

Tesis Doctoral

Fototransducción de señales en *Arabidopsis thaliana*. Dos casos de estudio: participación de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica; e identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el cuádruple mutante phyA phyB cry1 cry2

Fox, Ana Romina

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fox, Ana Romina. (2012). Fototransducción de señales en *Arabidopsis thaliana*. Dos casos de estudio: participación de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica; e identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el cuádruple mutante phyA phyB cry1 cry2. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fox, Ana Romina. "Fototransducción de señales en *Arabidopsis thaliana*. Dos casos de estudio: participación de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica; e identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el cuádruple mutante phyA phyB cry1 cry2". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Fototransducción de señales en *Arabidopsis thaliana*.
Dos casos de estudio: participación de la subunidad alfa de la
proteína G heterotrimérica; e identificación de proteínas
diferencialmente expresadas en el cuádruple mutante
phyA phyB cry1 cry2.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lic. Ana Romina Fox

Director de tesis: Dra. María Agustina Mazzella
Director Asistente: Dr. Jorge Prometeo Muschietti
Consejero de Estudios: Dr. Jorge Prometeo Muschietti

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Hector N. Torres". Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2012

Resumen

Fototransducción de señales en *Arabidopsis thaliana*. Dos casos de estudio: participación de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica; e identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.

El desarrollo de las plantas es un proceso que ocurre bajo fluctuaciones del ambiente lumínico que son percibidas por fotorreceptores específicos, principalmente los fitocromos *phyA* y *phyB*, y los criptocromos *cry1* y *cry2*. El estudio de las respuestas de mutantes simples y múltiples de fotorreceptores en diferentes condiciones lumínicas es una herramienta muy útil para analizar las vías de señalización. Este trabajo de tesis tuvo como objetivo principal estudiar los mecanismos moleculares y bioquímicos de la transducción de señales lumínicas mediadas por fitocromos y criptocromos durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. En el primer capítulo estudiamos la participación de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica (GPA1) en los caminos de señalización de los fotorreceptores. Los mutantes *cry1* fueron los únicos simples mutantes que mostraron una reducción en la unión de GTPyS³⁵, a niveles similares a los observados en el mutante *gpa1*. Hallamos interacción génica entre *cry1* y GPA1 en la apertura del gancho apical en oscuridad y en la acumulación de antocianinas en luz azul. Estas respuestas fueron dependientes de la presencia de sacarosa en el medio. Análisis moleculares nos llevaron a proponer un modelo en el que la posible modificación post-traduccional de GPA1 mediada por *cry1* alteraría su actividad. En el segundo capítulo realizamos un estudio comparativo de los perfiles proteicos entre plántulas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* y plántulas salvajes utilizando la técnica de geles bidimensionales. La identificación de proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fue consistente con la drástica reducción en la tasa fotosintética, el contenido de clorofila y el concomitante retraso en el desarrollo del mutante. Las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* estuvieron involucradas en respuesta a estrés por temperatura y por sequía. Sin embargo, sólo la expresión de éstas proteínas no permitió explicar el comportamiento del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en condiciones de estrés. La reducción en la cantidad relativa de ácidos grasos insaturados de las membranas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fue consistente con una mayor sensibilidad a un *shock* de bajas temperaturas y una mayor tolerancia a un *shock* de altas temperaturas. Las posibles significancias fisiológicas y ecológicas de estos resultados son discutidas en esta tesis.

Palabras claves: Proteína G heterotrimérica, criptocromo, fitocromo, transducción de señales, proteómica.

Abstract

Phototransduction signalling in *Arabidopsis thaliana*. Two case studies: Heterotrimeric G protein alpha subunit participation; and differentially expressed proteins in the *phyA phyB cry1 cry2* quadruple mutant.

Plant development is a process that occurs under fluctuating light environment which is perceived by specific photoreceptors, mainly by phytochromes *phyA* and *phyB*, and cryptochromes *cry1* and *cry2*. The study of the behaviour of simple and multiple photoreceptor mutants in different light conditions is a useful tool to analyze signalling pathways. The main objective of this thesis was to study the molecular and biochemical transduction of light signalling mediated by phytochromes and cryptochromes during *Arabidopsis thaliana* development. In the first chapter we studied the involvement of the α -subunit of the Heterotrimeric G protein (GPA1) in photoreceptors signalling pathways. *cry1* mutants were the only single mutants that showed GTP γ S³⁵ binding reduction, at similar levels to that observed for the *gpa1* mutant. We found genetic interaction between *cry1* and GPA1 on apical hook opening in darkness and anthocyanin accumulation under blue light. These responses were dependent on the presence of sucrose. Molecular approaches conducted us to propose a model where a potential post-translational modification of GPA1 mediated by *cry1* would alter its activity. In the second chapter we made a comparative study of the protein profiles between the *phyA phyB cry1 cry2* quadruple mutant and wild type seedlings using the two-dimensional gel electrophoresis technology. Under-expressed proteins in the *phyA phyB cry1 cry2* quadruple mutant were consistent with the drastic reduction in photosynthetic rates, reduced chlorophylls contents and retarded development in the mutants. Over-expressed proteins were involved in temperature and drought stresses. However, the expression of these proteins does not explain the *phyA phyB cry1 cry2* quadruple mutant behaviours under stress conditions. The reduction in the relative contents of unsaturated fatty acid of the *phyA phyB cry1 cry2* quadruple mutant membranes was consistent with its sensitivity to a low temperature shock and its tolerance to a high temperature shock. The physiological and ecological significance of these results are discussed in this thesis.

Keywords: Heterotrimeric G protein, cryptochrome, phytochrome, signal transduction, proteomic.

Publicación

La publicación que se cita a continuación se encuentra relacionada al primer capítulo de esta tesis:

Fox AR, Soto GC, Jones AM, Casal JJ, Muschietti JP, Mazzella MA (2012). **cry1 and GPA1 signaling genetically interact in hook opening and anthocyanin synthesis in Arabidopsis.** Plant Mol Biol 80 (3):315-324

Agradecimientos

Muchas personas y de maneras muy distintas colaboraron en mi aprendizaje en todos estos años por lo que les voy a estar siempre muy agradecida...

Antes que nada al Dr. Torres y la Dra. Flawiá por haber puesto todas sus energías en el crecimiento del INGEBI..

A mi directora de tesis, Agustina, por acompañarme durante todos estos años en el desarrollo de éste trabajo. Por introducirme en la fotobiología, por estar dispuesta a ayudarme en la mesada cuando las cosas eran nuevas o resultaban un tanto tediosas, por compartir las emociones cuando las cosas “funcionaban” y ser paciente cuando las cosas se complicaban y mi humor cambiaba...

A Jorge, mi director asistente que estuvo siempre presente y cuyos consejos nos resultaron fundamentales para llevar a cabo el trabajo. Por poner mucha energía en que el laboratorio funcione.

A Gabi, que creo que me adoptó desde el primer día, que se preocupó de que entienda siempre lo que hacía, que siempre me acompañó y compartió todo...

A los del 201: a Eva, por estar siempre presente, a Joaco (que vas a hacer sin mi!!), a Mari por ser taaan buena (aunque no lo creas aprendí mucho de vos!!). A mis compañeros de laboratorio, de polen: los actuales (Lau, Regi y Juli) y aquellos que pasaron (Diego y Tami). A Leo y a su grupo: Sil, Fede y Vicky.

A Caro y Ceci del 217, y a Mati del 209 que siempre me acompañaron. A Noe, Euge, Mauro, Eze y Fran con quienes siempre se puede contar....

En fin a todos los miembros del INGEBI que ayudaron a que durante estos 5 años de trabajo haya sentido al INGEBI como MI lugar de trabajo. Especialmente a Gladys y a Rubén..

A la gente del IFEVA, especialmente a Romi, Eli, Sil y Carlos que siempre estuvieron dispuestos a prestarme su luces/filtros y donarme semillas.

Al CONICET por otorgarme becas todos estos años y a los argentinos que finalmente son quienes las hacen posibles...

A mi familia, mi primera y eterna escuela: a mis papas por romperse todos para que no nos falte nunca nada, por ocuparse de “prepararme” para el mundo..., a mis hermanos, por cuidarme siempre como si fueran mis papas! y al mismo tiempos ser mis grandes compañeros en todo a la Noni y a la tía Delia por su gran ternura siempre las llevo conmigo...

... a Rama... sonaste caíste en la interfase entre familia y amigos...=) gracias por ser mi cable a tierra!!!

... y por último, y no por eso menos importante, a Lu y An, mis amigas de la Facu, que me acompañaron un lago trecho y que quedaron para toda la vida! Y a las chicas de V.T.: Ju, Naty, Na, Kiku y Pau..., que qué les puedo decir más que gracias por lo compartido...

*A todos aquellos que luchan
por un mundo mejor para todos...*

Índice

	Página
Resumen	1
Abstract	2
Publicación	3
Agradecimientos	4
Abreviaturas y Acrónimos	10
1. Introducción	12
1.1. La luz como señal en el desarrollo de las plantas	12
1.2. Percepción del ambiente lumínico	13
1.3. Los Fitocromos	14
1.3.1. Fotoquímica de los fitocromos	14
1.3.2. Modo de acción de los fitocromos	17
1.3.3. Funciones de los fitocromos	18
1.4. Los criptocromos	21
1.4.1. Fotoquímica de los criptocromos	21
1.4.2. Funciones biológicas	22
1.5. Interacción entre fotorreceptores	23
1.6. Convergencia de los caminos de señalización	25
1.6.1. Acción de los fotorreceptores a nivel nuclear	25
1.6.2. Acción de los fotorreceptores a nivel citoplasmático	27
1.7. Proteína G heterotrimérica en los caminos de señalización de la luz	27
1.7.1. La proteína G heterotrimérica en plantas	27
1.7.2. Función de GPA1 en plantas	29
1.7.3. Participación de GPA1 en las vías de señalización activadas por luz	30
1.8. Herramientas en fotobiología	31
2. OBJETIVOS	33
3. Materiales y Métodos	34
3.1. Material vegetal	34
3.2. Condiciones de crecimiento de las plantas	35
3.2.1. Estadios del desarrollo de Arabidopsis	35
3.3. Ensayos bioquímicos y de biología molecular	36
3.3.1. Genotipificación de plantas mutantes de inserción	36
3.3.1.1. Extracción de ADN de plantas de Arabidopsis	36

3.3.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	37
3.3.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc	37
3.3.3. Electroforesis en geles de agarosa para ADN, ADNc y ARN	38
3.3.4. RT-PCR semi-cuantitativa de GPA1	38
3.3.5. Extracción de proteínas totales: protocolo 1	38
3.3.6. Cuantificación de proteínas	39
3.3.7. Ensayo de unión de GTP	39
3.3.8. Electroforesis de proteínas	40
3.3.9. Tinción de geles SDS-PAGE con solución de <i>Coomassie Blue</i>	40
3.3.10. <i>Western blots</i> de GPA1	40
3.3.11. Purificación de ADN plasmídico	41
3.3.12. Transformación bacteriana	42
3.3.13. Expresión in vitro de GST-GPA1 y CRY1-S ³⁵	42
3.3.14. Co-inmunoprecipitación	43
3.3.15. Extracción de proteínas totales: protocolo 2 y 3	43
3.3.15.1. Protocolo 2: Extracción con fenol	44
3.3.15.2. Protocolo 3: Extracción con TCA-Acetona	44
3.3.16. Geles Bidimensionales (2D)	45
3.3.16.1. Hidratación de las tiras comerciales	45
3.3.16.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)	46
3.3.16.3. Equilibrado de las muestras	46
3.3.16.4. Segunda Dimensión: SDS-PAGE	47
3.3.16.5. Adquisición de imágenes y detección de <i>spots</i>	47
3.3.16.6. Análisis estadísticos de los geles 2D	47
3.3.16.7. Análisis bioinformáticos de las proteínas identificadas.....	48
3.3.17. Enriquecimiento en proteínas nucleares	48
3.3.17.1. Aislamiento de núcleos	49
3.3.17.2. Tinción con DAPI	49
3.3.17.3. Protocolo 4: Extracción de proteínas nucleares	50
3.3.17.4. <i>Western Blots</i> de proteínas nucleares	50
3.3.17.5. Nano-LC/ESI/MS/MS	51
3.3.18. <i>Differential in-gel electrophoresis</i> (DIGE) y tinción con Pro-Q	51
3.4. Ensayos fisiológicos	52
3.4.1. Mediciones del gancho apical y del largo del hipocotilo	52

3.4.2. Medición de los niveles de Antocianas	52
3.4.3. Medición de los niveles de Clorofila	53
3.4.4. Medición de la tasa fotosintética	53
3.4.5. Medición de la composición de ácidos grasos	53
3.4.6. Ensayos de tolerancia al frío y al calor	54
3.4.7. Ensayos de resistencia a la sequía	54
3.4.8. Estadística en ensayos fisiológicos	54
4. CAPÍTULO I: Estudio de la participación de GPA1 en la fototransducción de señales: Interacción genética entre cry1 y GPA1 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	
Introducción	55
Resultados	57
4.1. La unión de GTP- γ ³⁵ S se encuentra disminuida en el mutante <i>cry1</i>	57
4.2. Interacción entre <i>cry1</i> y GPA1 durante la apertura del gancho apical en oscuridad	58
4.2.1. Alteración de la apertura del gancho apical en los mutantes <i>cry1</i> en oscuridad	58
4.2.2. Interacción entre <i>cry1</i> y GPA1 durante la apertura del gancho apical	61
4.3. Análisis bioquímico y molecular de la interacción entre <i>cry1</i> y GPA1 en oscuridad	63
4.3.1. <i>Blots</i> de proteínas sugieren control post-traducciona l de GPA1 mediado por <i>cry1</i>	63
4.3.2. Estudio de la interacción física entre CRY1 y GPA1	66
4.4. Interacción entre <i>cry1</i> y GPA1 en la acumulación de antocianas en luz azul.....	67
Discusión	71
5. CAPÍTULO II: Modificaciones en el proteoma de cuádruple mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i> en respuesta a la luz y sus implicancias fisiológicas	
Introducción	75
Resultados	77
5.1. Comparación de los perfiles proteicos entre el genotipo WT y el cuádruple mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i>	77
5.1.1. Descripción del estadio de desarrollo utilizado: estadio 1.02	77
5.1.2. Estudio comparativo de los proteomas del cuádruple mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i> y del genotipo WT en el estadio 1.02	78
5.1.3. Análisis bioinformático de las proteínas identificadas	83
5.1.3.1. Ontologías Genéticas	83
5.1.3.2. Localización subcelular	87

5.1.3.3. Interactomas	88
5.1.4. Análisis de los cambios en el proteoma de plántulas etioladas	91
5.2. Ensayos fisiológicos	93
5.2.1. El cuádruple mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i> tiene severamente alterada la tasa fotosintética.....	93
5.2.2. El cuádruple mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i> es más resistente al estrés hídrico	94
5.2.3. El cuádruple mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i> es más sensible a un <i>shock</i> de temperatura congelante que el genotipo WT	95
5.2.4. El cuádruple mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i> tiene menor insaturación de ácidos grasos que el genotipo WT.....	97
5.2.5. El cuádruple mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i> es más tolerante a un <i>shock</i> de altas temperaturas que el genotipo WT	98
5.3. Introducción al análisis de proteínas nucleares	99
Discusión	107
6. Conclusiones Finales	116
7. Anexo	118
8. Bibliografía	120

Abreviaturas y Acrónimos

2D	Dos dimensiones
2-ME	β -mercaptoetanol
AGI	Identificador genético en Arabidopsis, del inglés <i>Arabidopsis gene identifier</i>
BPB	Azul de bromofenol , del inglés <i>bromophenol blue</i>
CO	<i>Constans</i>
Col	Columbia
COP1	Fotomorfogénesis constitutiva 1, del inglés <i>Constitutive photomorphogenesis 1</i>
CRY	Gen del criptocromo, del inglés <i>Cryptochrome</i>
CRY	Apoproteína del criptocromo
cry	Holoproteína del criptocromo
DIGE	Electroforesis diferencial en gel, del inglés <i>Differential in-gel electrophoresis</i>
FAD5-8	ω -3 desaturasa de ácidos grasos 5-8, del inglés <i>ω-3 fatty acid desaturase 5-8</i>
FC	Tasa de cambio, del inglés <i>Fold change</i>
GO	Ontología genética, del inglés <i>Gene ontology</i>
GPA1	Subunidad alfa de la proteína G, del inglés <i>G protein alpha subunit 1</i>
h	Horas
HIR	Respuesta a alta irradiancia, del inglés <i>High Irradiance Response</i>
HY5	Hipocotilo largo 5, del inglés <i>Long hypocotyl 5</i>
IEF	Isoelectroenfoque
kDa	KiloDalton
Ler	<i>Landsberg erecta</i>
LFR	Respuesta a bajo flujo, del inglés <i>Low Fluence Response</i>
Lhcb	Genes que codifican para las proteínas de unión a clorofila, del inglés <i>Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein</i>
M&M	Materiales y métodos
min	Minutos
MS	Espectrometría de masas, del inglés <i>Mass spectrometry</i>
MS	Medio basal Murashige & Skoog
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate buffered saline</i>
PHY	Gen del fitocromo, del inglés <i>Phytochrome</i>
PHY	Apoproteína del fitocromo
phy	Holoproteína del fitocromo
pl	Punto isoeléctrico
PIF	Factor que interacciona con fitocromo, del inglés <i>Phytochrome interacting factor</i>
PM	Peso molecular
R	Rojo
RGS	Regulador de la señalización de la proteína G, del inglés <i>Regulator of G signaling</i>
RL	Rojo lejano
SALK	<i>Salk Institute Genome Analysis Laboratory</i>
seg	Segundos
TAE	Tris, Ácido Acético, EDTA
TBS	Tampón Tris salino, del inglés <i>Tris Buffered Saline</i>

TCA	Tricloroacético
UV	Ultravioleta
VLFR	Respuesta a muy bajo flujo, del inglés <i>Very Low Fluence Response</i>
WT	Genotipo salvaje, del inglés <i>Wild type</i>

1 Introducción

1.1 La luz como señal en el desarrollo de las plantas

La supervivencia de un organismo depende de su habilidad para integrar y responder a las señales ambientales adecuadamente. La luz es un factor ambiental esencial y, en diferentes organismos, podemos encontrar sofisticados sistemas fotosensoriales que les permiten a los mismos responder correctamente a su presencia. Como organismos sésiles, las plantas no sólo transforman la energía solar en energía química a través de la fotosíntesis sino que también utilizan la luz como fuente de información en el control de diferentes procesos fisiológicos a lo largo de todo su ciclo de vida.

En plantas superiores, si bien el desarrollo de los órganos del embrión y la formación de la semilla ocurren en un ambiente parcialmente protegido por el óvulo parental, la germinación y el desarrollo posterior ocurren en un ambiente con condiciones de luz fluctuantes (revisado en Von Arnim y Deng, 1996). Un complejo sistema de integración de las señales lumínicas genera en las plantas la plasticidad que les permite responder exitosamente, a este ambiente con condiciones de luz variables, durante todo su desarrollo y crecimiento.

Las plantas presentan diferentes patrones de crecimiento y desarrollo según crezcan en oscuridad o en luz. Cuando una plántula crece en oscuridad utiliza las reservas de la semilla para llevar a cabo un tipo de desarrollo llamado escotomorfogénico. En *Arabidopsis*, durante la escotomorfogénesis se maximiza la elongación de las células del hipocotilo y el gancho apical permanece cerrado, presentando la plántula un fenotipo etiolado (Fig. 1.1). En un ambiente natural este tipo de desarrollo permite a la plántula emerger del suelo sin que resulte dañado el meristema apical al encontrarse protegido por la curvatura del hipocotilo. Por otro lado, en presencia de luz las plantas utilizan la energía lumínica para llevar a cabo un desarrollo denominado fotomorfogénico (revisado en Chen *et al.*, 2004, Fig. 1.1). Una vez que la plántula alcanza la superficie del suelo la transición de la oscuridad a un ambiente lumínico la lleva a cambiar de estrategia de desarrollo ocurriendo un proceso conocido como desetiación. Durante este proceso suceden cambios morfológicos entre los que se encuentran el arresto de la elongación del hipocotilo, la apertura del gancho apical, la expansión de los cotiledones y el desarrollo de la maquinaria fotosintética (revisado en Kami *et al.*, 2010, Fig. 1.1).

Durante todo su ciclo de vida, el desarrollo y crecimiento de la planta va a encontrarse condicionado por la calidad, duración, dirección e intensidad de la luz. Entre las respuestas adaptativas más importantes podemos destacar el fototropismo, el escape al sombreado, la sincronización de los ritmos circadianos y la floración (Fig. 1.1).

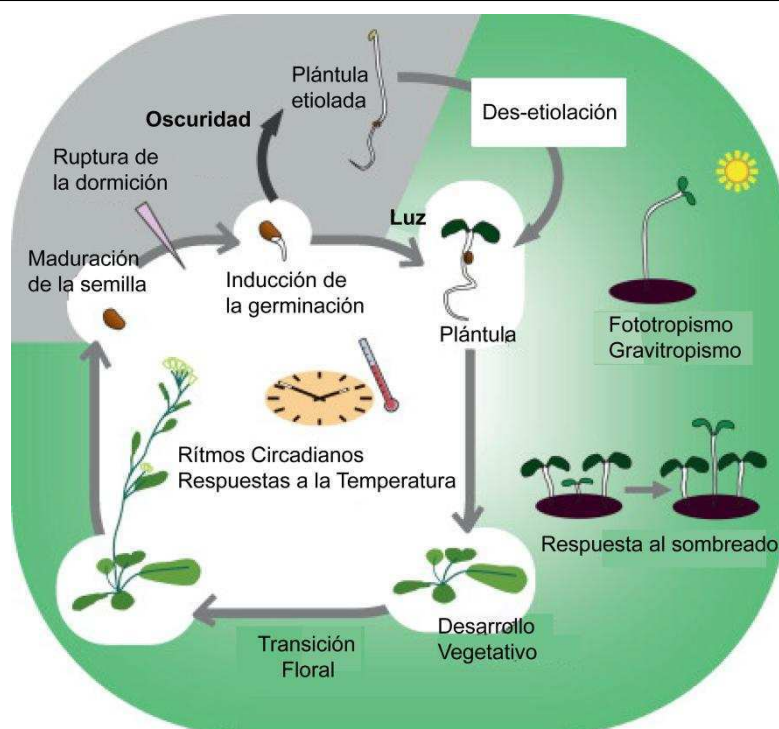


Figura 1.1. Fotomorfogénesis en Arabidopsis. El ambiente lumínico provee a la planta de señales durante todo su ciclo de vida. La luz promueve la germinación de la semilla y condiciona el desarrollo de la plántula que, en ausencia de luz, presenta un fenotipo etiolado mientras que, en presencia de luz, se desetiola y se desarrolla como una planta fotosintéticamente activa sensando permanentemente el ambiente y respondiendo de modo tal de asegurar su máxima reproducción (imagen tomada de Kami *et al.*, 2010).

1.2 Percepción del ambiente lumínico

Las plantas poseen fotorreceptores especializados que les permiten detectar la calidad, cantidad, duración y dirección de la luz, desde el ultravioleta-B (UV-B) hasta el rojo lejano. En *Arabidopsis*, la luz roja (R, 600-700nm) y roja lejana (RL, 700-800nm) son percibidas por cinco fotorreceptores de la familia de los fitocromos (phyA-phyE) y, al menos, tres familias distintas de fotorreceptores perciben UV-A/azul (315-400nm): los criptocromos (cry1, cry2 y cry3), las fototropinas (phot1, phot2) y la familia de proteínas ZTL/FKF1/LKP2 (*zeitlupe/flavin-binding kelch repeat f-box 1/lov kelch protein 2*) (revisado en Ito *et al.*, 2012 ; Kami *et al.*, 2010, Fig. 1.2).

Si bien los fitocromos se activan principalmente con luz R y se inactivan con luz RL, también la luz azul es capaz de activar a phyA y a phyB (Chun *et al.*, 2001; Neff y Chory, 1998; Usami *et al.*, 2004). Además, phyA puede activarse con muy bajos flujos de luz de cualquier longitud de onda en el rango UV/B-RL, respuesta denominada VLFR (*very low fluence response*), y también puede activarse con exposiciones a altas irradiancias de luz RL, respuesta llamada HIR (*high irradiance response*) (Fig. 1.2). Estos tipos de respuesta a diferentes

exposiciones a la luz conforman modos de acción de los fitocromos que serán explicados detalladamente en la sección 1.3.2. Por otro lado, si bien se ha descrito a *cry1* y *cry2* principalmente como fotorreceptores de luz azul, hoy se conoce que perciben luz verde y R (Bouly *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, se conoce sólo un receptor de luz UV-B (282-315nm), el UVR8 (Rizzini *et al.*, 2011), que percibe UV-B a través de triptófanos de la proteína (Christie *et al.*, 2012). Exceptuando UVR8, los fotorreceptores hasta hoy conocidos son cromoproteínas o sea apoproteínas a las que se les une un cromóforo específico. Diferentes estudios han involucrado a estos fotorreceptores en respuestas adaptativas, como son el fototropismo (revisado en Whippo y Hangarter, 2006) y el escape al sombreado (revisado en Franklin y Whitelam, 2005), y en procesos claves del desarrollo, como la germinación y la floración (revisado en Franklin y Quail, 2010; Fig. 1.1) evidenciando la importancia de estas proteínas en la supervivencia de las plantas.

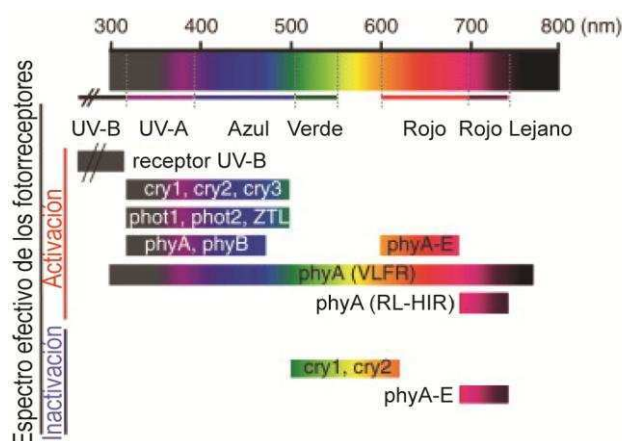


Figura 1.2. Espectro de acción de los fotorreceptores. Se señalan las regiones del espectro donde se activan e inactivan los distintos fotorreceptores conocidos en *Arabidopsis* (imagen tomada de Kami *et al.*, 2010).

1.3 Los Fitocromos

1.3.1 Fotoquímica de los fitocromos

Las apoproteínas de los fitocromos (PHYs) son sintetizadas en el citosol donde se unen autocatalíticamente con el cromóforo fitocromobilina, que es un tetrapirrol de cadena abierta (Fig. 1.3. C) sintetizado en cloroplastos (Tu y Lagarias, 2005). La unión de la apoproteína y el cromóforo forma la holoproteína (*phy*), que se activa por luz. Los fitocromos forman dímeros, donde cada monómero tiene una masa molecular de aproximadamente 125 kDa. Si bien *phyA*, *phyB* y *phyD* se detectan generalmente formando homodímeros, recientemente se observó que *phyC* y *phyE* se detectan formando principalmente heterodímeros con *phyB* y *phyD* (Clack

et al., 2009). Las implicancias fisiológicas de la heterodimerización de phyC y phyE se encuentran actualmente en estudio.

Los fitocromos tienen 2 dominios: un dominio N-terminal fotosensor, y un dominio C-terminal regulatorio. El dominio N-terminal contiene 4 subdominios: la extensión N-terminal o P1, el subdominio N-terminal PAS (Per/Arnt/Sim), el subdominio GAF (*cGMP phosphodiesterase/adenyl cyclase/FhlA*) y el subdominio PHY (*phytochrome*) (Fig. 1.3 A). Al subdominio GAF, que tiene actividad bilin-ligasa, se une de modo covalente el cromóforo; los subdominios PAS y PHY regulan la actividad espectroscópica del mismo (revisado en Nagatani, 2010, Fig. 1.3 A). El dominio C-terminal se encuentra formado por 3 sub-dominios: dos subdominios PAS sucesivos y un subdominio tipo histidina-quinasa, HKRD (revisado en Nagatani, 2010, Fig. 1.3 A). Las funciones mejor descritas del dominio C-terminal son la dimerización y la translocación al núcleo (revisado en Bae y Choi, 2008).

Los fitocromos presentan dos conformaciones interconvertibles. En una conformación absorben principalmente R ($\lambda_{\max} = 660\text{nm}$, forma Pr) y en la otra absorben RL ($\lambda_{\max} = 730\text{nm}$, forma Pfr) (Fig. 1.3 B). Durante la fotoconversión el cromóforo se isomeriza, lo cual es acompañado de un cambio estructural en la proteína (Rockwell y Lagarias, 2006). Cuando la cromoproteína absorbe luz R cambia de Pr a Pfr, que es el estado biológicamente activo. La forma Pfr puede convertirse a la forma Pr cuando absorbe RL o de manera independiente de la luz (reversión en oscuridad) (Fig. 1.3 B). Además, en el caso de phyA, la forma Pfr puede ser degradada rápidamente (revisado en Casal *et al.*, 2003).

Los espectros de absorción de la forma Pfr y Pr se solapan parcialmente (Fig. 1.3 C), estableciéndose así un equilibrio. La cantidad de Pfr en relación a la cantidad total de fitocromo (Pfr/P) dependerá de la composición espectral de la luz. Bajo radiación solar directa en espacios abiertos, la relación R/RL es cercana a 1 mientras que bajo un canopeo denso la relación R/RL es menor (Figura 1.3 C), ya que los tejidos verdes absorben luz R al mismo tiempo que reflejan y transmiten luz RL. Es así que, bajo radiación solar directa, puede establecerse un fotoequilibrio de 60 / Pfr/P mientras que, bajo un canopeo denso, el fotoequilibrio puede llegar a 0,1 / Pfr/P (revisado en Smith, 2000). De este modo el ambiente lumínico provee a las plantas información acerca de la presencia de plantas vecinas, futuras competidoras, y les permite responder de la manera que les confiere mayor ventaja; por ejemplo bajo un canopeo denso elongan el tallo para así exponer las hojas a la luz solar directa.

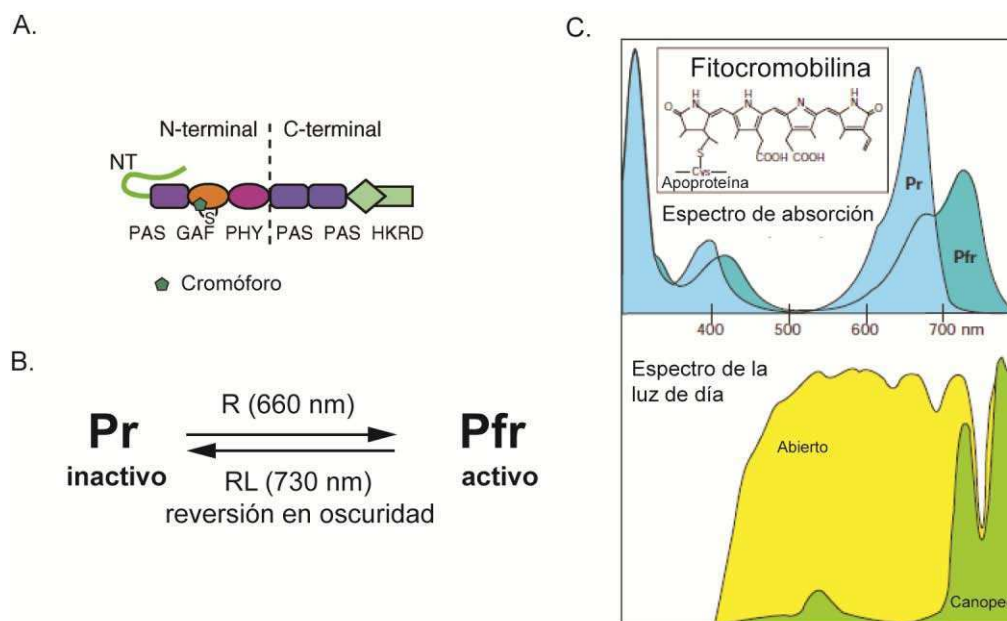


Figura 1.3. Dominios de los fitocromos y sus cambios conformacionales. **A.** Los fitocromos tienen un dominio N-terminal y un dominio C-terminal. El dominio N-terminal se encuentra formado por tres subdominios (PAS, GAF y PHY) y el cromóforo se une al subdominio GAF. El dominio C-terminal se encuentra formado por 2 subdominios PAS y un subdominio HKRD y es necesario para la dimerización de la proteína y para la formación de estructuras nucleares (imagen tomada de Nagatani, 2010). **B.** Esquema de los cambios conformacionales de la proteína que acompañan a la isomerización del cromóforo cuando se ilumina con R y RL. **C.** Espectro de absorción solapado de las distintas formas de la proteína (cuadrante superior) y espectro de la radiación solar disponible para la planta cuando se encuentra en un espacio abierto o cuando se encuentra bajo un canopeo (imagen tomada de Smith, 2000).

Inicialmente, se dividió a los fitocromos en dos grupos dependiendo de su estabilidad en presencia de la luz: tipo I, foto-lábiles y tipo II, foto-estables. Luego, se identificó al phyA como el fitocromo de tipo I, dado que se acumulaba en plántulas etioladas y se degradaba rápidamente en presencia de luz (o sea al encontrarse en la forma Pfr). También se observó que este fitocromo iniciaba respuestas a la luz aún cuando las relaciones Pfr/P generadas eran muy bajas (Casal *et al.*, 2003). A phyB, phyC, phyD y phyE se los caracterizó como fitocromos de tipo II, por lo que la forma Pfr de estos fitocromos es estable.

El dominio HKRD de los fitocromos parecería ser un vestigio evolutivo dado que no se ha detectado actividad histidina quinasa del mismo, sin embargo *in vitro* el fotorreceptor phyA tiene actividad quinasa del tipo serina/treonina (Yeh y Lagarias, 1998). Se ha observado que phyA se autofosforila y se propuso que la forma Pfr fosforilada de la proteína sería degradada más rápidamente que la forma Pfr no fosforilada (Han *et al.*, 2010). Además, phyA *in vitro* fosforila distintos sustratos: PKS1 (*Phytochrome Kinase Substrate1*) (Fankhauser *et al.*, 1999), NDPK2 (*Nucleoside Diphosphate Kinase2*) (Choi *et al.*, 1999), distintas proteínas de la familia Aux/IAA (*Auxin/Indole-3-Acetic Acid*; IAA1, IAA3, IAA4, IAA9 y IAA17) (Colon-Carmona *et al.*,

2000), *cry1* (Ahmad *et al.*, 1998), FHY1 (*Far-Red Elongated Hypocotyl1*) y su parólogo FHL (*FHY1-Like*) (Shen *et al.*, 2009a). Sin embargo, aún no se conocen las implicancias biológicas que podría tener la fosforilación de estos sustratos dado que no se ha reportado que phyA los fosforile *in vivo*.

En la oscuridad los fitocromos se encuentran en el citoplasma en su modo inactivo, Pr, y se translocan al núcleo en un modo luz-dependiente (Nagy *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, para cada fitocromo, la cinética de translocación y las condiciones en que se transloca son diferentes: phyA se transloca al núcleo tras la estimulación con RL o luz blanca en pocos minutos, mientras que phyB - phyE lo hacen en respuesta a la luz R o blanca y, al menos la translocación de phyB, se detecta varias horas después del estímulo (Kircher *et al.*, 2002; Kircher *et al.*, 1999). phyA, que no contiene señal de localización nuclear (NLS) en su secuencia, es translocado al núcleo mediante su interacción con FHY1 y FHL, que son proteínas con NLS (Hiltbrunner *et al.*, 2006). El mecanismo de translocación de phyB al núcleo aún se encuentra en discusión. Primero se propuso que tendría una secuencia NLS que se desenmascararía en respuesta a la luz (Chen *et al.*, 2005), pero recientemente se planteó que no tendría dicha secuencia y que, para su translocación al núcleo, necesitaría de la interacción con algún factor como ocurre con el phyA (Pfeiffer *et al.*, 2012). Por otro lado, una vez en el núcleo cada tipo de fitocromo tiene un comportamiento diferente formando o no cuerpos nucleares (*speckles*) con diferentes cinéticas: phyA a los pocos minutos de su importación al núcleo forma *speckles* (el número de núcleos con *speckles* alcanza su máximo a las 2 h en luz RL) mientras que phyB, phyC y phyE los forman más lentamente (el número de núcleos con *speckles* alcanza su máximo a las 6 h) y phyD prácticamente no forma *speckles* (Kircher *et al.*, 2002).

1.3.2 Modo de acción de los fitocromos

En la literatura se han descrito tres modos de acción de los fitocromos definidos en base a la cantidad de la forma Pfr que se establece: respuesta a muy bajo flujo de luz, VLFR, respuesta a bajo flujo de luz, LFR (*low fluence response*) y respuesta a alta irradiancia, HIR. Las primeras dos son dependientes de la cantidad de fotones acumulados y la última de la cantidad de fotones por unidad de tiempo que recibe la planta.

Distintos tipos de respuestas pueden asociarse a los distintos tipos de fitocromos e incluso a distintos modos de acción de los mismos. Cuando la planta percibe muy bajos flujos de luz del espectro visible o RL, el phyA media la respuesta VLFR, mientras que a altas irradiancias de RL continuo media la respuesta HIR (Casal *et al.*, 1998). Los fitocromos phyB, phyC, phyD y phyE, al ser estables, participan en las respuestas de tipo LFR cuando la planta percibe pulsos de luz R o luz R de modo continuo (revisado en Franklin y Quail, 2010).

1.3.3 Funciones de los fitocromos

El análisis de mutantes en genes *PHYs* ha permitido caracterizar los distintos fitocromos en respuesta a la relación R/RL del ambiente. Entre las funciones más caracterizadas se encuentran la germinación, la desetiación, el escape al sombreado y la floración.

Germinación.

Los fitocromos *phyA*, *phyB* y *phyE* serían los principales fotorreceptores involucrados en el control de la germinación en *Arabidopsis* (Fig. 1.4 A). Mientras que el mutante *phyA* falla en la inducción por VLFR y HIR de la germinación (Botto *et al.*, 1996; Shinomura *et al.*, 1994), el mutante *phyB* falla en la germinación en respuesta a LFR (Shinomura *et al.*, 1994). Entonces, si una semilla se encuentra por debajo de la superficie del suelo y es alcanzada por muy bajos flujos de luz como consecuencia de la distorsión del suelo, resultado por ejemplo de la labranza del mismo, el *phyA* percibiría los muy bajos flujos de luz e induciría la germinación vía VLFR (Botto *et al.*, 1996). Además, el mutante *phyE* falla en la germinación cuando se expone a altas irradiancias de RL, por lo que *phyE* también participaría en la inducción de la germinación, en este caso vía HIR (Hennig *et al.*, 2002).

El quintuple mutante *phyA phyB phyC phyD phyE* no germina en respuesta a la luz blanca, R, RL o azul lo cual pone en evidencia que sólo los fitocromos (*phyA-phyE*) serían necesarios para romper la dormición de la semilla en respuesta a la luz (Strasser *et al.*, 2010).

Desetiación.

Los 5 fitocromos de *Arabidopsis* participan en la desetiación de la plántula. El mutante *phyA* se desetiola normalmente cuando crece bajo luz blanca o luz R (Whitelam *et al.*, 1993) mientras que bajo luz RL continua falla en la inhibición de la elongación del hipocotilo, en la expansión de los cotiledones y en la síntesis de clorofila; en base a estas observaciones se considera al *phyA* el principal fotorreceptor involucrado en la desetiación bajo luz RL (Nagatani *et al.*, 1993; Parks y Quail, 1993; Fig. 1.4 B). Analizando al mutante *phyA*, se reportó que bajo un canopeo denso rico en RL la actividad de *phyA* tienen implicancias ecológicas ya que le permite a la plántula desetiarse y no morir prematuramente (Yanovsky *et al.*, 1995). El análisis comparativo de plántulas etioladas de genotipo salvaje (WT) con mutantes *phyA* sometidas a tratamientos de RL reveló que *phyA* regula a nivel transcripcional más de 800 genes, entre los cuales se encuentran factores de transcripción centrales en la regulación de la desetiación de la plántula (Tepperman *et al.*, 2001).

