

Exploring chloroplast targeting of RNA silencing-related proteins

Fruitore : Beatriz Navarro Ramirez, Istituto di Virologia Vegetal del CNR, UOS Bari.

Istituzione ospitante: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Valencia, Spagna.

Il silenziamento mediato da RNA è un meccanismo di regolazione dell'espressione genica e di difesa contro acidi nucleici invasivi (trasposoni, transgeni, virus e viroidi) che opera in maniera sequenza-specifica a livello trascrizionale, post-trascrizionale e traduzionale. Piccoli RNA di 21-24 nt (small RNA, sRNA), anche noti come microRNA e piccoli RNA interferenti (siRNA), sono le molecole chiave di questo complesso processo regolativo catalizzato da attività enzimatiche finora identificate nel nucleo e nel citoplasma delle cellule eucariotiche. Le informazioni finora disponibili sul silenziamento mediato da RNA però non sono in grado di giustificare l'esistenza di sRNA derivati da RNAs cloroplastici, messa in evidenza in questi ultimi anni dal sequenziamento massivo di librerie di sRNA generate da tessuti vegetali. Inoltre, poco chiara è anche la biogenesi di siRNA derivati da RNA viroidali con localizzazione cloroplastica.

Il presente programma di ricerca aveva l'obiettivo di esplorare la possibilità che alcune proteine coinvolte nel meccanismo di silenziamento mediato da RNA, in particolare quelle implicate nella genesi (Dicer-like, DCL) e nella funzionalità (Argonaute, AGO) degli sRNAs, potessero avere anche una localizzazione cloroplastica mediata dalla presenza di specifici segnali di localizzazione subcellulare. I segnali di localizzazione cloroplastica, denominati peptidi di transito cloroplastico (chloroplast transit peptide, cTP), sono situati nell'estremo ammino terminale (N-terminale) delle proteine. Applicando programmi di predizione di localizzazione alle diverse proteine AGO e DCL di *Arabidopsis*, la sottoscritta ha identificato un cTP nella proteina AGO10 e in una possibile isoforma di DCL4 (generata da un inizio di traduzione alternativo). Possibili cTP sono stati anche identificati in proteine omologhe a AGO10 e DCL4 di altre specie di piante, indicando una conservazione evolutiva dei potenziali segnali.

Attività svolta presso l'Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia, Spagna

Per comprovare se i peptidi identificati funzionano effettivamente come segnali di localizzazione cloroplastica, sono stati generati vettori binari per l'espressione transiente, mediante agroinfiltrazione in *Nicotiana benthamiana*, di proteine ricombinanti contenenti i cTPs di AGO10 e DCL4 di *Arabidopsis* fusi alla green fluorescent protein (GFP). I vettori sono stati costruiti nel laboratorio dell'IVV-CNR di Bari prima dell'inizio del programma STM. Come controllo positivo è stato utilizzato un vettore binario che esprime una proteina ricombinante composta dal cTP della proteina RecA di *A. thaliana* (proteina codificata nel nucleo e indirizzata al cloroplasto) fuso a GFP [RecA(cTP)GFP]. Come controllo negativo è stato utilizzato un vettore binario che esprime la GFP senza alcun segnale di localizzazione subcellulare. Durante il periodo di permanenza di B. Navarro nel laboratorio del Dr. Flores presso l'IBMCP, *Agrobacterium tumefaciens* è stato trasformato con i costrutti elencati ed i batteri ricombinanti ottenuti, sono stati agroinfiltrati in piante di *N. benthamiana* (4 piante per costrutto) in due esperimenti indipendenti. L'espressione e localizzazione subcellulare

delle proteine di fusione nelle foglie agroinfiltrate è stata testata mediante l'osservazione al microscopio confocale (Microscopio confocal LSM 780, Zeiss) a due tempi differenti: 24 e 48 ore post-agroinfiltrazione.

Studio della localizzazione subcellulare di AGO10

Nel caso della proteina AGO10 sono stati testati due diversi costrutti: i) AGO10(cTP)GFP, che contiene il cTP di AGO10 predetto con metodi bioinformatici fuso a GFP e ii) AGO10(cTPlong)GFP, in cui la porzione N-terminale di AGO10 fusa a GFP include il cTP predetto ed i successivi 100 aminoacidi.

