

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA* CON UN SENSOR DE ARN ESPECÍFICO PARA LA DETECCIÓN DE S- ADENOSIL METIONINA

García Canales Rhoscio (1), Yong Villalobos Lenin Enrique (2)

1 Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya | rhoscio.gc@gmail.com

2 Fisiología e Ingeniería metabólica de plantas, Langebio, Irapuato, Cinvestav | lenin.yong@cinvestav.mx

Resumen

En el presente proyecto se trabajó con variaciones experimentales hasta disponer de condiciones óptimas para la visualización *in vivo* de líneas transgénicas con un sensor de RNA específico para la detección de S-Adenosil Metionina (SAM), así como la generación de herramientas para la caracterización de la distribución dinámica de SAM durante procesos biológicos de importancia donde interviene dicho metabolito y la generación de herramientas moleculares para la caracterización del sensor de SAM durante la triple respuesta al etileno, hormona involucrada en procesos importantes del desarrollo de las plantas.

Abstract

In the present project we worked with experimental variations to obtain the optimum conditions for *in vivo* visualization of transgenic lines with a RNA sensor specific for the detection of S-Adenosil methionine (SAM), as well as the generation of molecular tools for the characterization of the dynamic distribution of SAM during important biological processes and the generation of molecular tools for the characterization of lines during the triple response to ethylene, hormone involved in important developmental processes of plants.

Palabras Clave

Plantas; Metabolismo; Biosensor; S-Adenosil metionina; Etileno

INTRODUCCIÓN

El estudio del perfil de metabolitos en plantas incluye el análisis de una amplia gama de especies químicas con diversas propiedades físicas, la complejidad inherente de estos análisis ha requerido el empleo de tecnologías y herramientas analíticas para la separación y caracterización de la extremadamente diversa cantidad de compuestos que pueden producir las plantas.

Sin embargo a pesar de los avances en metabolómica, la distribución dinámica *in vivo* de los metabolitos dentro de células, tejidos u órganos de las plantas aún permanece sin ser ampliamente investigada.

Las herramientas actuales de visualización *in vivo* del perfil metabólico en plantas requieren de equipamiento y materiales que pueden ser muy costosos y requieren de una considerable experiencia técnica.

Una alternativa novedosa y accesible para el análisis *in vivo* de la distribución y localización de metabolitos surge de la utilización de moléculas de ARN como sensores para metabolitos específicos [1], este enfoque permite generar líneas transgénicas en las que es posible visualizar en tiempo real metabolitos de interés mediante microscopía de fluorescencia [1,2].

Los sensores de ARN actúan de manera similar a la proteína verde fluorescente (GFP) aunque frecuentemente presentan una intensidad mayor, exhibiendo fluorescencia en las células y sin generar citotoxicidad. "Spinach" un aptámero de ARN utilizado y que es llamado así por presentar una señal de fluorescencia verde brillante al unirse al fluoróforo 3,5-difluoro-4-hidroxibenciliden imidazolinona (DFHBI) [1,2].

Los aptámeros de ARN se unen selectivamente a cualquier molécula pequeña y también pueden ser rápidamente generados usando selección *in vitro* [1,2]. El complejo Spinach contiene tres tallos de bucles que rodean un bucle central (IMAGEN 1). Mediante mutagénesis se reveló que un tallo-bucle tiene un papel estructural esencial en la fluorescencia de Spinach; por ello, se utilizó este tallo-bucle como punto de entrada para la inserción de los pequeños aptámeros de unión a moléculas específicas [2].

En el presente trabajo se muestran los resultados de una primera prueba para introducir un sensor de ARN específico para detectar SAM en plantas de *Arabidopsis*.

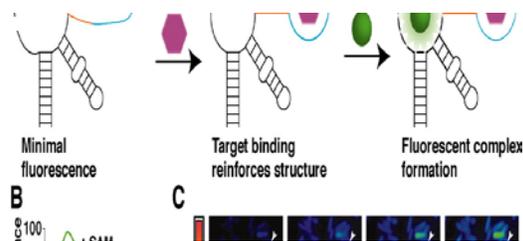


IMAGEN 1: Esquema general del funcionamiento del sensor de ARN. El sensor consiste en Spinach (negro), un transductor (naranja), y aptámero de unión al metabolito (azul). La unión del metabolito al aptámero favorece la estabilización del tallo transductor, lo que permite a Spinach obtener su conformación activa y activar la fluorescencia del DFHBI. Figura tomada de [2].

