopadhyay S, Gama F, Molina-Navarro MM, Gualberto JM, Claxton R, Naik SG, Huynh BH, Herrero E, Jacquot JP, Johnson MK, Rouhier N** (2008) Chloroplast monothiol glutaredoxins as scaffold proteins for the assembly and delivery of [2Fe-2S] clusters. *EMBO J* **27**: 1122-1133
- Barrett-Lennard EG, Marschner H, Romheld V** (1983) Mechanism of Short Term Fe Reduction by Roots : Evidence against the Role of Secreted Reductants. *Plant Physiol* **73**: 893-898
- Beinert H** (2000) A tribute to sulfur. *Eur J Biochem* **267**: 5657-5664
- Beinert H, Holm RH, Munck E** (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**: 653-659
- Beinert H, Kennedy MC, Stout CD** (1996) Aconitase as Iron minus sign Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. *Chem Rev* **96**: 2335-2374
- Bernard DG, Cheng Y, Zhao Y, Balk J** (2009) An allelic mutant series of ATM3 reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron-sulfur proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151**: 590-602
- Bernard DG, Netz DJ, Lagny TJ, Pierik AJ, Balk J** (2013) Requirements of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway in *Arabidopsis*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 20120259
- Bernard P, Couturier M** (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**: 735-745
- Bitto E, Bingman CA, Bittova L, Kondrashov DA, Bannen RM, Fox BG, Markley JL, Phillips GN, Jr.** (2008) Structure of Human J-type Co-chaperone HscB Reveals a Tetracysteine Metal-binding Domain. *J Biol Chem* **283**: 30184-30192

- Bollag DM, Edelstein SJ** (1991) Protein Methods. Wiley-Liss Inc., Nueva York.
- Bonomi F, Iametti S, Morleo A, Ta D, Vickery LE** (2008) Studies on the mechanism of catalysis of iron-sulfur cluster transfer from IscU[2Fe2S] by HscA/HscB chaperones. *Biochemistry* **47**: 12795-12801
- Boshoff A, Hennessy F, Blatch GL** (2004) The in vivo and in vitro characterization of DnaK from *Agrobacterium tumefaciens* RUOR. *Protein Expr Purif* **38**: 161-169
- Bradford MM** (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
- Briat JF, Curie C, Gaymard F** (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 276-282
- Brooks SP** (1992) A simple computer program with statistical tests for the analysis of enzyme kinetics. *Biotechniques* **13**: 906-911
- Buckhout TJ, Yang TJ, Schmidt W** (2009) Early iron-deficiency-induced transcriptional changes in *Arabidopsis* roots as revealed by microarray analyses. *BMC Genomics* **10**: 147
- Bulteau AL, O'Neill HA, Kennedy MC, Ikeda-Saito M, Isaya G, Szweda LI** (2004) Frataxin acts as an iron chaperone protein to modulate mitochondrial aconitase activity. *Science* **305**: 242-245
- Busi MV, Gomez-Casati DF** (2012) Exploring frataxin function. *IUBMB Life* **64**: 56-63
- Busi MV, Maliandi MV, Valdez H, Clemente M, Zabaleta EJ, Araya A, Gomez-Casati DF** (2006) Deficiency of *Arabidopsis thaliana* frataxin alters activity of mitochondrial Fe-S proteins and induces oxidative stress. *Plant J* **48**: 873-882
- Bych K, Netz DJ, Vigani G, Bill E, Lill R, Pierik AJ, Balk J** (2008) The essential cytosolic iron-sulfur protein Nbp35 acts without Cfd1 partner in the green lineage. *J Biol Chem* **283**: 35797-35804
- Ciesielski SJ, Schilke BA, Osipiuk J, Bigelow L, Mulligan R, Majewska J, Joachimiak A, Marszalek J, Craig EA, Dutkiewicz R** (2012) Interaction of J-protein co-chaperone Jac1 with Fe-S scaffold Isu is indispensable in vivo and conserved in evolution. *J Mol Biol* **417**: 1-12
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Colangelo EP, Guerinot ML** (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**: 3400-3412
- Connolly EL, Campbell NH, Grotz N, Prichard CL, Guerinot ML** (2003) Overexpression of the FRO2 ferric chelate reductase confers tolerance to growth on low iron and uncovers posttranscriptional control. *Plant Physiol* **133**: 1102-1110
- Craig EA, Huang P, Aron R, Andrew A** (2006) The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **156**: 1-21
- Cupp-Vickery JR, Peterson JC, Ta DT, Vickery LE** (2004) Crystal structure of the molecular chaperone HscA substrate binding domain complexed with the IscU recognition peptide ELPPVKIHC. *J Mol Biol* **342**: 1265-1278
- Curie C, Briat JF** (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 183-206
- Chandramouli K, Johnson MK** (2006) HscA and HscB stimulate [2Fe-2S] cluster transfer from IscU to apoferredoxin in an ATP-dependent reaction. *Biochemistry* **45**: 11087-11095