Por otro lado, en respuesta a luz R, phyB es el principal fotorreceptor involucrado en la desetiología de la plántula (Reed *et al.*, 1993; Somers *et al.*, 1991; Fig. 1.4 B). Mientras que phyC, phyD y phyE interaccionan con phyB en dicha respuesta, según lo reveló el análisis de distintas combinaciones de dobles mutantes (revisado en Franklin y Quail, 2010; Fig. 1.4 B). Además, se ha reportado que phyA es capaz de percibir muy bajos flujos de luz R de manera redundante con el phyB (Mazzella *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 1994), lo cual es consistente con una convergencia a nivel transcripcional de las vías de señalización de luz R y RL en los primeros momentos de exposición a la luz (Tepperman *et al.*, 2004). Finalmente, el quintuple mutante *phyA phyB phyC phyD phyE*, en un fondo genético *ft* (*flowering locus T*) que permite su germinación, cuando es crecido bajo luz R no logra superar el estadio del desarrollo de los cotiledones y muere (Strasser *et al.*, 2010), por lo que otros fotorreceptores distintos de los fitocromos no pueden mediar la desetiología en respuesta a la luz R.

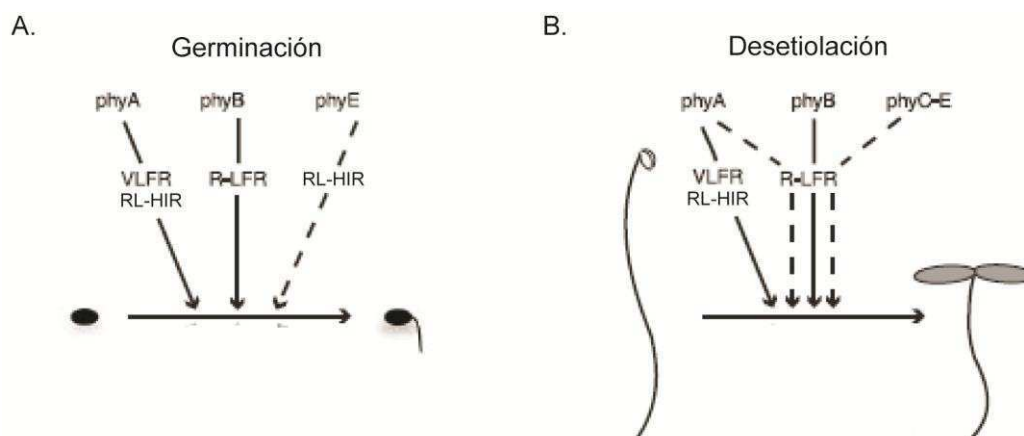


Figura 1.4. Funciones de los fitocromos en la germinación y desetiología. A. Germinación. B. Desetiología. Las flechas de línea llena hacen referencia a una fuerte influencia del fitocromo en la respuesta, líneas punteadas señalan un rol secundario (figura tomada de Mathews, 2006).

Escape al sombreado

Ante la presencia de plantas vecinas que le generen o puedan generarle en un futuro una disminución de la radiación fotosintéticamente activa, sensando la calidad del ambiente lumínico, la planta es capaz de modificar su arquitectura y su estrategia reproductiva. Como se expuso anteriormente, los tejidos verdes absorben luz R mientras reflejan y transmiten luz RL, produciendo una disminución de la relación R/RL. Así es que una baja relación R/RL es información para la planta acerca de la presencia del sombreado vecino, y responde a esta señal favoreciendo el crecimiento vertical, suprimiendo las ramificaciones, generando hojas más finas y alargadas y floreciendo tempranamente. En ambientes de bajo R/RL, la inducción de la respuesta al sombreado se encuentra mediada principalmente por el phyB (Fig. 1.5 A). El

mutante *phyB* tiene tallos elongados, hojas más finas y florece antes que el genotipo WT, o sea que tiene las características de una planta crecida en condiciones de bajo R/RL (Nagatani *et al.*, 1991; Somers *et al.*, 1991). Sin embargo el mutante *phyB* retiene algunas respuestas de escape al sombreado lo cual sugiere la participación de otros fitocromos en la respuesta (Robson *et al.*, 1993). Consistente con esta observación se ha reportado que, si bien los mutantes simples *phyD* y *phyE* se comportan como plantas WT en respuestas relacionadas con el escape al sombreado, los dobles mutantes *phyB phyE* y *phyB phyD* presentan características de respuesta al sombreado más exageradas que el simple mutante *phyB*. Entonces, *phyD* y *phyE* actuarían de modo redundante con *phyB* en el escape al sombreado (revisado en Franklin y Quail, 2010; Fig. 1.5 A). Por otro lado, el aumento de la radiación RL continua lleva a que *phyA* inhiba la elongación del hipocotilo antagonizando la respuesta al sombreado de los otros fitocromos (Yanovsky *et al.*, 1995; Fig. 1.5 A). El quintuple mutante *phyA phyB phyC phyD phyE* no conserva ninguna de las respuestas de escape al sombreado descritas (Strasser *et al.*, 2010).

Floración.

El largo del día y la temperatura son claves ambientales que permiten a las plantas ajustar su desarrollo a los cambios estacionales. Ambos factores son importantes en el control de la floración. En *Arabidopsis*, el gen *CO* (*constans*) promueve la floración en días largos. La floración se induce cuando la expresión del ARN mensajero (ARNm) de *CO* coincide con la exposición de la planta a la luz. En las últimas horas del día la luz estabiliza a la proteína *CO* mientras que en las primeras horas del día o en oscuridad *CO* es degradada (Valverde *et al.*, 2004). La participación de los fitocromos es clave en la regulación de los niveles de expresión de *CO* ya que en días largos durante las últimas horas del día *phyA* estabiliza a *CO* mientras que *phyB* desestabiliza a *CO* durante la mañana (Valverde *et al.*, 2004; Fig. 1.5 B). Por otro lado, la floración forma parte de las respuestas de escape al sombreado y *phyB*, a través de una vía que se propuso independiente de *CO*, induce la floración en respuesta a condiciones subóptimas de luz regulando la expresión de *PFT1* (*phytochrome and flowering time 1*) (Cerdán y Chory, 2003). Del mismo modo, en condiciones de bajo R/RL *phyD* y *phyE* participarían de la inducción de la floración (revisado en Franklin y Quail, 2010, Fig. 1.5 B). En días cortos la importancia de cada fitocromo en la floración variaría dependiendo de la temperatura: a 22°C *phyB* sería el principal fotorreceptor involucrado en la respuesta mientras que a temperaturas más bajas (16°C) serían *phyA*, *phyD* y *phyE* los fotorreceptores con un rol central en el control de la respuesta (Halliday *et al.*, 2003; Halliday y Whitelam, 2003; Fig.1.5 B).

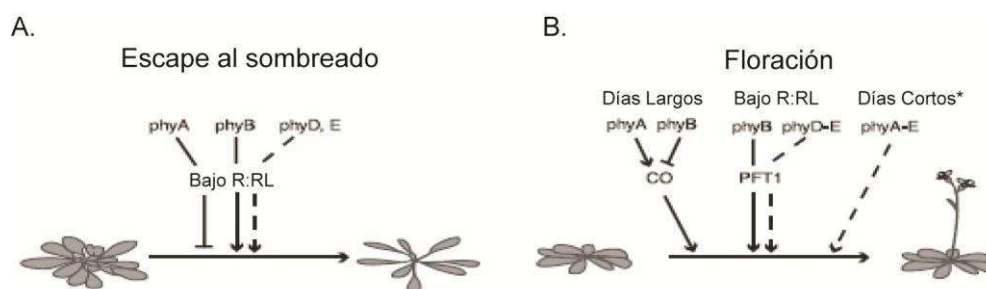


Figura 1.5. Participación de los fitocromos en la respuesta de escape al sombreado y en la floración. A. Escape al sombreado. B. Floración. Las flechas de línea llena hacen referencia a una fuerte influencia del fitocromo en la respuesta, líneas punteadas señalan un rol secundario. *señala que la participación es dependiente de la temperatura. CO y PFT1 son componentes de distintas vías de transducción de señales que promueven la floración (figura tomada de Mathews, 2006).

1.4 Los criptocromos

1.4.1 Fotoquímica de los criptocromos

En *Arabidopsis*, se conocen 3 criptocromos: *cry1* y *cry2* cuyas funciones se encuentran muy estudiadas (Ahmad y Cashmore, 1993; Lin *et al.*, 1998) y, *cry3* que parece no compartir un origen evolutivo común con los otros criptocromos y cuya actividad biológica aún no se encuentra claramente definida (Kleine *et al.*, 2003).

Los criptocromos son flavoproteínas con 2 dominios: un dominio N-terminal con homología con las DNA fotoliasas y un dominio C-terminal necesario para el tránsito citosol/núcleo y para la interacción proteína-proteína. Las DNA fotoliasas constituyen una familia de enzimas que, tras activarse por UV-A o luz azul, reparan daños en el DNA producidos por UV-B; *cry1* y *cry2* no poseen dicha actividad de reparación (Sancar, 2003) mientras que *cry3* sí la tendría (Selby y Sancar, 2006).

Como ocurre con los fitocromos, a la apoproteína se la identifica como CRY y a la holoproteína como cry. Al dominio N-terminal se unen 2 cromóforos: el dinucleótido flavina-adenina (FAD) y el pterina (*methenyltetrahydrofolate*, MTHF) (Fig. 1.6 A). La longitud de onda correspondiente a la luz azul es la que cambia el estado de oxidación del FAD, activando así al fotorreceptor. En *cry1* y *cry2*, la luz azul induce un estado radical intermedio (semiquinona, $FADH^{\bullet}$) que se acumula cuando la señalización se encuentra activa. Se desconoce cuánto tiempo estos fotorreceptores permanecen activos pero se sabe que la señalización podría finalizar de dos maneras: mediante la reducción del cromóforo al estado $FADH^-$, tras la absorción de luz verde y mediante la reversión al estado oxidado inactivo, FAD, durante un período de oscuridad (Bouly *et al.*, 2007; revisado en Moglich *et al.*, 2010; Fig. 1.6 B). El cromóforo pterina actuaría como un pigmento antena al absorber energía lumínica y transferirla al FAD asegurando su reducción (revisado en Moglich *et al.*, 2010).

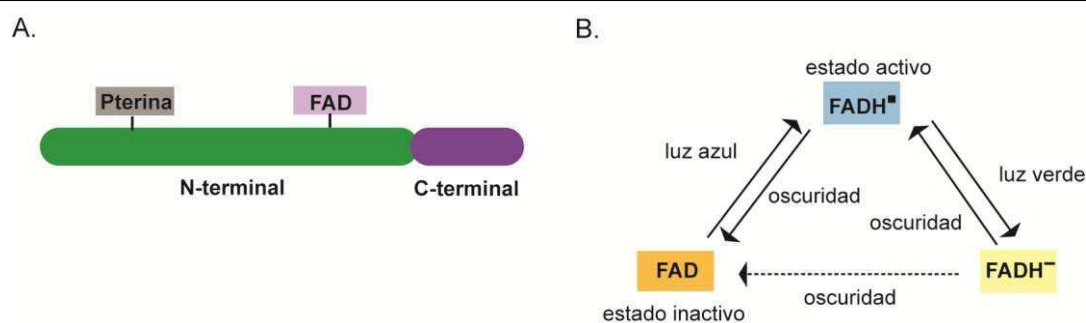


Figura 1.6. Dominios de los criptocromos y sus distintos estados. **A.** Los criptocromos tienen un dominio N-terminal al cual se unen los cromóforos (Pterina y FAD) y un dominio C-terminal necesario para la interacción proteína-proteína y para el tránsito citosol/núcleo. **B.** Modelo propuesto de los cambios de estados del FAD en los criptocromos (imagen adaptada de Bouly *et al.*, 2007).

El *cry2*, que es fotolábil, localiza de forma constitutiva en el núcleo y es degradado cuando se irradia la planta con luz azul (Guo *et al.*, 1999). Se propuso que se degradaría al encontrarse el cromóforo en estado activo $FADH^{\bullet}$, y no en los estados FAD o $FADH^{-}$, dado que la proteína no se degrada en oscuridad o al irradiar la planta con luz dicromática azul y verde o con pulsos de luz azul seguidos de pulsos de luz verde (Bouly *et al.*, 2007). En cambio, el *cry1* no es fotolábil y se encuentra tanto en núcleo como en citoplasma sin modificar su distribución tras un estímulo lumínico (Wu y Spalding, 2007).

La luz azul induce la fosforilación de *cry1* y *cry2* *in vivo* (Shalitin *et al.*, 2002; Shalitin *et al.*, 2003). En el caso de *cry2*, la fosforilación se asoció a la degradación de la proteína (Yu *et al.*, 2007b) mientras que la fosforilación de *cry1* se considera crítica para su actividad en la célula como se evidencia a partir de la obtención de alelos mutantes *cry1* que expresan proteína no fosforilable (Shalitin *et al.*, 2003).

1.4.2 Funciones biológicas

En la década del 80 se aisló en *Arabidopsis* un mutante que se lo denominó *hy4*, que poseía hipocotilo largo en luz azul pero no en luz R o RL, (Koornneef *et al.*, 1980). Posteriormente, al caracterizar molecularmente otro alelo del mutante *hy4* obtenido a partir de una población de *Arabidopsis* con inserciones de ADN-T (transposones), se identificó el gen *CRY1* (Ahmad y Cashmore, 1993). Luego se involucró a *cry1* en distintas respuestas inducidas por luz azul como son la síntesis de antocianinas (Ahmad *et al.*, 1995) y la regulación a nivel transcripcional de genes, entre los que se encuentran genes involucrados en fotosíntesis (Ohgishi *et al.*, 2004).

El gen *CRY2* se identificó por su similitud de secuencia con *CRY1* (Lin *et al.*, 1996). Aunque bajo luz azul *cry1* es el principal fotorreceptor involucrado en la desetiología, análisis de plántulas sobre-expresantes de *CRY2* y de plántulas mutantes *cry2* permitieron concluir que, a

bajos flujos de luz azul, *cry2* participaría en la inhibición de la elongación del hipocotilo y en la apertura de los cotiledones (Lin *et al.*, 1998).

Como se expuso previamente, la percepción del largo del día es un factor central en el control de la floración y *cry2* tiene un rol importante en la inducción de la floración en días largos (Guo *et al.*, 1998). *cry1* también participaría de la respuesta dado que el doble mutante *cry1 cry2* florece más tarde que el mutante *cry2* en días largos (Liu *et al.*, 2008). Además, bajo luz azul continua los simples mutantes *cry1* y *cry2* florecen normalmente pero el doble mutante *cry1 cry2* florece más tarde que el WT sugiriendo redundancia entre los criptocromos en esta respuesta (Mockler *et al.*, 1999). Al igual que *phyA* en días largos, *cry1* y *cry2* facilitan la acumulación de CO durante las últimas horas del día (Liu *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2004).

Por otro lado los criptocromos se encuentran involucrados en la regulación de la actividad de los estomas. El aparato estomático se conforma por dos células oclusivas, entre las cuales se forma un poro (ostiole), y por células acompañantes. La apertura y cierre de estomas regula la entrada del CO₂ necesario para la fotosíntesis y la pérdida de agua por transpiración. *cry1* y *cry2*, junto con las fototropinas (*phot1* y *phot2*), participan de modo aditivo de la apertura de estomas en respuesta a la luz azul (Mao *et al.*, 2005). Además, el doble mutante *cry1 cry2* es tolerante a la sequía y dicha tolerancia se asoció a la menor apertura de los estomas de estos mutantes (Mao *et al.*, 2005). Finalmente, la luz azul también participa del desarrollo del aparato estomático. La inducción del desarrollo de estomas en respuesta a la luz azul se encontraría regulada por *cry1* y *cry2* (Kang *et al.*, 2009).

1.5 Interacción entre fotorreceptores

En condiciones naturales las plantas crecen expuestas a la radiación solar, una combinación de radiaciones de distintas longitudes de onda, debiendo integrar la información que perciben para dar respuestas únicas. En las respuestas descritas en los párrafos anteriores se presentaron ejemplos de redundancia entre fotorreceptores dentro de una misma familia; sin embargo existen condiciones en las cuales hay interacciones sinérgicas o antagónicas entre fotorreceptores de la misma familia o de familias distintas. Estas interacciones son complejas y existe mucha información al respecto. A continuación se presentan sólo algunos casos.

Por ejemplo, en el control del crecimiento del hipocotilo, el tipo de interacción entre *phyA* y *phyB* depende del ambiente lumínico. La respuesta HIR de *phyA* y la respuesta LFR de *phyB* interaccionan de modo sinérgico en la inhibición de la elongación del hipocotilo (Casal, 1995), sin embargo a bajos flujos de luz R continua, *phyA* actúa de modo antagónico a *phyB* (Mazzella *et al.*, 1997).

Por otro lado, también se ha observado sinergismo entre *phyB* y *cry1* en el control de la elongación del hipocotilo (Casal y Boccalandro, 1995; Casal y Mazzella, 1998) y en la apertura de los cotiledones (Neff y Chory, 1998). Este sinergismo es condicional, dado que sólo se observa cuando las condiciones de luz son subóptimas, es decir cuando la exposición a luz azul no es prolongada y la relación R/RL es baja (Casal y Mazzella, 1998). Además, el sinergismo entre *phyB* y *cry1* genera histéresis en la tasa de elongación del hipocotilo (Sellaro *et al.*, 2009). Recientemente se ha reportado que *phyB* y *cry1* interactúan físicamente en oscuridad o bajo luz RL y se disocian en respuesta a luz R o azul (Hughes *et al.*, 2012). Este hallazgo es interesante dado que podría ser parte del mecanismo que explique a nivel molecular el sinergismo observado en las respuestas fisiológicas.

En *Arabidopsis*, los fitocromos (principalmente, pero no exclusivamente *phyA* y *phyB*) y los criptocromos *cry1* y *cry2*, son los fotorreceptores más importantes involucrados en la modulación de su crecimiento y desarrollo. A nivel fenotípico, el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (que carece de los cuatro fotorreceptores: *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2*) se encuentra severamente afectado comparado incluso con cualquier combinación de doble o triple mutante de estos fotorreceptores (Mazzella *et al.*, 2001). El hipocotilo de este cuádruple mutante es alargado asemejándose al de una planta crecida en oscuridad; los cotiledones se abren 20 días más tarde que en el WT y sólo parcialmente. Las plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* no forman una roseta normal, tienen una baja tasa de producción de hojas (Fig. 1.7 A) y, como la estabilidad del vástago es pobre, las plantas crecen por sobre la superficie del suelo (Fig. 1.7 B). El ciclo de vida de plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* es más largo que el ciclo de vida de plantas WT (Mazzella *et al.*, 2001).

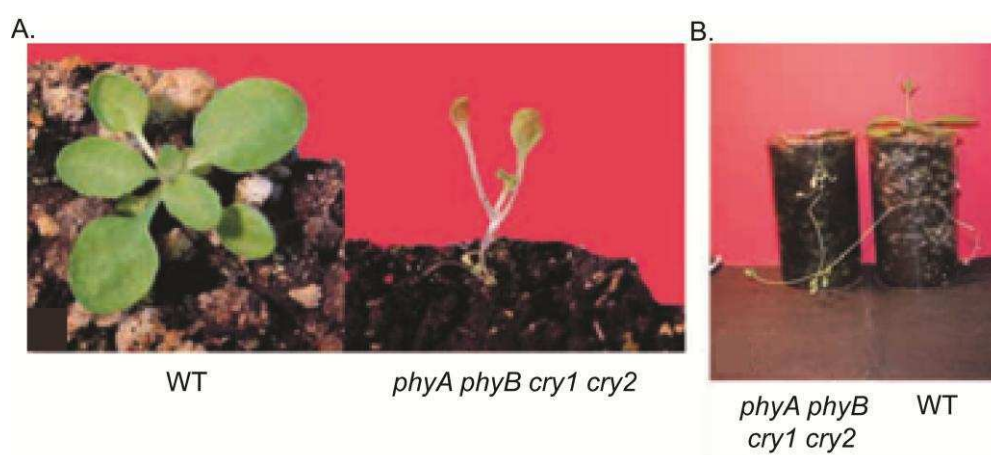


Figura 1.7. Desarrollo alterado del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. **A** Foto de una planta WT y de una cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, crecidas durante 3 semanas. **B**. Foto de una planta cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* crecida durante 10 semanas al lado de una planta WT crecida durante 4 semanas. Las plantas adultas se encuentran en un estadio del desarrollo similar (foto tomada de Mazzella *et al.*, 2001).

A partir de lo previamente expuesto se advierte que el estudio del comportamiento de mutantes que carecen de un fotorreceptor específico junto con el estudio de los múltiples mutantes han puesto en evidencia que el procesamiento de la información ocurre a través de una compleja red de señalización con efectos redundantes, mecanismos de acción sinérgicos y mutuamente antagónicos (revisado en Casal, 2000). Se propuso que esta red favorecería la homeostasis en el crecimiento ya que disminuiría el impacto de las fluctuaciones lumínicas del medio ambiente que no tienen relevancia ecológica, como son los cambios temporarios de la irradiancia debido a la presencia de nubes o los cambios en la composición espectral debido a la variación diaria del ángulo solar (Mazzella y Casal, 2001).

1.6 Convergencia de los caminos de señalización

1.6.1 Acción de los fotorreceptores a nivel nuclear

El desarrollo escotomorfogénico de la plántula en oscuridad ocurre mediante la activa represión de genes responsables de la desetiología. COP1 (*Constitutive photomorphogenesis 1*) y DET1 (*de-etiolated 1*) fueron los primeros represores de la fotomorfogénesis en ser descubiertos hace más de 20 años atrás (Chory *et al.*, 1989; Deng *et al.*, 1992). Actualmente COP1 es considerado uno de los principales centros de integración de las señales provenientes de phyA, phyB, cry1 y cry2 regulando, al mismo tiempo, distintos efectores río abajo (Fig. 1.8). COP1 es una ubiquitin-ligasa de tipo E3 que envía a degradación por proteosoma a reguladores positivos de la fotomorfogénesis, como son los factores de transcripción HY5 (*long hypocotyl 5*), HYH (*HY5 homolog*), HFR1 (*long hypocotyl in far-red1*) (revisado en Hoecker, 2005; Josse y Halliday, 2008), LAF (*long after far-red light 1*) (Seo *et al.*, 2003), y los fotorreceptores phyA (Seo *et al.*, 2004), phyB (Jang *et al.*, 2010) y cry2 (Shalitin *et al.*, 2002) (Fig. 1.8). Este proceso se encuentra regulado principalmente por complejos proteicos que forma COP1 con distintas proteínas que modulan su actividad, por ejemplo la familia de proteínas SPA (*suppressor of phytochrome A*, SPA1-4) que participa de la supresión de la fotomorfogénesis en oscuridad (Laubinger *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2008). COP1 tiene localización nuclear en oscuridad y migra al citoplasma en presencia de luz, permitiendo así la acumulación de reguladores positivos de la fotomorfogénesis en el núcleo (Von Arnim y Deng, 1994). Sin embargo la cinética de traslocación es lenta (aproximadamente 24h) (Von Arnim *et al.*, 1997) por lo cual los fotorreceptores activos reprimirían la actividad COP1 mediante algún otro mecanismo en las primeras horas de respuesta a la luz (Yi y Deng, 2005). El mecanismo molecular a través del cual phyA y phyB regulan a COP1 aún no se conoce (revisado en Lau y Deng, 2012) pero sí se plantearon mecanismos para la regulación de COP1 por parte de cry1 y cry2. Recientemente se

propuso que *cry1* interaccionaría con el complejo COP1-SPA1 a través del dominio C-terminal de SPA1 disociándolo, lo cual disminuiría la actividad de COP1 sobre efectores fotomorfogénicos (Liu *et al.*, 2011). Mediante un mecanismo similar *cry2* interaccionaría con el complejo COP1-SPA1 disminuyendo la actividad de COP1 y permitiendo en este caso la acumulación de CO, lo cual induciría la floración (Zuo *et al.*, 2011). *GI* (*gigantea*) es una proteína que participa del control de la floración en respuesta al fotoperiodo y del control del comportamiento oscilatorio de proteínas claves del reloj circadiano de las plantas (Ding *et al.*, 2007; Mizoguchi *et al.*, 2005). COP1, además de regular directamente los niveles de CO, también participaría del control de la floración y de los ritmos circadianos regulando los niveles de *GI* (Yu *et al.*, 2008; Fig. 1.8).

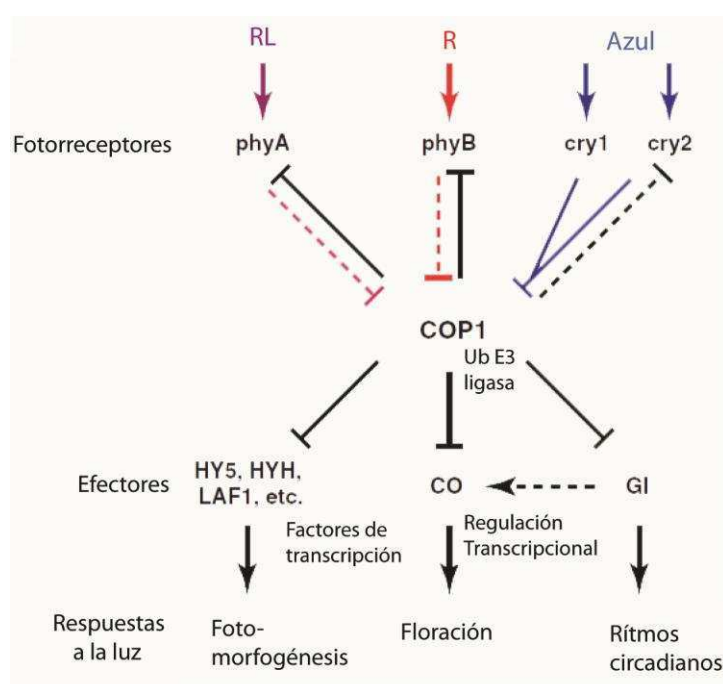


Figura 1.8. COP1 en el centro de la transducción de las señales lumínicas. La luz RL, R y azul, a través de sus fotorreceptores específicos (*phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2*), inhibe a COP1, represor de los factores fotomorfogénicos (*HY5*, *HYH*, *LAF1*, etc.), de proteínas involucradas en la floración (*CO*) y los ritmos circadianos (*GI*). Al inhibirse COP1 los efectores positivos disparan las distintas respuestas a la luz que regulan. Las flechas de línea llena hacen referencia a mecanismos conocidos de regulación y las líneas punteadas señalan aquellos mecanismos que aún no se conocen a nivel molecular (Imagen tomada de Lau y Deng, 2012).

Paralelamente, cuando los fitocromos activos (Pfr) se traslocan al núcleo interaccionan con factores de transcripción del tipo *basic-helix-loop-helix*, llamados PIFs (*phytochrome interacting factor*) que actúan como represores constitutivos de la fotomorfogénesis. Los fitocromos llevan a los PIFs a una rápida degradación proteolítica induciendo así los eventos fotomorfogénicos (revisado en Leivar *et al.*, 2008). Los PIFs participan en distintas respuestas

mediadas por los fitocromos como la germinación y la desetiología en respuesta a luz R y RL y las respuestas de escape al sombreado (Leivar y Quail, 2011). Además, se propuso que COP1 regula positiva e indirectamente los niveles de PIF3 (Bauer *et al.*, 2004).

1.6.2 Acción de los fotorreceptores a nivel citoplasmático

Una vez que los fotorreceptores se activan y traslocan al núcleo, se produce un masivo cambio en la expresión génica. Sin embargo reportes recientes indican que hay fenómenos que no parecerían depender de la transcripción de genes dado que ocurren demasiado rápido para ser explicados por un cambio a nivel transcripcional (revisado en Rosler *et al.*, 2010). Por ejemplo, se ha involucrado a los fitocromos de localización citoplasmática en la elongación de la raíz (Shin *et al.*, 2010) y se propuso que la respuesta a luz azul de fototropismo mediada por fototropinas sería amplificada por la luz R, efecto que se daría por la interacción física entre phyA y phot1 en la membrana plasmática (Jaedicke *et al.*, 2012).

De los criptocromos cry1 y cry2, sólo cry1 localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma y se propuso que la cromoproteína de localización nuclear participaría en la inhibición de la elongación del hipocotilo y de los peciolo así como en la despolarización de la membrana plasmática mientras que la cromoproteína citoplasmática participaría de la apertura de los cotiledones y de la elongación de la raíz primaria (Wu y Spalding, 2007). Al mismo tiempo, algunas respuestas descritas para el cry1 citoplasmático se encontrarían inhibidas por el cry1 nuclear y la síntesis de antocianinas estaría fuertemente inducida por la proteína nuclear y en menor medida por la citoplasmática (Wu y Spalding, 2007).

En la década de 1990 se propuso que el fotorreceptor phyA (Neuhaus *et al.*, 1993) y que algún fotorreceptor de luz azul (Warpeha *et al.*, 1991) actuarían a nivel citoplasmático a través de proteínas G heterotriméricas asociadas a la membrana plasmática.

1.7 Proteína G heterotrimérica en los caminos de señalización de la luz

1.7.1 La proteína G heterotrimérica en plantas

Las proteínas G participan de la transducción de señales en una amplia variedad de procesos durante el desarrollo y crecimiento de plantas y animales (revisado en Temple y Jones, 2007). La proteína G heterotrimérica, típicamente acoplada a un receptor transmembrana (GPCR), consiste en 3 subunidades: $G\alpha$, $G\beta$, y $G\gamma$, que regulan la actividad de efectores río abajo (Fig. 1.9). En mamíferos se conocen diecisiete $G\alpha$, cinco $G\beta$, y doce $G\gamma$ (Offermanns, 2003), mientras que en el genoma de *Arabidopsis* se ha hallado una $G\alpha$ canónica

(GPA1), una G β (AGB1) y tres G γ (AGG) (Chakravorty *et al.*, 2011; revisado en Temple y Jones, 2007). Similar a lo que se observó en Arabidopsis, en el genoma de arroz se encontró una G α (RGA1), una G β (RGB1) (Ishikawa *et al.*, 1996) y dos G γ (RGG1 y RGG2) (Kato *et al.*, 2004). Por otro lado, en mamíferos hay más de 1000 GPCR (Offermanns, 2003) mientras que en Arabidopsis se propuso a GCR1 como GPCR pero nunca se identificó el ligando correspondiente. Además, se caracterizaron en Arabidopsis dos receptores GPCR tipo G (GTG1 y GTG2), denominados “tipo G” porque unen e hidrolizan GTP. Estos receptores unen como ligando ácido abscísico (ABA) (Pandey *et al.*, 2009).

La subunidad G α une nucleótidos de guanina, GDP y GTP. Cuando se encuentra unida a GDP se ensambla el heterotrímero y se une al receptor transmembrana, el cual tiene actividad GEF (*guanine exchange factor*) o sea que, ante una señal, induce el intercambio de GDP por GTP, lo que lleva a la disociación del sistema. La subunidad G α activada, es decir unida a GTP, modula la actividad de enzimas citoplasmáticas. La actividad GTPasa intrínseca de G α hidroliza GTP a GDP y el complejo vuelve a asociarse al receptor transmembrana (Fig. 1.9). Además, existen proteínas denominadas RGS (*regulator of G signaling*) que, sin ser efectores, regulan la actividad GTPasa de G α . En mamíferos se han encontrados 20 RGS (Hurst y Hooks, 2009) mientras que en Arabidopsis se ha encontrado sólo una, RGS1 (Chen *et al.*, 2003).

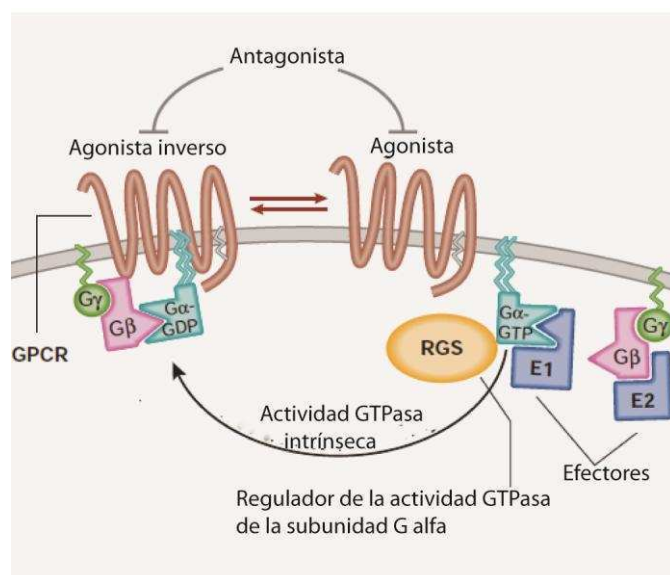


Figura 1.9. Ciclo de acoplamiento - desacoplamiento de una proteína G heterotrimérica típica.

Cuando la subunidad G α se encuentra unida a GDP el heterotrímero (G α , G β , y G γ) se encuentra unido a un receptor transmembrana (GPCR) que tiene actividad GEF. Ante una señal (la unión de un ligando agonista por ejemplo) el GPCR induce el intercambio de GDP por GTP en la subunidad G α , lo que lleva a la disociación del sistema. La subunidad G α activada y el complejo G $\beta\gamma$ modulan la actividad de distintos efectores. La actividad GTPasa

intrínseca de G α hidroliza GTP a GDP y el complejo vuelve a asociarse al GPCR. La velocidad de hidrólisis puede encontrarse modulada por RGS (Figura tomada de Jones y Assmann, 2004).

Las características bioquímicas estudiadas *in vitro* de GPA1 presentan al menos dos diferencias con lo descrito en mamíferos. Primero, la cinética de intercambio de GDP por GTP de GPA1 es la más rápida conocida de las subunidades G α (Johnston *et al.*, 2007). Esto, acoplado a una lenta hidrólisis del GTP lleva a que, al menos *in vitro*, la proteína esté en su

modo activo la mayor parte del tiempo (Johnston *et al.*, 2007) por lo que GPA1 no necesitaría de la activación mediada por un GPCR. Segundo, RGS1 es una RGS particular dado que contiene un dominio de 7 pasos transmembrana y localiza en membrana plasmática (Chen *et al.*, 2003). Estudios recientes sugieren que esta proteína regularía la cantidad de GPA1 activa en la célula promoviendo la formación del heterotrímero (Jones *et al.*, 2011). Si la función del dominio transmembrana de RGS1 es anclar al complejo en membrana o si es la de modular la actividad GAP de RGS1 en respuesta a algún ligando es lo que hoy se encuentra en discusión (Jones *et al.*, 2011).

1.7.2 Función de GPA1 en plantas

El transcripto *GPA1* se encuentra presente en todos los tejidos, excepto en semilla madura, y su expresión es abundante en tejido vascular y tejidos con activa división celular como meristemas (apical, raíz y flores) y embriones, lo cual fue un indicio de la participación de GPA1 en la división celular (Ma *et al.*, 1990).

En el año 2001 se obtuvo en *Arabidopsis* el mutante *gpa1* cuyas características fisiológicas aportaron nuevas evidencias sobre su participación en la división celular (Ullah *et al.*, 2001). El mutante *gpa1* presentó en oscuridad hipocotilo más corto y mayor apertura del gancho apical que el genotipo WT. Además, en plantas adultas la morfología de las hojas del mutantes *gpa1* fue diferente a la morfología de las hojas del genotipo WT. Estos defectos se asociaron a una menor actividad mitótica en células mutantes *gpa1* y, en consecuencia, a un menor número de células en el hipocotilo y en las hojas de las plantas mutantes *gpa1* (Ullah *et al.*, 2001). Consistentemente, la sobre-expresión de GPA1 llevaba a una división celular de modo ectópico en diferentes órganos (Ullah *et al.*, 2001). A partir de estudios posteriores con el mutante *gpa1*, se involucró a GPA1 en múltiples procesos en la planta, entre los que se incluye la respuesta a hormonas y al ozono, y la resistencia a patógenos (revisado en Perfus-Barbeoch *et al.*, 2004).

Particularmente en relación a la respuesta a hormonas, se puso en evidencia su participación en la promoción de la germinación de la semilla en respuesta a brasinoesteroides (BR) y ácido giberélico (GA), y en la inhibición de la elongación del hipocotilo en respuesta a BR (Ullah *et al.*, 2002). En plántulas, GPA1 modula positivamente el aumento del número de raíces laterales inducido por auxinas (Ullah *et al.*, 2003). Es interesante lo que sucede con la sensibilidad a ABA, ya que mientras semillas *gpa1* son hiper-sensibles ABA (Ullah *et al.*, 2002), en hojas de plantas adulta las células de la guarda de mutantes *gpa1* son hipo-sensibles a ABA (Wang *et al.*, 2001). Esta diferencia sugiere que distintos estímulos y efectores tejido-

específicos le otorgan a GPA1 diferentes roles en múltiples procesos durante el ciclo de vida de la planta (revisado en Perfus-Barbeoch *et al.*, 2004).

1.7.3 Participación de GPA1 en las vías de señalización activadas por luz

La participación de GPA1 en fotomorfogénesis fue siempre controversial. Durante la década de 1990 distintos trabajos han involucrado a la proteína G heterotrimérica en la transducción de señales lumínicas en plantas. Se observó que en protoplastos de *Medicago sativa* como en extractos de plántulas etioladas de *Avena sativa* un tratamiento con luz R aumentaba la unión de GTP radiactivo de la muestra y el efecto era revertido por luz RL (Muschietti *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1991). En el trabajo de Muschietti *et al.* (1993) se purificó de membranas celulares de *Medicago sativa* una proteína de 43 kDa con características bioquímicas de proteína G, ya que unía GTP y era reconocida por un anticuerpo anti-transducina (que reconoce la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica de retina bovina). Romero *et al.* demostraron que la toxina de cólera (que activa proteínas G), aumentaba la expresión de genes *Lhcb* (*light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein*) en plántulas etioladas de avena y cultivos celulares de soja (Romero y Lam, 1993; Romero *et al.*, 1991). En ensayos farmacológicos con células de hipocotilo de tomate deficientes en phyA activo, se observó que la inyección de proteína G era suficiente para transducir la señales de phyA a través de los segundos mensajeros GMP cíclico y Ca^{2+} /Calmodulina, induciendo la expresión de proteínas fotosintéticas como CHS (chalcona sintetasa), FNR (ferredoxin-NADP reductasa) y CAB (proteínas de unión a la clorofila, productos de genes *Lhcb*) (Bowler *et al.*, 1994a; Bowler *et al.*, 1994b; Neuhaus *et al.*, 1993).

La participación de $G\alpha$ en respuestas inducidas por luz azul también se analizó mediante ensayos farmacológicos. Se observó que bajos flujos de luz azul aumentaban la actividad GTPasa de una proteína G de alrededor de 40 kDa presente en la membrana plasmática de plantas etioladas de *Pisum sativa* (arveja) (Warpeha *et al.*, 1991). En ese entonces, si bien se predecía la existencia de receptores de luz azul aún no se habían identificado (Warpeha *et al.*, 1992). Sin embargo, tenían evidencias de que el cromóforo del receptor era una flavina y compuestos que inactivaban el estado excitado de dicha molécula inhibían la actividad de la proteína G en respuesta a la luz azul (Warpeha *et al.*, 1992).