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col 0) y de mutantes en la respuesta de etileno (*ein2*, *ein3*, *eto2*, *etr1*, *eir1*) fueron utilizadas para la transformación con la construcción del sensor de ARN para SAM.

Generación de construcciones

Se amplificó por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la secuencia correspondiente al sensor de SAM usando como templado el vector pET28c-SAM utilizado previamente para visualización de SAM en *E. Coli* [1]. La secuencia de el sensor de SAM fue introducida usando tecnología Gateway en el vector de entrada pDNOR 221 y posteriormente introducida en el vector destino pFAST-G02. La construcción portadora del sensor de SAM fue transformada por medio de *Agrobacterium tumefaciens* en plantas Col 0 y en mutantes de

etileno por el método floral dip con modificaciones [3].

Los promotores de cuatro SAM sintetasas de *Arabidopsis* (SAMS1, SAMS2, SAMS3 y SAMS4) se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico. La clonación de los promotores se realizó de la misma manera que el sensor de SAM con la diferencia de que se utilizó el vector destino pFAST-GO2.

Selección de líneas transgénicas con el sensor de SAM

Se realizó la selección de líneas transgénicas portadoras del sensor de SAM (sSAM) mediante el uso del agente de selección glufosinato de amonio (PPT). Las líneas transgénicas que presentaron una segregación 3:1 de la resistencia a PPT sugerían la presencia de eventos únicos de integración de la construcción y fueron seleccionadas para la obtención de líneas homocigotas. Para la caracterización del sistema se utilizaron líneas homocigotas independientes de sSAM.

Preparación de las muestras para la visualización del sensor de SAM

Plántulas de Col 0 y de líneas sSAM crecidas por 8 días en medio Murashige-Skoog (MS) sólido, fueron incubadas en el buffer de reacción (agua destilada, detergente y fluoróforo) y lavadas cuidadosamente con agua destilada para evitar daños en el tejido.

Para estandarizar la visualización *in vivo* de SAM se llevaron a cabo tratamientos con distintas condiciones que incluían el uso de diferentes concentraciones (0.01 y 0.05%) de detergentes (Triton X-100, SDS, Tween 20) que relajaran la membrana celular para permitir el paso del fluoróforo DFHBI al interior de las células. También se ensayaron concentraciones de DFHBI (20 y 50 μM) y tiempos de incubación (5, 10, 20 y ∞) con el fin de obtener las condiciones óptimas y estandarizar la visualización del sistema sensor; durante la

incubación las muestras eran cubiertas debido a que DFHBI es fotolábil.

Para los ensayos con una versión mejorada del fluoróforo DFHBI, "DFHBI-1T", las plántulas fueron incubadas en buffer de reacción sin detergentes.

Las plántulas utilizadas para la visualización en microscopio confocal fueron acomodadas en portaobjetos. Se analizaron raíces de plantas sSAM y de el control silvestre Col 0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de líneas transgénicas con el sensor de SAM (sSAM)

El análisis de líneas homocigotas independientes de sSAM (sSAM1A y sSAM1B) mostró actividad significativa del sensor de SAM y una visualización clara de la distribución de SAM en los ápices de las raíces. Las condiciones óptimas de visualización de sSAM se obtuvieron con concentraciones de DFHBI de 20 μM y de Tween 22 al 0.01% (IMAGEN 2).

Es importante hacer notar que en dichas condiciones la fluorescencia obtenida en las líneas sSAM fue significativamente mayor que la observada en el control Col 0, sin embargo para la visualización de metabolitos con un sensor específico dichos resultados no son óptimos (IMAGEN 2A).

Debido a que el sensor de ARN no es capaz de presentar fluorescencia si no se estabiliza con la presencia del metabolito [1,2] y el fluoróforo, este fondo débil en el control Col 0 podría ser causado por la actividad del fluoróforo el cual recientemente se ha reportado que es capaz de mostrar ligera actividad sin estar unido al sensor [4]. Otra posibilidad que no podemos descartar es que el sensor reconozca de una forma menos específica un metabolito diferente a SAM, pero resulta poco probable ya que en bacterias se reportó una actividad específica solo para SAM.