- Chen S, Sanchez-Fernandez R, Lyver ER, Dancis A, Rea PA** (2007) Functional characterization of AtATM1, AtATM2, and AtATM3, a subfamily of *Arabidopsis* half-molecule ATP-binding cassette transporters implicated in iron homeostasis. *J Biol Chem* **282**: 21561-21571
- Chu HH, Chiecko J, Punshon T, Lanzirotti A, Lahner B, Salt DE, Walker EL** (2010) Successful reproduction requires the function of *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures. *Plant Physiol* **154**: 197-210
- Darbani B, Briat JF, Holm PB, Husted S, Noeparvar S, Borg S** (2013) Dissecting plant iron homeostasis under short and long-term iron fluctuations. *Biotechnol Adv* **31**: 1292-1307

- DiDonato RJ, Jr., Roberts LA, Sanderson T, Easley RB, Walker EL** (2004) Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J* **39**: 403-414
- Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE** (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol* **144**: 197-205
- Dutkiewicz R, Schilke B, Cheng S, Knieszner H, Craig EA, Marszalek J** (2004) Sequence-specific interaction between mitochondrial Fe-S scaffold protein Isu and Hsp70 Ssq1 is essential for their in vivo function. *J Biol Chem* **279**: 29167-29174
- Dutkiewicz R, Schilke B, Knieszner H, Walter W, Craig EA, Marszalek J** (2003) Ssq1, a mitochondrial Hsp70 involved in iron-sulfur (Fe/S) center biogenesis. Similarities to and differences from its bacterial counterpart. *J Biol Chem* **278**: 29719-29727
- Fontecave M, Choudens SO, Py B, Barras F** (2005) Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *J Biol Inorg Chem* **10**: 713-721
- Frazzon AP, Ramirez MV, Warek U, Balk J, Frazzon J, Dean DR, Winkel BS** (2007) Functional analysis of Arabidopsis genes involved in mitochondrial iron-sulfur cluster assembly. *Plant Mol Biol* **64**: 225-240
- Frazzon J, Dean DR** (2003) Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 166-173
- Garcia-Mina JM, Bacaicoa E, Fuentes M, Casanova E** (2013) Fine regulation of leaf iron use efficiency and iron root uptake under limited iron bioavailability. *Plant Sci* **198**: 39-45
- Garcia MJ, Romera FJ, Stacey MG, Stacey G, Villar E, Alcantara E, Perez-Vicente R** (2013) Shoot to root communication is necessary to control the expression of iron-acquisition genes in Strategy I plants. *Planta* **237**: 65-75
- Gardner PR** (2002) Aconitase: sensitive target and measure of superoxide. *Methods Enzymol* **349**: 9-23
- Gerber J, Lill R** (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* **2**: 71-86
- Giehl RF, Lima JE, von Wieren N** (2012) Localized iron supply triggers lateral root elongation in Arabidopsis by altering the AUX1-mediated auxin distribution. *Plant Cell* **24**: 33-49
- Grotz N, Guerinot ML** (2002) Limiting nutrients: an old problem with new solutions? *Curr Opin Plant Biol* **5**: 158-163
- Grusak MA, Pezeshgi S** (1996) Shoot-to-Root Signal Transmission Regulates Root Fe(III) Reductase Activity in the dgl Mutant of Pea. *Plant Physiol* **110**: 329-334
- Grusak MA, Welch RM, Kochian LV** (1990) Physiological Characterization of a Single-Gene Mutant of *Pisum sativum* Exhibiting Excess Iron Accumulation: I. Root Iron Reduction and Iron Uptake. *Plant Physiol* **93**: 976-981
- Hageman J, Kampinga HH** (2009) Computational analysis of the human HSPH/HSPA/DNAJ family and cloning of a human HSPH/HSPA/DNAJ expression library. *Cell Stress Chaperones* **14**: 1-21
- Hell R, Stephan UW** (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**: 541-551
- Hoff KG, Ta DT, Tapley TL, Silberg JJ, Vickery LE** (2002) Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the iron-sulfur cluster template protein IscU. *J Biol Chem* **277**: 27353-27359
- Horsefield R, Iwata S, Byrne B** (2004) Complex II from a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci* **5**: 107-118
- Huttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW** (2008) Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 445-456
- Huynen MA, Snel B, Bork P, Gibson TJ** (2001) The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron-sulfur cluster protein assembly. *Hum Mol Genet* **10**: 2463-2468

- Ishimaru Y, Kim S, Tsukamoto T, Oki H, Kobayashi T, Watanabe S, Matsubishi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK (2007) Mutational reconstructed ferric chelate reductase confers enhanced tolerance in rice to iron deficiency in calcareous soil. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7373-7378