Más tarde, mediante experimentos donde se sobre-expresó GPA1 en los mutantes *phyA*, *phyB* y *cry1* se propuso que GPA1 estaría involucrada en la inhibición de la elongación del hipocotilo en respuesta a la luz R, RL y azul (Okamoto *et al.*, 2001). Sin embargo estos resultados no fueron apoyados por estudios realizados con el mutante *gpa1* (Jones *et al.*, 2003). En dichos estudios se analizó el alargamiento del hipocotilo del simple mutante *gpa1* en

luz R y RL, concluyéndose que no difería en ningún caso del alargamiento observado en el genotipo WT, por lo cual se propuso, contrariamente a lo sugerido por Okamoto *et al.* (2001), que GPA1 no estaría involucrado en la transducción de luz R o RL (Jones *et al.*, 2003).

En los últimos años, a partir del análisis del mutante *gpa1*, surgieron nuevas evidencias de la participación de Gα en respuestas inducidas por luz. Se propuso que GPA1 participaría en dos respuestas disparadas por phyA: la inducción por luz de la germinación (Botto *et al.*, 2009) y la muerte de células del hipocotilo en plántulas crecidas en luz RL y luego se trasladaron a luz blanca (Wei *et al.*, 2008). También se presentaron evidencias genéticas de la participación de GPA1 en el desarrollo de los cloroplastos participando río abajo o paralelamente a una proteína involucrada en la variegación de la hoja, THF1 (*thylakoid formation1*) (Yu *et al.*, 2007a; Zhang *et al.*, 2009). También se obtuvieron nuevas evidencias de la participación de GPA1 en respuestas inducidas por luz azul. Se involucró a GPA1 en dos respuestas a bajos flujos de luz azul identificándose efectores diferentes: en la síntesis de fenilalanina en plántulas de *Arabidopsis* (Warpeha *et al.*, 2006) y en la expresión de genes *Lhcb* (Warpeha *et al.*, 2007). Como la expresión de genes *Lhcb* no se encontró alterada en el mutante *cry1* a bajos flujos de luz azul, los autores propusieron que otros receptor/es diferentes de *cry1* serían los que participarían de la percepción de esta señal (Gao y Kaufman, 1994; Warpeha *et al.*, 2007).

1.8 Herramientas en fotobiología

La fotobiología tiene una larga historia, ya Darwin en 1880 proponía la existencia de una sustancia que se producía en la región apical de la planta responsable de la curvatura del tallo. En 1931 se propuso llamar a esa sustancia, responsable del fototropismo, auxina (Whippo y Hangarter, 2006).

En 1943 el laboratorio de Laibach publica sus primeros resultados en *Arabidopsis thaliana*, una especie de planta caracterizada por su corto periodo de regeneración, fácil cruzamiento y posibilidad de mutagénesis (revisado en Meyerowitz, 2001). Proponen sobre esta base a *Arabidopsis* como un modelo genético en plantas (revisado en Meyerowitz, 2001). Con el advenimiento de la genética molecular a fines de la década de 1980, *Arabidopsis* pasó entonces a ser el principal modelo para el estudio de los fotorreceptores. En 1989 se secuencian *PHYA*, *PHYB* y *PHYC* (Sharrock y Quail, 1989) y en 1994 se secuencian *PHYD* y *PHYE* (Clack *et al.*, 1994). En la década de 1990, el trabajo con mutantes hipo- o hiper-sensibles a diferentes longitudes de onda llevó a la caracterización de los distintos fitocromos, criptocromos y fototropina 1, y a la identificación de algunos componentes en la vía de señalización de los mismos como la familia de COPs (revisado en Chory, 2010). En el 2000 se completa la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* (The *Arabidopsis* Genome

Initiative,2000). Esto permitió la creación de largas colecciones de mutantes y sobre-expresantes que han permitido caracterizar las funciones de muchísimos genes. Asimismo, se impulsó el uso de microarreglos y ensayos proteómicos para analizar la expresión global de genes y de proteínas.

La técnica de microarreglos ha permitido la identificación de genes regulados por los fitocromos y/o criptocromos en diferentes etapas del desarrollo y en plantas expuestas a diferentes estímulos lumínicos (Jiao *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2001; Sellaro *et al.*, 2009; Tepperman *et al.*, 2004; Tepperman *et al.*, 2001). Sin embargo, en distintos organismos se ha descrito una pobre correlación entre los niveles de ARNm y los niveles de las proteínas (Beyer *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012b; Tian *et al.*, 2004). Actualmente, se han utilizado microarreglos diseñados para analizar casos de *splicing* alternativo en respuestas reguladas por luz (Sanchez *et al.*, 2010); también se ha analizado el ARNm en polisomas (el conjunto de mensajeros en activa traducción) en comparación con ARNm total encontrándose un selectivo aumento de la traducción de determinados transcriptos en respuesta a la luz (Liu *et al.*, 2012b).

La abundancia de estudios proteómicos relacionados con caminos de señalización mediados por la luz es marcadamente menor que el número de análisis de transcriptomas. Un método clásico para el estudio de proteomas es la electroforesis en geles en dos dimensiones (2D). Se han utilizado geles 2D para comparar patrones de expresión de proteínas en plántulas crecidas en oscuridad, R, RL y luz azul (Kim *et al.*, 2006). También se ha investigado el perfil de proteínas de los mutantes *cry1*, *cry1 cry2* y *phyA phyB* en *Arabidopsis* (Phee *et al.*, 2007; Xu Li *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008) y del sobre-expresante de *cry2* en tomate (Lopez *et al.*, 2012). Estos estudios han demostrado que la luz percibida por los fotorreceptores regula la expresión de proteínas involucradas en fotosíntesis y generación de metabolitos y energía, sugiriendo también la participación de los fotorreceptores en respuestas a estrés.

2 OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es estudiar los mecanismos moleculares y bioquímicos de la transducción de señales lumínicas mediadas por fitocromos y criptocromos durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Los **objetivos específicos** son:

1. Estudiar la participación de la subunidad alfa de la proteína G heterotrimérica (GPA1) en los caminos de señalización mediados por los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y cry2.
2.
 - a. Obtener y comparar, utilizando la técnica de geles 2D, los perfiles de expresión de proteínas del genotipo WT y del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.
 - b. Analizar, utilizando herramientas bioinformáticas, las proteínas diferencialmente expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.
 - c. Estudiar la relación entre las proteínas diferencialmente expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y las respuestas fisiológicas de las plantas.

3 Materiales y Métodos

3.1 Material vegetal

En los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* de los genotipos que se detallan a continuación.

En el ecotipo Landsberg *erecta* (Ler):

- Plantas WT
- *phyA* (*phyA-201*) (Nagatani *et al.*, 1993).
- *phyB* (*phyB-5*) (Reed *et al.*, 1993).
- *cry1-1* (*hy4-2.23 n*) (Koornneef *et al.*, 1980).
- *cry2* (*fha-1*) (Koornneef *et al.*, 1991).
- *cry1 cry2* (*cry1-1 fha-1*) (Casal y Mazzella, 1998).
- *phyA phyB* (*phyA-201 phyB-1*) (Mazzella *et al.*, 1997).
- *phyA phyB cry1 cry2* (*phyA-201 phyB-1 cry1-1 fha-1*) (Mazzella *et al.*, 2001).

En el ecotipo Columbia (Col):

- Plantas WT.
- *cry1-304* (Bruggemann *et al.*, 1996).
- *gpa1-3* (SALK_066823), (Jones *et al.*, 2003).
- *cry1* (SALK_069292).
- *cry1 gpa1* (*cry1-304 gpa1-3*). Generamos éste doble mutante mediante la polinización cruzada de los mutantes simples *cry1-304* y *gpa1-3*.

SALK: Líneas de inserción de ADN-T provenientes de la colección del *Salk Institute Genome Analysis Laboratory*, San Diego (SIGnAL; www.signal.salk.edu).

El simple mutante *gpa1-3* fue donado por el Dr. Alan Jones, y el simple mutante *cry1* por el Dr. Jorge Casal.

Los *loci* de los mutantes utilizados se identifican con los siguientes códigos (AGI, *Arabidopsis gene identifier*): *PHYA*, AT1G09570; *PHYB*, AT2G18790; *CRY1*, AT4G08920; *CRY2*, AT1G04400; *GPA1*, AT2G26300.

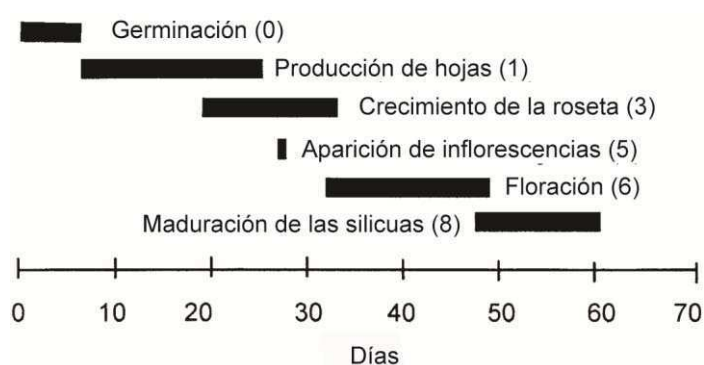
3.2 Condiciones de crecimiento de las plantas

Las semillas se esterilizaron durante 2 horas (h) 30 minutos (min) en un ambiente de Cl_2 (g) generado por la adición de 2,5 ml de HCl 37 / a 75 ml de una solución concentrada de NaClO (agua lavandina). Se sembraron en cajas de plástico transparente de aproximadamente 3x2 cm (o en placas de Petri) con el medio basal Murashige & Skoog 0,5X, pH 5,7 (MS 0,5X)- agar 0,8 / , suplementado con sacarosa o glucosa sólo cuando se indica. Las cajas se mantuvieron en oscuridad a 4 °C durante 3 días para reducir la dormición de las semillas (estratificación). Se indujo la germinación con un pulso de 2 h de luz blanca y luego de 24 h de oscuridad se trasladaron al tratamiento correspondiente.

Para los experimentos del capítulo II, las plantas fueron crecidas a 22 ± 1 °C bajo luz continua ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a menos que en el experimento se plantee un tratamiento particular. En los experimentos que se utilizaron macetas las plántulas fueron crecidas en una mezcla de tierra:vermiculita:perlita:turba (1:1:1:1).

3.2.1 Estadios del desarrollo de Arabidopsis

Para definir en qué estadios del desarrollo se encontraban las plantas se adoptó la clasificación en estadios publicada por Boyes *et al.* (2001). Dichos autores proponen 30 estadios, divididos en 6 estadios principales, que cubren el desarrollo de la planta de Arabidopsis desde la imbibición de la semilla hasta la producción de semillas maduras (Fig. 3.1) y un último estadio principal (9) que corresponde a la senescencia de la planta.



3.1. Esquema de la progresión cronológica de los estadios del desarrollo en Arabidopsis. Las barras horizontales indican el período de tiempo durante el cual cada estadio ocurre en plantas WT (Col). Los números en paréntesis indican el número de estadio del desarrollo principal (Imagen tomada de Boyes *et al.*, 2001).

En la Tabla 3.1 se describen en detalle los estadios principales 1 y 6 que son los estadios con que trabajamos en el Capítulo II.

Tabla 3.1. Descripción de los estadios de desarrollo principal utilizados en esta tesis (1 y 6). Datos tomados de la Tabla 2 publicada por Boyes *et al.* (2001).

Estadio	Descripción
Estadio de desarrollo principal 1	Desarrollo foliar
1.02	2 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.03	3 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.04	4 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.05	5 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.06	6 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.07	7 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.08	8 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.09	9 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.10	10 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.11	11 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.12	12 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.13	13 hojas de la roseta >1 mm de largo
1.14	14 hojas de la roseta >1 mm de largo
Estadio de desarrollo principal 6	Producción de flores
6.00	Apertura de la primera flor
6.10	10% de las flores que serán producidas abiertas
6.30	30% de las flores que serán producidas abiertas
6.50	50% de las flores que serán producidas abiertas
6.90	Floración completa

3.3 Ensayos bioquímicos y de biología molecular

3.3.1 Genotipificación de plantas mutantes de inserción

Para verificar los genotipos de las plantas mutantes simples de inserción (*gpa1-3* y *cry1*) y el doble mutante *cry1-304 gpa1-3* y así seleccionar las plantas homocigotas mutantes se siguió el siguiente esquema protocolar:

3.3.1.1 Extracción de ADN de plantas de Arabidopsis

Se cortó una hoja de una planta con 6 o más hojas en su roseta. Se machacó el material vegetal en un microtubo de 1,5 ml con un émbolo de cabeza cónica. Luego se agregaron 350 µl de *buffer* de lisis y se continuó homogeneizando. Se incubó el tubo a 65 °C durante 10 min y se neutralizó con la solución III mezclando por inversión. Luego se incubó en hielo por 20 min y se centrifugó en frío a 16.000 *g*. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se precipitó centrifugando por 15 min a 16.000 *g* con 1 volumen de isopropanol a 4 °C. Finalmente se lavó el *pellet* con etanol 80%, se dejó secar, se resuspendió en 25 µl de agua y se conservó a – 20 °C.

- *Buffer* de lisis: 50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% SDS; 10 mM β -mercaptoetanol (2-ME).
- Solución III: 11% ácido acético; 3 M acetato de potasio.

3.3.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir del ADN genómico extraído de las plantas a genotipear se realizaron, mediante la técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*), amplificaciones de fragmentos de los genes de interés utilizando la polimerasa Taq (Invitrogen, California, USA) según las indicaciones del proveedor. Para la genotipificación de cada línea mutante de inserción se diseñaron dos *primers* (PD y PI) específicos para la secuencia flanqueante a la inserción (ver Fig. 3.2). Para determinar la presencia o no de cada gen se efectuaron dos reacciones de PCR. La primera, con los *primers* PI+PD, que pone de manifiesto el alelo WT y por lo tanto sólo estará presente en plantas WT y heterocigotas. La segunda, con los *primers* PD + Lba1 (que se une al borde izquierdo del T-ADN), evidencia que el alelo sufrió la inserción y está presente en plantas homocigotas y heterocigotas para la inserción (esta PCR no se realiza para *cry1-304* porque no es un mutante de inserción) (Fig. 3.2).

Para identificar el alelo WT del gen *GPA1* se usaron los *primers*: PD 5'-TACCAAGGACATCGCTGAGG-3' y PI 5'-TGTCCTACTCTATCCGGCGC-3'. Para el alelo WT del gen *CRY1* se usaron los *primers*: PD 5'-ATGTCTGGTTCTGTATCTG-3' y PI 5'-TGTCCTACTCTATCCGGCGC-3'. La secuencia del *primer* Lba1 es 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'

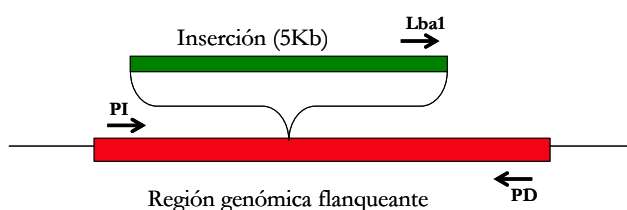


Figura 3.2. Esquema de la disposición de *primers* para genotipificar la inserción de ADN-T. En rojo se representa el fragmento de ADN genómica donde se inserta el ADN-T (en verde). Con flechas se señalan las regiones a las que se unen los *primers*.

3.3.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Las plántulas fueron cosechadas y disgregadas con mortero en N_2 líquido. La extracción de ARN total se llevó a cabo usando el *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Para la síntesis de ADNc se utilizaron 3 μ g de ARN previamente tratados durante 15 min con DNasa RQ1 RNasa-Free (Promega, Madison, WI, USA). La transcripción reversa se realizó en 25 μ l de reacción utilizando la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia

murina (MMLV-RT, Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando como *primers* Oligo(dT). Las muestras se guardaron a -20°C hasta el momento de su uso.

3.3.3 Electroforesis en geles de agarosa para ADN, ADNc y ARN.

Para la separación y visualización de las purificaciones de ARN total de la planta, de ADN plasmídico y de los productos de PCR y RT-PCR se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1 -1,5 / en TAE 1X que contenía bromuro de etidio 0,5 mg/ml. Las muestras se sembraron con *Buffer* de siembra para ADN 6x y en el caso de ARN se sembró ARN: *Buffer*: formamida en relación 1:1:1. Las corridas se realizaron a 80 V constante en TAE 1X.

- TAE 50X: 242 g de Tris Base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8 en 1 L de agua destilada.
- *Buffer* de siembra para ADN 6x: Azul de bromofenol (BPB) 0,25/ (p/v) o xilencianol 0,25/ (p/v) y glicerol 30/ (v/v) en agua. En un gel de agarosa 1/ (p/v) en TAE 1X, el BPB migra como un fragmento de ADN de aproximadamente 300 pb y el xilencianol lo hace como un fragmento de 4.000 pb.

3.3.4 RT-PCR semi-cuantitativa de GPA1

La expresión del transcripto de *GPA1* se analizó a partir de ADNc utilizando los mismos *primers* que se usaron para genotipar (PI y PD) y se describieron anteriormente. Como control de carga se utilizó *ACTINA8* (AT1G49240) utilizando los *primers* 5' - ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA-3' y 5'-GTTTTTATCCGAGTTTGAAGAGGC-3'. Las amplificaciones de cada ADN copia (ADNc) específico fueron realizadas utilizando la polimerasa Taq *Platinum* (Invitrogen, California, USA), según las indicaciones del proveedor, en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, USA). Las condiciones de ciclado fueron: 94 °C durante 5 min, 30 (o 35) ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 1 min a 72 °C. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 1/ en 1x TAE que contenía bromuro de etidio 0,5 mg/ml.

3.3.5 Extracción de proteínas totales: protocolo 1

Plántulas de genotipo WT y de los simples mutantes *gpa1* y *cry1* fueron crecidas en placas de Petri en oscuridad a 20 ± 1 °C durante 3 días. Se cosecharon aproximadamente 300 mg de plántulas bajo luz verde tenue, colocándose inmediatamente en N₂ líquido. Se homogeneizó el tejido en presencia de N₂ líquido en morteros hasta obtener un fino polvo claro que se resuspendió en 500 µl de *Buffer* de extracción. Se centrifugó 15 min a 13.000 g

para eliminar los restos celulares y se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante.

- *Buffer* de extracción: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA, 1 mM DTT; 0,1 / Tritón X-100 y 1x *Roche complete protease inhibitor* (Roche, Molecular Biochemicals)

3.3.6 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos obtenidos, se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó una microplaca de 96 pocillos y se realizaron las siguientes mezclas por triplicado:

- *Muestras*: 200 μ l de reactivo de Bradford + 10 μ l de la dilución de la muestra.
- *Curva Patrón*: 200 μ l de reactivo de Bradford + 10 μ l de soluciones de BSA (seroalbúmina bovina) de concentración conocida (0,05–0,1–0,2–0,3–0,4–0,5 μ g/ μ l).
- *Blanco de Lectura*: 200 μ l de reactivo de Bradford + 10 μ l de agua.

Las lecturas de absorbancia se hicieron a 580 nm en un equipo lector de ELISA. A continuación, se construyó una curva de A580 nm *versus* masa (μ g) de BSA y a partir de ella se obtuvo el valor de μ g de proteínas presentes en los 10 μ l de la dilución de la muestra.

3.3.7 Ensayo de unión de GTP

Para los ensayos de unión de GTP se extrajeron proteínas totales mediante el protocolo 1. Se mezclaron 100 μ g de proteínas con 80 μ l de *Buffer* de reacción que se llevó con agua a 180 μ l finales. Luego se agregaron 20 μ l de *Buffer* de iniciación y se incubó la reacción 1, 2, 5, 10 o 15 min bajo luz blanca, o 10 min en oscuridad a temperatura ambiente (luego de los tratamientos de luz blanca durante 1, 2 o 5 min se incubó 10 min en oscuridad). Para frenar la reacción se agregaron 2 ml de *Buffer stop* frío. La reacción se filtró con discos de nitrocelulosa 0,45 μ m usando una bomba de vacío. Los discos fueron lavados 5 veces con 2 ml de *Buffer stop* y secados. Luego fueron colocados en viales con 2 ml de solución de centelleo. Las cuentas por minuto (cpm) fueron medidas con un contador de centelleo. La unión no específica de GTP fue estimada de dos modos, usando como blanco el *Buffer* de extracción (sin proteínas) o 100 μ g de proteína calentada a 95°C por 10 min. No se observó diferencias en la unión de GTP entre los 2 blancos.

- *Buffer* de reacción: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT (ditiotreitól); 0,1/ Tritón X-100.
- *Buffer* de iniciación: GTP- γ S³⁵, 300.000 cpm; 10 mM MgCl₂; 0,1/ Tritón X-100.

- *Buffer stop* frío: 20 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 25 mM MgCl₂ y 1 mM PBS (*Buffer* fosfato salino).

3.3.8 Electroforesis de proteínas

Las muestras fueron separadas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE, *Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis*) 10-12 / (p/v) de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se armaron y se corrieron en el equipo de electroforesis *Hoefler Mighty Small II Mini Vertical* (Fisher Scientific).

En geles monodimensionales, antes de la electroforesis se agregó a cada muestra *buffer* de siembra 5X, se incubó durante 10 min a 95 °C. La corrida electroforética se realizó a 15 y 25 mA de corriente constante para el gel concentrador y separador, respectivamente. Como *buffer* de corrida se usó Tris-Glicina-SDS 1x y como marcadores de peso molecular se empleó el marcador pre-teñido p7708S de amplio rango (New England BioLabs, Beverly, MA, USA).

- *Buffer* de siembra 5x: 10 / SDS; 50 / Glicerol; 25 / 2-ME; 125 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,004 / BPB.
- Tris-Glicina 10x: 30,3 g de Tris Base y 144 g de glicina en 1 L de agua destilada.
- Tris-Glicina-SDS 1x: 1 L de *buffer* Tris-Glicina 1x, 10 ml de SDS 10 / (p/v).

3.3.9 Tinción de geles SDS-PAGE con solución de *Coomassie Blue*

Luego de la corrida electroforética las proteínas separadas en los geles fueron teñidas por la técnica de *Coomassie Coloidal* que es más sensible que la tinción tradicional por *Coomassie blue*, generando un fondo de reacción inespecífica mucho menor. Para esto los geles fueron incubados ON (toda la noche, *overnight*) en 50 ml de una solución compuesta de: 40 ml *Coomassie brilliant blue* G250 5 / + 10 ml metanol. El gel fue lavado con agua desionizada durante 24-48 h. Esta tinción con *Coomassie* es capaz de detectar desde 10 ng de proteínas (Kang *et al.*, 2002).

- *Coomassie brilliant blue* G250 5 / : 0,5 gr *Coomassie* G-250; 0,5 gr sulfato de amonio; 5,8 ml de ácido fosfórico 85 / en 400 ml de agua desionizada.

3.3.10 *Western blots* de GPA1

Se crecieron 3 días en oscuridad plántulas de los genotipos WT (Col y Ler) y los simples mutantes: *gpa1*, *cry1-304*, *cry1*, *cry1-1* y *phyB*. Se cosecharon y se extrajeron proteínas totales mediante el protocolo 1. Sesenta gramos de proteínas se corrieron en geles SDS-PAGE 10 / (20 mA por 2 h) y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, GE Healthcare) usando un equipo de transferencia húmeda (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

CA, USA) a 100 Volts 1 h. Luego las membranas se tiñeron con el colorante Ponceau S para verificar la correcta transferencia de las proteínas.

Las membranas se incubaron ON a 4 °C con *Buffer* de bloqueo. Luego se incubaron 1 h a temperatura ambiente, con el anticuerpo policlonal (NC9572) generado contra GPA1 1/2000 (Anti-GPA1) (Chen *et al.*, 2006a) o con el anticuerpo policlonal anti-transducina (AS/7) 1/1000 (Goldsmith *et al.*, 1987), ambos diluidos en *Buffer* de bloqueo. Se lavaron las membranas con 1x TBS-1 / Tween-20 (4 veces, 10 min cada vez) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con IgG anti-conejo conjugado a peroxidasa de rabanito diluido 1/4000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Se volvieron a lavar las membranas 4 veces y luego se revelaron con quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare). Se cubrió la membrana con la mezcla reveladora durante 1 min y luego, en oscuridad, se la expuso a una placa radiográfica (Kodak).

- *Buffer* de transferencia: *Buffer* Tris-Glicina 1X con el agregado de metanol 20 / (v/v).
- Ponceau S: 0,1 / (p/v) Ponceau S en ácido acético 5 / (v/v).
- TBS 10X: 30,3 g Tris Base y 90 g de NaCl en 1 L de agua destilada. Llevado a pH 8,0 con HCl.
- TBS 1X-Tween-20: 1 / (v/v) Tween-20 en TBS 1X.
- *Buffer* de bloqueo: 2X TBS; 0,2 / (v/v) Tritón X-100; 4 / (p/v) leche descremada y 2 / (p/v) glicina.

3.3.11 Purificación de ADN plasmídico

En el laboratorio se encontraban clonados el ADNc de *GPA1* en el plásmido pGEX-4T-3 con la etiqueta GST en el extremo N-terminal (GST-GPA1) y el ADNc de *CRY1* en el plásmido pRSETb.

Se realizaron mini-preparaciones empleando el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) modificado. 5-7ml de un cultivo bacteriano realizado en medio LB líquido (con el antibiótico necesario para la selección del vector de interés), crecido a 37 °C ON con agitación, se centrifugó a 3.000 *g* durante 15 min a 4°C. El *pellet* se resuspendió en 200 µl de Solución I y se agregaron 300 µl de Solución II, preparada en el momento, tras lo cual se mezcló suavemente por inversión y se dejó 5 min en hielo. La lisis se detuvo con el agregado de 300 µl de Solución III, se mezcló suavemente y se dejó en hielo 5 min (neutralización). Luego de centrifugar a 16.000 *g* por 10-20 min a temperatura ambiente, para eliminar el ADN cromosómico, se agregó al sobrenadante ARNasa A (libre de ADNasa) a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó por 0,5-1 h a 37 °C. Se realizaron dos extracciones con 400 µl de cloroformo. De la fase acuosa se precipitó el ADN plasmídico agregando 1 volumen de

isopropanol y centrifugando a 16.000 *g* durante 10-20 min a 4 °C. El *pellet* se lavó con 500 µl de etanol 70/ (v/v). Se dejó secar, se resuspendió en 15-25 µl de agua destilada estéril y se guardó a -20°C hasta ser utilizado.

- Solución I (*Buffer* TGE): Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glucosa 50 mM y EDTA 10 mM en agua.
- Solución II: NaOH 0,2 M y SDS 1/ (p/v) en agua.
- Solución III: Acetato de sodio 3 M pH 4,8 en agua.

3.3.12 Transformación bacteriana

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5α competentes preparadas con el método Inoue (Sambrook y Russell, 2010) con los plásmidos a utilizar para la expresión de GST-GPA1 y GST (pGEX) y para la expresión de CRY1 (pRSETb). Para esto se preparó una mezcla de 50 µl de bacterias competentes y 2 µl de ligada y se la conservó en hielo durante 30 min. Luego se aplicó durante 1 min y 30 seg un *shock* térmico de 42 °C e inmediatamente se sumergió el tubo en hielo. A continuación se rescataron las células con 800 µl de medio SOC y se incubaron sin antibiótico a 37 °C durante 1 h. Pasado este tiempo, se rastrillaron 100 µl de la solución bacteriana en placas de Petri con LB-agar y el antibiótico ampicilina 50 µg/ml, que es el agente de selección para los plásmidos utilizados. Se incubaron durante 16 h a 37 °C en oscuridad y posteriormente se observó la formación de colonias.

- LB-agar: 10gr de triptona, 10 gr de NaCl y 5 gr de extracto de levadura en un litro de agua bidestilada. 15g de Agar.
- Medio SOC: 2/ peptona; 0,5/ extracto de levadura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂-6H₂O; 20 mM glucosa.

3.3.13 Expresión in vitro de GST-GPA1 y CRY1-S³⁵

La expresión de CRY1 se llevó a cabo a partir de una preparación plasmídica del pRSETb-CRY1, linealizada con EcoRI, utilizando el *Kit TNT Quick Coupled Transcription/Translation System*TM (Promega, Madison, WI, USA) en presencia de ³⁵S-Metionina siguiendo las instrucciones del proveedor por lo que la proteína CRY1 quedó marcada radiactivamente (CRY*).

Para la expresión de GST-GPA1 se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5α como se detalló anteriormente con el plásmido pGEX-4T-3 dónde estaba clonado GPA1. Luego se picaron bacterias de colonias aisladas y se largaron cultivos ON en 10 ml de medio LB-Ampicilina. Se tomaron 2 ml de estos cultivos y se largaron cultivos de 500 ml. Cuando los cultivos llegaron a una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,4 se las indujo con 0,1 mM IPTG

(Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido) durante 4 h a 30 °C. Los cultivos se centrifugaron 15 min a 5.000 *g*. El *pellet* obtenido se guardó a -70 °C hasta que se prosiguiera a la purificación.

La proteína GST-GPA1 se purificó utilizando *Glutathione-Sepharose 4BTM* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), bajo condiciones no desnaturalizantes, siguiendo las instrucciones de los proveedores.

3.3.14 Co-inmunoprecipitación

Se incubaron 30 μ g de GST-GPA1 con 20 μ l de la reacción de TNT (CRY1*) y 2 μ l del anticuerpo Anti-GST (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) en 100 μ l de *Buffer* de unión 2X en un volumen final de 200 μ l por 2 h a 4 °C con agitación suave (también se ensayó incubar 30 min a 37 °C). El complejo anticuerpo-antígeno fue precipitado con Proteína G-agarosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Se centrifugó 1 min a 0,8 rpm y se lavó 3 veces el inmunoprecipitado con *Buffer* de lavado (*Buffer* de unión 1X sin BSA). El precipitado del último lavado se trató con *Buffer* de siembra 5X a 95 °C por 15 min, se centrifugó 10.000 *g* y el sobrenadante se separó electroforéticamente por SDS-PAGE 10 / . Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, GE Healthcare) por el método de transferencia semiseca. Para obtener la señal radiactiva (CRY1*), se utilizó el sistema de autorradiografías sin film *Storm 820 PhosphorImager* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). La presencia de GST-GPA1 se determinó mediante *Westerns blots* usando el anticuerpo anti-GST diluido 1/3000 como anticuerpo primario. Como control negativo de la co-inmunoprecipitación se realizó el mismo experimento pero con GST en lugar de GST-GPA1.

- *Buffer* de unión 2X: 2X PBS suplementado con 0,2 / v/v NP-40; 0,1 / m/v BSA, y 1x *Roche complete protease inhibitor* (Roche, Molecular Biochemicals)

3.3.15 Extracción de proteínas totales: protocolo 2 y 3

Para plántulas desetiadas usamos un protocolo que genera muestras proteicas de alta pureza donde las proteínas se separan de los polisacáridos y otros contaminantes solubles en agua. Está basado en la solubilización de las proteínas en fenol seguida de la precipitación con acetato de amonio en metanol (Isaacson *et al.*, 2006). En la bibliografía se sugiere que el mismo permite resolver en geles 2D un mayor número de *spots* y a pHs más básicos que otros protocolos basados por ejemplo en el uso de TCA (tricloroacético) (Isaacson *et al.*, 2006). Para plántulas etioladas usamos el protocolo de TCA-Acetona.

3.3.15.1 Protocolo 2: Extracción con fenol

Se homogeneizaron aproximadamente 3 gr de tejido en N₂ líquido hasta obtener un fino polvo claro. Se resuspendieron en *Buffer* de extracción (BE) frío (cada 1 gr de tejido 3 ml de BE). Se agregó un volumen igual de fenol saturado y se incubó en agitación a 4 °C durante 30 min. Se centrifugó a 5.000 *g* durante 30 min a 4 °C. La fase acuosa, donde se solubilizaban ácidos nucleicos y carbohidratos, era más densa que la fase fenólica entonces quedaba en el fondo del tubo mientras que la fase fenólica, que contenía las proteínas junto con pigmentos y lípidos, quedaba en la parte superior de tubo. Se tomó la fase fenólica y se le agregó 1 volumen de BE y se repitió el protocolo 2 veces más. La última vez que se tomó la fase fenólica y se la mezcló con 5 volúmenes de 0,1 M acetato de amonio en metanol frío. La mezcla se incubó ON a -20 °C para que precipiten las proteínas. Se centrifugó 30 min a 5.000 *g* a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 2 volúmenes de metanol frío para lavar el precipitado, se agitó y se centrifugó 10 min a 5.000 *g* a 4 °C. Estos lavados se repitieron 2 veces más con metanol. Luego se realizaron 2 lavados con acetona fría siguiendo el mismo esquema que con los lavados de metanol. Se dejó secar el precipitado y se resuspendieron las proteínas en 300 µl de *Buffer* de isoelectroenfoque (BIEF).

- BE: 0,7 M sacarosa; 0,1 M KCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 y 50 mM EDTA. Se le agrega 2-ME a una concentración final 2 / (v/v) antes de usar.
- Fenol Equilibrado a pH 8,0 con Tris-HCl.
- BIEF: 7 M urea, 2 M tiourea, 4 / (p/v) CHAPS (3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato).

3.3.15.2 Protocolo 3: Extracción con TCA-Acetona

El tejido fue homogeneizado en N₂ líquido hasta obtener un fino polvo claro (1,5 - 2 gramos de tejido etiolado resultó suficiente para correr un gel 2D de 7 cm de ancho). Se resuspendió en 5 ml de BE bien frío y se pasó por un homogeneizador de vidrio y posteriormente se lo llevó a un volumen final de 24 ml. Se filtró la muestra por 3 capas de Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA) y se dejó precipitando ON a -20 °C. Se centrifugó a 40.000 *g* durante 1 h a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se lavó con Acetona 0,07 / 2-ME fría, se centrifugó 10 min a 40.000 *g* a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar aproximadamente 5 min. Luego se lo resuspendió en 100 µl de BIEF (ver composición en la sección 3.3.15.1).

- BE: 10 / (v/v) TCA en Acetona. Antes de usar se agrega 2-ME a una concentración final de 0,07 / (v/v).

- Acetona fría; 0,07 / (v/v) 2-ME (agregado antes de usar).

3.3.16 Geles Bidimensionales (2D)

Para obtener los geles 2D seguimos los siguientes pasos: (1) Hidratación de las tiras comerciales (*Immobiline DryStrip GE Healthcare*) y cargado de las muestras; (2) primera dimensión (isoelectroenfoque); (3) equilibrado de las tiras comerciales; (4) segunda dimensión (SDS-PAGE); (5) tinción de los geles, (6) adquisición de las imágenes y detección de *spots*, (7) análisis estadístico. El paso 4 es una modificación de la técnica que se detalló en 3.3.8 y el paso 5 se llevó a cabo tal cual se detalla en la sección 3.3.9.

3.3.16.1 Hidratación de las tiras comerciales

Las tiras comerciales son geles que poseen un gradiente de pH inmovilizado, las proteínas migran hasta que su pI (punto isoeléctrico) coincide con alguno de los pH presentes en la tira. En los ensayos realizados se utilizaron tiras comerciales de 7 cm con rangos de pH lineales de 3-10 y 4-7. Y tiras de 13 cm con rangos de pH lineal de 4-7 y no lineal de 3-10 (estas últimas tiras fueron utilizadas para las proteínas nucleares).

Antes de sembrar las muestras en las tiras se prepararon como se detalla a continuación:

- Preparación para el sembrado en tiras de 7 cm, pH 3-10, se prepararon 200 µg de proteínas totales en 125 µl de volumen final de BIEF suplementado con 60 mM DTT; 0,5 / (p/v) de anfolitos pH 3-10, 0,01 / (p/v) BPB.
- Preparación para el sembrado en tiras de 7 cm, pH 4-7, se prepararon 200 µg de proteínas totales en 125 µl de volumen final de BIEF suplementado con 10 mM DTT, 0,5 / p/v de anfolitos pH 4-7, 1,2 / *DeStreak Reagent* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), 0,01 / BPB.
- Preparación para el sembrado en tiras de 13 cm con intervalo de pH 4-7 se prepararon 450 µg de proteínas totales en un volumen final de 250 µl con 10 mM DTT, 0,5 / p/v de anfolitos pH 4-7, 1,2 / *DeStreak Reagent*, 0,01 / BPB.

Las muestras preparadas fueron incubadas 1 h a 30 °C y se la centrifugó a 10.000 *g* 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de cada muestra fue colocado por separado en cada una de las calles del *Immobilin DryStrip Reswelling Trays* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Luego se colocaron las tiras comerciales con la parte del gel hacia abajo en las calles que contenían las muestras. Se cubrió cada una de las calles con 3 ml de aceite mineral (*Drystrip cover fluid*, Amersham Biosciences, USA) para prevenir la evaporación de la muestra

y la cristalización de la urea. Se incubaron 16 h a 30 °C para permitir la hidratación de las tiras.

Las proteínas de extractos nucleares se sembraron mediante otro método que se denomina *cup loading*, según las instrucciones que se encuentran en el Manual “2-D Electrophoresis: Principles and Methods” de GE-Healthcare (<http://www.med.unc.edu/sysprot/files/2D/20Manual/20from/20GE.pdf>). En este caso se realiza la hidratación de la tira ON con BIEF y la muestra se siembra al principio de la corrida mediante pocillos que se colocan en el extremo catódico o anódico del gel, nosotros los colocamos en el extremo anódico.

3.3.16.2 Primera dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Una vez completado el proceso de hidratación se colocaron las tiras comerciales con el gel hacia arriba en las calles del *Manifold* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Se colocaron en los extremos de las tiras papeles hidratados con 200 µl de agua desionizada. Se aseguraron los electrodos en el *Manifold*. Se cubrieron las calles del *Manifold* donde estaban las tiras con aceite mineral hasta cubrir totalmente la calle. El IEF se llevó a cabo en un sistema Ettan IPGphor 3 (Amersham Biosciences, USA). Para las tiras de 7 cm, pH 3-10, el IEF se llevó a cabo hasta un voltaje total de 8.000 V, para las tiras de 7 cm, pH 4-7, el IEF se llevó a cabo hasta un voltaje total de 6.600 V y para las tiras de 13 cm, pH 4-7, el IEF se llevó a cabo hasta un voltaje total de 19.800 V. El protocolo de corrida en cada caso fue el sugerido en el Manual “2-D Electrophoresis: Principles and Methods” de GE-Healthcare. Finalizada la corrida, las tiras se guardaron a -80 °C.

3.3.16.3 Equilibrado de las muestras

Las proteínas enfocadas en la tira se encuentran sin carga neta y no pueden migrar en una electroforesis SDS-PAGE. Entonces para cargar negativamente las proteínas antes de la electroforesis en SDS-PAGE, las tiras fueron incubadas a temperatura ambiente con agitación suave durante 20 min en 4 ml de *Buffer* de equilibrio (BEI) con 40 mg de DTT (para reducir los grupos tioles de las proteínas). Luego se traspasó la tira a 4 ml de BEI con 180 mg de yodoacetamida (para alquilar los grupos tioles de modo no reversible y reaccionar con el exceso de DTT) y 0,01% BPB, y se lo agitó a temperatura ambiente 20 min. Luego se procedió inmediatamente a correr la segunda dimensión.

- BEI: 50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M urea; 30% glicerol; 2% SDS; 0,01% BPB.

3.3.16.4 Segunda Dimensión: SDS-PAGE

Para la segunda dimensión se utilizaron geles 10 o 12 / de acrilamida-bisacrilamida, según se señala en cada caso. La tira comercial se sumergió 3 veces en *buffer* de corrida Tris-Glicina 1X - SDS 0,15 / . En la calle del gel, se colocó la tira y se cubrió con una solución que contenía 1 ml de agarosa 0,5 / fundida en *Buffer* de corrida y 30 μ l BPB. Una vez solidificada la agarosa, se armó el dispositivo de geles, y se comenzó la corrida. Los geles se corrieron a 12 mA, 1 h y luego a 25 mA. Como *buffer* de electroforesis, se utilizó Tris Glicina 1X, SDS 0,15 / .