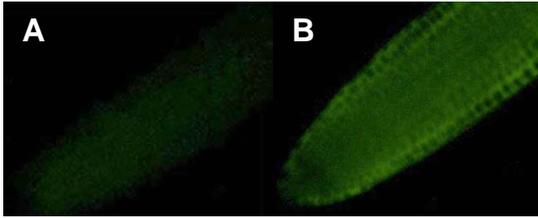


IMAGEN 2: Visualización *in vivo* de SAM en raíz de líneas sSAM usando DFHBI. Microscopía confocal, se observa fluorescencia correspondiente a la distribución de SAM. A) Control silvestre Col 0. B) sSAM1B.

Procedimos a utilizar una versión mejorada del fluoróforo DFHBI, se ha reportado que esta versión DFHBI-1T tiene la ventaja de ser mas brillante y mas específico para la estructura de Spinach que DFHBI [4]. Durante nuestros ensayos preliminares observamos que el DFHBI-1T tiene además la ventaja de que es capaz de ingresar al interior de las células sin la necesidad de utilizar detergentes a diferencia del DFHBI.

Las condiciones óptimas para la visualización de líneas sSAM se obtuvieron utilizando una concentración de DFHBI-1T de 20 μ M. Los resultados de la visualización de el sensor de SAM utilizando DFHBI-1T mostraron una señal específica para la distribución de SAM en las células de la raíz (IMAGEN 3). Interesantemente en las raíces del control Col 0 (IMAGEN 3A), no pudimos detectar fluorescencia alguna indicando que probablemente en nuestros primeros experimentos DFHBI se integraba al aptámero Spinach sin necesidad de la estabilización completa del sensor de ARN.

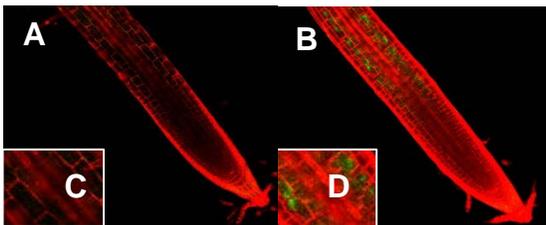


IMAGEN 3: Visualización *in vivo* de SAM en raíz de líneas sSAM usando DFHBI-1T. Microscopía confocal, se observa la fluorescencia correspondiente a la distribución de SAM (verde) y al yoduro de propidio (rojo). A) Control silvestre Col 0. B) sSAM1B. C y D) Acercamiento de regiones equivalentes en Col 0 y sSAM1B respectivamente.

La distribución de SAM marcada por sSAM en las raíces se concentra puntualmente en células de

endodermis (IMAGEN 3B y 3D), dicha distribución no es observable en el control Col 0 (IMAGEN 3A y 3C). La distribución de SAM en la endodermis de la raíz es consistente con la expresión de SAM sintetasas en tejido endodérmico, dicha actividad se ha relacionado con la síntesis de la hormona etileno durante el control de los procesos de elongación y diferenciación de las células de la raíz [5].

SAM es el principal donador de grupos metilos en plantas, las reacciones de metilación son importantes para una gran variedad de procesos metabólicos, procesos del desarrollo, respuestas a condiciones de estrés y en la regulación transcripcional de los genes [6]. Entre los procesos metabólicos en los que interviene SAM se encuentra la biosíntesis de la hormona gaseosa etileno, el ácido aminociclopropano carboxílico (ACC) se produce a partir de SAM vía la acción de la enzima ACC sintasa en una reacción crítica y limitante para la producción de etileno [7].

El etileno es una hormona gaseosa que regula varios aspectos del crecimiento, desarrollo y respuestas de estrés durante el ciclo de vida de las plantas [7]. Entre los procesos en los que se involucra el etileno se encuentran la maduración, la senescencia y la abscisión.