- Jakoby M, Wang HY, Reidt W, Weisshaar B, Bauer P (2004) FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **577**: 528-534
- Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 579-592
- Kaplan CD, Kaplan J (2009) Iron acquisition and transcriptional regulation. *Chem Rev* **109**: 4536-4552
- Kim KD, Chung WH, Kim HJ, Lee KC, Roe JH (2010) Monothiol glutaredoxin Grx5 interacts with Fe-S scaffold proteins Isa1 and Isa2 and supports Fe-S assembly and DNA integrity in mitochondria of fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **392**: 467-472
- Kim R, Saxena S, Gordon DM, Pain D, Dancis A (2001) J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins. *J Biol Chem* **276**: 17524-17532
- Kim SA, Guerinet ML (2007) Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* **581**: 2273-2280
- Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* **18**: 3981-3989
- Klatte M, Schuler M, Wirtz M, Fink-Straube C, Hell R, Bauer P (2009) The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. *Plant Physiol* **150**: 257-271
- Kushnir S, Babiyshuk E, Storozhenko S, Davey MW, Papenbrock J, De Rycke R, Engler G, Stephan UW, Lange H, Kispal G, Lill R, Van Montagu M (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter Sta1 leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant starik. *Plant Cell* **13**: 89-100
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* **100**: 95-97
- Layer G, Ollagnier-de Choudens S, Sanakis Y, 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
- Le Jean M, Schikora A, Mari S, Briat JF, Curie C (2005) A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J* **44**: 769-782
- Lehninger A, Nelson DL, Cox MM (1993) *Principles of Biochemistry*. 2nd edition. Worth Publishers, Estados Unidos.
- Lemire BD, Oyedotun KS (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 102-116
- Leon S, Touraine B, Briat JF, Lobreaux S (2002) The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochem J* **366**: 557-564
- Leon S, Touraine B, Briat JF, Lobreaux S (2005) Mitochondrial localization of *Arabidopsis thaliana* Isu Fe-S scaffold proteins. *FEBS Lett* **579**: 1930-1934
- Leon S, Touraine B, Ribot C, Briat JF, Lobreaux S (2003) Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* **371**: 823-830
- Lezhneva L, Amann K, Meurer J (2004) The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]-cluster-containing complexes in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant J* **37**: 174-185

- Li J, Kogan M, Knight SA, Pain D, Dancis A (1999) Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J Biol Chem* **274**: 33025-33034
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350-382
- Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**: 831-838
- Lill R, Diekert K, Kaut A, Lange H, Pelzer W, Prohl C, Kispal G (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol Chem* **380**: 1157-1166
- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Muhlenhoff U (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 1491-1508
- Lill R, Muhlenhoff U (2008) Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* **77**: 669-700
- Ling HQ, Bauer P, Bereczky Z, Keller B, Ganai M (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13938-13943
- Loiseau L, Ollagnier-de-Choudens S, Nachin L, Fontecave M, Barras F (2003) Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J Biol Chem* **278**: 38352-38359
- Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant Cell* **22**: 2219-2236
- Lopez-Millan AF, Morales F, Abadia A, Abadia J (2000) Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiol* **124**: 873-884
- Lucena C, Waters BM, Romera FJ, Garcia MJ, Morales M, Alcantara E, Perez-Vicente R (2006) Ethylene could influence ferric reductase, iron transporter, and H<sup>+</sup>-ATPase gene expression by affecting FER (or FER-like) gene activity. *J Exp Bot* **57**: 4145-4154
- Luo D, Bernard DG, Balk J, Hai H, Cui X (2012) The DUF59 family gene AE7 acts in the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway to maintain nuclear genome integrity in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 4135-4148
- Maliandi MV (2009) "*Estudios sobre la participación de AtFH en la biogénesis de proteínas Fe-S y hemoproteínas en mitocondrias de plantas*". Tesis Doctoral.