3.3.16.5 Adquisición de imágenes y detección de *spots*

Los geles fueron teñidos con una solución de *Coomassie* (ver punto 3.3.9) y una vez desteñidos con agua desionizada fueron escaneados utilizando el *Image Scanner III* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) con una resolución de 300 dpi (*dots per inch*) en escala de grises. Las imágenes se analizaron utilizando el programa *Image Master 2D Platinum* versión 7.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Con este programa se detectaron los *spots*, se cuantificaron y se realizó el *match* entre los *spots* de los diferentes geles. Para compensar las posibles variaciones experimentales (por ejemplo cantidad de proteína que se cargó en cada gel o diferencias en la tinción entre geles) se utilizó como parámetro de comparación al volumen normalizado (\int vol) de cada *spot*.

3.3.16.6 Análisis estadísticos de los geles 2D

Se generaron listas con los \int vol de los *spots* de los geles a comparar y se las utilizaron para los análisis estadísticos. Se trabajó con el paquete estadístico Limma (Smyth, 2005) dentro del entorno R. Para el análisis se seleccionaron sólo aquellos *spots* que estaban presentes en al menos 3 geles de las muestras WT y en 3 geles de las muestras del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* de los 4 geles totales realizados para cada genotipo. El \int vol se transformó a Log (\int vol) (datos crudos) y se normalizó entre geles utilizando 2 algoritmos típicamente utilizados para la normalización de datos de microarreglos (*Quantile* y *Scale*) (Smyth y Speed, 2003) pero que también se usan en análisis proteómicos (Kultima *et al.*, 2006). Una normalización óptima se logró con el algoritmo *Quantile* porque se obtuvieron varianzas similares entre los geles (mismo tamaño de cajas) (Fig. 3.3). Los datos normalizados fueron ajustados a un modelo lineal usando la función *lmFit* Limma (Smyth, 2005) y el método empírico de Bayes (Smyth, 2004) se utilizó para comparar los *spots*. Aquellos *spots* con un p-valor < 0,05 y una tasa de cambio (FC, del inglés *fold change*) > 1,5 se consideraron

diferencialmente expresados. Sólo *spots* que se observaban claramente como picos únicos se cortaron para ser analizados en el servicio de MS del CEQUIBIEM (www.qb.fcen.uba.ar/cequibiem), donde se utiliza un espectrómetro MALDI-TOF/TOF (Desorción/ionización láser asistida por una matriz-tiempo de vuelo/tiempo de vuelo, del inglés *Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time Of Flight/Time Of Flight*).

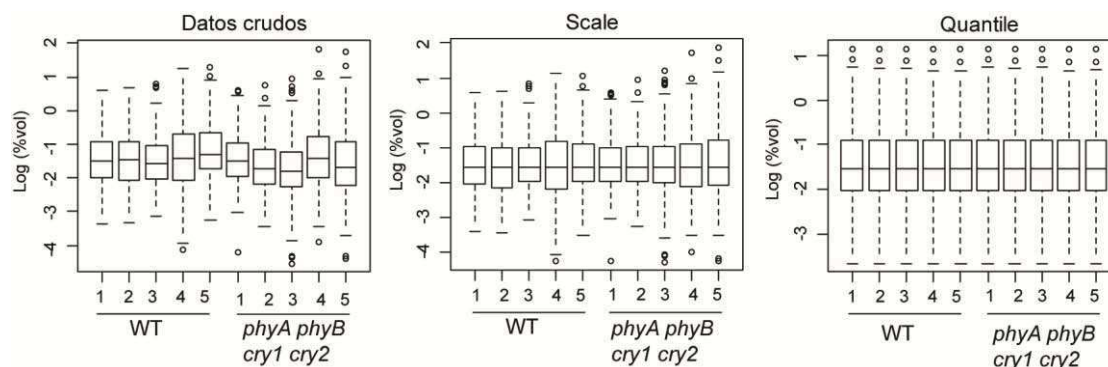


Figura 3.3. Comparación de la distribución de *spots* en cada gel con los datos crudos y normalizados por los algoritmos *Scale* y *Quantile*. Este análisis corresponde a los geles de plántulas etioladas, pero en las demás comparaciones realizadas se observó un comportamiento similar.

3.3.16.7 Análisis bioinformáticos de las proteínas identificadas

Para determinar que GO (ontologías genéticas) se encontraban estadísticamente sobre-representadas utilizamos el complemento BiNGO en la interfase de *Cytoscape*, que es un software de uso libre útil para visualizar e integrar redes (Maere *et al.*, 2005).

Para construir las redes usamos GeneMANIA (<http://www.genemania.org/>). Este programa contiene una amplia base de datos que permite predecir asociación funcional entre genes. Contiene datos de interacción proteína-proteína, proteína-ADN e interacciones génicas, datos de co-expresión de ARNm y proteínas, de co-localización e información sobre los dominios de las proteínas. La red generada la visualizamos con *Cytoscape* y utilizamos un complemento del programa para analizar la topología de la red. Para analizar datos de microarreglos disponibles *on-line* usamos *Genevestigator* (www.genevestigator.com/gv).

3.3.17 Enriquecimiento en proteínas nucleares

Esta sección de la tesis se realizó mediante una colaboración con el Laboratorio de la Dra. Mattei en la Universidad *La Sapienza* de Roma, Italia. Semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Ler* esterilizadas se sembraron en MS 0,5X- agar 0,8 / suplementado con sacarosa 0,5 / . Se estratificaron entre 2 y 3 días a 4 °C en oscuridad. Luego se colocaron en cámaras bajo luz continua a 22 °C y se cosecharon en el estadio 1.02. Apenas cosechadas las plántulas

se congelaron en N₂ líquido, se procesaron en el momento o se guardó el tejido a -80 °C hasta su procesamiento.

3.3.17.1 Aislamiento de núcleos

El protocolo de aislamiento se desarrolló usando de base los ya publicados por Folta y Kaufman (2006), y por Calikowski y Meier (2006). Se homogeneizaron 5-7 gr de tejido en N₂ líquido hasta obtener un fino polvo. Se descongeló a 4 °C en continua agitación en 20-25 ml de BE. Se agregó 0,625 ml de Tritón X-100 25 / (v/v) lentamente en continua agitación (5 min). Se filtró con una capa de Miracloth (Calbiochem, San Diego, CA, USA) y luego con 3 capas (previamente bañadas con BE frío). Se llevó a 30 ml finales con BE y se le agregó 0,625 ml de Tritón X-100 25 / (v/v) para llegar a una concentración final de 1 / . Se centrifugó a 1.000 g 10 min a 4 °C en un rotor basculante (centrífuga Universal320R, Hettich, rotor 1617). Se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 10 ml de Percoll 80 / en *Buffer* de gradiente (BG). El gradiente discontinuo se montó en una cámara fría (4 °C) del siguiente modo: con una pipeta pasteur se colocó lenta y sucesivamente 10 ml de Percoll 80 / , 10 ml del 60 / , 10 ml del 30 / , 10 ml 0 / (BG 1X). Se centrifugó en un rotor basculante a 1.000 g durante 100 min. La fracción nuclear, que se encontraba en la interfase 30-60 / , se tomó con una pipeta pasteur y se resuspendió en 20 ml de BG. Con una pipeta pasteur se agregaron en el fondo del tubo 6 ml de Percoll 30 / y se centrifugó a 2.000 g durante 10 min, el *pellet* se resuspendió en 20 ml de BG. Se centrifugó a 850 g 10 min, se descartó el sobrenadante tratando de no disturbar el *pellet*. El *pellet* se resuspendió en el sobrenadante residual y se pasó a un microtubo (a este punto se tomaron 2 µl para la microscopía de fluorescencia), se centrifugó nuevamente a 850 g 10 min y se eliminó el sobrenadante. Los núcleos se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

- BE: 1 M hexilenglicol (2-metil-2,4-pentanodiol); 20 mM PIPES-KOH (pH 7,0); 10 mM MgCl₂ y 5 mM 2-ME.
- BG: 0,5 M hexilenglicol; 5 mM PIPES-KOH (pH 7,0), 10 mM MgCl₂; 5 mM 2-ME y 1 / Tritón X-100. El BG se prepara 5X y se diluye para obtener las distintas soluciones de gradiente.

3.3.17.2 Tinción con DAPI

Se observaron los núcleos realizando la tinción específica de los mismos con 4',6-diamidino-2-fenil indol (DAPI). 2 µl de la fracción nuclear se tiñó durante 10 min con 3 µg/ml DAPI en 0,1 M PBS pH 7,4 en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se lavó con PBS. Para

la obtención de las imágenes microscópicas, 8 μ l de la suspensión se observaron a 40X y 100X. Las imágenes se tomaron con filtro UV.

3.3.17.3 Protocolo 4: Extracción de proteínas nucleares

Las proteínas nucleares fueron extraídas usando el reactivo *Iso-RNA Lysis Buffer* (5Prime), que es una solución a base de fenol y tiocianato de guanidina, siguiendo las instrucciones del fabricante con las modificaciones propuestas por Kirkland *et al.* (2006). Brevemente, la fracción nuclear se resuspendió en *Iso-RNA Lysis Buffer*, cada 120 mg de fracción nuclear 1 ml de *Buffer*. La muestra se sonicó durante 3 min en hielo y se agitó vigorosamente 10 min a temperatura ambiente para romper completamente las membranas nucleares. La mezcla se incubó a temperatura ambiente sin agitación 5 min. Luego se agregaron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de *Buffer* inicial, se agitó vigorosamente 15 seg y se dejó reposar 5 min para que se separen lentamente las fases. Se centrifugó a 12.000 *g* 15 min a 4 °C y se removió la fase acuosa superior que contenía el ARN. La fase fenólica se mezcló por inversión con 0,3 ml de etanol 100% por cada ml de *Buffer* inicial para precipitar el ADN y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Luego se centrifugó a 12.000 *g* 5 min a 4 °C, quedando en la fase inferior el ADN. Se tomó la fase superior y las proteínas se precipitaron con 1,5 ml de isopropanol por cada ml de *Buffer* inicial. La muestra se incubó a temperatura ambiente 15 min y se centrifugó a 12.000 *g* 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el precipitado de proteínas se rompió mecánicamente con una punta de plástico. Se agregaron 2 ml de 300 mM hidrocloreuro de guanidina en etanol 95 / (v/v), se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y se centrifugó a 12.000 *g* durante 5 min a 4 °C. Este paso se realizó 4 veces para remover el fenol residual. Luego la muestra se lavó 2 veces con 2 ml de Acetona fría para remover sales residuales y se dejó secar en contacto con el aire. El precipitado se resuspendió en BIEF, se cuantificó y se guardó a -80 °C hasta su uso.

- BIEF: 1 mM Tris-HCl pH 8,0; 7 M urea, 2 M tiourea; 1 / (p/v) ASB-14 y 2 / (p/v) CHAPS.

3.3.17.4 Western Blots de proteínas nucleares

Se corrieron aproximadamente 10 μ g de proteínas totales y 10 μ g de proteínas nucleares por duplicado en geles SDS-PAGE. Una mitad se tiñó con *Coomassie* y la otra se transfirió como se detalla en la sección 3.3.10. Los *Western Blots* también se realizaron como se indica en dicha sección, primero usando como anticuerpo primario anti-histona4 1/1000 y como secundario IgG anti-conejo conjugado a peroxidasa de rabanito diluido 1/4000, y luego usando como anticuerpo primario Anti-RubiscoL 1/1000 y como secundario IgG anti-conejo.

3.3.17.5 Nano-LC/ESI/MS/MS

Se corrieron extractos de proteínas en geles SDS-PAGE, se tiñeron con *Coomassie* G-250. Se cortaron diferentes bandas que fueron digeridas con tripsina y analizadas en un espectrómetro de masa Nano-LC/ESI/Orbitrap. Para identificar las proteínas se confrontaron los espectros obtenidos contra el proteoma de *Arabidopsis* usando el algoritmo de búsqueda *Sequest* (ThermoFisher). Usando el programa *SeqViewer* (<http://bbc.botany.utoronto.ca>) se clasificaron las proteínas según *Cellular component-GO*.

3.3.18 Differential in-gel electrophoresis (DIGE) y tinción con Pro-Q

Para analizar los extractos de proteínas nucleares utilizamos la técnica de geles 2D llamada DIGE. En esta técnica se marcan con diferentes fluoróforos (Cy3, Cy5 y Cy2) a los extractos proteicos y se los mezcla antes de largar la primera dimensión. Esto trae varias ventajas en comparación con los 2D tradicionales: al correr las proteínas de ambos genotipos en el mismo gel se disminuye la variabilidad aportada por realizar IEF en tiras de pH separados; además, el *match* entre *spots* es más simple y en cada gel se corre un *pool* de proteínas marcadas con un tercer fluoróforo (Cy2) lo que permite una mejor normalización entre geles; finalmente, los fluoróforos responden de modo lineal a la concentración de proteínas en un rango de 5 órdenes de magnitud mientras que con *Coomassie* el rango es de 3 órdenes de magnitud. Para el marcado de las proteínas utilizamos el *Kit CyDye DIGE fluor minimal* (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) siguiendo las instrucciones del comerciante. Realizamos 3 réplicas biológicas y una réplica técnica de cada réplica biológica con cambio de fluoróforo según el siguiente esquema:

GEL 1	GEL 2	GEL 3	GEL 4	GEL 5	GEL6
WT 1 - Cy5	WT 2 - Cy5	WT 1 - Cy5	WT 1 - Cy3	WT 2 - Cy3	WT 3 - Cy3
MUT3 - Cy3	MUT3 - Cy3	MUT2 - Cy3	MUT1 - Cy5	MUT3 - Cy5	MUT2 - Cy5
POOL - Cy2	POOL - Cy2	POOL - Cy2	POOL - Cy2	POOL - Cy2	POOL - Cy2

Luego de la marcación la electroforesis 2D se realizó como se detalló en la sección 3.3.16. La adquisición de imágenes se realizó con un *Typhoon TM 9410 imager* (GE Healthcare). Luego de escanear los geles, los teñimos con *Pro-Q Diamond* (Molecular Probe, Invitrogen), un fluoróforo específico de proteínas fosforiladas. Adquirimos las imágenes de los geles nuevamente en las mismas condiciones que para los geles de DIGE. La tinción específica del *Pro-Q Diamond* y el fluoróforo Cy3 tienen espectros similares de fluorescencia. Entonces las fosfoproteínas se detectan como *spots* con un aumento en la fluorescencia de Cy3 (Stasyk *et al.*, 2005, Fig. 3.4).

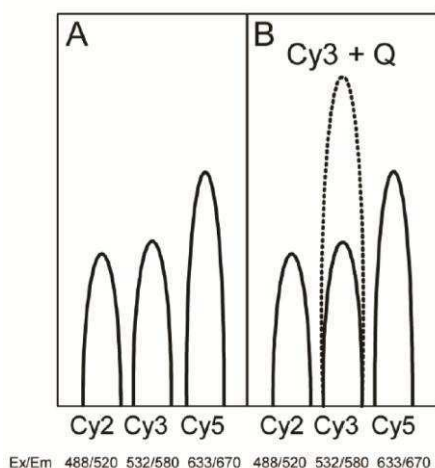


Figura 3.4. Principio de la combinación de los métodos de fluorescencia. **A.** El gel 2D con tres muestras marcadas con diferentes *CyDye DIGE minimal dyes* se escanea 3 veces, excitando cada vez un fluoróforo con una longitud de onda de emisión particular. **B.** Luego de la tinción específica con *Pro-Q Diamond* se vuelve a escanear a las mismas longitudes de onda, y las fosfoproteínas se detectan como un aumento en la intensidad del canal de Cy3 (Cy3 + Q). En la parte inferior se detallan las longitudes de onda de excitación y emisión de cada fluoróforo (Ex/Em). Imagen tomada de (Stasyk *et al.*, 2005).

El análisis de los geles se realizó usando el programa DeCyder BVA V 6.5 (GE Healthcare), un programa diseñado específicamente para ser usado con DIGE.

3.4 Ensayos fisiológicos

3.4.1 Mediciones del gancho apical y del largo del hipocotilo

Para la medición de la apertura del gancho apical, las semillas se sembraron en cajas transparentes cuadradas de plástico con MS 0,5X – agar 0,8 / suplementado en los casos indicados con sacarosa 1/ o glucosa 0,53/ como se explica en la sección 3.2. Luego del pulso de luz para inducir la germinación, se guardaron en oscuridad verticalmente a 21 °C. En los tiempos indicados se fotografiaron con una cámara Canon (Power Shot G9) bajo luz verde tenue. La apertura del gancho apical se midió utilizando el programa de libre acceso *ImageJ* 1.43u (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). En cada placa se midieron entre 5 y 8 plántulas de cada genotipo y la media de dichas mediciones se consideró una réplica biológica.

Para la medición del largo del hipocotilo de las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos lumínicos se utilizó una regla con una precisión de 0,5mm y se promediaron las mediciones de las 10 plantas más altas. Cada tratamiento se realizó como mínimo por triplicado y cada placa se consideró una réplica biológica (Fankhauser y Casal, 2004).

3.4.2 Medición de los niveles de Antocianas

Para la medición de antocianas semillas del genotipo WT (Col), los simples mutantes *cry1-304* y *gpa1-3* y el doble mutante *cry1 gpa1* fueron tratadas como se detalla en la sección 3.2. Luego del pulso de germinación, se dejaron en oscuridad 24 h y un grupo de placas quedó en oscuridad mientras que el otro se expuso a luz azul continua ($9 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, acrílico azul Paolini 2031) durante 3 días. Se cosecharon 50 plántulas de cada genotipo, se colocaron en 600 μl de una solución 1/ (v/v) HCl-Metanol, la mezcla se vortexeó durante pocos

segundos y se colocó 48 h a 4 °C en oscuridad. Luego se centrifugaron 1 min a máxima velocidad y se midió la absorbancia de la solución a 530 nm y 657 nm. La concentración de antocianinas ($\mu\text{g/ml}$) se calculó como $A_{530 \text{ nm}} - 0,25 \times A_{657 \text{ nm}}$, donde $0,25 \times A_{657 \text{ nm}}$ se utiliza para compensar la absorbancia a 530 nm de la clorofila y los productos derivados de su degradación (Mancinelli *et al.*, 1991).

3.4.3 Medición de los niveles de Clorofila

Para la medición de los niveles de clorofila de plántulas, semillas del genotipo WT (*Ler*) y del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fueron tratadas como se detalla en la sección 3.2 y crecidas en placas de Petri con MS 0,5X hasta el estadio 1.02 bajo luz continua. Luego se homogeneizaron 10 plántulas en Acetona 80 / , se centrifugó 5 min a máxima velocidad y se midió la absorbancia de la solución a 645 nm, 663 nm y 710 nm. La concentración de clorofila ($\mu\text{g/ml}$) se calculó como $8,02 \times (A_{663 \text{ nm}} - A_{710 \text{ nm}}) + 20,1 \times (A_{645 \text{ nm}} - A_{710 \text{ nm}})$ (Oyama *et al.*, 1997), se dividió por el número de plántulas para tener μg de clorofila por plántula. Paralelamente se midió el área verde de plántulas crecidas en el mismo momento (cotiledones más las 2 primeras hojas de la roseta de 5 plántulas) usando el programa *ImageJ* para estimar los μg de clorofila por unidad de área.

Para medir los niveles de clorofila de plantas adultas, se crecieron las plantas en macetas como se indica en la sección 3.2. El genotipo WT (*Ler*) se creció durante 44 días y el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* durante 44 y 65 días. Con un sacabocados se tomaron muestras de las hojas roseta y se extrajo la clorofila como se hizo con las plántulas.

3.4.4 Medición de la tasa fotosintética

Plantas WT *Ler* y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* se crecieron en macetas 44 o 65 días según se indica en cada experimento. El intercambio de CO_2 y la tasa de transpiración se midió con un sistema portátil Li-COR 6200 (LI-COR Inc., Lincoln, NE). El CO_2 de la celda de referencia se fijó en 400 ppm y el intercambio de CO_2 se midió a $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF (densidad de flujo de fotones fotosintéticos). El consumo neto de CO_2 y la tasa de transpiración se relativizó al área de las hojas utilizadas. Se analizaron dos grupos de 4 plantas crecidas en diferentes momentos. Estos experimentos se llevaron a cabo en colaboración con el Dr. Ploschuk de la Facultad de Agronomía (UBA).

3.4.5 Medición de la composición de ácidos grasos

Semillas del genotipo WT (*Ler*) y del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fueron tratadas como se detalla en la sección 3.2 y crecidas hasta el estadio 1.02 bajo luz continua y

cosechadas en N₂ líquido. La extracción de lípidos totales, transmetilación de los mismos y la medición mediante cromatografía gaseosa de la composición de ácidos grasos la realizó el Dr. Fernando García del INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata). Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes, y una réplica técnica de cada medición.

3.4.6 Ensayos de tolerancia al frío y al calor

Los ensayos de tolerancia al frío se realizaron con plántulas en el estadio 1.02 crecidas en macetas de los genotipos WT (*Ler*), simple mutante *phyB* y cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. Las plantas fueron colocadas en un congelador a -5 °C durante 4 h o 6,5 h. Una vez retiradas se dejaron descongelar. Cinco días después se contabilizó el número de plantas de cada genotipo que sobrevivieron.

Para los ensayos de tolerancia al calor semillas del genotipo WT (*Ler*), de los dobles mutantes *phyA phyB* y *cry1 cry2*, y del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fueron tratadas como se detalla en la sección 3.2 y crecidas hasta el estadio 1.02 bajo luz continua en placas de Petri con MS 0,5X bajo luz continua 22 °C hasta el estadio 1.02. Se trataron las placas durante 40 min a distintas temperaturas (40 °C, 43 °C y 44 °C) y un grupo control permaneció a 22 °C. Luego de 5 días se cosecharon 50 plántulas de cada genotipo y se las secó a 85°C durante 24 h. El peso seco promedio de 50 plántulas de cada placa se consideró una réplica biológica. El experimento se repitió al menos 5 veces para cada genotipo.

3.4.7 Ensayos de resistencia a la sequía

Plantas WT *Ler* y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* se crecieron en macetas de 3 cm de diámetro y, cuando alcanzaron estadio 1.03 (con 3 hojas de la roseta), se dejaron de regar durante 14 días. Cinco días después de retomado el riego se contabilizó cuántas plantas de cada genotipo habían sobrevivido. Cada bandeja con al menos 15 plantas de cada genotipo (3 plantas por maceta) se consideró una réplica biológica (se realizaron 4 réplicas biológicas).

3.4.8 Estadística en ensayos fisiológicos

Los datos se analizaron mediante Análisis de la Varianza (ANOVA). La homocedacea de los datos se comprobó mediante la prueba de Levene's y Normalidad se ensayó mediante la Prueba Shapiro-Wilks modificada. Cuando los datos crudos no cumplían alguno de estos dos supuestos se transformaron de modo tal que los cumplan antes de realizar el ANOVA. Estos análisis se realizaron utilizando la versión libre del programa estadístico INFOSTAT (<http://www.infostat.com.ar/>).

4 Capítulo I:

Estudio de la participación de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica GPA1 en la fototransducción de señales: Interacción genética entre *cry1* y GPA1 en *Arabidopsis thaliana*.

Introducción

Como mencionamos en la introducción, en el genoma de *Arabidopsis* se conoce sólo una $G\alpha$ canónica (*GPA1*), cuya expresión ha sido observada en todos los órganos y estadios del desarrollo de la planta (Ma *et al.*, 1990). Ensayos celulares, fisiológicos, genéticos y bioquímicos llevados a cabo en mutantes *gpa1*, sugieren que la subunidad α de la proteína G Heterotrimérica participa de la transducción de señales en numerosos procesos durante el desarrollo de *Arabidopsis*. Entre las respuestas más estudiadas se encuentra la participación de $G\alpha$ en vías de señalización de hormonas, principalmente en respuestas reguladas por ABA como son la germinación de la semilla (Pandey y Assmann, 2004; Pandey *et al.*, 2006) y la apertura de estomas (Wang *et al.*, 2001).

Durante la década de los 90 distintos trabajos han involucrado a la subunidad α de la proteína G heterotrimérica en la transducción de señales lumínicas en plantas tanto en respuesta a la luz R, RL como a la luz azul (Muschiatti *et al.*, 1993; Neuhaus *et al.*, 1993; Romero y Lam, 1993; Warpeha *et al.*, 1992; Warpeha *et al.*, 1991). Sin embargo, como ya lo mencionamos en la introducción (1.7.3), la participación de GPA1 en fotomorfogénesis fue siempre controversial. Un claro ejemplo de esto son los resultados reportados sobre la participación de GPA1 en la elongación del hipocotilo. Plántulas transgénicas sobre-expresantes de GPA1, fueron hipersensibles a la luz R, RL y azul (es decir, sus hipocotilos eran más cortos que los de plantas WT) (Okamoto *et al.*, 2001). El estudio de plántulas mutantes simples *phyA*, *phyB* y *cry1* que sobre-expresaban GPA1, sugirió que estas respuestas exageradas de inhibición de la elongación del hipocotilo a la luz R y RL requerirían de la presencia de *phyB* y *phyA* respectivamente, mientras que la respuesta a la luz azul estaría mediada por un fotorreceptor diferente de *cry1* (Okamoto *et al.*, 2001). En ese mismo año se mostró que la sobre-expresión de GPA1 inducía ectópicamente la división celular (Ullah *et al.*, 2001). En estudios posteriores, se observó que diferentes líneas sobre-expresantes de GPA1 tenían fenotipos difíciles de explicar (Jones *et al.*, 2003) y que diferentes alelos simples mutantes *gpa1* tenían hipocotilos WT a distintos flujos de luz R y RL (Jones *et al.*, 2003). Estos resultados no eran coherentes con lo anteriormente propuesto por Okamoto *et al.* (2001) dado que sugerían que GPA1 no estaría involucrado en la inhibición de la elongación del

hipocotilo bajo R o RL (Jones *et al.*, 2003). Recientemente volvió a proponerse la participación de GPA1 en dos vías de señalización de la luz R y RL (diferentes a la inhibición del alargamiento del hipocotilo): la germinación de la semilla (Botto *et al.*, 2009) y la muerte celular en hipocotilos (Wei *et al.*, 2008), ambas mediadas por phyA. Por otro lado, hasta la fecha no se conocen reportes que vinculen a GPA1 con algún fotorreceptor de luz azul, más allá de que han sido reportados cambios de actividad en luz azul de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica en distintas especies y se ha involucrado a GPA1 en caminos de señalización iniciados por luz azul (Warpeha *et al.*, 2006; Warpeha *et al.*, 2007) (ver introducción: 1.7.3).

En hojas de plantas mutantes *gpa1* la unión de GTP se encontró reducida en comparación con el genotipo WT (Colucci *et al.*, 2002). Por lo tanto, decidimos evaluar la posible participación de GPA1 en los caminos de señalización por luz midiendo la unión de GTP en los mutantes simples de los fotorreceptores *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2*.

Este capítulo está dividido en cuatro secciones: en la primera analizamos la unión de GTP en extractos proteicos de plántulas simples mutantes *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* crecidas en oscuridad o expuestas a un pulso de luz (4.1). En la segunda sección analizamos la interacción genética entre *cry1* y GPA1 en la apertura del gancho apical (4.2). En la tercera sección exponemos ensayos moleculares realizados con el objetivo de estudiar el mecanismo molecular de interacción entre *cry1* y GPA1 (4.3). Finalmente estudiamos la posible interacción entre *cry1* y GPA1 bajo luz azul (4.4).

Resultados

4.1 La unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ se encuentra disminuida en el mutante *cry1*

Proteínas totales fueron extraídas de plántulas de ecotipo *Ler* crecidas en oscuridad durante 3 días, tratadas o no con un pulso de luz blanca de 2 min. Medimos la capacidad de dichos extractos de unir un análogo no hidrolizable de GTP, GTP- $\gamma^{35}\text{S}$. El tratamiento de luz no tuvo un efecto significativo sobre la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ en el genotipo WT ni sobre la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ en los mutantes de fotorreceptores (Fig. 4.1). Sin embargo, la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ del mutante *cry1-1* fue significativamente menor tanto en oscuridad como bajo luz blanca comparada con la del WT mientras que los mutantes *phyA*, *phyB* e incluso el mutante *cry2* no diferían significativamente del mismo (Fig. 4.1). Cabe resaltar que tampoco logramos un aumento de la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ por luz cuando repetimos el experimento tratando los extractos proteicos con 1 min, 5 min, 10 min o 15 min de luz blanca (datos no mostrados). Esto podría deberse a que al utilizar luz blanca como tratamiento los fotorreceptores puedan tener interacciones sinérgicas y/o antagónicas entre ellos dificultando detectar un aumento de la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$.

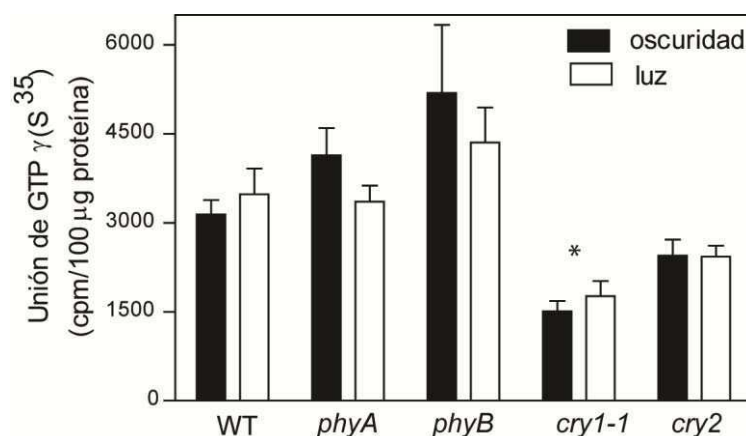


Figura 4.1 Unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ en extractos proteicos extraídos a partir de los mutantes de fotorreceptores *phyA*, *phyB*, *cry1-1* y *cry2*. Plántulas de ecotipo *Ler* fueron crecidas 3 días en oscuridad y cosechadas bajo luz verde tenue. Proteínas totales fueron extraídas, expuestas a 2 min de luz o oscuridad y se ensayó la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ de los extractos. Los datos representan la media \pm EE de al menos 4 réplicas biológicas de cada genotipo. Analizamos los datos mediante un ANOVA de 2 vías, seguido de un *test* de Dunnet, * $p < 0,05$.

La unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ del mutante *cry1-1* fue aproximadamente un 50% menor que la del genotipo WT y fue independiente de la presencia de luz (Fig. 4.1). Con el propósito de analizar si esta disminución en la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ era dependiente del ecotipo estudiamos los niveles de unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ en el ecotipo Col, incorporando como control el mutante *gpa1* (que no

se encontraba disponible en el ecotipo *Ler*). En estos ensayos usamos el mutante *cry1-304*, alelo mutante obtenido por bombardeo de neutrones (Bruggemann *et al.*, 1996). La unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ del mutante *cry1-304* fue comparable a la del mutante *gpa1*, siendo en ambos un 40 / menor que la del WT (Fig. 4.2). Dado que no esperábamos un efecto de la luz sobre la unión de GTP, realizamos los ensayos sólo en oscuridad. En el mutante *gpa1* los niveles basales de unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ pueden ser atribuidos a otras proteínas que unen GTP (Bischoff *et al.*, 1999; Moshkov *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2009).

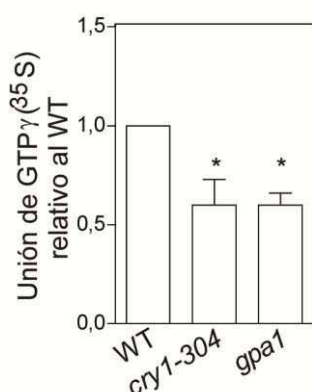


Figura 4.2. Disminución de la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ en el mutante *cry1-304*. Las plántulas de ecotipo Col fueron crecidas 3 días en oscuridad y cosechadas bajo luz verde tenue. Se extrajeron proteínas totales y se ensayó la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ de los extractos. Los datos se relativizaron a los niveles en el WT y representan la media \pm EE de al menos 4 réplicas biológicas de cada genotipo. * $p < 0,05$.

Estos resultados demuestran que los niveles de unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$: a) fueron independientes de la luz, ya que fueron observados en oscuridad y no se modificaron por la luz en el genotipo WT; b) fueron regulados específicamente por *cry1*, ya que disminuyeron en el mutante *cry1-304* a niveles comparables a los del mutante *gpa1*, así como también en el mutante *cry1-1* sin disminuir en los mutantes simples de fotorreceptores *phyA*, *phyB* y *cry2*; c) fueron independientes del ecotipo ya que pudo observarse la disminución en mutantes *cry1* de los ecotipos Col y *Ler*.

4.2 Interacción entre *cry1* y GPA1 durante la apertura del gancho apical en oscuridad

4.2.1 Alteración de la apertura del gancho apical en los mutantes *cry1* en oscuridad

Las plántulas mutantes *gpa1* tienen un fenotipo marcadamente diferente del genotipo WT cuando crecen en oscuridad en un medio suplementado con sacarosa, presentando una mayor apertura del gancho apical y hipocotilo más corto (Ullah *et al.*, 2001). La reducción de la unión de GTP observada en los mutantes *cry1* en oscuridad (Fig. 4.1 y 4.2) nos motivó a estudiar si dichos mutantes tenía algún fenotipo en común con el mutante *gpa1*. Entonces, analizamos la participación de *cry1* en la apertura del gancho apical en oscuridad y en presencia de sacarosa en el medio. Utilizamos plántulas del ecotipo *Ler* y del ecotipo Col. De

este último ecotipo utilizamos dos alelos mutantes de *CRY1*: *cry1-304* y *cry1* (proveniente de la colección SALK, ver Materiales y Métodos, M&M: 3.1).

Plántulas del genotipo WT y simples mutantes *cry1* y *gpa1* fueron crecidas en oscuridad en un medio suplementado con sacarosa 1 / midiendo la apertura del gancho apical 90 h después del pulso de germinación. Como esperábamos el mutante *gpa1* presentó el gancho apical más abierto que el genotipo WT (Fig. 4.3 A) y el hipocotilo más corto (Fig. 4.3 C). Tanto el mutante *cry1-1* del ecotipo Ler como ambos alelos mutantes *cry1* del ecotipo Col mostraron una mayor apertura del gancho apical que el genotipo WT, aunque menor que aquella observada en el mutante *gpa1* (Fig. 4.3).

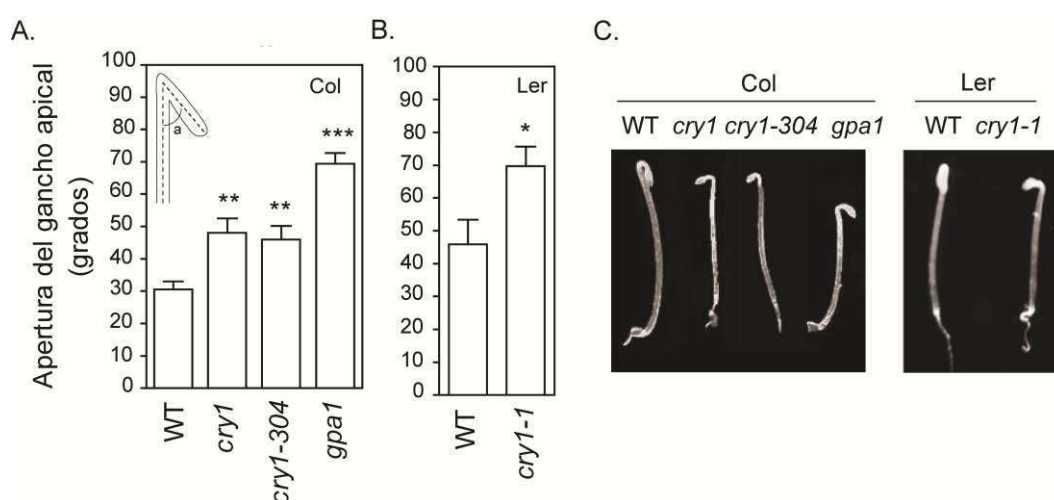


Figura 4.3. Apertura del gancho apical 90 h después del pulso de germinación de plántulas crecidas en oscuridad en un medio suplementado con sacarosa 1/ . A. Apertura del gancho apical del genotipo WT, el simple mutante *gpa1* y 2 alelos del simple mutante *cry1* en el ecotipo Col. En el esquema del ángulo superior izquierdo se muestra cómo se realizó la medición del ángulo (a). B. Apertura del gancho apical del genotipo WT y el simple mutante *cry1-1* en el ecotipo Ler. Los datos representan la media \pm EE de 13 réplicas biológicas (cada una de 15 plántulas), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. C. Plántulas representativas de los fenotipos observados.

Según lo observado en el ecotipo Col, los defectos de los mutantes *cry1* en oscuridad y sacarosa fueron específicos para la apertura del gancho apical y no detectamos que la ausencia de *cry1* produjera algún otro defecto en el desarrollo de la plántula en oscuridad. No encontramos diferencias con el genotipo WT en el largo del hipocotilo (mm, media \pm EE, $n = 15$; WT: $5,8 \pm 0,3$; *cry1*: $5,7 \pm 0,2$; *cry1-304*: $6,0 \pm 0,3$), en la tasa de germinación ($\%$, media \pm EE, $n = 5$; WT: $82,4 \pm 1,4$; *cry1*: $87,1 \pm 3,9$; *cry1-304*: $89,0 \pm 8,9$) ni en el largo de la raíz (mm, media \pm EE, $n = 8$; WT: $4,8 \pm 0,3$; *cry1*: $5,6 \pm 0,1$; *cry1-304*: $5,2 \pm 0,1$).

El desarrollo del gancho apical involucra 3 etapas: formación, mantenimiento y apertura (Raz y Ecker, 1999). Con el objetivo de caracterizar la participación de *cry1* en estas etapas estudiamos la dinámica de apertura del gancho apical en el mutante *cry1-1*. En este ensayo

decidimos incorporar a los simples mutantes, *phyA*, *phyB* y *cry2*, ya que se conoce la participación en presencia de luz de algunos de los fotorreceptores en la apertura del gancho apical (Liscum y Hangarter, 1993). La dinámica de apertura del genotipo WT fue diferente para plántulas crecidas en MS o MS suplementado con sacarosa 1 / (Fig. 4.4 A). En nuestras condiciones, 60 h después del pulso de germinación el gancho apical ya se encontraba formado en el genotipo WT (es decir cerrado). Aproximadamente un día después (a las 85 h), en un medio MS sin sacarosa adicionada, el gancho apical se abrió aproximadamente en 70°, mientras que en sacarosa recién comenzaba a abrirse. A las 110 h la apertura del gancho apical fue la misma para todos los genotipos (Fig. 4.4 A). Es decir que, la sacarosa adicionada al medio retrasó la apertura del gancho apical en el WT. El comportamiento del mutante *cry1-1* crecido en MS fue indistinguible del comportamiento del genotipo WT (Fig. 4.4 A). En cambio, en un medio MS suplementado con sacarosa 1/ el mutante *cry1* presentó una mayor apertura del gancho apical que el genotipo WT (entre las 85 y 92 h) (Fig. 4.4 A). Es decir que el mutante *cry1* fue insensible a la inhibición de la apertura del gancho apical en presencia de sacarosa. Los simples mutantes *phyA*, *phyB* y *cry2* se comportaron como el genotipo WT (Fig.4.4 B) sugiriendo que el *cry1* sería el único fotorreceptor involucrado en esta respuesta.

