

STRESZCZENIE

Molekularna charakterystyka roślinnych mitoferryn

Karolina Małas

Rośliny jako organizmy autotroficzne posiadają chloroplasty, co wyróżnia je spośród innych eukariontów. Organella te są głównym rezerwuarem żelaza w liściach, zawierającym 80-90% komórkowego poziomu tego mikroelementu (Terry i Low, 1982). Mitochondria podobnie jak chloroplasty charakteryzują się wysokim zapotrzebowaniem na żelazo. W obu kompartmentach jest to związane z zachodzącymi w nich procesami, kluczowymi dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, takimi jak fotosynteza i oddychanie komórkowe czy biosynteza klastrów żelazowo-siarkowych i hemu (Kim i Guerinot, 2007).

Mitoferryny należą do rodziny białek MCF, występującej u eukariontów, która łączy metabolizm mitochondriów z metabolizmem komórkowym. Pomimo że białka te są strukturalnie bardzo podobne, katalizują transport wielu różnych substratów (Haferkamp i Schmitz-Esser, 2012). Wykazano, że u poszczególnych gatunków rodzina ta może być reprezentowana przez ponad 50 transporterów (Palmieri i in., 2011). Pierwszymi scharakteryzowanymi mitoferrynami były drożdżowe białka ScMRS3 i ScMRS4. Są one transporterami żelaza o wysokim powinowactwie do substratu (Foury i Roganti, 2002), a szczep pozbawiony tych dwóch endogennych transporterów ($\Delta mrs3\Delta mrs4$) jest obecnie rutynowo wykorzystywany do badania funkcji ich homologów identyfikowanych u innych organizmów (Bashir i in., 2011b; Jain i in., 2019).

W genomie rzodkiewnika, w przeciwieństwie do drożdży (Foury i Roganti, 2002) i zwierząt (Shaw i in., 2006; Metzendorf i Lind, 2010) oraz ryżu (Bashir i in., 2011b) zidentyfikowano trzy geny kodujące mitoferryny: *AtMIT1*, *AtMIT2* i *AtMFL1* (Tarantino i in., 2011; Jain i in., 2019).

W pracy potwierdzono, że homologi białek rzodkiewnika występują w genomie ogórka (*Cucumis sativus*) i nazwano je odpowiednio CsMIT1, CsMIT2 i CsMFL1. Analizy *in silico* wykazały, że białka MIT i MFL *Arabidopsis* i *Cucumis* posiadają wszystkie cechy strukturalne charakterystyczne dla rodziny białek MCF: 6 helis transbłonowych tworzących trzy ok. 100-aminokwasowe moduły, motyw charakterystyczny i sekwencje odpowiedzialne za tworzenie mostków solnych od strony matriks/stromy i przestrzeni międzybłonowej. Przeprowadzone badania wykazały ponadto, że białka AtMIT i CsMIT są mitochondrialnymi importerami żelaza o wysokim powinowactwie do substratu, które nie posiadają N-końcowej sekwencji kierującej do tego organellum. W przeciwieństwie do białek MIT, białka MFL w komórkach *Arabidopsis* i *Cucumis* lokalizują się w chloroplastach, do których kierowane są dzięki odpowiednio 92 i 79-aminokwasowej sekwencji sygnałowej na N-końcu transportera.

Geny mitoferryn ulegają ekspresji we wszystkich analizowanych organach wegetatywnych: korzeniach i pędach *Arabidopsis* oraz korzeniach, hypokotylach, liścieniach i liściach *Cucumis*. Badając potencjalny wpływ warunków zróżnicowanej dostępności żelaza na poziom ich transkryptów w poszczególnych organach nie stwierdzono ścisłych zależności

po między poziomem ekspresji genów *AtMIT1*, *AtMIT2*, *CsMIT1*, *CsMIT2*, *AtMFL1* i *CsMFL1* a zawartością Fe w środowisku.

Substytucja konserwatywnych reszt aminokwasowych obu białek MIT *Arabidopsis*, przeprowadzona z wykorzystaniem mutagenazy ukierunkowanej, wykazała, że dwie reszty histydyny w pozycji 53 i 110 w *AtMIT1* oraz 51 i 108 w *AtMIT2* są niezbędne w procesie transportu żelaza przez te białka, w przeciwieństwie do reszty tyrozyny w pozycji 235 w *AtMIT1* i histydyny w pozycji 230 w *AtMIT2*. Mutacje reszt G₁₀₅, A₁₀₉, N₁₉₇ i A₃₀₈ w *AtMIT1* oraz G₁₀₃, A₁₀₇, M₁₉₄, N₁₉₅ i A₃₀₃ w *AtMIT2* również prawdopodobnie uczestniczą w przenoszeniu żelaza, ponieważ ich modyfikacja upośledza w różnym stopniu funkcję białek.

Badania wstępne dotyczące mutantów rzodkiewnika z nadekspresją genów kodujących *AtMIT1*, *AtMIT2* i *AtMFL1* pokazały, że nie wpływa ona w znaczący sposób na fenotyp 2-tygodniowych roślin, uprawianych w warunkach optymalnej dostępności żelaza, oraz na poziom ekspresji genów kodujących białka ważne dla homeostazy tego pierwiastka, takie jak *AtFER1*, *AtFER3*, *AtFER4*, *AtPIC1*, *AtNRAMP3*, *AtNRAMP4*, *AtAHA2* czy *AtFRO8*.