- Maliandi MV, Busi MV, Turowski VR, Leaden L, Araya A, Gomez-Casati DF (2011) The mitochondrial protein frataxin is essential for heme biosynthesis in plants. *FEBS J* **278**: 470-481
- Markley JL, Kim JH, Dai Z, Bothe JR, Cai K, Frederick RO, Tonelli M (2013) Metamorphic protein IscU alternates conformations in the course of its role as the scaffold protein for iron-sulfur cluster biosynthesis and delivery. *FEBS Lett* **587**: 1172-1179
- Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**: 670-684
- McKay DB (1993) Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. *Adv Protein Chem* **44**: 67-98
- Meguro R, Asano Y, Odagiri S, Li C, Iwatsuki H, Shoumura K (2007) Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. *Arch Histol Cytol* **70**: 1-19
- Merchant S, Dreyfuss BW (1998) Posttranslational Assembly of Photosynthetic Metalloproteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 25-51
- Miki T, Park JA, Nagao K, Murayama N, Horiuchi T (1992) Control of segregation of chromosomal DNA by sex factor F in Escherichia coli. Mutants of DNA gyrase subunit A suppress letD (ccdB) product growth inhibition. *J Mol Biol* **225**: 39-52

- Millar AH, Eubel H, Jansch L, Kruff V, Heazlewood JL, Braun HP** (2004) Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Mol Biol* **56**: 77-90
- Moller IM, Sweetlove LJ** (2010) ROS signalling--specificity is required. *Trends Plant Sci* **15**: 370-374
- Morrissey J, Guerinot ML** (2009) Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem Rev* **109**: 4553-4567
- Muhlenhoff U, 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
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Netz DJ, Stumpfig M, Dore C, Muhlenhoff U, Pierik AJ, Lill R** (2010) Tah18 transfers electrons to Dre2 in cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *Nat Chem Biol* **6**: 758-765
- Pagani S, Bonomi F, Cerletti P** (1984) Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur J Biochem* **142**: 361-366
- Palmer G, Sands RH** (1966) On the magnetic resonance of spinach ferredoxin. *J Biol Chem* **241**: 253
- Pandey A, Golla R, Yoon H, Dancis A, Pain D** (2012) Persulfide formation on mitochondrial cysteine desulfurase: enzyme activation by a eukaryote-specific interacting protein and Fe-S cluster synthesis. *Biochem J* **448**: 171-187
- Peters JW, Fisher K, Dean DR** (1995) Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu Rev Microbiol* **49**: 335-366
- Peters K, Niessen M, Peterhansel C, Spath B, Holzle A, Binder S, Marchfelder A, Braun HP** (2012) Complex I-complex II ratio strongly differs in various organs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **79**: 273-284
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pilon-Smits EA, Garifullina GF, Abdel-Ghany S, Kato S, Mihara H, Hale KL, Burkhead JL, Esaki N, Kurihara T, Pilon M** (2002) Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiol* **130**: 1309-1318
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Van Hoewyk D, Ye H, Pilon-Smits EA** (2006) Biogenesis of iron-sulfur cluster proteins in plastids. *Genet Eng (N Y)* **27**: 101-117
- Puig S, Andres-Colas N, Garcia-Molina A, Penarrubia L** (2007) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* **30**: 271-290
- Pukszta S, Schilke B, Dutkiewicz R, Kominek J, Moczulska K, Stepień B, Reitenga KG, Bujnicki JM, Williams B, Craig EA, Marszałek J** (2010) Co-evolution-driven switch of J-protein specificity towards an Hsp70 partner. *EMBO Rep* **11**: 360-365
- Rasmusson AG, Geisler DA, Moller IM** (2008) The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* **8**: 47-60
- Raulfs EC, O'Carroll IP, Dos Santos PC, Unciuleac MC, Dean DR** (2008) In vivo iron-sulfur cluster formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8591-8596
- Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F** (2009) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**: 400-412
- Richards TA, van der Giezen M** (2006) Evolution of the Isd11-IscS complex reveals a single alpha-proteobacterial endosymbiosis for all eukaryotes. *Mol Biol Evol* **23**: 1341-1344
- Rieske JS, Hansen RE, Zaugg WS** (1964) Studies on the Electron Transfer System. 58. Properties of a New Oxidation-Reduction Component of the Respiratory Chain as Studied by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *J Biol Chem* **239**: 3017-3022