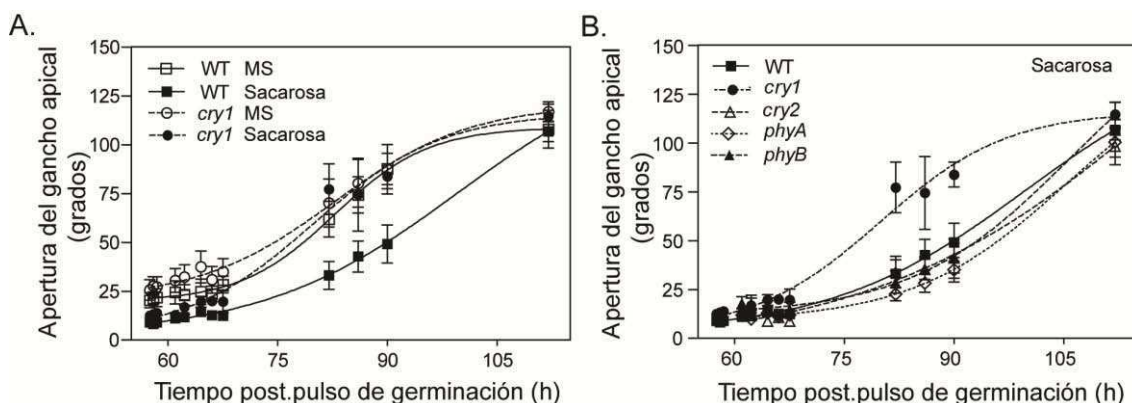


Figura 4.4. Dinámica de la apertura del gancho apical a partir de las 60 h después del pulso de germinación. A. Plántulas WT y mutantes *cry1-1*, en un medio (MS) con o sin la adición de sacarosa 1 / . **B.** Análisis de distintos mutantes simples de fotorreceptores en MS suplementado con sacarosa 1 / . Los genotipos utilizados en estos ensayos son de ecotipo Ler. Los datos representan la media \pm EE de 5 réplicas biológicas (cada una de 5 plántulas).

De estos resultados podemos concluir que: a) cuando las plántulas son crecidas en oscuridad, la sacarosa inhibe la apertura del gancho apical y *cry1* participaría de dicha inhibición, b) el fenotipo observado en plántulas mutantes *cry1* sería ecotipo y alelo independiente y c) la inhibición de la apertura del gancho apical es específica del fotorreceptor *cry1* ya que los simples mutantes *phyA*, *phyB* y *cry2* se comportaron como el genotipo WT en todas las etapas del desarrollo del gancho apical.

4.2.2 Interacción entre *cry1* y GPA1 durante la apertura del gancho apical

La observación de que el mutante *cry1* falló en la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ (Fig. 4.1 y 4.2) y que el fenotipo de gancho apical abierto observado en el mutante *cry1* luego de 90 h en oscuridad se asemejaba al reportado para el mutante *gpa1* (Ullah *et al.*, 2001), nos llevó a estudiar si existía interacción entre *cry1* y GPA1 durante la apertura del gancho apical en sacarosa. Para esto, cruzando los mutantes *cry1-304* y *gpa1-3*, generamos el doble mutante *cry1 gpa1*. En un medio suplementado con sacarosa 1 / , 90 h después del pulso de germinación la apertura del gancho apical del mutante *gpa1* (69°) y del mutante *cry1* (46°) fueron mayores que la apertura del genotipo WT (30°), mientras que el doble mutante *cry1 gpa1* presentó la misma apertura de gancho apical que el mutante *gpa1* (Fig. 4.5 A). Los mutantes *gpa1* y *cry1 gpa1* también presentaron hipocotilos más cortos que el genotipo WT (Ullah *et al.*, 2001, Fig. 4.5 B).

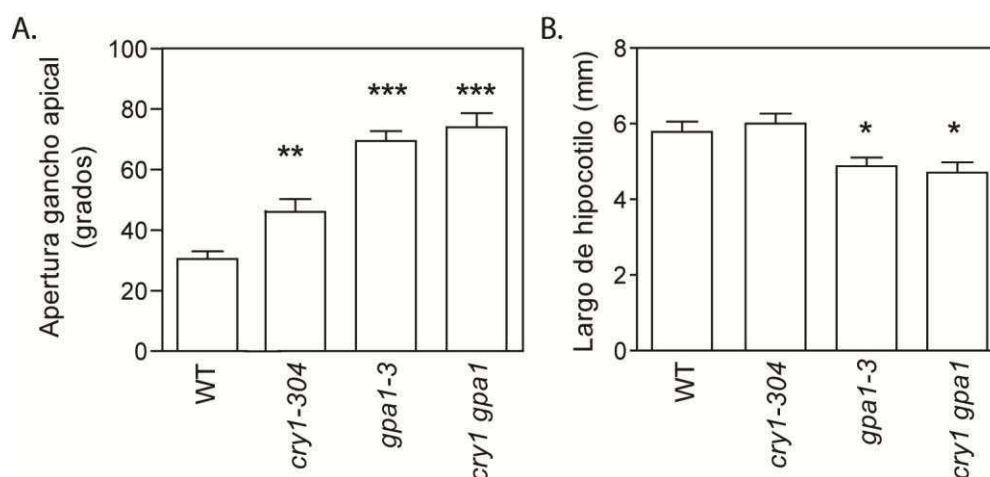


Figura 4.5. Comparación fenotípica de plántulas WT, *cry1-304*, *gpa1-3* y el doble mutante *cry1 gpa1*. Las plántulas fueron crecidas en oscuridad en un medio suplementado con sacarosa 1 / y medidas 90 h después de recibir un pulso de germinación. **A.** Apertura del gancho apical. **B.** Largo del hipocotilo. Los datos representan la media \pm EE de 12 réplicas biológicas (cada una de 15 plántulas). Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía, seguido de un *test* de Tukey; se representa con un asterisco la significancia de las diferencias de los distintos genotipos con el genotipo WT (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Estos primeros resultados sugerían que había interacción genética entre *cry1* y GPA1 al menos en la apertura del gancho apical en oscuridad, ya que si sus efectos fueran por vías completamente diferentes deberíamos haber observado un efecto aditivo de la apertura del gancho apical en el doble mutante *cry1 gpa1*. Con la intención de analizar en qué etapa/s de la apertura del gancho apical interaccionaban *cry1* y GPA1 estudiamos la dinámica de apertura del gancho apical. El gancho apical del genotipo WT y del mutante *cry1* comenzaron a abrirse 85 h después del pulso de germinación y a las 90 h la apertura fue mayor en el mutante *cry1* (Fig. 4.6). Durante todo el intervalo de tiempo analizado la apertura del gancho apical del

mutante *gpa1* fue significativamente mayor que la apertura del genotipo WT (Fig. 4.6). La apertura del gancho apical del doble mutante *cry1 gpa1* fue similar a la apertura del mutante simple *gpa1* en todos los puntos de la curva (Fig. 4.6). Luego de 100 h los mutantes *cry1*, *gpa1* y *cry1 gpa1* presentaron una apertura similar del gancho apical (Fig. 4.6).

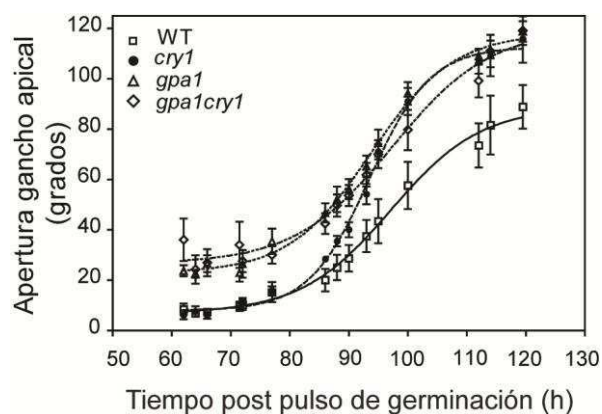


Figura 4.6. Dinámica de la apertura del gancho apical en plántulas WT, en los simples mutantes *cry1* y *gpa1* y en el doble mutante *cry1 gpa1* en MS-sacarosa 1/ . Apertura del gancho apical en plántulas crecidas en completa oscuridad en un medio suplementado con sacarosa 1/ . Los datos representan la media \pm EE de 6 réplicas biológicas (al menos 5 plántulas por réplica).

Para analizar si la acción de GPA1 en la apertura del gancho apical era dependiente de la presencia de sacarosa en el medio, como ocurría con el mutante *cry1* (Fig 4.4 A), estudiamos la dinámica de apertura del gancho apical en MS y observamos que en ausencia de sacarosa no había diferencias entre los genotipos (Fig. 4.7 A). Por otro lado, se encuentra reportado que el mutante *gpa1* responde diferente que el WT no sólo en presencia de sacarosa sino también en presencia de glucosa (Chen *et al.*, 2006b); por lo tanto decidimos analizar si el comportamiento observado en los mutantes era específico de la presencia de sacarosa o también se observaba en presencia de glucosa. Las plántulas de genotipo WT y simples mutantes *cry1* se comportaron de modo similar en presencia de 0,5 / glucosa (que se corresponde con la molaridad de 1 / sacarosa), mientras que el mutante *gpa1* y el doble mutante *cry1 gpa1* presentaron una mayor apertura del gancho apical (Fig. 4.7 B) como en presencia de sacarosa. Estos resultados demuestran que en el simple mutante *cry1* la alteración de la apertura del gancho apical sería dependiente exclusivamente de la presencia de sacarosa mientras que en el mutante *gpa1* sería independiente del tipo de azúcar.

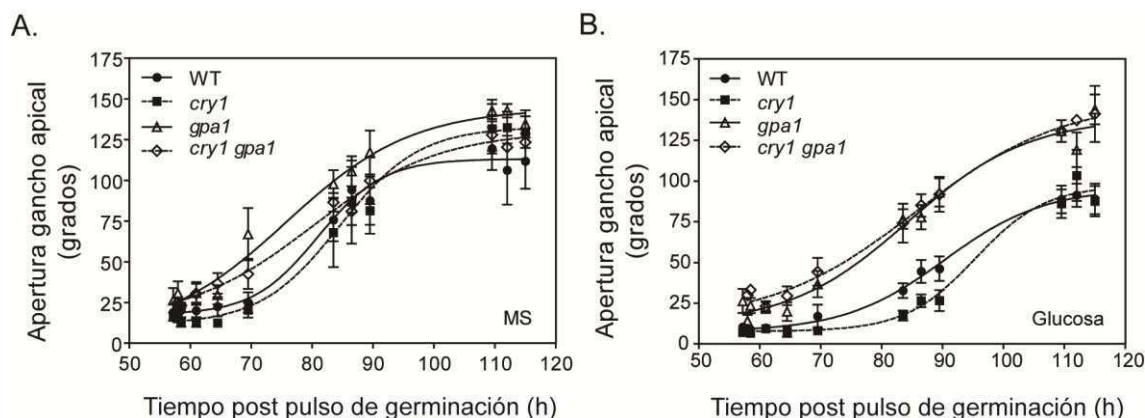


Figura 4.7. Dinámica de la apertura del gancho apical en plántulas WT, en los simples mutantes *cry1* y *gpa1* y en el doble mutante *cry1 gpa1* en MS y MS suplementado con 0,5 / glucosa. A. Dinámica de apertura en MS. B. Dinámica de apertura en 0,5 / de glucosa. Los datos representan la media \pm EE de 4 réplicas cada curva (al menos 4 plántulas en cada réplica).

En resumen, todos estos resultados sugieren interacción entre *cry1* y GPA1 en la apertura del gancho apical en oscuridad ya que los efectos de las mutaciones *cry1* y *gpa1* no fueron aditivos (Fig. 4.5 A, 4.6). Esta interacción sería específica para la apertura del gancho apical ya que *cry1* no tuvo un efecto sobre la elongación del hipocotilo (Fig. 4.5 B). La interacción fue específica de la presencia de sacarosa en el medio ya que el mutante *cry1* no mostró defectos en la apertura del gancho apical ni en MS ni en presencia de glucosa (Fig. 4.6, Fig. 4.7 A y B).

4.3 Análisis bioquímico y molecular de la interacción entre *cry1* y GPA1 en oscuridad

4.3.1 Blots de proteínas sugieren control post-traduccionale de GPA1 mediado por *cry1*

La reducción en la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ del mutante *cry1-304* a niveles comparables a los del mutante *gpa1* (Fig. 4.2), sugiere que la actividad de GPA1 estaría disminuida en ausencia de *cry1*. Con el propósito de analizar si la reducción de unión a GTP- $\gamma^{35}\text{S}$ se debía a una disminución en la transcripción y/o traducción de GPA1, realizamos experimentos de RT-PCR y *Western Blot*. Los estudios de RT-PCR semi-cuantitativa mostraron que los niveles de expresión del ARNm GPA1 fueron similares en el mutante *cry1-304* y el genotipo WT, mientras que no detectamos transcripto en el mutante *gpa1* (Fig. 4.8).

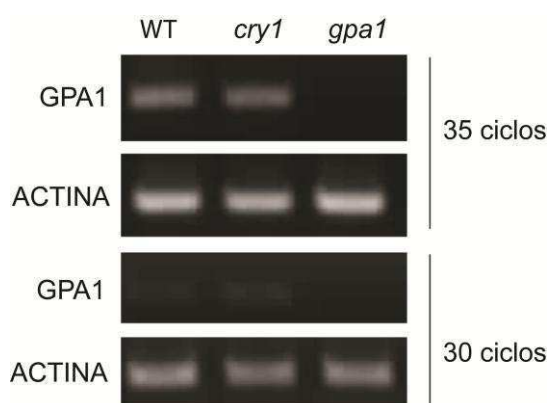


Figura 4.8. Análisis de los niveles de transcritpo de GPA1 en el mutante *cry1-304*. Se realizaron amplificaciones de 35 y 30 ciclos tanto del ARNm de GPA1 como de ACTINA (control de carga). Este experimento se repitió con 2 réplicas biológicas independientes.

Para analizar la presencia de la proteína GPA1 en el mutante *cry1* realizamos *Western blots* con dos anticuerpos, uno generado específicamente contra GPA1 (Chen *et al.*, 2006a) y el otro generado contra la subunidad α de la proteína G heterotrimérica de retina bovina (alfa-transducina), llamado AS/7. El anticuerpo AS/7 ha sido utilizado para reconocer la subunidad α de la proteínas G heterotrimérica en diferentes especies de plantas, entre las que se encuentran *Pisum sativum* (Warpeha *et al.*, 1991), *Avena sativa* (Romero *et al.*, 1991), *Cucumis melo* (Borochoy-Neori *et al.*, 1997) y *Medicago sativa* (Muschiatti *et al.*, 1993).

El anticuerpo Anti-GPA1 reveló una banda en el peso molecular esperado de 46 kDa con el mismo nivel de expresión tanto en el WT como en los diferentes alelos mutantes de *cry1* del ecotipo Col; como era de esperar, dicha banda no se reveló en el mutante *gpa1* (Fig. 4.9 A). Por otro lado, el anticuerpo AS/7 reveló una banda de 54 kDa en el genotipo WT (Col) ausente en el mutante *gpa1* y en los dos alelos mutantes *cry1* y *cry1-304* (Fig. 4.9 B). Para descartar que el anticuerpo AS/7 estuviera revelando una banda específica del ecotipo Col, realizamos *Western blots* con extractos proteicos de plántulas de ecotipo *Ler*. La banda de 54 kDa fue detectada en plántulas WT de ecotipo *Ler*, sin embargo nuevamente no fue detectada en el mutante *cry1-1* pero sí en el mutante *phyB* que utilizamos como nuevo control positivo (Fig. 4.9 C). Para evaluar la especificidad de los anticuerpos realizamos *Western blots* de purificaciones de la proteína GPA1 fusionada a GST (*glutathione S-transferase*) expresada *in vitro* en bacterias. El anticuerpo AS/7 fue capaz de reconocer a GPA1 *in vitro*, aunque si bien más débilmente que el anti-GPA1 (Fig. 4.9 D).

Ambos anticuerpos, anti GPA1 y AS/7 fueron generados contra una corta secuencia C-terminal de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica de *Arabidopsis* y de transducina de *Bos taurus*, respectivamente. Como expusimos en el párrafo anterior, AS/7 ha sido utilizado para reconocer la $G\alpha$ de *Pisum sativum* (Warpeha *et al.*, 1991). El alineamiento de las secuencias de α transducina, de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica de *Pisum*

sativum y de GPA1, mostró que 4 de los aminoácidos se encontraban conservados en las 3 secuencias (Fig. 4.9 E) lo cual sugiere que esta región del extremo C-terminal de GPA1 podrían ser reconocidos por AS/7.

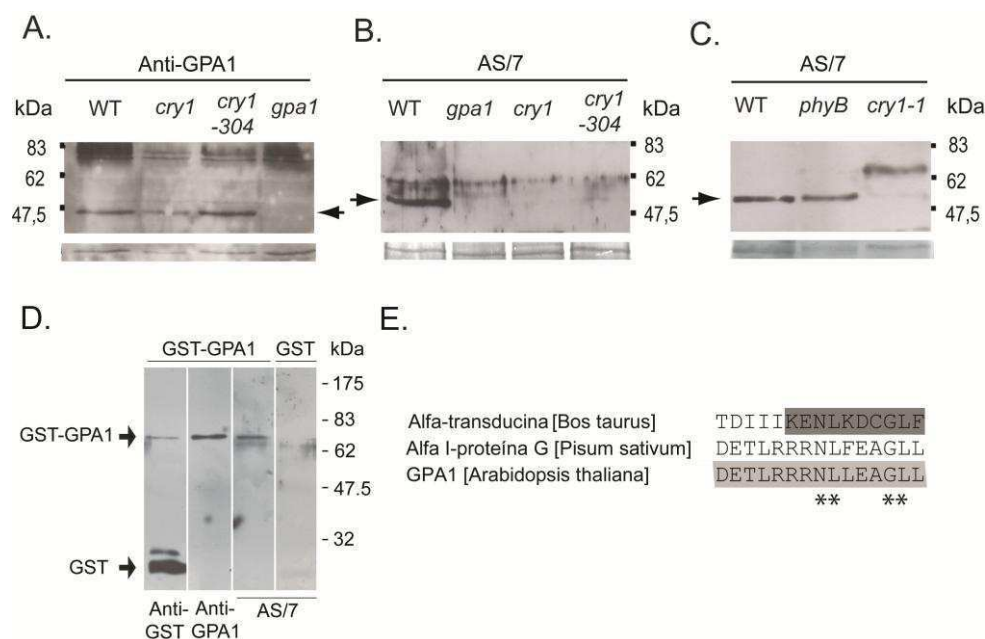


Figura 4.9. Análisis de la presencia de GPA1 en mutantes *cry1*. **A, B y C.** *Western blots* de extractos de proteínas totales de plántulas crecidas en oscuridad durante 3 días. **A.** *Western blot* usando como anticuerpo primario Anti-GPA1 en plántulas de ecotipo Col. La flecha señala la banda de 46 kDa reconocida específicamente por el anticuerpo. **B.** *Western blot* usando como anticuerpo primario AS/7 de plántulas en ecotipo Col. **C.** *Western blot* usando como anticuerpo primario AS/7 en plántulas de ecotipo Ler. La flecha en B y C señala la banda de 54 kDa que es específicamente reconocida por AS/7. En la parte inferior de las membranas se muestra el control de carga de las membranas teñidas con tinta china. **D.** *Western blot* de purificaciones de la fusión GST- GPA1 (calles 1-3) o GST sola (calle 4) expresadas *in vitro* usando como anticuerpo primario anti-GST (calle 1), anti-GPA1 (calle 2) o AS/7 (calle 3 y 4). **E.** Alineamiento de las secuencias contra las que se realizaron los anticuerpos; en gris oscuro se presenta la secuencia contra la cual se diseñó AS/7 (Goldsmith *et al.*, 1987), luego se muestra la secuencia de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica de *Pisum sativum* que fue reconocida por AS/7 (Warpeha *et al.*, 1991), y en gris claro la región contra la que fue diseñado el anticuerpo específico de Arabidopsis (anti-GPA1) (Chen *et al.*, 2006a). Con asteriscos señalamos los aminoácidos conservados entre las 3 secuencias.

En resumen, no encontramos alterados los niveles del transcritto *GPA1* en el mutante *cry1* (Fig. 4.8). La proteína GPA1 la encontramos presente en los mutantes *cry1* ya que fue revelada positivamente con el anticuerpo anti-GPA1 (Fig. 4.9 A). Con el anticuerpo AS/7 revelamos una banda 8 kDa más pesada en el genotipo WT que no se encontró presente en el mutante *gpa1*, ni en los mutantes *cry1* (Fig. 4.9 B y C). Al menos, *in vitro* GPA1 puede ser detectada tanto con el anticuerpo específico anti-GPA1 como con el anticuerpo AS/7 (Fig. 4.9 D).

Estos resultados sugieren que la menor actividad de GPA1 en los mutantes *cry1* observada a partir de los experimentos de unión a GTP (Fig. 4.1 y 4.2) no serían consecuencia de una menor transcripción de GPA1 (Fig. 4.8) ni de una menor expresión de la proteína GPA1 (Fig. 4.9). El hecho de que AS/7 reconociera una banda 8 kDa más pesada en el genotipo WT sugiere la posibilidad que la proteína GPA1 sufra alguna modificación post-traduccional en presencia de *cry1*. Esta modificación post-traduccional, al cambiar la conformación de la proteína, no permitiría el reconocimiento por el anticuerpo específico, pero sí por el AS/7.

4.3.2 Estudio de interacción física entre CRY1 y GPA1

Como se mencionó anteriormente la actividad de GPA1 en el mutante *cry1* se vio reducida, y esto no fue resultado de una menor transcripción del gen o expresión de la proteína. Para estudiar si existía interacción física entre GPA1 y CRY1, que pudiera afectar su actividad, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-ip) *in vitro*. Expresamos GPA1 fusionada a GST en el extremo carboxílico (GST-GPA1) en *E. coli* (Fig. 4.10 A) y CRY1 con un *Kit* de transcripción y traducción *in vitro* que permite marcar la proteína con metionina radiactiva (CRY1*) (Fig. 4.10 B).

Incubamos GST-GPA1 con CRY1* y con el anticuerpo Anti-GST. Luego precipitamos el complejo Anti-GST/GST-GPA1 con la proteína G-agarosa (Fig. 4.10 C, calle 4). Como control realizamos el mismo experimento pero incubando GST con CRY1* y el anticuerpo Anti-GST (Fig. 4.10 C, calle 1). En los precipitados analizamos la presencia de GST-GPA1 o GST (Fig. 4.10 C, panel superior) mediante *Western blot* y la presencia de CRY1* (Fig. 4.10 C, panel inferior) mediante autorradiografía. En el inmunoprecipitado Anti-GST/GST-GPA1 detectamos un señal tenue de CRY1* (Fig. 4.10 C, panel inferior, calle 4) pero también la detectamos con similar intensidad en el control (Fig. 4.10 C, panel inferior, calle 1) por lo que la interacción que veíamos no era específica. Estos ensayos los realizamos en 2 condiciones distintas: 2 h a 4 °C (Fig. 4.10 C) y 30 min a 30 °C (no mostrado porque se observó lo mismo). Finalmente, bajo nuestras condiciones experimentales CRY1 no interaccionó con GPA1.

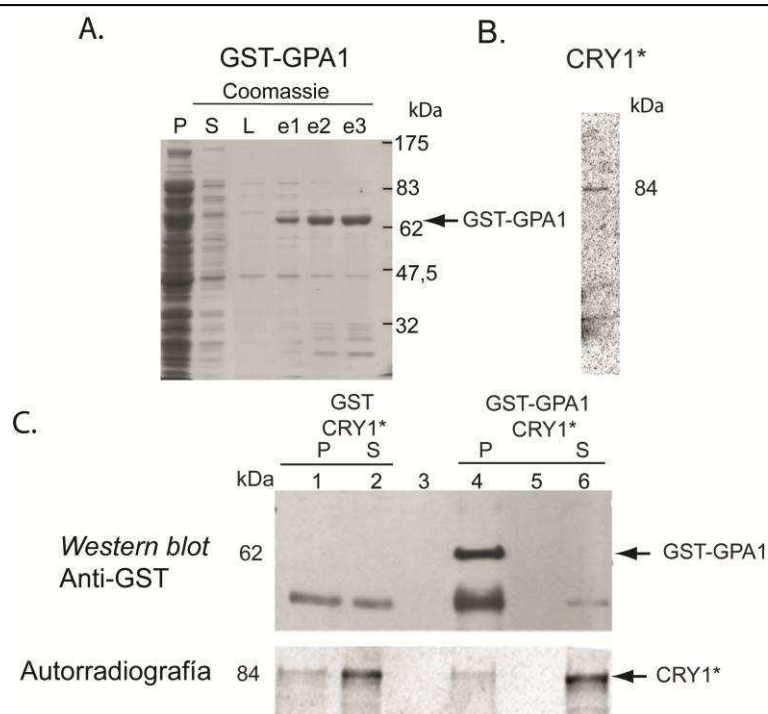


Figura 4.10. Ensayo de Co-inmunoprecipitación de GPA1 y CRY1. **A.** Expresión y purificación de GST-GPA1. P: *pellet*, S: sobrenadante, L: último lavado antes de la elución de GST-GPA1, e1: primera elución, e2: segunda elución, e3: tercera elución. El gel SDS-PAGE se tiñó con *Coomassie*. **B.** Expresión *in vitro* de CRY1 marcada con ^{35}S (CRY*). Corrimos las proteínas en un gel SDS-PAGE, las transferimos a una membrana de nitrocelulosa y detectamos la señal autorradiográfica. **C.** Co-ip de GST-GPA1/CRY1*: En las 2 primeras calles se encuentra el control de Co-ip en el cual se incubó CRY1* con GST solo y se inmunoprecipita. En las calles 1 y 4 se corrieron las muestras correspondientes a la inmunoprecipitación (P) de GST o GST-GPA1 con CRY1*. En las calles 2 y 6 se corrieron los sobrenadantes (S) de las inmunoprecipitaciones. Las calles 3 y 5 están vacías. En el panel superior se muestra el revelado de la membrana con Anti-GST y en el panel inferior la autorradiografía de la misma membrana.

4.4 Interacción entre cry1 y GPA1 en la acumulación de antocianinas en luz azul

En las secciones anteriores mostramos que *cry1* interacciona genéticamente con GPA1 en el control de la apertura del gancho apical en oscuridad y sacarosa (Fig. 4.5 y Fig. 4.6), una respuesta típicamente medida por GPA1 (Ullah *et al.*, 2001). Entonces, nos propusimos analizar si GPA1 y *cry1* interaccionaban en respuestas típicamente mediadas por *cry1*, es decir en respuestas a la luz azul.

El etileno participa en el mantenimiento del gancho apical y *cry1* sería necesario para la modificación dependiente de luz azul de la respuesta a etileno, abriendo el gancho apical (Knee *et al.*, 2000). Sin embargo, a flujos altos de luz azul continua, sin la presencia de etileno, no se observó la participación de *cry1* en esta respuesta (Wang *et al.*, 2009). De todos modos ninguno de estos experimentos fue realizado en presencia de sacarosa, y según nuestros resultados en oscuridad la participación de *cry1* en la apertura del gancho apical sería evidente

en presencia de sacarosa. En este contexto, analizamos la dinámica de apertura del gancho apical en los simples mutantes *cry1* y *gpa1*. Sembramos plántulas WT y simples mutantes *cry1* y *gpa1* en un medio con sacarosa y luego del pulso de germinación, las mantuvimos 58 h en oscuridad para permitir la formación del gancho apical. Luego las expusimos a luz azul continua y medimos la apertura del gancho apical a distintos tiempos (Fig. 4.11). Luego de 6 h de exposición a la luz azul tanto el gancho apical del genotipo WT como el gancho apical de los mutantes *cry1* y *gpa1* se encontraron casi totalmente abierto (Fig. 4.11). Es decir que *cry1* y *GPA1* no participarían en la apertura del gancho apical en respuesta a la luz azul en estas condiciones.

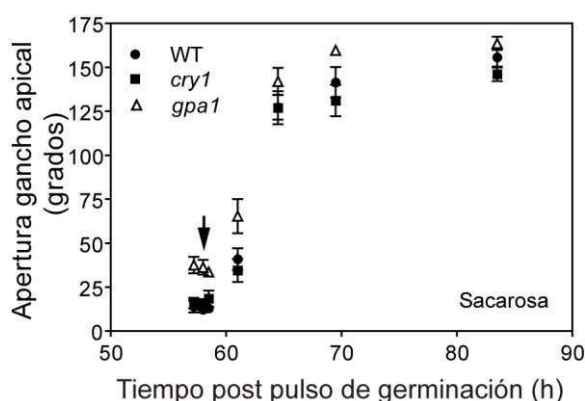


Figura 4.11. Dinámica de la apertura del gancho apical bajo luz azul continua en plántulas WT, en el mutante *cry1* y el mutante *gpa1* en MS-sacarosa 1/. Las plántulas fueron crecidas en oscuridad y a las 58 h del pulso de germinación se expusieron a luz azul continua ($6 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (flecha). Los datos representan la media \pm EE de 4 réplicas (al menos 5 plántulas por réplica).

cry1 es el fotorreceptor más importante involucrado en la inhibición del alargamiento del hipocotilo en respuesta a la luz azul (Ahmad y Cashmore, 1993; Ahmad *et al.*, 1995). En experimentos de sobre-expresión de *GPA1* se propuso que *GPA1* estaría involucrada en respuestas fotomorfogénicas mediadas por luz azul, luz R y RL, específicamente en la elongación del hipocotilo (Okamoto *et al.*, 2001). Si bien experimentos posteriores con el simple mutante *gpa1* descartaron que *GPA1* estuviera involucrada en la elongación del hipocotilo en respuesta a la luz R o RL (Jones *et al.*, 2003), no conocemos que se haya estudiado la inhibición del alargamiento del hipocotilo en respuesta a la luz azul en los mutantes *gpa1*. Entonces decidimos analizar el comportamiento del mutante *gpa1* bajo luz azul en un medio suplementado con sacarosa. El alargamiento del hipocotilo del simple mutante *gpa1* fue similar al del WT, mientras que el simple mutante *cry1* y el doble mutante *cry1 gpa1* fallaron del mismo modo en la inhibición de la elongación del hipocotilo (Fig. 4.12). Entonces *GPA1* no participaría de la inhibición de la elongación del hipocotilo en las condiciones ensayadas.

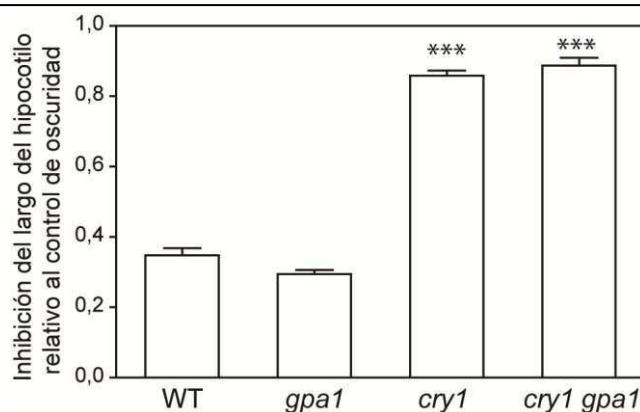


Figura 4.12. Inhibición de la elongación del hipocotilo bajo luz azul. Plántulas del genotipo WT, los mutantes simples *cry1* y *gpa1* y el doble mutante *cry1 gpa1*, 24 h después del pulso de germinación, fueron crecidas 3 días bajo luz azul continua ($3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en medio MS suplementado con sacarosa $1/$; luego se midió el largo del hipocotilo relativo a los controles de oscuridad. Se aplicó ANOVA de una vía para cada flujo de luz y se contrastaron los distintos genotipos mediante un *test* de Tukey; se representa con asteriscos la significancia de las diferencias con el genotipo WT (***) $p < 0,001$). Los datos representan la media \pm EE de 8 réplicas biológicas (cada una consiste en la media del largo de hipocotilo de 10 plántulas).

Por otro lado, *cry1* es el principal fotorreceptor involucrado en la acumulación de antocianinas en respuesta a la luz azul (Ahmad y Cashmore, 1993; Ahmad *et al.*, 1995). Estudios previos demostraron que GPA1 está involucrado de manera dependiente de la luz azul en la síntesis de fenilalanina, un precursor en la biosíntesis de fenilpropanoides (Warpeha *et al.*, 2006). Además, GPA1 se encuentra involucrado en distintas vías de señalización de los azúcares (Chen y Jones, 2004; Huang *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2007). Este conjunto de evidencias nos llevó a estudiar los niveles de antocianinas en los simples mutantes *cry1* y *gpa1*, y en el doble mutante *cry1 gpa1* en plántulas crecidas en oscuridad o bajo luz azul en medio MS suplementado o no con sacarosa $1/$. Luego de 3 días de crecimiento en oscuridad en MS los mutantes acumularon niveles de antocianinas comparables con los niveles acumulados por las plántulas WT ($p > 0,05$) (Fig. 4.13). En plántulas WT, tanto la sacarosa como la luz azul generaron un aumento significativo de los niveles de antocianinas ($p < 0,01$). Además, la luz azul y la sacarosa tuvieron en plántulas WT un efecto sinérgico dado que la combinación de los factores generó un aumento en los niveles de antocianinas que no puede ser explicado mediante la suma de los efectos individuales (en un ANOVA de dos vías la interacción resulta significativa, $p < 0,001$; Fig. 4.13). Bajo luz azul continua en un medio MS sin sacarosa sólo la mutación *cry1* redujo significativamente los niveles de antocianinas comparado con el genotipo WT ($p < 0,05$), ya que el mutante *gpa1* se comportó como el genotipo WT ($p > 0,05$).

Finalmente, en presencia de sacarosa y luz azul, los niveles de antocianinas en los mutantes *cry1*, *gpa1* y *cry1 gpa1* resultaron ser menores que en el genotipo WT ($p < 0,001$ para el mutante *cry1*, $p < 0,05$ para el mutante *gpa1*, $p < 0,01$ para el mutante *cry1 gpa1*).

Nuevamente, la reducción en la acumulación de antocianinas en el doble mutante *cry1 gpa1* en luz azul y sacarosa no fue mayor que la adición de los efectos separados de los simples mutantes, sugiriendo interacción génica entre GPA1 y cry1 en la respuesta de acumulación de antocianinas.

Resumiendo, la interacción entre *cry1* y GPA1 bajo luz azul sería dependiente de la presencia de sacarosa en el medio y ocurriría específicamente en la acumulación de antocianinas pero no en la elongación del hipocotilo ni en la apertura del gancho apical.

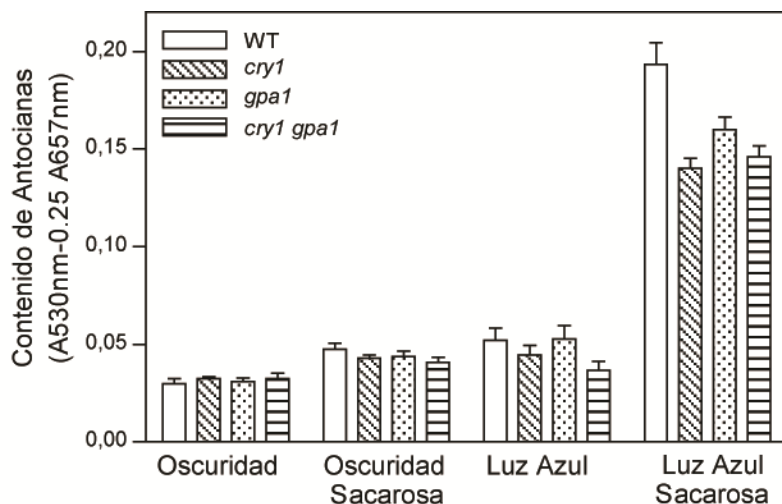


Figura 4.13. *cry1* y GPA1 interactúan en la acumulación de antocianinas en respuesta a luz azul y sacarosa. Acumulación de antocianinas en plántulas WT, mutantes *cry1*, *gpa1* y *cry1 gpa1* crecidas durante 3 días en oscuridad o bajo luz azul continua ($9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en un medio suplementado o no con sacarosa 1% . Los datos representan la media \pm EE de 8 réplicas biológicas (cada una consistió en al menos 40 plántulas).

Discusión

Los experimentos farmacológicos realizados en la década de 1990 sugirieron la posibilidad de que la subunidad α de la proteína G heterotrimérica de plantas integrase las señales provenientes de los fitocromos a nivel celular (Bowler *et al.*, 1994b; Neuhaus *et al.*, 1993). Actualmente se conoce que GPA1 participa en vías específicas de la señalización del fitocromo phyA y también en ciertas respuestas a la luz azul en las cuales no participaría cry1.

En este capítulo de la tesis nos propusimos analizar la participación de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica de Arabidopsis (GPA1) en las vías de señalización de los fotorreceptores en plántulas. Primero, ensayamos la unión de GTP radiactivo no hidrolizable de los simples mutantes *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* crecidos en oscuridad o que habían recibido un pulso de luz blanca (que contiene todas las longitudes de onda para activar a los fitocromos y criptocromos). Hallamos que la mutación *cry1* redujo la unión de GTP, independientemente de la presencia o ausencia de luz, a niveles comparables a los del mutante *gpa1* (Fig. 4.1 y Fig. 4.2) mientras que la unión no se alteró en los simples mutantes *phyA*, *phyB* y *cry2* (Fig. 4.1). Los nuevos modelos de mecanismos de acción de la proteína G heterotrimérica en Arabidopsis proponen que la mayor parte de la población de GPA1 estaría unida a GTP (Johnston *et al.*, 2007; Temple y Jones, 2007). Considerando que los mutantes *gpa1* y *cry1* tienen similar unión de GTP, *cry1* podría estar favoreciendo de algún modo el estado de GPA1 unido a GTP (en lugar de estar inhibiendo la actividad GTPasa incrementada por RGS1).

Al analizar en detalle el fenotipo del mutante *cry1*, en oscuridad en un medio suplementado con sacarosa, observamos que tenía una mayor apertura del gancho apical que el genotipo WT (Fig. 4.3). Se ha descrito anteriormente que tanto mutantes *cry1* como mutantes *cry2* presentan muchas veces fenotipos en ausencia de luz azul, por ejemplo en respuesta a luz R tienen la expresión de genes alterada (Yang *et al.*, 2008) y reducida la apertura de los estomas (Boccalandro *et al.*, 2012); también se ha observado un patrón alterado durante el desplegado de los cotiledones en respuesta a la luz RL (Botto *et al.*, 2003). Se desconoce cuánto tiempo permanecen activos los criptocromos después del estímulo de activación pero se ha propuesto que estos fenotipos independientes de la luz azul podrían ser el resultado indirecto de la activación previa de los criptocromos por luz azul, por ejemplo durante el pulso de germinación, y que dicha activación genere cambios que persistan en las plántulas (Boccalandro *et al.*, 2012). En este mismo sentido, también se ha sugerido que la luz percibida en las semillas por el phyB durante el pulso de germinación sería suficiente para mediar cambios en la transcripción de algunos genes en las plántulas (Mazzella *et al.*, 2005).

En esta tesis demostramos una mayor apertura del gancho apical en tres alelos mutantes *cry1* (*cry1-1* en ecotipo *Ler*, *cry1* y *cry1-304* en ecotipo *Col*) cuando crecen en completa oscuridad en un medio suplementado con sacarosa 1 / (Fig. 4.3). Este fenotipo fue específico del mutante *cry1* dado que los mutantes *phyA*, *phyB* y *cry2* se comportaron como el genotipo WT (4.4 B). Además, el fenotipo fue muy similar al descrito para el mutante *gpa1* (Chen *et al.*, 2003; Ullah *et al.*, 2003; Ullah *et al.*, 2001, Fig. 4.5). El hecho que la dinámica de apertura del gancho apical del doble mutante *cry1 gpa1* fuera indistinguible de la dinámica de apertura del simple mutante *gpa1* sugiere la existencia de convergencia entre las vías de señalización de *cry1* y GPA1 (Fig. 4.5).