Debido a la importancia de SAM en la biosíntesis de etileno, decidimos analizar la distribución de SAM durante la triple respuesta a etileno para probar nuestro sistema sensor de SAM en *Arabidopsis*. La triple respuesta es uno de los procesos mas estudiados y caracterizados de como el etileno se involucra en la regulación de cambios morfológicos y del desarrollo de las plantas [7]. Esta respuesta a etileno se caracteriza por tres diferentes cambios en la morfología de las plántulas: la reducción de la elongación del tallo, el ensanchamiento radial del tallo y la ausencia del crecimiento gravitrópico normal [8]. Estos tipos de cambios en la morfología de la plántula se llevan a cabo para proteger el meristemo apical y facilita la emergencia de la plántula del suelo [8,9].

Decidimos generar herramientas moleculares que en el futuro nos permitan monitorear en tiempo real y de manera dinámica los cambios en la distribución de SAM durante la triple respuesta a etileno.

Con el objetivo de analizar los cambios en la distribución de SAM en cada uno de los aspectos de la triple respuesta, realizamos la introducción de sSAM en mutantes sensibles y resistentes a la acción del etileno lo que nos puede generar información muy valiosa para determinar como la mutación de un receptor o un elemento de respuesta a etileno puede afectar la distribución de SAM.

Para determinar si los cambios en la distribución de SAM durante la triple respuesta a etileno son debidos a la acción específica de alguna de las SAM sintetasas, generamos construcciones transcripcionales de cuatro SAM sintetasas de *Arabidopsis*. Analizando el solapamiento de la actividad del promotor de cada una de estas sintetasas con los patrones de distribución de SAM eventualmente podríamos relacionar estos cambios con la actividad específica de cada SAM sintetasa.

CONCLUSIONES

La introducción de sensores a base de ARN en plantas representa un reto debido a que hasta la fecha solo están diseñados principalmente para funcionar en condiciones *in vitro* o en sistemas bacterianos.

Los resultados obtenidos en este proyecto sugieren fuertemente que es posible adaptar este tipo de sensores para funcionar en plantas. No obstante aun es necesario realizar una estandarización mas exhaustiva de dicho sistema de sensores para su aplicación en plantas.

Las herramientas moleculares generadas para caracterizar la distribución de SAM durante la triple respuesta a etileno nos permitirán ensayar el potencial de este sensor para ser utilizado en el análisis de la distribución de metabolitos *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Luis Herrera Estrella por sus acertadas observaciones, comentarios y aportaciones durante el transcurso de esta investigación, también por brindarnos el apoyo con la infraestructura y financiamiento necesario para llevar a cabo el presente proyecto. Agradecemos a

la M.C. Dolores Gutiérrez Alanís por su apoyo en los experimentos de microscopía en confocal.

REFERENCIAS

- [1] Paige, J. S., Wu, K. Y., & Jaffrey, S. R. (2011). RNA Mimics of Green Fluorescent Protein. *Science*, 333(6042), 642-646. doi:10.1126/science.1207339
- [2] Paige J. S., Duc T. N., Song W., & Jaffrey S. R. (2012). Fluorescence imaging of cellular metabolites with RNA. *Science*, 335(6073): 1194-1197. doi:10.1126/science.1218298
- [3] Martínez-Trujillo M., Limones-Briones V., Cabrera-Ponce J., & Herrera-Estrella L. (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 63-70. doi:10.1007/bf02773350
- [4] Song, W., Strack, R. L., Svendsen, N., & Jaffrey, S. R. (2014). Plug-and-Play Fluorophores Extend the Spectral Properties of Spinach. *Journal of the American Chemical Society*, 136(4), 1198-1201. doi:10.1021/ja410819x
- [5] Dugardeyn, J., Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. (2008). To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by *in silico* gene expression analysis?. *Journal of experimental botany*, 59(1), 1-16.
- [6] Gray, W. M. (2004). Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *PLoS Biol*, 2(9), e311. doi:10.1371/journal.pbio.0020311
- [7] Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual review of plant physiology*, 35(1), 155-189. doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.001103
- [8] Guzmán, P., & Ecker, J. R. (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2(6), 513-523. doi:10.1105/tpc.2.6.513
- [9] Bleecker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C., & Kende, H. (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 241(4869), 1086-1089. doi:10.1126/science.241.4869.1086