- Rodriguez-Celma J, Lattanzio G, Grusak MA, Abadia A, Abadia J, Lopez-Millan AF** (2011) Root responses of *Medicago truncatula* plants grown in two different iron deficiency conditions: changes in root protein profile and riboflavin biosynthesis. *J Proteome Res* **10**: 2590-2601
- Rodriguez-Celma J, Schmidt W** (2013) Reduction-based iron uptake revisited: on the role of secreted iron-binding compounds. *Plant Signal Behav* **8**: e26116
- Rodriguez-Manzanares MT, Tamarit J, Belli G, Ros J, Herrero E** (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**: 1109-1121
- Rogers EE, Guerinot ML** (2002) FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 1787-1799
- Roschzttardtz H, Conejero G, Curie C, Mari S** (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol* **151**: 1329-1338
- Roschzttardtz H, Seguela-Arnaud M, Briat JF, Vert G, Curie C** (2011) The FRD3 citrate effluxer promotes iron nutrition between symplastically disconnected tissues throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **23**: 2725-2737
- Rubio V, Shen Y, Saijo Y, Liu Y, Gusmaroli G, Dinesh-Kumar SP, Deng XW** (2005) An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation. *Plant J* **41**: 767-778
- Rutherford JC, Ojeda L, Balk J, Muhlenhoff U, Lill R, Winge DR** (2005) Activation of the iron regulon by the yeast Aft1/Aft2 transcription factors depends on mitochondrial but not cytosolic iron-sulfur protein biogenesis. *J Biol Chem* **280**: 10135-10140
- Sambrook J, Russell D** (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd. Cold Spring Harbor, N.Y. .
- Samuelson AI, Martin RC, Mok DW, Mok MC** (1998) Expression of the yeast FRE genes in transgenic tobacco. *Plant Physiol* **118**: 51-58
- Scheffler IE** (1998) Molecular genetics of succinate:quinone oxidoreductase in eukaryotes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **60**: 267-315
- Schilke B, Williams B, Knieszner H, Pukszta S, D'Silva P, Craig EA, Marszalek J** (2006) Evolution of mitochondrial chaperones utilized in Fe-S cluster biogenesis. *Curr Biol* **16**: 1660-1665
- Schirawski J, Uden G** (1998) Menaquinone-dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential. *Eur J Biochem* **257**: 210-215
- Schmidt W** (2003) Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci* **8**: 188-193
- Schmidt W, Tittel J, Schikora A** (2000) Role of hormones in the induction of iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol* **122**: 1109-1118
- Schwenkert S, Netz DJ, Frazzon J, Pierik AJ, Bill E, Gross J, Lill R, Meurer J** (2009) Chloroplast HCF101 is a scaffold protein for [4Fe-4S] cluster assembly. *Biochem J* **425**: 207-214
- Seaton BL, Vickery LE** (1994) A gene encoding a DnaK/hsp70 homolog in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2066-2070
- Shin LJ, Lo JC, Chen GH, Callis J, Fu H, Yeh KC** (2013) IRT1 degradation factor1, a ring E3 ubiquitin ligase, regulates the degradation of iron-regulated transporter1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 3039-3051
- Silberg JJ, Hoff KG, Vickery LE** (1998) The Hsc66-Hsc20 chaperone system in *Escherichia coli*: chaperone activity and interactions with the DnaK-DnaJ-grpE system. *J Bacteriol* **180**: 6617-6624
- Stacey MG, Patel A, McClain WE, Mathieu M, Remley M, Rogers EE, Gassmann W, Blevins DG, Stacey G** (2008) The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiol* **146**: 589-601
- Sung DY, Vierling E, Guy CL** (2001) Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol* **126**: 789-800

- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK** (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* **15**: 1263-1280
- Takahashi Y, Mitsui A, Fujita Y, Matsubara H** (1991) Roles of ATP and NADPH in formation of the Fe-S cluster of spinach ferredoxin. *Plant Physiol* **95**: 104-110
- Takahashi Y, Mitsui A, Hase T, Matsubara H** (1986) Formation of the iron-sulfur cluster of ferredoxin in isolated chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2434-2437
- Takahashi Y, Nakamura M** (1999) Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *J Biochem* **126**: 917-926
- Takahashi Y, Tokumoto U** (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**: 28380-28383
- Tamarit J, Irazusta V, Moreno-Cermeno A, Ros J** (2006) Colorimetric assay for the quantitation of iron in yeast. *Anal Biochem* **351**: 149-151
- Tone Y, Kawai-Yamada M, Uchimiya H** (2004) Isolation and characterization of *Arabidopsis thaliana* ISU1 gene. *Biochim Biophys Acta* **1680**: 171-175