La participación de la sacarosa en la regulación de la apertura del gancho apical se ha reportado en plántulas de girasol. Específicamente, lo que se observó es que cuando disminuye la concentración de sacarosa en la región del gancho apical el mismo se abre, lo cual coincide con un aumento de actividad de la enzima invertasa en dicha región (Rabe y Kutschera, 1998). El fenotipo de gancho apical abierto observado en el mutante *gpa1* como en los alelos mutante *cry1* fue estrictamente dependiente de la presencia de sacarosa en el medio (Fig. 4.4 A, 4.5 y 4.7). Por otro lado, la mayoría de los efectos de GPA1 en la planta son sensibles a la presencia de sacarosa (Chen *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Ullah *et al.*, 2003; Ullah *et al.*, 2002) y RGS1 regula la actividad GTPasa de GPA1 en un modo dependiente de glucosa (Johnston *et al.*, 2007). En tejidos no fotosintéticos, la sacarosa es metabolizada a través de la glicólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico produciendo ATP. La unión de ATP a CRY1 en oscuridad es capaz de producir cambios conformacionales en la molécula (Burney *et al.*, 2009) y probablemente modular su actividad.

En este trabajo evidenciamos que la interacción génica entre *CRY1* y *GPA1* no se encuentra limitada a la apertura del gancho apical en oscuridad. Los niveles de antocianinas en plántulas crecidas bajo luz azul en un medio suplementado con sacarosa 1 / fueron menores tanto en el mutante *cry1* como en el mutante *gpa1* y en el doble mutante *cry1 gpa1* en relación a los niveles de antocianinas del WT, por lo que también habría convergencia en esta respuesta (Fig. 4.13). En ambos casos se observa convergencia sólo cuando hay sacarosa presente en el medio.

A partir del análisis del fenotipo del doble mutante *cry1 gpa1* podemos concluir que los efectos de las mutaciones en *cry1* y GPA1 no son aditivos en el fenotipo del gancho apical en sacarosa y oscuridad, ni en la acumulación de antocianinas en sacarosa y bajo luz azul. La interacción genética entre *CRY1* y *GPA1* es sustentada por las siguientes observaciones: 1) el mutante *cry1* presentó una mayor apertura del gancho apical en oscuridad y sacarosa que el genotipo WT, fenotipo característico del mutante *gpa1*; 2) el mutante *gpa1* mostró niveles

reducidos de antocianinas en respuesta a la luz azul, un fenotipo característico del mutante *cry1*; 3) la unión de GTP fue menor en los mutantes *cry1* en comparación a los niveles de unión de GTP del genotipo WT. Sin embargo no parecería haber interacción en otras vías de señalización, por ejemplo en la elongación del hipocotilo en oscuridad (Fig. 4.5) o bajo luz azul (Fig. 4.12), por lo que la interacción dependería del contexto celular.

La disminución en la unión de GTP en el mutante *cry1* no se debió a una alteración de los niveles del ARNm *GPA1* (Fig. 4.8). El análisis mediante *Western blot* de la presencia de GPA1 con el anticuerpo específico contra la proteína reveló niveles de GPA1 en el mutante *cry1* comparables a los niveles WT (Fig. 4.9 A), por lo que el efecto de *cry1* sobre la unión de GTP podría ser post-traducciona. El anticuerpo AS/7 generado contra transducina de retina bovina, que ya había sido utilizado en otros trabajos para reconocer la subunidad α de proteínas G en diferentes especies de plantas, reveló una banda de mayor peso molecular en el genotipo WT, ausente en los mutantes *gpa1* y *cry1* (Fig. 4.9 B). Esta banda es 8 kDa mayor que lo esperado para GPA1 (Fig. 4.9 A, B y C). Luego, demostramos que AS/7 es capaz de reconocer a la proteína recombinante GST-GPA1 (Fig. 4.9 D) pero no podemos descartar la posibilidad de que el anticuerpo AS/7 esté reconociendo una proteína diferente de GPA1 cuyo peso molecular sea de 54 kDa y que no se exprese en el mutante *gpa1*, ni en el mutante *cry1* pero sí en el mutante *phyB*. En *Arabidopsis*, se conocen 3 proteínas llamadas proteínas G extra-grandes (*extra-large GTP-binding*) con homología en el extremo C-terminal a GPA1 pero el peso molecular de las mismas es mayor a 54 kDa (aproximadamente 99 kDa) (Assmann, 2002; Lee y Assmann, 1999). Otra posibilidad podría ser que los anticuerpos estén reconociendo diferentes formas de la proteína GPA1 y que *cry1* esté mediando alguna modificación post-traducciona de GPA1. El anticuerpo anti-GPA1 está dirigido contra el extremo C-terminal de GPA1 mientras que AS/7 se generó contra el extremo C-terminal de α -transducina (Goldsmith *et al.*, 1987) (Fig. 4.9 E), por lo que una modificación post-traducciona en esa región de GPA1 podría estar modificando la afinidad de los anticuerpos por la proteína.

En levaduras se ha reportado que la mono-ubiquitinación de la subunidad α de la proteína G heterotrimérica se revela como una banda de 63 kDa mientras que sin ella se revela una banda de 54 kDa (Marotti *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). En base a estas evidencias podemos especular que la mono-ubiquitinación de GPA1, mediada por *cry1*, podría ser el punto de regulación de la actividad o de los niveles de proteína GPA1 activa. Siguiendo esta hipótesis, el anticuerpo específico anti-GPA1 reconocería la proteína no ubiquitinada de 46 kDa y el anticuerpo AS/7 reconocería la versión mono-ubiquitinada de GPA1, 8 kDa más pesada. Considerando que no encontramos evidencias de interacción física entre GPA1 y CRY1 *in vitro*

(Fig. 4.10 C), de existir una modificación post-traducciona de GPA1 mediada por cry1 debería ser de modo indirecto.

En síntesis, encontramos evidencias de interacción génica entre cry1 y GPA1, en la apertura del gancho apical en oscuridad y en la síntesis de antocianas en luz azul. Esta interacción sólo ocurre cuando el medio se suplementa con sacarosa. También demostramos que la interacción dependería del contexto celular ya que no encontramos evidencias de interacción en otras respuestas como son la elongación del hipocotilo en oscuridad y luz azul o la apertura del gancho apical en luz azul. cry1, favorecería la capacidad de unión de GTP de GPA1, probablemente a través de una modificación post-traducciona de GPA1. Aunque tentadora, esta hipótesis requiere de más experimentos para ser confirmada.

5 Capítulo II:

Modificaciones en el proteoma de cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en respuesta a la luz y sus implicancias fisiológicas.

Introducción

Dentro de la fotobiología de plantas el estudio de la fisiología de mutantes múltiples de fotorreceptores es central para el análisis de las vías de señalización donde estos interactúan actuando por ejemplo de modo redundante, sinérgico o antagónico.

En la actualidad se encuentra ampliamente difundido el uso de distintas técnicas que permiten analizar cambios globales en la expresión de genes (transcriptómica), de proteínas (proteómica) y de metabolitos (metabolómica). Técnicas de este tipo, aplicadas a mutantes de fotorreceptores, han aportado información muy valiosa para el entendimiento de cómo se procesan las señales lumínicas y sus consecuencias fisiológicas. Además, datos de co-expresión de los genes pueden ser utilizados en la identificación de patrones de regulación de los mismos (Eisen *et al.*, 1998; Persson *et al.*, 2005).

La automatización de técnicas de transcriptómica fue central para que su uso se extienda dentro de la biología. En 1995 se publica el primer trabajo utilizando microarreglos de ADN creado por tecnología robotizada en el cual se analizó la expresión diferencial de 45 genes de *Arabidopsis* (Schena *et al.*, 1995). Actualmente los microarreglos comerciales permiten analizar en simultáneo la expresión de más de 24.000 genes. Esta tecnología ha sido muy útil para hallar patrones de expresión de genes regulados por los fitocromos y/o criptocromos en plantas mutantes en dichos fotorreceptores y/o expuestas a diferentes estímulos lumínicos (Devlin *et al.*, 2003; Jiao *et al.*, 2003; Mazzella *et al.*, 2005; Tepperman *et al.*, 2004; Tepperman *et al.*, 2001). Sin embargo, el hecho de que las funciones celulares sean principalmente llevadas a cabo por proteínas que además pueden sufrir modificaciones postraduccionales, sumado en muchos casos a la falta de correlación entre los niveles de mensajeros y proteínas (Liu *et al.*, 2012b; Tian *et al.*, 2004), ponen en evidencia que los estudios proteómicos pueden generar información novedosa no deducible del transcriptoma.

La sistematización en proteómica no se hizo evidente hasta el año 2000, año en el cual se hicieron grandes avances en el uso de geles 2D para la separación de proteínas. Ya desde 1975 se había introducido la idea de separar las proteínas primero según pI y luego según PM, quedando así distribuidas en un mapa de dos dimensiones. En ese entonces la técnica era poco reproducible y era complicado realizar estudios comparativos. En el año 2000 se comenzó a comercializar geles en forma de tiras con gradientes de pH inmovilizado para separar las

proteínas según su pl. El uso de estas tiras comerciales generó mayor reproducibilidad y resolución de los geles al mismo tiempo que permitió aumentar la cantidad de muestra de proteínas que se podía separar en un gel (Thelen, 2007).

En el área de la fotobiología se han realizado pocos análisis de proteomas en comparación con la cantidad de estudios de transcriptomas. En *Arabidopsis*, se utilizaron geles 2D para comparar patrones de expresión de proteínas en plántulas WT crecidas en oscuridad, en luz R, RL y azul (Kim *et al.*, 2006), así como para investigar el perfil de proteínas de las plantas simples mutantes de *phyA*, *phyB* y *cry1* (Kim *et al.*, 2006; Phee *et al.*, 2007) y de los dobles mutantes *phyA phyB* (Xu Li *et al.*, 2009) y *cry1 cry2* (Yang *et al.*, 2008). En todos estos trabajos se encontraron proteínas que se conocía que estaban involucradas en los caminos de señalización por luz y por lo tanto los cambios eran consistentes con las alteraciones fisiológicas observadas en los mutantes; pero además se advirtieron cambios en grupos de proteínas cuya participación en respuestas inducidas por luz se desconocía. Por ejemplo el análisis del perfil proteico del doble mutante *cry1 cry2* bajo luz R puso en evidencia la participación de los criptocromos en la expresión de proteínas bajo este flujo de luz típicamente mediado por *phys* (Yang *et al.*, 2008).

Como expusimos en el ítem 1.5 de la introducción, el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* tiene un fenotipo muy afectado durante su desarrollo. En este contexto, el análisis proteómico del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* proporcionaría datos útiles para entender a nivel molecular sus alteraciones fisiológicas. Además, el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* provee una herramienta genética importante para revelar componentes involucrados en el camino de la fototransducción de señales enmascarados por las interacciones génicas entre las familias de fitocromos y/o criptocromos.

Éste capítulo se divide en tres secciones, en la primera se analiza el perfil de proteínas diferencialmente expresadas entre el genotipo WT y el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* crecidos bajo luz blanca (5.1). En la segunda sección estudiamos parámetros fisiológicos relacionados con las modificaciones encontradas en el proteoma (5.2). En la tercera sección comenzamos a realizar un análisis de fracciones nucleares de plántulas crecidas bajo luz blanca con la intención de evaluar cambios del proteoma nuclear generados por la ausencia simultánea de *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* (5.3).

Resultados

5.1. Comparación de los perfiles proteicos entre el genotipo WT y el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*

5.1.1 Descripción del estadio de desarrollo utilizado: estadio 1.02

En el año 2001 se publicó una detallada clasificación de los estadios del desarrollo de *Arabidopsis* en la cual a cada estadio se le asignó un número (Boyes *et al.*, 2001). En este trabajo adoptamos su clasificación para definir los estadios en el que se encontraban las plántulas al momento de la cosecha (M&M: 3.2.1).

A medida que el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* crece, su morfología resulta cada vez más afectada y la transición entre estadios ocurre más lentamente que en el WT (Mazzella *et al.*, 2001). Entonces decidimos seleccionar un estadio temprano del desarrollo para reducir al máximo las diferencias en el tiempo de desarrollo y así evitar confundir estadios. Seleccionamos el estadio 1.02 en el cual la plántula tiene los cotiledones ya expandidos y el primer par de hojas de la roseta con un tamaño mayor a 1 mm². Como se observa en la Figura 5.1, las plántulas WT alcanzaron este estadio 9 días después del pulso de germinación. En cambio, el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* lo alcanzó al día 14 después del pulso de germinación (nótese que 9 días después de la germinación el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* no ha desarrollado hojas).

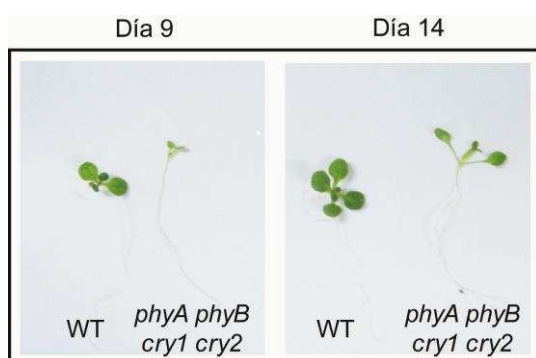


Figura 5.1. Fenotipo de plántulas WT y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* luego de los 9 y 14 días de desarrollo. Las plántulas fueron crecidas en MS 0,5X bajo luz blanca continua.

Es decir que, para los estudios de proteómica en los que utilizamos plántulas en el estadio 1.02, se cosecharon al día 9 las plantas WT y al día 14 las plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2*. En el estadio 1.02, el cuádruple mutante presentó una menor área verde y menores niveles de clorofila por unidad de área que el genotipo WT (Fig. 5.2 A y B).

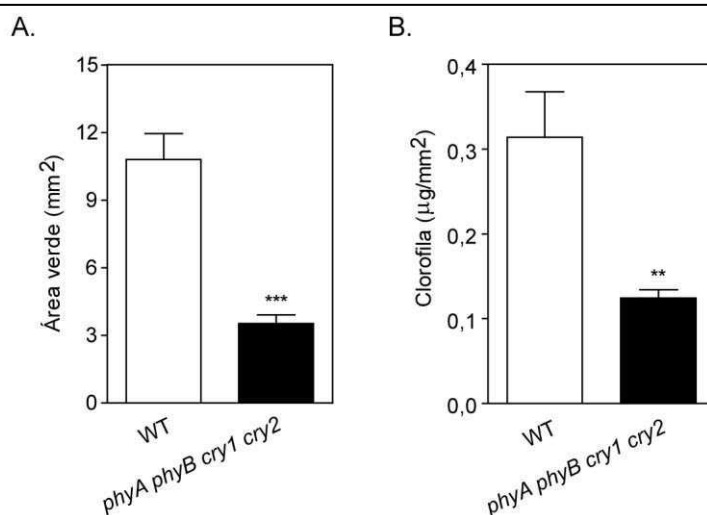


Figura 5.2. Comparación del área verde y del contenido de clorofila por unidad de área de plántulas WT y cuádruple mutantes *phyA phyB cry1 cry2* en el estadio 1.02. Las plántulas crecieron bajo luz blanca continua en medio MS 0,5X hasta el estadio 1.02, el WT hasta el día 9 y el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* hasta el día 14 post pulso de germinación. **A.** Área verde total, n=4. **B.** Contenido de clorofila por unidad de área, n=6. Los datos representan la media \pm EE. Analizamos los resultados mediante un *t-test*, previa transformación logarítmica de los datos, **p<0,01; *** p<0,001.

5.1.2 Estudio comparativo de los proteomas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y del genotipo WT en el estadio 1.02

Como primera aproximación al estudio comparativo de los proteomas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y del WT separamos, en geles 2D, 150 µg de proteínas totales extraídas de plántulas crecidas en luz blanca hasta el estadio 1.02 (ver M&M: 3.3.15.1: protocolo 2). En la primera dimensión enfocamos las proteínas según su pI en un intervalo de pH de 3 a 10 en tiras comerciales de 7 cm de largo y en la segunda dimensión separamos las proteínas según PM en geles SDS-PAGE 10 / . Realizamos cuatro réplicas biológicas de cada genotipo encontrando 194 *spots* en al menos tres de los cuatro geles correspondientes a cada genotipo (*matches*). Luego de aplicar un análisis estadístico riguroso (ver M&M: 3.3.16.6) demostramos que 36 *spots* se encontraban diferencialmente expresados con una tasa de cambio (FC) mayor a 1,5. Diecinueve *spots* se encontraron sub-expresados y 17 *spots* sobre-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en comparación con el WT. De los 19 *spots* sub-expresados logramos identificar por espectrometría de masas (MS) 11 proteínas (Fig. 5.3 A, Tabla 5.1) y de los 17 *spots* sobre-expresados identificamos 4 proteínas (Fig. 5.3 A y Tabla 5.2).

Como puede observarse en la Figura 5.3 A, la mayoría de los *spots* localizaban en los pHs centrales. Con la intención de resolver entonces un mayor número de *spots*, usamos tiras comerciales con un intervalo de pH mas acotado (4 a 7) y de mayor longitud (13 cm). Así

hallamos 354 *spots* presentes en al menos 3 de las cuatro réplicas de cada genotipo. Sesenta y dos *spots* se encontraron diferencialmente expresados con FCs mayores a 1,5. Veintiocho *spots* se encontraron sub-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* comparado con el WT. De estos 28 *spots* logramos identificar 15 que resultaron ser 12 proteínas diferentes (Fig. 5.2 B, Tabla 5.1). Por otro lado, hallamos 34 *spots* diferencialmente sobre-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* comparado con el WT, de los cuales identificamos 15, que correspondieron a 13 proteínas diferentes (Fig. 5.2 B, Tabla 5.2). En un solo *spot* (número 75, Tabla 5.2) identificamos más de una proteína y lo descartamos para futuros análisis.

De un total de 53 *spots* secuenciados (18 *spots* de los geles de pH 3-10 y 35 *spots* de los geles de pH 4-7) sólo 8 *spots* no se lograron identificar en el servicio de secuenciación.

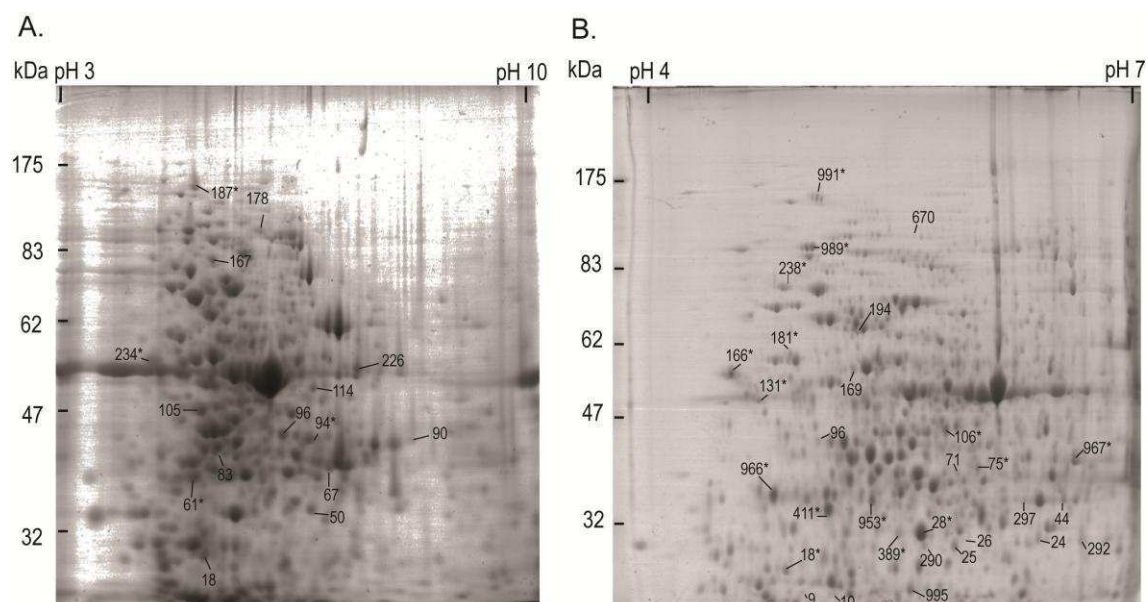


Figura 5.3. Geles 2D representativos de proteínas totales extraídas de plántulas en el estadio 1.02. A. Gel de proteínas enfocadas en 7 cm en el intervalo de pH de 3 a 10. **B.** Gel de proteínas enfocadas en 13 cm en el intervalo de pH de 4 a 7. Los *spots* identificados por MS se señalan en los geles con el número de *match* que los identifica. Los *spots* marcados con un asterisco son los sobre-expresados, y los que no tienen asterisco los sub-expresados, en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* comparado con el WT.

Como puede observarse en las tablas 5.1 y 5.2 varios *spots* identificados en los geles con un intervalo de pH 3-10, fueron también identificados en los geles con un intervalo de pH 4-7: 3 *spots* sub-expresados (18, 50 y 105, Tabla 5.1) y 4 *spots* sobre-expresados (61, 94, 187 y 232, Tabla 5.2) en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* comparado con el WT. Esto pone en evidencia que el análisis estadístico utilizado en este estudio ha permitido detectar algunas proteínas diferencialmente expresadas en geles con diferentes rangos de pH y cuyas corridas fueron completamente diferentes.

Se identificaron en más de un *spot* las proteínas PSBO-2 (*spots* 9 y 10), FNR1 (*spots* 25 y 290), FNR2 (*spots* 24 y 292) y PBP1 (*spots* 28 y 389) (Fig. 5.3 B; Tablas 5.1 y 5.2) con PM similares y *pl* diferentes. Estos datos sugieren que estas proteínas sufren modificaciones post-traduccionales como ya se propuso para las isoformas de FRN1 y FRN2 (Lintala *et al.*, 2007). En estos casos ambas versiones de las proteínas se encontraron sub- o sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. Por otro lado, identificamos a PATL2 (*Patellin 2*) en más de un *spot* (670: PM de 102,8 y *pl* de 5,65; 991: PM 149,7 y *pl* de 5,08) y lo interesante es que la identificamos sub- (*spot* 670) y sobre- (*spot* 911) expresada en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Tabla 5.1 y 5.2). Se ha reportado que PATL2, como el resto de las proteínas de la familia *Patellin*, migran como si tuvieran un mayor PM (obsérvese que el teórico es de 60 kDa) dado que unen deficientemente el SDS en el extremo N-terminal debido a que es ácido (Peterman *et al.*, 2004). La diferencia en la movilidad de ambos *spots* podría deberse a alguna modificación post-traduccionales como fosforilación (Jones *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la alteración de la abundancia de cada isoforma de PATL2 sería dependiente de la presencia o ausencia de los fotorreceptores.

En resumen, a partir de extractos proteicos totales de plántulas en el estadio 1.02 crecidas bajo luz blanca, identificamos por MS un total de 32 proteínas diferencialmente expresadas entre el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y el genotipo WT (20 sub-expresadas y 12 sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, Tablas 5.1 y 5.2).

Tabla 5.2. Identificación por MS de spots sub-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.

Spot a	pH 3-10				Spot a	pH 4-7				PM/pl Teórico f	AGI ^j	Nombre de la Proteína	Proceso celular ^k	FC ^h 3-10	FC ^h 4-7				
	PM/pl exp b	Matches c	CS / d	Puntaje e		PM/pl exp b	Matches c	CS / d	Puntaje e										
67	38,3/7,02	14	44	194						42,6/8,41	AT1G09340	Proteína de 41 kDa de unión a ARN en cloroplasto B (CSP41B)	ARN. Regulación de la transcripción.	2,0					
83	40,9/5,34	12	46	288						44,0/5,91	AT1G32060	Fosforibulosaquinasa (PRK)	PS. Ciclo de Calvin.	1,7					
90	42,4/8,3	13	50	344						44,2/7,95	AT2G13360	Alanina:Gloxilato aminotransferasa (AGT)	PS. Aminotransferasa de peroxisoma.	1,6					
96	42,7/6,33	5	8	97						43,0/6,78	AT1G42970	Subunidad β Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPB)	PS. Ciclo de Calvin.	1,5					
114	49,3/6,78	16	36	367						53,3/6,88	AT1G23310	Glutamato:Gloxilato aminotransferasa 1 (GGT1)	PS. Aminotransferasa de peroxisoma.	1,6					
167	79,3/5,25	21	39	429						86,1/5,28	AT1G62750	Cotiledón nevado 1 (SCO1)	Síntesis de proteínas. Elongación.	1,7					
178	97/5,96	7	7	103						114/6,63	AT2G26080	P2 - Glicina descarboxilasa (GLDP2)	PS. Fotorrespiración/ Metabolismo C1.	2,0					
226	52,8/7,4	20	38	229						57,0/8,37	AT4G37930	Serina Hidroximetil Transferasa 1 (SHM1)	Metabolismo C1.	1,6					
18	28,9/5,13	23	70	473	9	28/5,05	8	34	315	35,0/5,96	AT3G50820	Subunidad O-2 del fotosistema II (PSBO-2)	PS. Reacción Lumínica.	1,7	1,8				
					10	27,7/5,15	11	44	363						1,8				
50	33,7/6,76	11	29	218	24	32,5/6,37	17	53	256	28,0/8,51	AT1G20020	Ferredoxina NADP(+)-Oxidoreductasa 2 (FNR2)	PS. Reacción Lumínica.	1,6	1,9				
					292	32,8/6,63	17	46	410						1,7				
105	45,3/5,1	13	45	411	96	44,5/5,06	8	25	231	52,0/5,93	AT2G39730	Rubisco activasa (RCA)	PS. Ciclo de Calvin.	1,5	1,7				
					25	32,5/5,86	16	56	388						1,9				
					290	32,4/5,69	15	43	433						40,3/8,3	AT5G66190	Ferredoxina NADP(+)-Oxidoreductasa 1 (FNR1)	PS. Reacción Lumínica.	1,6
					26	34,2/5,90	7	25	137						32,9/5,80	AT2G38230	Biosíntesis de Piridoxina (PDX)	Cofactor, metabolismo de vitaminas.	2,9
					44	37,2/6,52	5	9	246	43,9/8,74	AT3G63140	Proteína de 41 kDa de unión a ARN en cloroplasto A (CSP41A)	ARN. Regulación de la transcripción.	1,7					
					71	40,5/5,87	6	25	313	38,3/5,53	AT4G26530	Proteína de la superfamilia de aldolasas (M3E9.40)	PS. Ciclo de Calvin. Glicólisis.	2,0					
					169	55,3/5,28	16	31	304	55,3/4,9	ATCG00120	Subunidad alfa de la ATP-sintetasa (ATPA)	Metabolismo. PS.	1,8					
					194	62,2/5,32	11	32	237	74,2/6,24	AT2G30950	<i>Variegated 2</i> (VAR2)	Regulación. Degradación de proteínas. Metaloproteasa.	1,7					
					297	37,2/6,28	13	43	228	40,9/8,17	AT4G04640	Subunidad γ ATP-sintetasa de cloroplasto (ATPC1)	PS. Reacción Lumínica.	1,9					
					670	102,8/5,64	7	15	99	60/4,59	AT1G22530	<i>Patellin 2</i> (PATL2)	Transporte.	1,8					
					995	28,7/5,58	8	38	272	34,9/8,64	AT2G37660	Superfamilia Rossmann, unión de NAD(P) (F13M22.16)	Desconocida.	1,7					

^a Número de spot según se asignó en la Figura 5.3; ^bPM (kDa)/pl experimental, calculados con el software "Image Master 2D Platinum"; ^c Número de péptidos que su relación masa/carga coincide con los picos observados por MS; ^d Cobertura de secuencia con los péptidos que coincidieron; ^e Puntaje reportado en el Mascot luego de la búsqueda en la base de datos de NCBI, un valor > a 60 señala que la proteína se encuentra identificada significativamente; ^f PM (kDa)/pl teórico obtenidos de la base de datos de TAIR. ^j Identificador genético en Arabidopsis; ^k Proceso celular en el que participa la proteína, integramos información de PPBD y MapMan, PS: Fotosíntesis. ^h diferencia en los niveles de expresión entre genotipos.

Tabla 5.3. Identificación por MS de spots sobre-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.

Spot a	pH 3-10				pH 4-7					PM/pl Teórico f	AGI ^j	Nombre de la Proteína	Proceso celular ^k	FC ^h 3-10	FC ^h 4-7
	PM/pl exp b	Mat- ches c	CS / d	Pun- taje e	Spot a	PM/pl exp b	Mat- ches c	CS / d	Pun- taje e						
61	37,3/5,02	4	21	219	411	36,0/5,12	3	---	69	24,7/4,65	AT4G20260	Proteína 1 de unión a cationes asociada a membrana plasmática (PCAP1)	Señalización.	1,7	2,4
94	42/6,70	6	25	97	967	42/6,61	13	49	474	42,4/7,59	AT5G14780	Formato Deshidrogenasa (FDH)	Metabolismo C1.	2,1	2,3
187	145,4/4,9 6	11	28	164	991	149,7/5,08	10	21	189	60/4,59	AT1G22530	<i>Patellin 2</i> (PATL2)	Transporte.	1,5	2,0
234	55/4,39	11	60	233	166	55,3/4,55	9	48	215	29,9/4,44	AT1G20440	Proteína regulada por el frío 47 (COR47)	Estrés abiótico	2,3	2,3
					18	30,0/4,89	9	33	283	33,36/4,44	AT1G35160	Factor general de regulación 4 (GRF4)	Señalización.		1,6
					28	33,2/5,66	6	27	109				Pertenece a un grupo de familias de proteínas miosinas y jacalinas.		1,9
					389	34/5,52	9	34	284	32,2/5,56	AT3G16420	Proteína de unión a PYK10 (PBP1)			1,8
					75	41,3/6,00	13 11	34 28	310 121		AT2G20420 AT1G01560	MAP quinasa 11 (MPK11). Subunidad beta de Succinil-CoA ligasa [formadora de GDP]			
					106	46,2/5,81	16	53	389	42,8/5,60	AT3G17390	Metionina Adenosiltransferasa 4 (MTO3)	Proteína de unión a metales.		1,7
					131	50,8/4,73	13	40	305	43,5/4,42	AT5G39570	MIJ24.6, NM_123319	Desconocida.		2,0
					181	58,7/4,92	8	19	69	56,4/4,64	AT1G77510	Disulfuro Isomerasa 6 (PDI6)	Redox.		1,7
					953	37,2/5,37	20	69	328	36,2/5,02	AT1G35720	<i>Annexin 1</i> (ANNAT1)	Organización celular.		1,9
					966	38,0/4,80	6	45	211	20,8/5,2	AT1G76180	Respuesta temprana a la deshidratación 14 (ERD14)	Estrés abiótico.		3,2
					989	95,0/5,03	7	10	143	64/4,5	AT1G72150	<i>Patellin 1</i> (PATL1)	Transporte.		1,7

^a Número de spot según se asignó en la Figura 5.3; ^bPM (kDa)/pl experimental, calculados con el software "Image Master 2D Platinum"; ^c Número de péptidos que su relación masa/carga coincide con los picos observados por MS; ^d Cobertura de secuencia con los péptidos que coincidieron; ^e Puntaje reportado en el Mascot luego de la búsqueda en la base de datos de NCBI, un valor > a 60 señala que la proteína se encuentra identificada significativamente; ^f PM (kDa)/pl teórico obtenidos de la base de datos de TAIR. ^j Identificador genético en Arabidopsis; ^k Proceso celular en el que participa la proteína, integramos información de PPBD y MapMan, PS: Fotosíntesis. ^h diferencia en los niveles de expresión entre genotipos.

5.1.3 Análisis bioinformático de las proteínas identificadas

5.1.3.1 Ontologías Genéticas

La Ontología de Genes (GO) permite la descripción precisa de los productos génicos anotados en las bases de datos (<http://www.geneontology.org/>) mediante una terminología unificada y lógicamente consistente. El análisis del enriquecimiento en una categoría (término) GO determinada en un conjunto de genes permite determinar los procesos, funciones y localizaciones que están sobre- o sub-representadas en ese conjunto de genes de interés. Básicamente, se compara la frecuencia de una categoría en el conjunto de genes de interés con la frecuencia de la misma categoría calculada para los genes de un genoma (genes de referencia de la base de datos).

Con el objetivo de entender la relevancia biológica de los grupos de proteínas sobre- y sub-expresadas encontrados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, analizamos qué términos de la GO podrían encontrarse estadísticamente sobre-representados. La clasificación la realizamos dentro de la GO denominada “Proceso Biológico” y como base de datos utilizamos una versión reducida de GO denominada *Slim*. Esta base de datos contiene un subconjunto de términos GO que aportan información general del contenido de la ontología sin entrar en detalle en cada uno de los términos (<http://www.geneontology.org/GO.slims.shtml>).

Para las proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* los términos enriquecidos fueron 9: fotosíntesis, generación de precursores de metabolitos y energía, procesos catabólicos, procesos biosintéticos, procesos de metabolismo de carbohidratos, respuestas a estímulos abióticos, respuestas a estímulos bióticos, respuesta a estrés y organización de componentes celulares (Tabla 5.3, punto 1). Un análisis más detallado de este último término reveló un enriquecimiento en los términos “organización de cloroplastos” y “organización de membranas de tilacoides” (Tabla 5.3, punto 2).

Los términos enriquecidos para las proteínas sobre-expresadas en el mutante fueron 3: respuestas a estímulos abióticos, respuesta a estrés y respuesta a estímulos endógenos (Tabla 5.3, punto 3).

Los términos “respuesta a estrés” y “respuestas a estímulos abióticos” los encontramos enriquecidos cuando analizamos las proteínas tanto sub- como sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Tabla 5.3, puntos 1 y 3). Entonces evaluamos en detalle las ontologías correspondientes. Para las proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* hallamos enriquecidos los términos respuesta al frío y respuesta

a estímulo lumínico (Tabla 5.3, punto 2) mientras que para las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* encontramos los términos respuesta a estímulos de temperatura (dentro del cual estaban enriquecidos los términos respuesta al frío y respuesta a calor) y el término respuesta a la sequía (Tabla 5.3, punto 4).

Es interesante destacar que en el caso de las proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* el término “respuesta a frío” estaba integrado por proteínas que participan activamente en la fotosíntesis pero cuya actividad se modifica en respuesta al frío como se ha reportado anteriormente (Fowler y Thomashow, 2002; Yan *et al.*, 2006); por otro lado, las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* que integraron el mismo término fueron proteínas relacionadas directamente con la tolerancia al frío como se ha reportado en varios trabajos (Clark *et al.*, 2010; Kawamura y Uemura, 2003; Puhakainen *et al.*, 2004).

Estos datos, sobre cuáles eran los términos de GO enriquecidos, fueron posteriormente utilizados como base para el estudio de las respuestas fisiológicas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.

Tabla 5.4. Enriquecimiento en Ontologías Genéticas (GO) de las proteínas sub- y sobre- expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. La clasificación se realizó usando BINGO 2.44. GO es el número que identifica al término.

Sub-expresadas en <i>phyA phyB cry1 cry2</i>					
1. Slim GO – Procesos Biológicos					
GO	Descripción	p-valor ajustado ^a	Frecuencia en el grupo	Frecuencia en el Genoma ^b	Nombre de la proteína ^c
15979	Fotosíntesis	1,65E-20	14/20 70,0/	419/30507 1,3/	SCO1 CSP41A RCA GAPB PRK FNR1 ATPC1 SHM1 FNR2 ATPA VAR2 PSBO-2 CSP41B AT2G37660
6091	Generación de precursores de metabolitos y energía	4,09E-20	15/20 75,0/	664/30507 2,2/	SCO1 CSP41A RCA GAPB PRK FNR1 ATPC1 SHM1 FNR2 ATPA VAR2 PSBO-2 CSP41B AT2G37660 AT4G26530
9056	Procesos catabólicos	2,25E-13	16/20 80,0/	2530/30507 8,2/	SCO1 CSP41A GAPB PRK FNR1 GGT1 ATPC1 SHM1 FNR2 ATPA VAR2 PSBO-2 CSP41B GLDP2 AT2G37660 AT4G26530
9058	Procesos Biosintéticos	8,97E-11	18/20 90,0/	5639/30507 18,4/	SCO1 CSP41A RCA PDX AGT GAPB PRK FNR1 GGT1 ATPC1 FNR2 SHM1 ATPA VAR2 PSBO-2 CSP41B AT2G37660 AT4G26530
5975	Procesos de metabolismo de carbohidratos	1,31E-10	13/20 65,0/	1941/30507 6,3/	SCO1 CSP41A GAPB PRK FNR1 ATPC1 FNR2 ATPA VAR2 CSP41B PSBO-2 AT2G37660 AT4G26530
9628	Respuesta a estímulo abiótico	4,47E-10	14/20 70,0/	2755/30507 9,0/	CSP41A RCA AGT GAPB PRK FNR1 GGT1 SHM1 FNR2 ATPA VAR2 PSBO-2 CSP41B AT2G37660
9607	Respuesta a estímulo biótico	7,07E-08	10/20 50,0/	1533/30507 5,0/	FNR1 PRK FNR2 SHM1 ATPA RCA PSBO-2 CSP41B GAPB AT2G37660
6950	Respuesta a estrés	6,73E-07	13/20 65,0/	4075/30507 13,3/	RCA AGT GAPB PRK FNR1 GGT1 SHM1 FNR2 ATPA VAR2 CSP41B PSBO-2 AT2G37660
16043	Organización de componentes celulares	7,63E-06	11/20 55,0/	3337/30507 10,9/	FNR1 PRK SCO1 ATPC1 CSP41A FNR2 VAR2 PSBO-2 CSP41B GAPB AT2G37660
2. Procesos Biológicos más enriquecidos dentro de "Respuesta a estrés", "Respuesta a estímulo abiótico" y "Organización de componentes celulares "					
9409	Respuesta a frío	1,09 E-9	9/20 45,0/	616/28699 2,1/	FNR1 PRK FNR2 SHM1 ATPA RCA CSP41B GAPB AT2G37660
9416	Respuesta a estímulo lumínico	2,70 E-5	7/20 35,0/	1172/28699 4,0/	PRK CSP41A VAR2 RCA PSBO-2 CSP41B GAPB
9658	Organización de cloroplastos	8,33 E-8	6/20 30,0/	250/28699 0,8/	PRK SCO1 VAR2 PSBO-2 CSP41B GAPB
10027	Organización de membranas de tilacoides	2,80 E-5	4/20 20,0/	198/28699 0,6/	SCO1 VAR2 PSBO-2 CSP41B
Continúa en la siguiente página →					

Sobre-expresados en <i>phyA phyB cry1 cry2</i>					
3. Slim GO – Procesos Biológicos					
GO	Descripción	p-valor ajustado	Frecuencia en el grupo	Frecuencia en el Genoma ^b	Nombre de la proteína ^c
6950	Respuesta a estrés	3,50 E-04	8/12 66,6/	4075/30507 13,3/	MTO3 PCAP1 PATL1 COR47 PDI6 ERD14 FDH ANNAT1
9628	Respuesta a estímulo abiótico	3,50 E-04	7/12 58,3/	2755/30507 9,0/	MTO3 PCAP1 PATL1 COR47 PDI6 ERD14 ANNAT1
9719	Respuesta a estímulo endógeno	1,50 E-02	4/12 33,3/	1627/30507 5,3/	COR47 GRF4 ERD14 ANNAT1
4. Procesos Biológicos más enriquecidos dentro de "Respuesta a estrés" y "Respuesta a estímulo abiótico"					
9266	Respuesta a estímulos de temperatura	2,80 E-06	7/12 58,3/	947/28699 3,2/	MTO3 PCAP1 PATL1 COR47 PDI6 ERD14 ANNAT1
9409	Respuesta a frío	1,31 E-04	7/12 58,3/	947/28699 3,2/	MTO3 PCAP1 PATL1 COR47 PDI6 ERD14 ANNAT1
4908	Respuesta a calor	1,93 E-04	4/12 33,3/	296/28699 1,0/	COR47 PDI6 ERD14 ANNAT1
9414	Respuesta a la sequía	5,33 E-04	4/12 33,3/	396/28699 1,3/	PCAP1 COR47 ERD14 ANNAT1

^a p-val < 0,05 señala que la frecuencia en el grupo es significativamente diferente de la frecuencia en el Genoma. ^b El número de genes utilizados para calcular la frecuencia en el Genoma es diferente según la base de datos que se utilice (la Slim-GO o la base de datos de GO-Procesos Biológicos). ^c Nombre de la proteína según se indica en la Tabla 5.1 o 5.2

5.1.3.2 Localización subcelular

Dado que el 90 / (18 de 20) de las proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* participan en funciones asociadas a los cloroplastos y organelas de producción de energía, comparamos estas proteínas con la base de datos de proteínas cloroplásticas publicada por Ferro *et al.* (2010). Observamos que 14 de las 20 proteínas localizaban en cloroplasto, 8 de las cuales localizaban en el estroma (RCA, AT2G37660, GAPB, PRK, SCO1, AT4G26530, CSP41A y CSP41B) y 6 en tilacoides (VAR2, FNR1, ATPC1, FNR2, ATPA, PSBO-2). De las 6 restantes, según SUBA (<http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>), PDX localiza en citoplasma, GLDP2 y SHM1 en mitocondrias, AGT1 y GGT1 en peroxisoma y PATL2 en membrana plasmática y vacuola.