Nelle foglie agroinfiltrate con il controllo positivo, che esprime RecA(cTP)GFP, la fluorescenza verde interessava quasi tutte le cellule dell'area agroinfiltrata e co-localizzava specificamente con l'auto-fluorescenza rossa dei cloroplasti, validando il sistema di espressione transiente eterologa utilizzato. Nei controlli negativi che esprimono GFP, la localizzazione della fluorescenza verde, molto intensa in tutte le cellule, era citoplasmatica e spesso anche diffusa nel nucleo. Nei tessuti fogliari che esprimevano AGO10(cTP)GFP la fluorescenza verde si osservava in poche cellule ed era molto più debole che nei controlli. Inoltre essa era localizzata nel citoplasma, assumendo l'aspetto di un reticolo. Anche dopo numerose osservazioni non è stata mai individuata alcuna localizzazione cloroplastica della fluorescenza verde. Questi risultati indicano che probabilmente l'ipotetico cTP di AGO10 di *Arabidopsis* non è in grado di indirizzare la GFP nel cloroplasto. Rimane da stabilire se la mancata diffusione della proteina di fusione in tutto il citoplasma e nel nucleo sia dovuta ad un suo basso livello di espressione.

Sebbene anche nel caso di AGO10(cTPlong)GFP le cellule che esprimevano fluorescenza nel tessuto agroinfiltrato erano molto poche, questo costrutto ha fornito risultati diversi dal costrutto AGO10(cTP)GFP ed apparentemente contrastanti. La fluorescenza verde era localizzata principalmente nel citoplasma e a volte diffusa anche nel nucleo, come nel controllo GFP. Comunque, l'osservazione di numerosi campi di tessuto agroinfiltrato ha consentito di individuare anche alcune cellule in cui si osservava una perfetta e chiara co-localizzazione della fluorescenza verde con l'autofluorescenza rossa di alcuni cloroplasti. Questa co-localizzazione è stata osservata in entrambi gli esperimenti realizzati indipendentemente.

Questo risultato è particolarmente incoraggiante perchè suggerisce, sebbene in maniera solamente preliminare, che AGO10 possa, in alcuni casi, avere una localizzazione cloroplastica. Rimane da chiarire il motivo degli scarsi livelli di espressione dei nostri costrutti e soprattutto della sporadicità della co-localizzazione con i cloroplasti.

Un'analisi più dettagliata della regione N-terminale di AGO10 ha permesso l'identificazione di un codone alternativo di inizio della traduzione, in fase con il primo, che potrebbe generare una isoforma di AGO10 più corta, ma con una predizione di localizzazione cloroplastica migliore della proteina completa. Il contesto di inizio di questa traduzione alternativa è più debole di quello canonico e probabilmente meno efficiente. E' interessante osservare che il peptide di localizzazione cloroplastica alternativo è assente in AGO10(cTP)GFP, ma potrebbe essere generato dall'inizio alternativo della traduzione di AGO10(cTPlong)GFP, la cui localizzazione cloroplastica è stata osservata sporadicamente nei nostri esperimenti.

Per verificare questa ipotesi abbiamo iniziato a generare nuovi costrutti AGO10(cTPlong)GFP allo scopo di mutare sia il primo che l'ipotetico secondo codone di inizio della traduzione.

Studio della localizzazione subcellulare di DCL4

L'espressione del costrutto contenente il cTP della isoforma alternativa di DCL4 fuso a GFP, DCL4(cTP)GFP, non ha generato nessun segnale fluorescente verde in nessuno dei esperimenti realizzati. Al contrario, i controlli positivo e negativo hanno dato i risultati attesi (vedi sopra). E' probabile che la mancata espressione della proteina di fusione sia dovuta i) al contesto di inizio della traduzione debole della isoforma alternativa e/o ii) alla presenza di un codone di inizio (contenuto nel sito di restrizione utilizzato per il clonaggio) localizzato a monte del cTP dell'isoforma alternativa di DCL4, in un contesto di inizio della traduzione forte e non in fase con GFP. Pertanto, si sta procedendo all'eliminazione, mediante mutagenesi sito-diretta, del codone d'inizio della traduzione presente nel sito di clonaggio di tutti i costrutti. La ripetizione degli esperimenti di agroinfiltrazione con i nuovi costrutti consentirà di verificare la nostra ipotesi di lavoro relativa alla localizzazione subcellulare di tale isoforma.

Gli esperimenti realizzati durante questa breve permanenza, sebbene preliminari, hanno permesso di generare nuove e stimolanti ipotesi di lavoro. Futuri esperimenti saranno realizzati con i nuovi costrutti, la cui preparazione è già iniziata durante questo stage, al fine di confermare se le isoforme alternative delle proteine AGO1 e DCL4 hanno un segnale di localizzazione cloroplastica funzionale.

Bari, 19/09/2013



Beatriz Navarro Ramirez