Podsumowując, uzyskane w ramach pracy wyniki umożliwiły funkcjonalną charakterystykę sześciu mitoferryn, trzech w modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana* i trzech w roślinie uprawnej *Cucumis sativus*. Charakterystyka ta obejmowała określenie lokalizacji, funkcji oraz sposobu regulacji ekspresji genów pod wpływem żelaza. Ponadto zidentyfikowano reszty aminokwasowe białek MIT kluczowe w procesie transportu substratu.

27.07.2023 Kordine Kozłowska

ABSTRACT

Molecular characterization of plant mitoferrins

Karolina Małas

Plants as autotrophic organisms have chloroplasts, which distinguishes them from other eukaryotes. These organelles are the main reservoir of iron in the leaves, containing 80-90% of the cellular level of this micronutrient (Terry and Low, 1982). Mitochondria, like chloroplasts, have a high requirement for iron. In both compartments, it is related to the processes taking place in them, which are crucial for the proper functioning of the organism, such as photosynthesis and cellular respiration or the biosynthesis of iron-sulfur clusters and heme (Kim and Guerinot, 2007).

Mitoferrins belong to the MCF protein family, found in eukaryotes, which links mitochondrial metabolism with cellular metabolism. Although these proteins are structurally very similar, they catalyze the transport of many different substrates (Haferkamp and Schmitz-Esser, 2012). It has been shown that in particular species this family may be represented by more than 50 transporters (Palmieri et al., 2011). The first mitoferrins to be characterized were the yeast proteins ScMRS3 and ScMRS4. They are high-affinity iron transporters (Foury and Roganti, 2002), and a strain lacking these two endogenous transporters (*Δmrs3Δmrs4*) is now routinely used to study the function of their homologues identified in other organisms (Bashir et al., 2011; Jain et al., 2019).

In *Arabidopsis* genome, unlike yeast (Foury and Roganti, 2002), animals (Shaw et al., 2006; Metzendorf and Lind, 2010) and rice (Bashir et al., 2011), three mitoferrin-coding genes have been identified: *AtMIT1*, *AtMIT2* and *AtMFL1* (Tarantino et al., 2011; Jain et al., 2019).

This work confirmed that homologues of *Arabidopsis* proteins are also present in the genome of cucumber (*Cucumis sativus*) and were named CsMIT1, CsMIT2 and CsMFL1, respectively. *In silico* analyzes showed that the *Arabidopsis* and *Cucumis* MIT and MFL proteins have all the structural characteristic features of the MCF protein family: 6 transmembrane helices forming three approximately 100-amino acid modules, a characteristic motif and sequences responsible for the formation of salt bridges from the side of the matrix/stroma and the intermembrane space. The conducted studies also showed that AtMIT and CsMIT proteins are mitochondrial iron importers with high affinity for the substrate, which do not have an N-terminal targeting sequence directing them to this organelle. In contrast to the MIT proteins, the MFL proteins in *Arabidopsis* and *Cucumis* cells are localized in the chloroplasts, where they are targeted by a 92 and 79 amino acid targeting sequence respectively, at the N-terminus of the transporter.

Mitoferrin genes are expressed in all analyzed vegetative organs: roots and shoots of *Arabidopsis* and roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of *Cucumis*. While examining the potential impact of the different iron availability conditions on the level of their transcripts in individual organs, no strict correlations were found between the level of expression of the *AtMIT1*, *AtMIT2*, *CsMIT1*, *CsMIT2*, *AtMFL1* and *CsMFL1* genes and the Fe content in the environment.

Substitution of conserved amino acid residues of both *Arabidopsis* MIT proteins, using site-directed mutagenesis, showed that two histidine residues at positions 53 and 110 in AtMIT1 and 51 and 108 in AtMIT2 are essential for iron transport by these proteins, in contrast to tyrosine residues at position 235 in AtMIT1 and histidine residues at position 230 in AtMIT2. Mutations of residues G₁₀₅, A₁₀₉, N₁₉₇ and A₃₀₈ in AtMIT1 and G₁₀₃, A₁₀₇, M₁₉₄, N₁₉₅ and A₃₀₃ in AtMIT2 are also likely to be involved in iron transfer as their modification impairs protein function to varying degrees.

Preliminary studies on *Arabidopsis* mutants with overexpression of genes encoding AtMIT1, AtMIT2 and AtMFL1 have shown that it does not significantly affect the phenotype of 2-week-old plants grown in conditions of optimal iron availability, and the level of expression of genes encoding proteins important for iron homeostasis, such as AtFER1, AtFER3, AtFER4, AtPIC1, AtNRAMP3, AtNRAMP4, AtAHA2 or AtFRO8.

In conclusion, the results obtained in this work enabled the functional characterization of six mitoferrins, three in the model plant *Arabidopsis thaliana* and three in the cultivated plant *Cucumis sativus*. This characterization included determining the localization, function and regulation of gene expression under the influence of iron. In addition, amino acid residues of the MIT proteins crucial in the substrate transport process were identified.

27.07.2023 Karoline Kering