Las proteínas de localización tilacoidal (PSBO-2, FNR1, FNR2, ATPC1 y ATPA) se encuentran involucradas en la etapa fotodependiente de la fotosíntesis (Fig. 5.4) mientras que las proteínas del estroma (PRK, GAPB, RCA y AT4G26530) participan del Ciclo de Calvin (Fig. 5.4). Por otro lado, SHM1 y GLDP2 (en mitocondrias), AGT1 y GGT1 (en peroxisomas) participan en la fotorrespiración (Fig. 5.4). De las proteínas de cloroplastos, a las cuales no se les encontró asociada ninguna actividad enzimática, SCO1 se encuentra involucrada en la organización de cloroplastos (Albrecht *et al.*, 2006), mientras que VAR2 participa de la biogénesis de las membranas tilacoidales (Liu *et al.*, 2010). CSP41B y CSP41A forman complejos que estabilizan ARNm y precursores de ARNr en el cloroplasto (Qi *et al.*, 2012) y la función de AT2G37660 aún se desconoce.

De las 12 proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* sólo ERD14 y FDH se encontraron en cloroplastos, ERD14 en la envoltura y FDH en el estroma (Ferro *et al.*, 2010). Para el resto de las proteínas no observamos ningún patrón definido de localización subcelular.

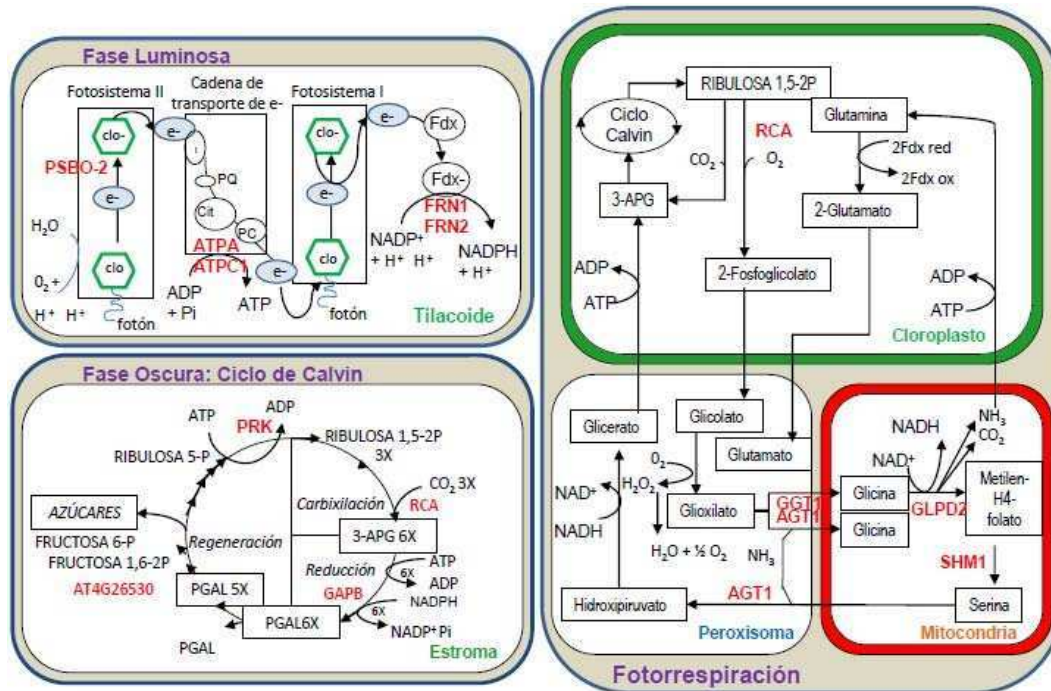


Figura 5.4. Reacciones de fotosíntesis y fotorrespiración en las que participan enzimas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. Las proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* se marcaron en rojo. Este esquema se realizó utilizando el programa Mapman y se completó con datos tomados del *Plant Metabolic Network* (PMN, <http://www.plantcyc.org/>).

5.1.3.3 Interactomas

Con la intención de explorar en bases de datos públicas la posible asociación entre las proteínas que se co-expresaban en nuestras condiciones experimentales (sobre- y sub-expresadas) generamos redes de genes utilizando el programa GeneMANIA (<http://www.genemania.org/>). La base de datos de GeneMANIA brinda asociación funcional al integrar información proveniente de diferentes tipos de base de datos (perfiles de expresión de genes y proteínas, interacción proteína-proteína, localización subcelular, etc.) y permite predecir qué otras entidades (genes o proteínas), funcionalmente relacionadas, podrían estar involucradas en la respuesta en estudio. Vale remarcar que el peso que se le da a cada variable en la red no se obtiene usando bases de datos de GO (ver M&M: 3.3.16.7) por lo que ésta aproximación no es redundante con el estudio de enriquecimiento de términos GO ya expuesto, sino que son análisis complementarios.

Realizamos 2 redes, en una ingresamos como nodos principales los AGIs de las proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y en la otra los AGIs de las proteínas sobre-expresadas en el mismo (Fig. 5.5 A y B). Cuánto se puede confiar en la predicción de un cambio en las proteínas no detectadas en el análisis proteómico, dependerá

de la confianza en los agrupamientos generados en la red. Para tener en cuenta esto, realizamos un análisis topológico de cada red. Uno de los parámetros que se obtiene del análisis es el “coeficiente de agrupamiento” que está influenciado por la cantidad de uniones que se establecen entre los distintos nodos y toma valores entre 0 y 1. Los genes sub-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* formaron un grupo con un coeficiente de agrupamiento promedio alto (0,890) con dos nodos aislados (PATL2 y PDX) mientras que los genes sobre-expresados formaron un grupo con un coeficiente bajo (coeficiente: 0,544) y también 2 nodos aislados (ANNAT1 y PBP1) (Fig. 5.5 A y B). Para poder comparar los coeficientes de agrupamiento generamos redes con genes tomados al azar del genoma de Arabidopsis. Al generar una red con una lista de 20 genes, el coeficiente fue de 0,590 con 12 nodos aislados y al generarla con 12 genes tomados al azar fue de 0,416 con 6 nodos aislados (datos no mostrados). El alto coeficiente de agrupamiento de los genes sub-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (0,890) nos permite predecir la sub-expresión de otras entidades que no identificamos en el análisis proteómico (marcadas con un círculo en la Fig. 5.5 A). Según la GO “Proceso Biológico”, la mayoría de estas proteínas predichas se encuentran involucradas en fotosíntesis y generación de precursores de metabolitos y energía, como por ejemplo PSBO-1, LHCB4.1 y LHCA3, apoyando la confianza de la prueba. En la red generada a partir de las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* el coeficiente de agrupamiento fue cercano al obtenido tomando genes al azar por lo tanto no podemos predecir qué otras entidades se encuentran sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.

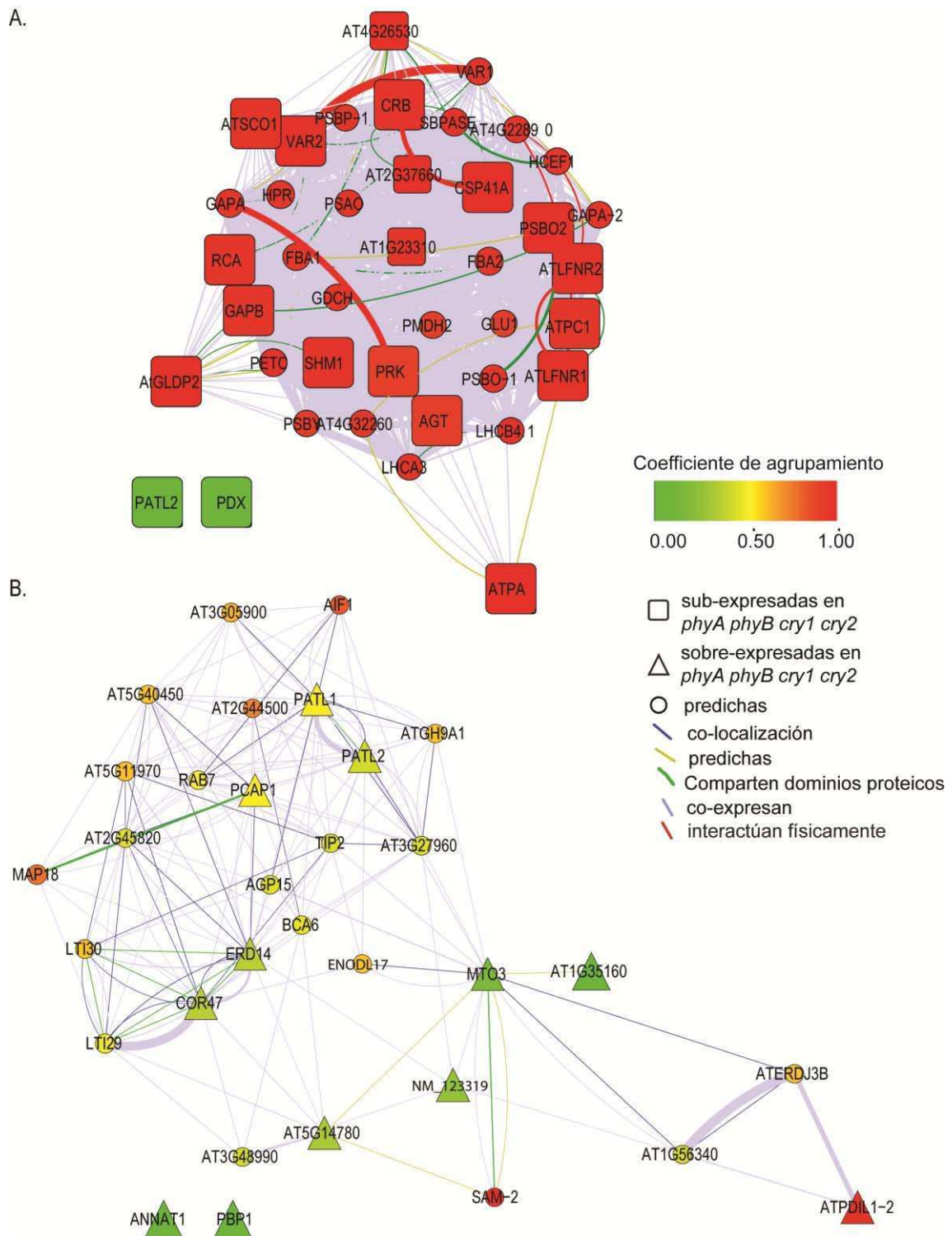


Figura 5.5. Redes de interacción generadas en GeneMANIA. A. Red generada utilizando como nodos principales las 20 proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. **B.** Red generada utilizando como nodos principales las 12 proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.

5.1.4. Análisis de los cambios en el proteoma de plántulas etioladas

En las secciones anteriores analizamos las diferencias existentes en el perfil de expresión de proteínas entre el genotipo WT y el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* cuando las plantas crecen bajo luz blanca. Para estudiar si la expresión diferencial de las proteínas identificadas era dependiente de la luz o si ya se observaban diferencias en la expresión de las mismas antes de exponer las plántulas a la luz, decidimos estudiar el proteoma de plántulas crecidas en completa oscuridad.

Plántulas WT y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* fueron sembradas en MS 0,5X; luego del pulso de luz para inducir la germinación, se mantuvieron en completa oscuridad durante 5 días y se cosecharon en luz verde tenue. En estas condiciones, ambos genotipos fueron fenotípicamente indistinguibles (largo hipocotilo, media \pm EE en mm: WT= $8,8 \pm 0,5$; *phyA phyB cry1 cry2*: $8,9 \pm 0,5$; n=8, ambos genotipos tenían los cotiledones cerrados). Se extrajeron proteínas totales utilizando 10 / TCA/Acetona (ver M&M, 3.3.15.1: protocolo 3) y se corrieron 250 μ g totales en tiras comerciales de 7 cm en el intervalo de pH de 4 a 7. Se realizaron 3 réplicas biológicas en las que encontramos 222 *spots* en al menos 2 de las réplicas biológicas de cada genotipo. Como puede observarse, el perfil general de expresión de proteínas fue muy diferente al patrón de expresión de proteínas crecidas a la luz (comparar Fig. 5.3 B con Fig. 5.6). Sólo cuatro *spots* resultaron significativamente diferentes ($p < 0,05$ y FC $> 1,2$) estando todos sobre-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.6).

Identificamos estos 4 *spots* por MS. Los *spots* 1 y 2 resultaron ser la misma proteína llamada CRU3 (cruciferina 3), muy probablemente dos formas diferencialmente fosforiladas como ya se ha descrito (Wan *et al.*, 2007); y en el *spot* 4 identificamos la CRU1 (cruciferina 1) mientras que el *spot* 3 tenía una mezcla de proteínas (Tabla 4.4). Las cruciferinas, que son las principales proteínas de reserva en semillas de *Arabidopsis*, se acumulan durante la etapa tardía de formación del embrión y comienzan a degradarse rápidamente a partir de la germinación de las semillas. Después de 4 días de crecer en luz casi no hay niveles detectables mediante *Western blot* de cruciferinas en plantas de genotipo WT (Job *et al.*, 2005). Estos resultados fueron consistentes con la observación de que en mutantes *phyB* crecidos en oscuridad aumenta la expresión de un grupo de transcritos con funciones de reserva en la semilla, entre los que se encuentran los de CRA1 y CRU3 (Mazzella *et al.*, 2005).

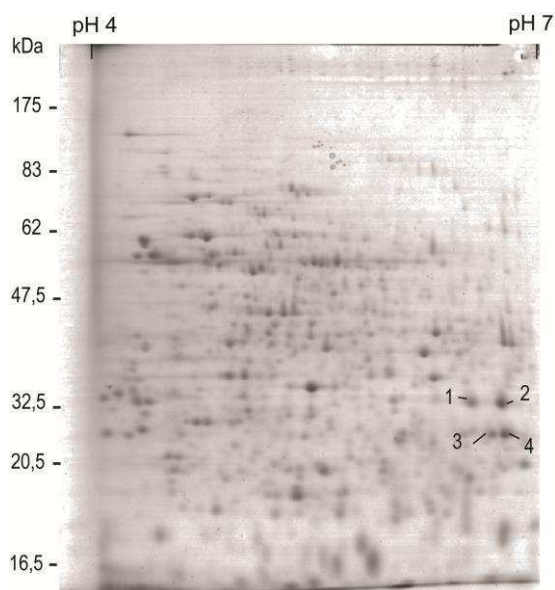


Figura 5.6. Gel 2D de plántulas etioladas. Se muestra un gel modelo realizado a partir de extractos proteicos totales de plántulas crecidas durante 5 días en oscuridad. Se numeran (1-4) las proteínas diferencialmente expresadas y secuenciadas por MS.

Tabla 5.4. Identificación por MS de las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en comparación con el WT en plántulas etioladas.

N° spot	pi/PM experimental	pi/PM teórico*	AGI	Nombre	Proceso Biológico	FC
1	6,6/32,0	6,99/58,2	AT4G28520	Cruciferina 3 (CRU3)	Proteína de reserva	1,75
2	6,8/32,2	6,99/58,2	AT4G28520	CRU3	Proteína de reserva	1,4
3	6,7/28,7	7,88/52,6	AT5G44120	Cruciferina 1 (CRU1/CRA1)	Proteína de unión a GTP relacionada a RAS	1,3
		6,99/58,2	AT4G28520	CRU3		
		6,86/25,1	AT5G20020	Proteína de unión a GTP relacionada a RAS		
4	6,8/28,2	7,88/52,6	AT5G44120	CRA1/CRU1	Proteína de reserva	1,2

* PM del precursor, en vacuola se cliva en las subunidades α y β de 30 y 20 kDa, respectivamente.

En base a estos resultados podemos concluir que las diferencias observadas en los niveles de expresión de proteínas entre el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y el genotipo WT en plántulas crecidas bajo luz blanca (Fig. 5.3, Tabla 5.1 y 5.2) son consecuencia de la deficiencia del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en la percepción de las señales lumínicas, ya que en completa oscuridad no se vieron alteradas las mismas proteínas. Esto parece evidente para las proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* que, como mostramos anteriormente, participan de procesos relacionados con la fotosíntesis y generación de energía, pero no resultaba evidente para las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*.

5.2 Ensayos fisiológicos

Teniendo en consideración que los cambios observados en el proteoma del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* estarían reflejando alteraciones fisiológicas analizamos aquellas respuestas vinculadas a los términos enriquecidos en el análisis de las GO.

5.2.1 El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* tiene severamente alterada la tasa fotosintética

Con la intención de analizar en qué medida la reducción en la expresión de proteínas cloroplásticas repercutía en la tasa fotosintética del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* medimos el consumo neto de CO₂ de dicho genotipo y de plantas WT, en colaboración con el Dr. Edmundo Ploschuk de la Facultad de Agronomía (UBA). Debido a limitaciones técnicas este experimento no pudo realizarse con plántulas y utilizamos plantas adultas. Las mediciones se realizaron en plantas WT de 44 días de crecimiento que se encontraban en el estadio 6.1 (plantas que ya habían extendido el vástago y tenían las primeras flores abiertas) y en plantas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* que alcanzaron el mismo estadio al día 65. Considerando que en plantas de 65 días la tasa fotosintética será menor debido a que la fotosíntesis disminuye cuando las hojas comienzan a movilizar reservas antes de la senescencia, decidimos analizar la tasa fotosintética de plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* de 44 días, que se encontraban en el estadio 1.12 (plantas con 12 hojas en la roseta y en las que todavía no se observa el botón floral).

El consumo neto de CO₂ del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fue entre un 65 y 70 / menor que el consumo del WT independientemente del estadio del desarrollo en el que se encontraban las plantas (Fig. 5.7 A). Este menor consumo neto de CO₂ fue consistente con un menor contenido de clorofila de las hojas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.7 C). La tasa de transpiración del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* disminuyó también entre un 65 y 70 / (Fig. 5.7 B).

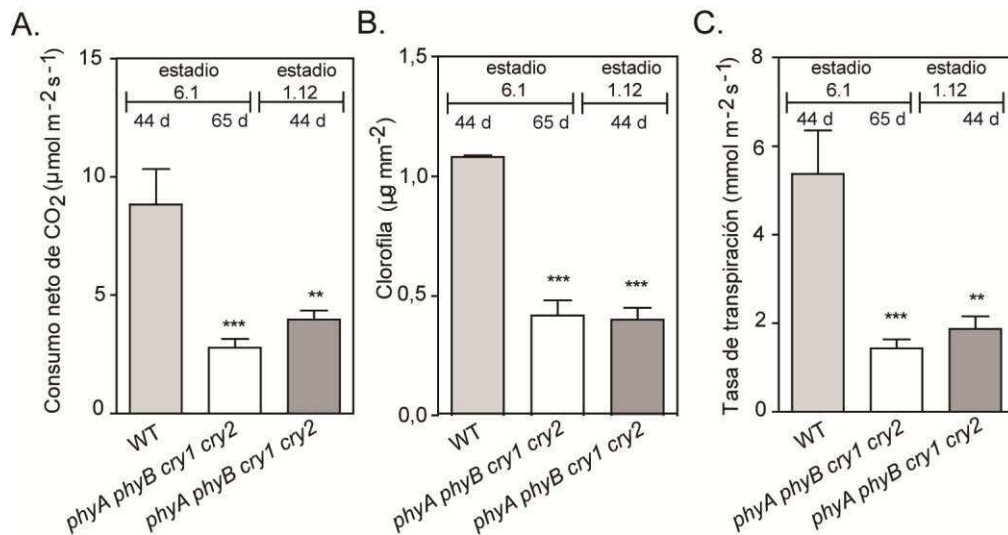


Figura 5.7. A. Tasa fotosintética, B. Tasa de transpiración y C. Contenido de clorofila. Las mediciones se realizaron en plantas WT en el estadio 6.1 (44 días) y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* en el estadio 6.1 (65 días) y 1.2 (44 días). Los datos representan la media \pm EE, n=8, ** p<0,01, *** p<0,001.

5.2.2 El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* es más resistente al estrés hídrico

Se ha descrito que plantas mutantes *phyB* y doble mutantes *cry1 cry2* son más tolerantes a la sequía que plantas WT (Liu *et al.*, 2012a; Mao *et al.*, 2005). Esto previamente se lo ha vinculado a la densidad de estomas y a la baja tasa de transpiración de las plantas mutantes. Considerando que el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* presentó un 30% de la tasa de transpiración de plantas WT (Fig. 5.7 C), además de sobre-expresar proteínas de resistencia a la sequía (Tabla 5.3), decidimos analizar su resistencia a la sequía.

Plantas del genotipo WT y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* sembradas en macetas dejaron de regarse en el estadio 1.03 (plantas con 3 hojas, WT al día 14, cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* al día 18). Luego de 14 días se restableció el riego y 5 días después se calculó la supervivencia. Realizamos 4 experimentos independientes con al menos 15 plantas de cada genotipo en cada uno. Luego del tratamiento sobrevivieron un $21 \pm 16\%$ de plantas WT y un $76 \pm 12\%$ de plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2*. Es decir, el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fue significativamente más tolerante a la sequía (p<0,05). La Fig. 5.8 muestra que el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* no solamente fue más resistente luego de 14 días de sequía sino que no se evidenció en general un daño permanente en el tejido verde. Esto fue consistente con la menor tasa de transpiración del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.7 B).

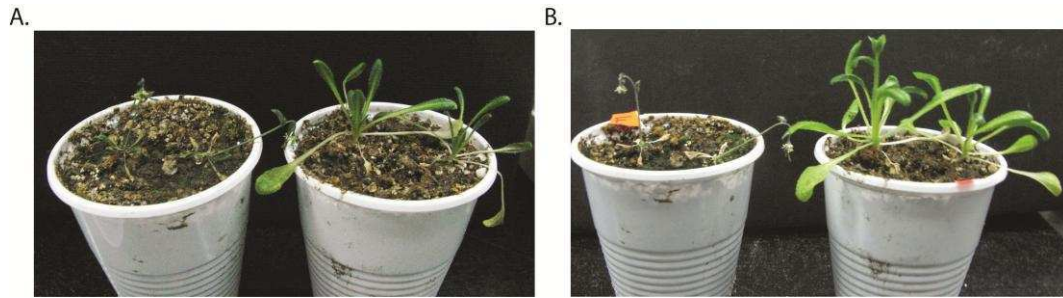


Figura 5.8. Resistencia a la sequía. Plantas WT y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* dejaron de regarse durante 14 días cuando alcanzaron el estadio 1.03 y luego se restableció el riego. **A.** Foto tomada al día 14 de estrés hídrico; WT (izquierda) y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* (derecha). **B.** Foto tomada 5 días después desde que se volvieron a regar; WT (izquierda) y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* (derecha). Realizamos 4 experimentos independientes con al menos 15 plantas de cada genotipo en cada uno.

5.2.3 El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* es más sensible a un *shock* de temperatura congelante que el genotipo WT

Tomando en cuenta que el 58 / (7 de 12) de las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* se encontraron involucradas en tolerancia al frío, decidimos analizar si plántulas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* eran más resistentes al congelamiento.

Plantas del genotipo WT y del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fueron crecidas en macetas a 22 °C hasta el estadio 1.02, se las expuso a -5 °C durante 4 h y luego se volvieron a crecer a 22 °C. Después de 5 días sobrevivieron el 97 ± 3 / de las plantas WT y el 16 ± 9 / de las plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.9 A). Plantas en un estadio más avanzado (1.03), fueron sometidas al mismo tratamiento sobreviviendo en este caso el 100 / de ambos genotipos. Seguidamente decidimos probar con un tratamiento más prolongado y expusimos las plantas a -5 °C durante 6 h 30 min. Bajo estas condiciones, sobrevivieron el 98 ± 2 / de las plantas del genotipo WT y el 20 ± 13 / de las plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.9 B). Por lo tanto, los resultados obtenidos a partir de ambos tratamientos sugieren que el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* es más sensible que el genotipo WT al congelamiento. Estos resultados discrepaban con los datos de sobre-expresión de las proteínas relacionadas a la tolerancia al frío (Tabla 5.3) y también con trabajos previos en los que se propuso que el mutante *phyB* sería más tolerante al congelamiento (Franklin y Whitelam, 2007; Lee y Thomashow, 2012). Es así que incorporamos al mutante *phyB* en nuestros experimentos para analizar su tasa de supervivencia. Observamos que, en el estadio 1.02 luego de 4 h a -5 °C, su tasa de supervivencia era comparable a la observada para el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.9 C).

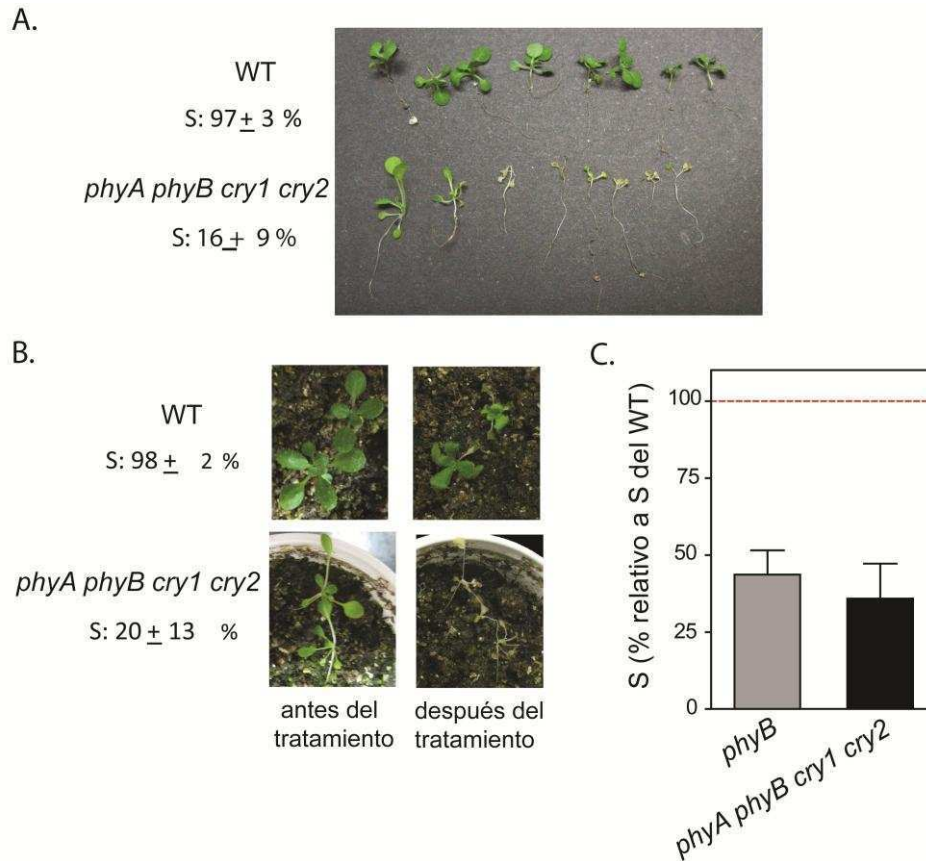


Figura 5.9. El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* es más sensible a un *shock* de temperatura congelante que el genotipo WT. **A. Plantas WT y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* en el estadio 1.02 fueron expuestas a -5 °C durante 4 h. Se fotografiaron 5 días después del tratamiento (n= 4 réplicas, cada una de 8 plántulas). **B.** Plantas en el estadio 1.03 expuestas a -5 °C durante 6 h 30 min. Se fotografiaron antes del tratamiento (panel izquierdo) y 5 días después (panel derecho) (n= 4 réplicas, cada una de 4 plantas). **C.** Se repitió el experimento de la figura A incorporando al mutante *phyB* en el análisis, n=8, datos: media \pm EE. Se analizó si la S del mutante *phyB* era diferente a la S del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* mediante un *t-Test*. S: porcentaje de plantas que sobrevivieron 5 días después del tratamiento (media \pm EE).**

Al finalizar los tratamientos de frío observábamos frecuentemente que las plántulas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y del simple mutante *phyB* presentaban el hipocotilo y/o alguno de los pecioloos quebrados luego del proceso de descongelamiento, por lo que la muerte observada en las mutantes podía ser consecuencia del daño mecánico que sufrían en ese momento y no consecuencia directa del tratamiento de frío. Entonces repetimos el ensayo con plántulas en el estadio 1.02 realizando un seguimiento de las mismas y diferenciando las plántulas sanas de las dañadas. En este ensayo el genotipo WT no sufrió daño durante el descongelamiento (de 24 plantas analizadas) y sobrevivieron todas (100/). Sin embargo, de 46 plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* que entraron en el tratamiento de frío sólo 20 no sufrieron daño mecánico y de estas sobrevivieron 12 (60 /). Además, de las 34 plantas mutantes de *phyB* que recibieron un tratamiento de frío, 21 permanecieron sanas y de estas

sobrevivieron 10 (48 /). Por lo tanto, aún descartando el daño mecánico que ocurría durante el descongelamiento, observamos una mayor sensibilidad al tratamiento de un *shock* de congelamiento del mutante *phyB* y del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en relación al genotipo WT.

5.2.4 El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* tiene menor insaturación de ácidos grasos que el genotipo WT

Contrariamente a lo que esperábamos a partir del análisis del perfil proteico, las plantas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* resultaron ser más sensibles que el genotipo WT al congelamiento (Fig. 5.9). Entonces decidimos estudiar si algún otro factor existente en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* podría conferirle la condición de sensibilidad frente al estrés por frío.

Cuando las plantas se exponen a un estrés por frío, además de aumentar la expresión de proteínas asociadas a la tolerancia a dicho estrés (Puhakainen *et al.*, 2004), también se produce un aumento en la insaturación de los ácidos grasos de las membranas celulares manteniéndose así la fluidez de las mismas (Uemura *et al.*, 1995). En la literatura existen evidencias de que la luz regularía la actividad de las desaturasas en plantas (Newman, 1971; Nishiuchi *et al.*, 1995). La familia de genes *FADs* (ω -3 *fatty acid desaturase*) regulan el nivel de insaturación de ácidos grasos: FAD5, FAD6, FAD7, FAD8 en cloroplastos y FAD2 y FAD3 en retículo endoplasmático (revisado en Wallis y Browse, 2002). Entonces, como primera aproximación para analizar si estaba alterada la saturación de los ácidos grasos en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, realizamos una búsqueda en publicaciones científicas de cambios en los niveles de expresión de las FADs en respuesta a la luz o en mutantes de fotorreceptores. En el análisis de transcriptomas de plántulas crecidas en oscuridad que recibieron 4 h de luz R, RL, azul o blanca se observó que FAD6 se indujo sólo con RL, FAD7/8 y FAD5 en todas las luces mientras que no se reportaron cambios en FAD2 o FAD3 (Peschke y Kretsch, 2011). En otros análisis de transcriptomas se encontró a FAD8 inducido por *cry1* y por *cry2* (Ohgishi *et al.*, 2004) y a FAD6, FAD7 y FAD8 como genes inducidos tardíamente por *phyA* (Tepperman *et al.*, 2001). Entonces la luz regularía positivamente los niveles de expresión de los mensajeros que codifican para las enzimas de actividad cloroplástica (FAD5, FAD6, FAD7 y FAD8) y no para aquellas de retículo endoplasmático (FAD 2 y FAD 3).

Los datos expuestos en el párrafo anterior sugerían que la composición de ácidos grasos de membrana del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* podría encontrarse alterada. Mediante una colaboración con el Dr. Fernando García del INIBIOLP, analizamos la composición de ácidos grasos de plántulas WT y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* en

el estadio 1.02. El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* presentó una menor proporción de los ácidos grasos totalmente insaturados 16:3 y 18:3 y del ácido graso parcialmente insaturado 16:1, mientras que presentaba una mayor proporción del 18:1 y de los ácidos grasos saturados 14:0 y 16:0 (Fig. 5.10 A). Agrupando a los ácidos grasos según sean totalmente insaturados, parcialmente insaturados o saturados podemos observar que el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* tuvo una menor proporción de ácidos grasos totalmente insaturados y mayor proporción de ácidos grasos parcialmente insaturados y saturados (Fig. 5.10 B).

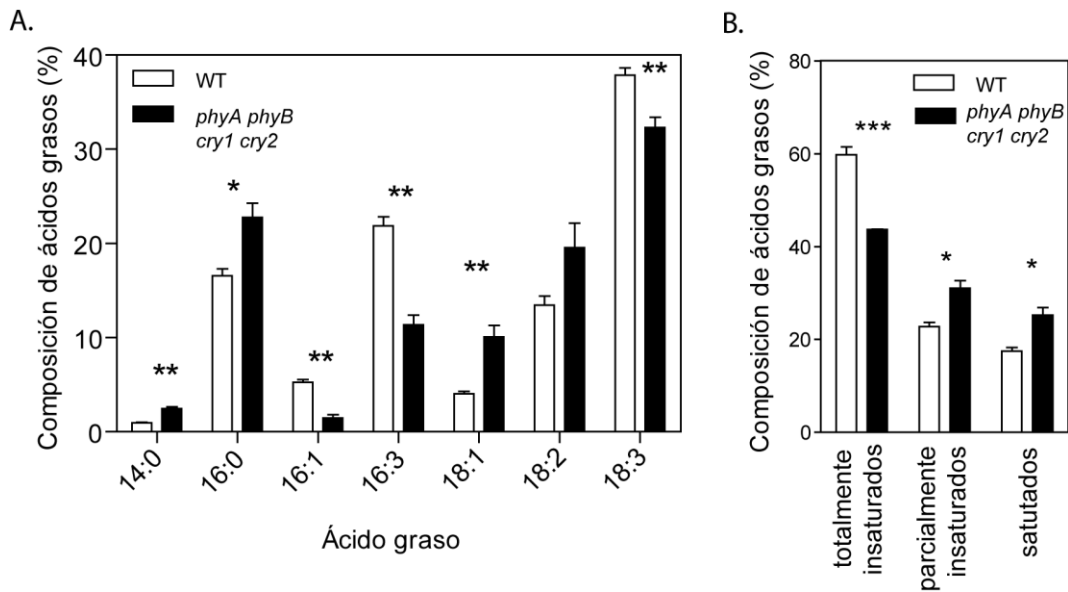


Figura 5.10. Composición de ácidos grasos de plántulas WT y cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en el estadio 1.02. **A.** Composición de las especies mayoritarias. **B.** Composición de ácidos grasos totalmente insaturados (16:3 + 18:3), parcialmente insaturados (16:1, 18:1 y 18:2) y saturados (14:0 y 16:0). Cada especie se comparó con un *t-Test*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Se realizó una réplica técnica de cada medición y 3 réplicas biológicas independientes.

El menor contenido de ácidos grasos insaturados observados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.10 B) sería consistente con una mayor sensibilidad al frío en comparación con el genotipo WT (Fig. 5.9 A).

5.2.5 El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* es más tolerante a un *shock* de altas temperaturas que el genotipo WT

Como expusimos anteriormente, el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* presentó menor cantidad de ácidos grasos insaturados en sus membranas (Fig. 5.10). Se ha descrito que mutantes con menor insaturación de ácidos grasos en sus membranas tilacoidales son más tolerantes a altas temperaturas (Falcone *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2000). En este contexto, evaluamos si el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* era más tolerante a un *shock* de altas temperaturas. Crecimos las plantas a 22 °C hasta el estadio 1.02, las sometimos durante 40

min a un *shock* térmico, de 40 °C o 43 °C, y las regresamos a 22 °C, mientras que un grupo de plantas control permaneció a 22 °C. Cinco días después del tratamiento las cosechamos y medimos el peso seco de las mismas. El tratamiento a 43 °C afectó de modo negativo el crecimiento de plantas WT pero no afectó el crecimiento del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.11 A). Las plantas WT sufrieron daños en sus hojas mientras que en el genotipo cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* no se evidenciaron daños (Fig. 5. 11 B). Esto fue muy evidente en plantas que recibieron un *shock* a 44 °C (Fig. 5. 11 B). Finalmente, los resultados expuestos ponen en evidencia la mayor tolerancia del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* a un *shock* de altas temperaturas.

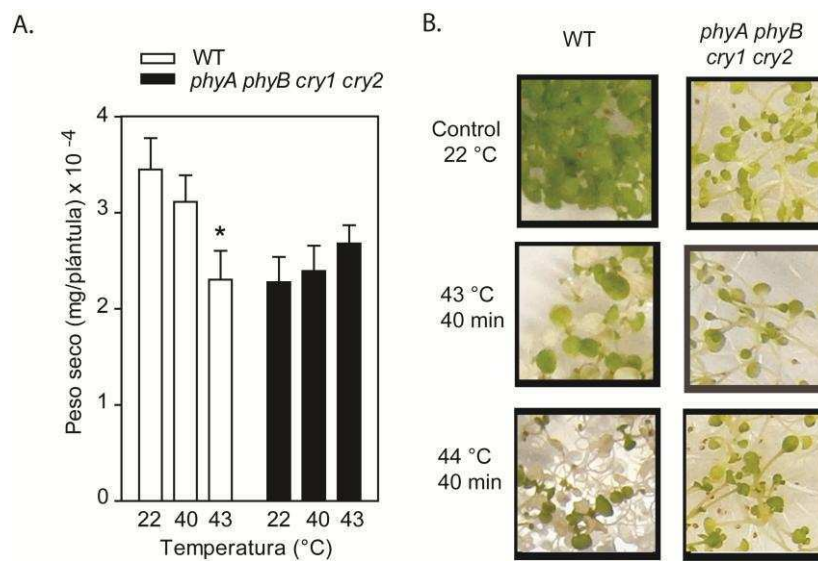


Figura 5.11. El cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* es más tolerante que el genotipo WT a un *shock* de altas temperaturas. A. Peso seco de plántulas WT y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* en el estadio 1.02. Las plántulas recibieron un *shock* térmico y fueron cosechadas 5 días después (se grafica: media \pm EE, n>4). Analizamos mediante ANOVA de una vía el efecto de la temperatura en cada genotipo, seguido por un *test* de Dunnett, * p < 0,05. **B.** Comparación del daño en plántulas WT y cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2*, 5 días después del *shock* térmico a 43 °C y 44 °C con plantas control que no recibieron el *shock* térmico y permanecieron a 22 °C.

5.3 Introducción al análisis de proteínas nucleares.

La acumulación de los fotorreceptores en el núcleo es clave para la regulación de las vías de señalización iniciadas por la luz. Cuando analizamos los perfiles proteicos provenientes de extractos totales encontramos que la mayoría de los cambios eran en proteínas estructurales y en proteínas abundantes involucradas en reacciones energéticas. Como parte del esfuerzo por entender la señalización disparada por los fotorreceptores, decidimos buscar diferencias en los niveles de expresión de proteínas nucleares entre el genotipo WT y el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. Este trabajo lo realizamos en colaboración con el Laboratorio de la Dra. Mattei

en la Universidad *La Sapienza* de Roma, Italia. Utilizamos la técnica de DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*), en la cual se marcan los extractos proteicos con diferentes fluoróforos (Cy3, Cy5 y Cy2) y se los mezcla antes de realizar la primera dimensión.