- Touraine B, Boutin JP, Marion-Poll A, Briat JF, Peltier G, Lobreaux S** (2004) Nfu2: a scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant J* **40**: 101-111
- Trípodí KEJ, Podestá FE** (2003) Purification and characterization of an NAD-dependent malate dehydrogenase from leaves of the crassulacean acid metabolism plant *Aptenia cordifolia*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 97-105
- Tsai CL, Barondeau DP** (2010) Human frataxin is an allosteric switch that activates the Fe-S cluster biosynthetic complex. *Biochemistry* **49**: 9132-9139
- Turowski VR, Busi MV, Gomez-Casati DF** (2012) Structural and functional studies of the mitochondrial cysteine desulfurase from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **5**: 1001-1010
- Uhrigshardt H, Singh A, Kovtunovych G, Ghosh M, Rouault TA** (2010) Characterization of the human HSC20, an unusual DnaJ type III protein, involved in iron-sulfur cluster biogenesis. *Hum Mol Genet* **19**: 3816-3834
- Urbina HD, Cupp-Vickery JR, Vickery LE** (2002) Preliminary crystallographic analysis of the cysteine desulfurase IscS from *Escherichia coli*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 1224-1225
- Van Hoewyk D, Abdel-Ghany SE, CoHu CM, Herbert SK, Kugrens P, Pilon M, Pilon-Smiths EA** (2007) Chloroplast iron-sulfur cluster protein maturation requires the essential cysteine desulfurase CpnifS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5686-5691
- Vasconcelos M, Eckert H, Arahana V, Graef G, Grusak MA, Clemente T** (2006) Molecular and phenotypic characterization of transgenic soybean expressing the *Arabidopsis* ferric chelate reductase gene, FRO2. *Planta* **224**: 1116-1128
- Vazzola V, Losa A, Soave C, Murgia I** (2007) Knockout of frataxin gene causes embryo lethality in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **581**: 667-672
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-1233
- Vert GA, Briat JF, Curie C** (2003) Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by local and long-distance signals. *Plant Physiol* **132**: 796-804
- Vickery LE, Cupp-Vickery JR** (2007) Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**: 95-111
- Vickery LE, Silberg JJ, Ta DT** (1997) Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Protein Sci* **6**: 1047-1056
- Vigani G** (2012) Discovering the role of mitochondria in the iron deficiency-induced metabolic responses of plants. *J Plant Physiol* **169**: 1-11

- Vigani G, Maffi D, Zocchi G** (2009) Iron availability affects the function of mitochondria in cucumber roots. *New Phytol* **182**: 127-136
- Vigani G, Zocchi G** (2010) Effect of Fe deficiency on mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in cucumber roots. *J Plant Physiol* **167**: 666-669
- Vigani G, Zocchi G, Bashir K, Philippar K, Briat JF** (2013) Signals from chloroplasts and mitochondria for iron homeostasis regulation. *Trends Plant Sci* **18**: 305-311
- Voisine C, Cheng YC, Ohlson M, Schilke B, Hoff K, Beinert H, Marszalek J, Craig EA** (2001) Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1483-1488
- Wachtershauser G** (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog Biophys Mol Biol* **58**: 85-201
- Wiedemann N, Urzica E, Guiard B, Muller H, Lohaus C, Meyer HE, Ryan MT, Meisinger C, Muhlenhoff U, Lill R, Pfanner N** (2006) Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *EMBO J* **25**: 184-195
- Xu XM, Lin H, Latijnhouwers M, Moller SG** (2009) Dual localized AtHscB involved in iron sulfur protein biogenesis in Arabidopsis. *PLoS ONE* **4**: e7662
- Xu XM, Moller SG** (2008) Iron-sulfur cluster biogenesis systems and their crosstalk. *Chembiochem* **9**: 2355-2362
- Xu XM, Moller SG** (2011) Iron-sulfur clusters: biogenesis, molecular mechanisms, and their functional significance. *Antioxid Redox Signal* **15**: 271-307
- Yabe T, Morimoto K, Kikuchi S, Nishio K, Terashima I, Nakai M** (2004) The Arabidopsis chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I. *Plant Cell* **16**: 993-1007
- Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S** (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**: 700-704
- Yuan Y, Wu H, Wang N, Li J, Zhao W, Du J, Wang D, Ling HQ** (2008) FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res* **18**: 385-397
- Zheng L, White RH, Cash VL, Jack RF, Dean DR** (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2754-2758