Para el aislamiento de núcleos generalmente se utilizan gradientes de sacarosa o de Percoll. En el año 2006 se describió un protocolo de aislamiento de núcleos a partir de 5-6 gr de tejido fresco basado en la separación en un gradiente de Percoll (Folta y Kaufman, 2006). Cuando realizamos este protocolo no pudimos reproducir los resultados publicados, ya que la formación de fases no ocurría tal cual se había reportado (se acumulaba material en la interfase 0-30 / y la interfase 30-60 / no era gris) (Fig. 5.12 A) y la fracción nuclear que obteníamos finalmente resultaba muy contaminada (el precipitado final era verde). Entonces modificamos el protocolo de Folta y Kaufman introduciendo cambios a partir de otro protocolo descrito por Calikowski & Meier (2006) (ver M&M, 3.3.17.3: protocolo 4, lo llamamos “protocolo modificado”). Así logramos obtener fases claramente separadas (Fig. 5.12 B) y la cantidad de proteínas extraídas era suficiente para un análisis de DIGE. La calidad de la preparación nuclear la evaluamos observando los núcleos utilizando la tinción de DAPI (Fig. 5.12 C).

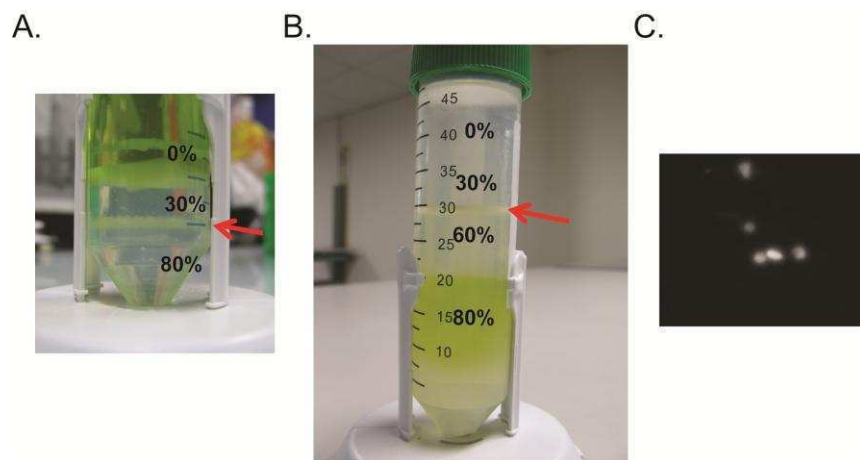


Figura 5.12. Gradientes de Percoll para el aislamiento de núcleos. **A.** Protocolo de Folta & Kaufman (2006). **B.** Protocolo modificado. La flecha roja señala la localización de la banda nuclear según se describe en cada protocolo, además en cada imagen se indica el porcentaje de Percoll de cada fase. **C.** Imagen de una muestra de núcleos extraída según el protocolo modificado (de la figura B) y teñida con DAPI (aumento 100x).

El enriquecimiento en proteínas nucleares lo analizamos mediante 2 estrategias. Corrimos en un gel SDS-PAGE proteínas extraídas de un extracto total y proteínas nucleares (extraídas según el protocolo modificado) y analizamos el enriquecimiento mediante *Western blot* revelando primero con un anticuerpo anti-histona 4 (anti-H4) y luego, la misma membrana con un anticuerpo anti-Rubisco-L. Si bien detectamos Rubisco en la fracción nuclear, la H4 fue

detectada en el extracto nuclear pero no en el extracto total (Fig. 5.13 A) sugiriendo que el extracto nuclear se encontraba realmente enriquecido en proteínas nucleares. Para corroborar esta observación, comparamos el enriquecimiento que obteníamos con cada uno de los protocolos (el de Folta & Kaufman y el modificado). Corrimos extractos de proteínas extraídos mediante estos protocolos en geles SDS-PAGE, los teñimos con *Coomassie* G-250, cortamos diferentes bandas que fueron digeridas con tripsina y las analizamos en un espectrómetro de masas Nano-LC/ESI/Orbitrap. Para identificar las proteínas confrontamos los espectros obtenidos contra el proteoma de *Arabidopsis* usando el algoritmo de búsqueda *Sequest* (ThermoFisher). Identificamos alrededor de 160 proteínas en cada grupo de bandas de cada protocolo de extracción. Usando el programa *SeqViewer* (<http://bbc.botany.utoronto.ca>) clasificamos las proteínas según *Cellular component-GO* (Fig. 5.13 B). Como puede observarse, con el protocolo modificado logramos incrementar 4 veces la diversidad de proteínas nucleares mientras que con el de Folta & Kaufman lo lográbamos incrementar sólo 2 veces (Fig. 5.13 B).

Es importante recalcar además que, en el extracto de proteínas obtenido con el protocolo modificado, las proteínas con mayor porcentaje de cobertura (es decir que se identificaron con un mayor número de péptidos) fueron nucleares lo cual era un indicio de la abundancia de las mismas en la mezcla de proteínas (datos no mostrados).

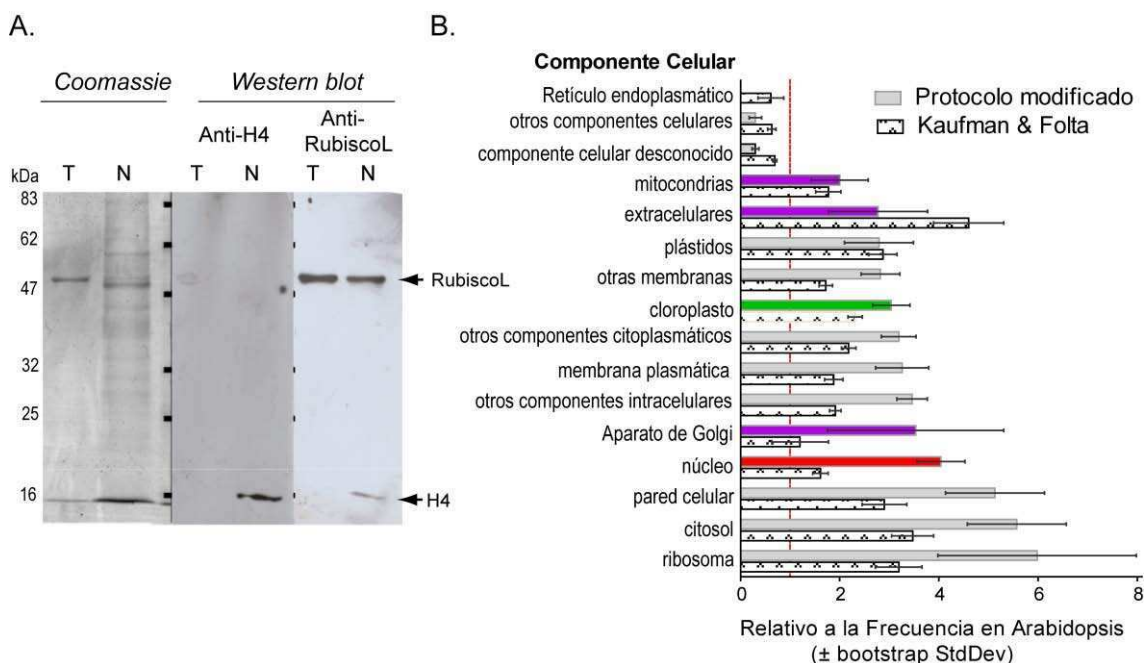


Figura 5.13. Análisis del enriquecimiento en proteínas nucleares. **A.** Se corrieron 10 μ g de proteínas totales (T) y proteínas nucleares (N) por duplicado en SDS-PAGE 12%. Se cortó el gel por la mitad. Una mitad se tiñó con *Coomassie* y la otra se utilizó para *Western blot* con anti-H4 primero y luego con anti-RubiscoL. **B.** Análisis del enriquecimiento en proteínas de los distintos componentes celulares según los dos métodos de extracción de proteínas nucleares ensayados. Se corrieron en un

gel SDS-PAGE proteínas extraídas con el protocolo de Folta & Kaufman y proteínas extraídas con el protocolo modificado, se cortaron grupos de bandas que se analizaron en un Nano-LC/ESI/Orbitrap identificándose, aproximadamente, 160 proteínas en cada grupo de bandas. Usando *SeqViewer* se clasificaron según *Cellular component-GO* las proteínas provenientes de los dos métodos de extracción estudiados. Código de colores dentro del protocolo modificado: violeta, no es significativa la variación en relación a la frecuencia de proteínas en el genoma total; rojo, se destaca el enriquecimiento en proteínas nucleares; en verde se pone en evidencia el enriquecimiento en proteínas cloroplásticas.

Luego de comprobar el enriquecimiento en proteínas nucleares, diseñamos el experimento de DIGE como se detalla en M&M, realizando tres réplicas biológicas y una réplica técnica de cada réplica biológica intercambiando el fluoróforo utilizado (Cy3 y Cy5). Realizamos la corrida de las muestras marcadas en geles 2D (Fig. 5.14 A) (la primera dimensión en tiras comerciales de 13 cm, intervalo de pH 3-10 no lineal y la segunda en SDS-PAGE 12 /). Analizamos los geles con el programa DeCyder y encontramos 11 y 22 *spots* sobre- y sub-expresados en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, respectivamente.

La fosforilación de proteínas es un mecanismo de regulación post-traducciona, y se ha reportado que distintos factores nucleares de la cascada de señalización de los fotorreceptores se encuentran regulados por cambios en el estado de fosforilación (revisado en Jiao *et al.*, 2007). En este contexto, también nos resultaba de interés analizar los cambios en los niveles de fosforilación de las proteínas nucleares entre el genotipo WT y el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. Entonces, luego de escanear los geles en la longitud de onda correspondiente los teñimos con *Pro-Q Diamond* (Q), que tiñe específicamente proteínas fosforiladas, y los escaneamos nuevamente. Considerando que el fluoróforo Cy3 y la tinción de Q se excitan y emiten en las mismas longitudes de onda (Stasyk *et al.*, 2005, ver en M&M la Fig. 3.4) realizamos dos análisis. Primero, estudiamos en cuales de los 33 *spots* diferencialmente expresados se encontraban proteínas fosforiladas observando cuando la señal Cy3+Q era mayor que la señal de Cy3 en al menos una de las comparaciones (WT+Q vs WT o *phyA phyB cry1 cry2*+Q vs *phyA phyB cry1 cry2*) (Fig. 5.14 B). De este modo hallamos 3 *spots* fosforilados de los 33 *spots* diferencialmente expresados, de los cuales identificamos 2 (*spots* 216 y 889, Tabla 5.5). En el segundo análisis consideramos todos los *spots* independientemente de si eran significativos o no en el análisis de DIGE y realizamos la comparación WT+Q vs *phyA phyB cry1 cry2*+Q. De este análisis resultaron significativos (p -corregido < 0,05), 5 *spots* fosforilados en mayor medida en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* de los cuales identificamos 2 (*spot* 415 y 464) y 9 *spots* fosforilados en menor medida en el mismo de los cuales identificamos 3 (*spots* 392, 536 y 411, Tabla 5.5)

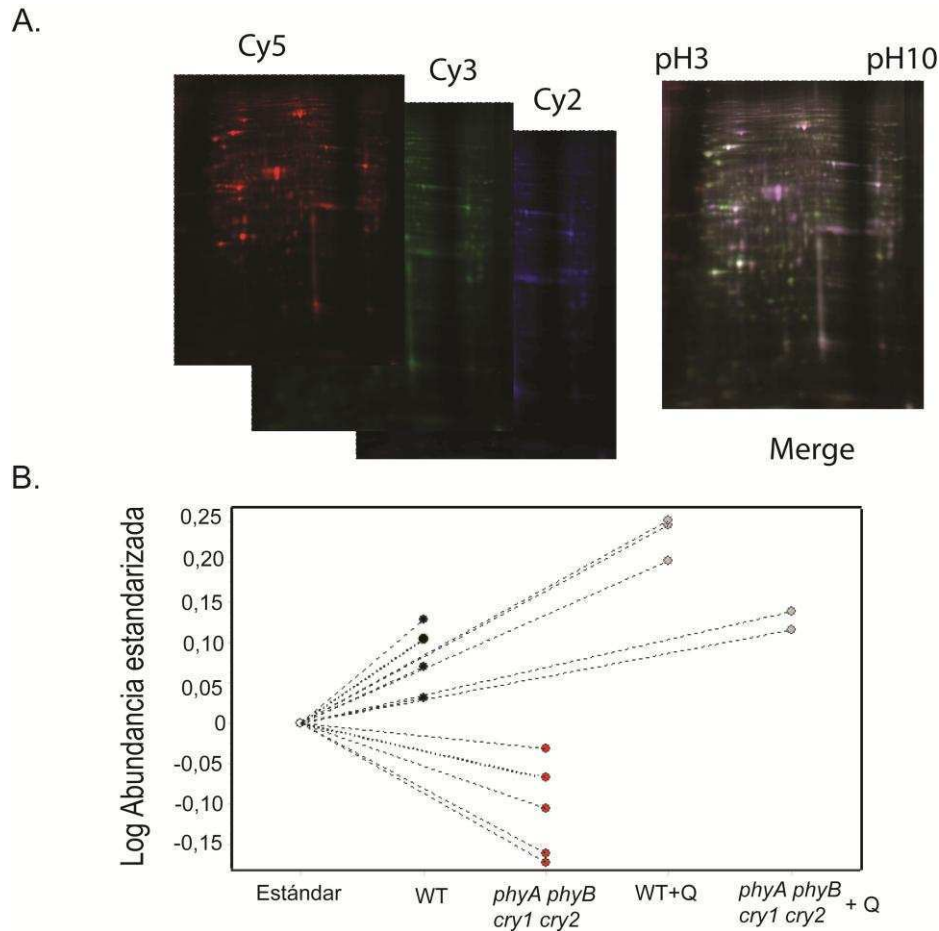


Figura 5.14. Gel 2D modelo de DIGE. **A.** Gel 2D donde proteínas del WT y del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fueron marcadas con distintos fluoróforos (Cy5 y Cy3) y corridas en el mismo gel junto con un estándar interno construido con un pool de proteínas WT y cuádruple mutantes *phyA phyB cry1 cry2* que se ha marcado con Cy2. A la derecha se expone una superposición de las 3 imágenes (*Merge*). **B.** Se muestra como ejemplo el análisis de un *spot*: 216, su abundancia en cada muestra (WT y *phyA phyB cry1 cry2*, y como aumenta la señal tras la tinción con Pro-Q).

En el Laboratorio de la Dra. Mattei se corrió un gel preparativo con 250 μg de proteínas y se secuenciaron 35 *spots* de expresión diferencial y/o diferencialmente fosforilados. Del total de *spots* secuenciados, 16 fueron identificados (ver Tabla 5.5), indicándose si fueron significativos en la comparación WT vs *phyA phyB cry1 cry2* (DIGE, o sea si la expresión fue diferencial) o en la comparación WT+Q vs *phyA phyB cry1 cry2*+Q (ProQ, o sea si la fosforilación fue diferencial). También se analizaron las posibles localizaciones subcelulares y los procesos biológicos en los que se las ha involucrado. El número de *spots* identificados fue bajo seguramente por una combinación de factores. En primer lugar, el gel preparativo debió haberse realizado con mayor carga de proteínas (500 μg). En segundo lugar la secuenciación se realizó con un MALDI-TOF (que no realiza análisis en tándem MS/MS.) por lo que no se lograron identificar *spots* para los que se obtenían uno o dos picos en el espectro.

En los últimos años los ensayos de proteómica a nivel subcelular han generado mucha información que luego no ha sido validada mediante algún tipo de ensayo experimental. Teniendo esto en cuenta, organizamos los datos disponibles de localización subcelular de las proteínas identificadas diferenciando si los resultados fueron obtenidos mediante MS, fusión a GFP (proteína verde fluorescente) o mediante algún otro ensayo. También tuvimos en cuenta la información de distintos predictores, particularmente AtSubP que agrupa distintos algoritmos de búsqueda (*Arabidopsis subcellular localization predictor*) (Kaundal *et al.*, 2010). En el Anexo (Pág. 118) se encuentran los DOI (*Digital Object Identifier*, Identificadores de Objetos Digitales) de las publicaciones que señalan cada localización subcelular y mediante qué estrategia se realizaron las predicciones. Podrían tener localización nuclear 2 de las 8 proteínas identificadas como sub-expresadas y 2 de las 3 proteínas identificadas como sub-fosforiladas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Tabla 5.5, *spots* con sombra verde). De las 3 proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, dos se proponen de localización nuclear como también se proponen de localización nuclear las 2 proteínas sobre-fosforiladas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Tabla 5.5). Dado que, las proteínas mayoritarias de los cloroplastos como Rubisco-L aun se encontraban presentes en las fracciones nucleares (Fig. 5.13 A), era esperable que la contaminación en las proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* fuera mayor.

Tabla 5.5. Identificación de spots sub-expresados y sobre-expresados en el mutante *phyA phyB cry1 cry2* en el análisis de proteínas de fracciones nucleares. Se señalan en verde los spots que corresponden a proteínas para las cuales existen evidencias de localización nuclear. La escala de verdes trata de representar la confianza en el método de localización desde verde oscuro para GFP o métodos similares a verde claro para ensayos de proteómica no validados mediante alguna otra tecnología. (MS/MS: datos de espectrometría de masas, MP: membrana plasmática, ND: no determinado)

Spot	DIGE	ProQ	AGI	Nombre	Localización Subcelular			Proceso Biológico	FC DIGE/Q
					GFP	MS/MS	Otro método		
spots sub-expresados en el mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i>									
216	SI	SI	AT4G39690	Desconocida	ND	Mitocondria	Predictores: mitocondrias, núcleo	Desconocido	1,5/-
889	SI	SI	AT5G50920	Proteína de <i>Heat shock</i> 93-V (CLPC1)	cloroplasto	cloroplasto, mitocondria	ND	Organización de cloroplasto. Transporte de proteínas.	2,6/-
449	SI	NO	ATCG00490	Ribulosa bisfosfato carboxilasa sub unidad mayor (Rbcl)	ND	cloroplasto	Cloroplasto	Fotosíntesis	2,1/-
192	SI	NO	AT5G50920	Proteína de <i>Heat shock</i> 93-V (CLPC1)	cloroplasto	cloroplasto, mitocondria	ND	Organización de cloroplasto. Transporte de proteínas.	2,2/-
610	SI	NO	AT3G63140	Proteína de 41 kDa de unión a ARN en cloroplasto A (CSP41A)	ND	Cloroplasto	Western Blot. Predictores: Cloroplasto	Procesamiento del rRNA	1,4/-
434	SI	NO	At5g08670	ATP sintetasa subunidad β 1	mitocondria	mitocondria, vacuola, MP	ND	Síntesis de ATP	1,5/-
455	SI	NO	AT4G13930	Serina Hidroximetil Transferasa 4 (SHM4)	ND	citosol, MP	ND	Metabolismo de C1	1,4/-
612	SI	NO	AT3G56850	<i>Abcisic acid-insensitive 5-like protein 2</i> (AREB3)	nuclear		ND	Señalización de ABA. Transcripción	1,4/-
392	NO	SI	AT3G02090	Probable peptidasa mitocondrial, subunidad beta (MPPBETA)	extra núcleo	nucléolo, pared celular, cloroplasto, mitocondrial	Predictores: mitocondria	Metaloendopeptidasa	-/1,6
536	NO	SI	AT5G35400	Proteína de la familia <i>Pseudouridine synthase</i>	ND	ND	predictores: núcleo	Procesamiento de tRNA	-/2,2
411	NO	SI	AT1G48030	Dihidrolipoil deshidrogenasa 1 (LPD1)	ND	mitocondria, MP, cloroplasto	Predictores: mitocondria	Mantenimiento del estado REDOX	-/2,5
spots sobre-expresados en el mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i>									
485	SI	NO	AT1G57720	Probable factor de elongación EF-1B- γ	ND	pared celular, citosol, vacuola, MP	Interacción: CYCA2;3: nuclear. Predictores: citoplasma, núcleo.	Biosíntesis de proteínas	1,6/-
779	SI	NO	AT4G02520	Glutation- S-transferasa PM24	MP y núcleo	cloroplasto, citosol, vacuola	Predictores: citoplasma, núcleo.	Señalización de auxinas	2,2/-
842	SI	NO	AT2G22230	beta-hidroxilacil-ACP deshidratasa	ND	cloroplasto, pared celular	Predictores: citoplasma, cloroplasto.	Metabolismo de ácidos grasos	2,3/-
464	NO	SI	AT5G67630	Proteína tipo helicasa RuvB DNA	ND	cloroplasto, nucléolo	Predictores: núcleo	Actividad helicasa	-/1,6
415	NO	SI	AT1G76030	Sub. β 1 de-ATPasa tipo V (VAB1)	ND	aparato de Golgi, MP, cloroplasto	Western blot: núcleo. Predictores: MP, núcleo	Estabilización de filamentos de actina	-/2,0

La proteína, sub-expresada en el cuádruple mutante *phyA phyBcry1 cry2*, AREB3 (*spot* 612) es uno de los 13 miembros de una familia de factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta a ABA (ABRE), llamada ABI5/ABF/AREB (Bensmihen *et al.*, 2002). AREB1 y AREB2, pero no AREB3, inducirían la expresión de genes en respuesta a sequía, estrés salino o tratamientos con ABA (Uno *et al.*, 2000). Según los datos de *Genevestigator*, el mayor nivel de expresión de AREB3 es en el embrión maduro expresándose menos en plántulas. En respuesta a la luz no existen evidencias de que se modifiquen sus niveles de expresión.

La proteína AT5G35400 (*spot* 536), involucrada en el procesamiento del ARNt, no se encuentra representada en los microarreglos de Arabidopsis y tampoco encontramos publicaciones que hagan referencia a la modificación de su expresión por algún estímulo particular. Sus niveles de expresión fueron similares entre los genotipos comparados pero se encontraría fosforilada en mayor medida en el genotipo WT.

Entre las proteínas que nos resultaron de mayor interés se encuentra la proteína AT4G39690 (*spot* 216) cuyo nivel de expresión fue mayor en el WT y se encontró fosforilada. Se desconoce cuál sería su función y hay predictores que sugieren que tendría localización nuclear. Por otro lado identificamos que VAB1 (*spot* 415) tendría mayor nivel de fosforilación en el genotipo cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* mientras que la diferencia de abundancia no fue significativamente diferente (Tabla 5.5). Esta proteína es una subunidad de una ATPasa vacuolar que recientemente se encontró formando en el núcleo un complejo con la Hexoquinasa1 (HKS1) regulando la transcripción de genes en respuesta a glucosa (Cho *et al.*, 2006). El predictor que sugiere la localización nuclear de AT4G39690 divide la proteína en 3 regiones para la búsqueda de señales de localización (se llama N-terminal-C) y es el mismo que predice la localización nuclear de VAB1.

Utilizando la base de datos de *Genevestigator*, no hallamos que se modifique en respuesta a la luz la expresión de los transcritos de las proteínas de posible localización nuclear. Por otro lado, un análisis bioinformático global de las mismas no aportaría mucha información dado que son pocas las proteínas identificadas. Sin embargo, las proteínas descritas en el párrafo anterior las consideramos interesantes para evaluar en un futuro.

Discusión

Las plantas poseen distintos fotorreceptores que les permiten captar las diferentes longitudes de onda que componen la radiación solar. Estos fotorreceptores interactúan entre sí durante los diferentes procesos fotomorfogénicos que permiten a la planta crecer adaptándose al ambiente. La identificación de proteínas diferencialmente expresadas en el genotipo cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* es un paso fundamental en el entendimiento de los mecanismos iniciados por la luz. En esta parte de la tesis, realizamos un estudio proteómico utilizando como herramienta la técnica de geles 2D acoplada a la identificación de las proteínas por MS y estudiamos diferentes aspectos fisiológicos relacionados a los resultados de proteómica.

Consideraciones generales sobre la tecnología utilizada

En este capítulo de la tesis hemos realizado geles bidimensionales, utilizando distintos gradientes de pH, con extractos proteicos totales de plántulas en el estadio 1.02. En geles de 7 cm de ancho con un gradiente de pH de 3 a 10, hemos podido resolver de modo consistente 194 *spots* entre réplicas de ambos genotipos mientras que utilizando geles de 13 cm de ancho con un gradiente de pH de 4 a 7 hemos podido resolver 350 *spots* (Fig. 5.3). Si bien la cantidad de *spots* detectados es baja en comparación con el número de proteínas que se expresan en la plántula en un determinado estadio y tejido, en ambos casos aproximadamente un 20% de los *spots* resultaron ser significativamente diferentes entre ambos genotipos (36 de 194 *spots* en el intervalo de pH 3-10 y 62 de 354 *spots* en el intervalo de pH 4-7). El porcentaje de cambio que observamos (20%) fue similar al porcentaje de cambio observado en el transcriptoma de plántulas crecidas en luz blanca durante 6 días en comparación con plántulas crecidas en oscuridad (Jiao *et al.*, 2005). Asimismo, un porcentaje de cambio similar se observó en el proteoma del mutante *hy4* crecido bajo luz azul en comparación con el proteoma del WT en dicha situación (analizado en geles de 24 cm de ancho: 205 *spots* significativos de un total de 1000 *spots* resueltos) (Phee *et al.*, 2007). Los diferentes niveles de expresión de proteínas observados entre plántulas desetioldadas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y plántulas WT fueron dependientes de la presencia de luz, ya que en geles realizados a partir de extractos proteicos de plántulas etioladas detectamos cambios de expresión de muy pocos *spots* (4 de 222) (Fig. 5.6).

Nuestra limitación en la identificación de proteínas poco abundantes en los geles de plántulas desetioldadas está relacionada principalmente a dos factores: la presencia de proteínas cloroplásticas muy abundantes en tejidos verdes (la enzima Rubisco puede llegar a

constituir el 40% de la muestra proteica) y la limitación técnica respecto a la identificación de proteínas por MS. El primero de estos factores pone en evidencia la necesidad de realizar fraccionamientos subcelulares para poder analizar mayor diversidad de proteínas. En este contexto, y considerando la participación de los fotorreceptores en la regulación de la expresión de genes, realizamos un enriquecimiento en fracciones nucleares previo a la separación de las proteínas en geles 2D. Aún realizando un enriquecimiento, de las 8 proteínas identificadas como sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, 6 provendrían de contaminación con cloroplastos u otras organelas mientras que 2 de las 3 proteínas sobre-expresadas y las 2 fosforiladas en mayor medida en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* resultaron ser de localización nuclear (Tabla 5.5). En relación al segundo factor, distintos espectrómetros de masas presentan distinta resolución, exactitud y sensibilidad en el análisis de péptidos y proteínas por lo que el éxito en la identificación de la/s proteína/s presente/s en un *spot* depende mucho del equipo utilizado así como de la cantidad de proteína presente en el *spot*. Es así que de los 53 *spots* secuenciados en un espectrómetro MALDI-TOF/TOF no se lograron identificar 8 (15%, Pág. 79) mientras que de los 35 *spots* (provenientes de extractos enriquecidos en proteínas nucleares) secuenciados en un espectrómetro MALDI-TOF no se lograron identificar 19 *spots* (54%, Pág. 103).

Por otro lado, una de las limitaciones de la tecnología de geles 2D es que generalmente quedan excluidas del análisis proteínas muy básicas, muy ácidas, hidrofóbicas o liposolubles. Las mismas no se solubilizan eficientemente en los *buffers* utilizados y luego no ingresan al gel o ingresan y no se separan en *spots* discretos. En la actualidad existen diferentes tecnologías que permiten analizar las proteínas de una muestra sin necesidad de una separación en gel. Las mismas consisten en un cromatógrafo (HPLC o LC) acoplado a un espectrómetro de masas (revisado en Bindschedler y Cramer, 2011). Estos sistemas permiten identificar en un solo experimento cientos de proteínas y se los suele utilizar para analizar diferencias cuantitativas entre muestras. Una de las estrategias para estudiar diferencias en los niveles de expresión de proteínas entre muestras consiste en el marcaje isobárico de los péptidos de digestión (iTRAQ, Ross *et al.*, 2004). Dicho marcaje consiste en derivatizar las distintas muestras con distintos compuestos que tienen la misma masa molecular. Durante la cromatografía y durante la primera separación por MS las muestras corren juntas y recién se separan durante la segunda MS (en la que se fragmentan los péptidos dando los distintos compuestos diferentes distribuciones de m/z (masa/carga)). Luego, al comparar las áreas de los picos de la espectrometría, se obtiene la cuantificación relativa de cada péptido. En la actualidad, para simultáneamente identificar y cuantificar un alto número de proteínas se utiliza ese tipo de tecnologías que son muy poderosas pero que lamentablemente son muy costosas.

El cuádruple mutante phyA phyB cry1 cry2 presenta severas deficiencias en la expresión de proteínas de cloroplastos, niveles reducidos de ácidos grasos insaturados en la membranas y severamente alterada la tasa fotosintética

Durante la maduración de los cloroplastos la acumulación de clorofila está acompañada de una extensa formación de membranas tilacoidales en sintonía con la acumulación de complejos fotosintéticos. En esta tesis identificamos, a partir de extractos de proteínas totales, quince proteínas sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* que se encuentran específicamente involucradas en procesos relacionados con la fotosíntesis, generación de metabolitos y energía, desarrollo y organización de cloroplastos (Tabla 5.3). La asociación funcional entre las proteínas sub-expresadas en el mutante es sólida como se observa en la red generada (Fig. 5.5 A) y nos permite así predecir cambios en los niveles de expresión de otras proteínas como son PMDH, PSBO-1 y distintas LHC, también involucradas en los procesos arriba mencionados. Estos resultados son consistentes tanto con los estudios de proteómica ya publicados para los dobles mutantes *phyA phyB* (Xu Li *et al.*, 2009) y *cry1 cry2* (Yang *et al.*, 2008) y los simples mutantes de *phyA*, *phyB* (Kim *et al.*, 2006) y *cry1* (Phee *et al.*, 2007) como con los estudios proteómicos de desetiación en arroz y maíz (Reiland *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2009b).

Diferentes estudios muestran que el aumento en la abundancia de las proteínas relacionadas a la asimilación de carbono por la luz, estaría regulado a nivel transcripcional. Estudios realizados con el promotor del gen *Lhcb1*2* de tabaco, gen que forma parte de uno de los complejos que capturan la luz en cloroplastos, ponen de manifiesto que este promotor puede ser regulado por los fotorreceptores *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* (Cerdán *et al.*, 1997; Mazzella *et al.*, 2001). Esto sugiere que diferentes fotorreceptores pueden regular la expresión de un único gen e integrar las señales lumínicas a nivel del promotor (Cerdán *et al.*, 1997; Cerdán *et al.*, 2000). Por otro lado, se demostró que las proteínas PIF (represores de la fotomorfogénesis) se encuentran unidas activamente a motivos *G-box* de la región promotora de genes fotosintéticos evitando así su transcripción. Entonces, promoviendo la degradación de las proteínas PIFs, los fitocromos regulan positivamente la expresión de genes fotosintéticos, entre los que se encuentran los genes que codifican para dos enzimas claves en la biosíntesis de clorofila, *HEMA1* (glutamil-ARNt reductasa) y *GUN5* (*genomes uncoupled 5*), y dos genes que codifican para proteínas del fotosistema I, *LHCA1* y *PsaE1* (subunidad E del fotosistema I) (Shin *et al.*, 2009). Por otro lado, fitocromos y criptocromos, a través de la inhibición de COP1, regulan positivamente la actividad de HY5 que, en respuesta a la luz R, RL y azul, se une a motivos *G-box* e induce la transcripción de genes involucrados en fotosíntesis (Lee *et al.*, 2007; Oyama *et al.*, 1997). Esta regulación a nivel transcripcional de genes

fotosintéticos es confirmada por estudios de transcriptomas, en mutantes de fotorreceptores y en plantas expuestas a distintas condiciones lumínicas, y por trabajos que analizan conjuntamente los cambios de la abundancia de las proteínas y los transcritos en plántulas que crecen en presencia de luz (Ohgishi *et al.*, 2004; Peschke y Kretsch, 2011; Tepperman *et al.*, 2004; Tepperman *et al.*, 2001; Xu Li *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008). Consistente con lo arriba expresado, los transcritos correspondientes a 15 de las 20 proteínas que identificamos sub-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, se encontraron inducidos cuando plántulas de 3 días de *Arabidopsis* fueron expuestas a 4 h de luz R, RL o azul (Peschke y Kretsch, 2011).

A partir de nuestros resultados observamos que en condiciones ambientales óptimas para el desarrollo del genotipo WT, la baja percepción de luz del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* afecta drásticamente el contenido de proteínas involucradas en el desarrollo y la organización de los plástidos, afectándose así las estructuras necesarias para captar la energía lumínica. Consistentes con estos datos son los bajos niveles de acumulación de clorofila por unidad de área (Fig. 5.2 B y Fig. 5.7 B) y la marcada reducción de la tasa fotosintética del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, que fue entre un 65 y 70% menor que la del genotipo WT (Fig. 5.7 A). En condiciones similares a las nuestras, las tasas fotosintéticas registradas para el doble mutante *cry1 cry2* y el simple mutante *phyB* fueron aproximadamente un 40% menor que la del genotipo WT (Boccalandro *et al.*, 2012; Boccalandro *et al.*, 2009). Un estudio reciente muestra que el quintuple mutante *phyA phyB phyC phyD phyE* es capaz de desarrollarse vegetativamente y florecer cuando las plantas crecen en luz azul (ya que los criptocromos no se ven afectados) (Strasser *et al.*, 2010). Estos resultados junto con los aportados por esta tesis resaltan la importancia de ambas familias de fotorreceptores en el establecimiento de la autotrofía.

Los cloroplastos se encuentran en cotiledones, hojas, tallos, frutos y flores dependiendo de la especie y etapa del desarrollo. Estudios genéticos muestran que el desarrollo de los cloroplastos es diferente en cotiledones y hojas. Por ejemplo el fenotipo clorótico del mutante *var2* está restringido a las hojas (Liu *et al.*, 2010) mientras que el mutante *sco1*, presenta cotiledones cloróticos pero hojas color verde (Albrecht *et al.*, 2006). En el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* encontramos sub-expresadas tanto a VAR2 como SCO1 (Tabla 5.2) sugiriendo que el desarrollo de los cloroplastos en ausencia de estos fotorreceptores está afectado en ambos tejidos.

Por otro lado, en los cloroplastos, además de la fotosíntesis, ocurren entre otros procesos la biosíntesis de ácidos grasos. La envoltura de los cloroplastos es rica en galactolípidos (GDG) (Kelly y Dormann, 2004), y la biosíntesis de los mismos es esencial para la formación de los

tilacoides (Kobayashi *et al.*, 2007). Se ha reportado que en plántulas de mostaza la forma Pfr de los fitocromos induce la síntesis de GDGs en cloroplastos (Unser y Mohr, 1970). Además, tejidos verdes tendrían mayor nivel de insaturación de ácidos grasos que tejidos etiolados (Crombie, 1958) observándose fluctuaciones diurnas de los niveles de insaturación de los mismos tanto en maíz (Browse *et al.*, 1981) como en *Arabidopsis* (Ekman *et al.*, 2007). Sin embargo el nivel de insaturación de los ácidos grasos de las membranas no ha sido evaluado en ningún mutante de fotorreceptores.

Las membranas de cloroplastos de las células de hojas contienen entre un 75 y 80 % de ácidos grasos insaturados, mientras que en otras membranas de tejidos verdes o tejidos no fotosintéticos rondan en el 60-65 %. Se ha demostrado que la fotosíntesis es un proceso que requiere de altos niveles de insaturación en la membrana (McConn y Browse, 1998). Distintos análisis de transcriptomas mostraron que la transcripción de las desaturasas FAD5-8 presentes en cloroplastos podría ser inducidas por la luz R, RL y azul (Ohgishi *et al.*, 2004; Peschke y Kretsch, 2011; Tepperman *et al.*, 2001). Además, al menos FAD7 presenta en su promotor un elemento G-box y es inducible por luz (Nishiuchi *et al.*, 1995). La reducción de la transcripción de estas FADs afecta los niveles de ácidos grasos insaturados en las membranas tilacoides como se vio en los mutantes *fads* (Browse y Somerville, 1991; Okuley *et al.*, 1994). En este trabajo mostramos que el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*, cuando crece en luz blanca a 22° C, en el estadio 1.02 tiene reducidos los niveles relativos de ácidos grasos poli-insaturados, específicamente los trienoicos (tres insaturaciones), y aumentados los niveles de ácidos grasos saturados y dienoicos (dos insaturaciones) (Fig 5.10).

Entonces, si la fotosíntesis requiere de ácidos grasos insaturados, ¿por qué una planta que crece en condiciones deficientes de luz tendría menor insaturación de sus ácidos grasos, lo cual afectaría negativamente su eficiencia fotosintética? En respuesta a esta pregunta hay que considerar que una planta con poca disponibilidad de luz se encuentra en condiciones deficientes de recursos energéticos y tanto la producción de ácidos grasos insaturados como la síntesis de proteínas que se ensamblan en los complejos fotosintéticos acarrearían un gasto de energía no necesario si la disponibilidad de radiación fotosintética es escasa.

La reducción de la insaturación de los ácidos grasos de las membranas del cuádruple mutante phyA phyB cry1 cry2 es consistente con su comportamiento frente a un shock de temperaturas extremas

Varios trabajos han demostrado que los caminos de transducción iniciados por la luz son regulados por la temperatura y, al mismo tiempo, fotorreceptores específicos tienen roles importantes sobre la homeostasis del impacto de la temperatura en las plantas (Blázquez *et*

al., 2003; Halliday y Whitelam, 2003; Mazzella *et al.*, 2000). Es así que las plantas dependen de la percepción tanto de altas como de bajas temperaturas para la regulación de su desarrollo y para su supervivencia. Existen respuestas rápidas y respuestas más lentas que involucran la percepción de la temperatura durante varios días o semanas, como por ejemplo la ruptura de la dormición de la semilla (Koornneef *et al.*, 2002) o la vernalización para la promoción de la floración (Henderson y Dean, 2004). Algunas especies de plantas que son expuestas a temperaturas de congelamiento por debajo de los 0 °C mueren, pero si son expuestas previamente a temperaturas bajas no congelantes (proceso llamado aclimatación, temperaturas generalmente menores a 4 °C) adquieren la capacidad de tolerar exposiciones de hasta -30 °C (Thomashow, 1999). En este mismo sentido, plantas aclimatadas previamente a altas temperaturas adquieren tolerancia a un *shock* térmico de alta temperatura posterior (Larkindale *et al.*, 2005; Larkindale y Vierling, 2008). Los mecanismos moleculares de los procesos de adaptación son complejos e incluyen la biosíntesis de compuestos protectores de bajo peso molecular como la sacarosa y la prolina, cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana y la producción de proteínas protectoras como son las proteínas LEA/COR/DHN (*late embryogenesis abundant/Cold responsive/Dehydrins*) (revisado en Krasensky y Jonak, 2012; Thomashow, 1999). Estas proteínas también se encontraron aumentadas en respuesta a distintos estreses tales como la sequía y las altas temperaturas (Battaglia *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2006).

Las plantas responden a altas temperaturas aumentando el contenido de ácidos grasos saturados, mono- y di-insaturados, mientras que a bajas temperaturas aumenta la síntesis de ácidos grasos trienoicos (Falcone *et al.*, 2004; Uemura *et al.*, 1995; Wallis y Browse, 2002). De esta manera se regula la fluidez de las membranas, lo cual es esencial para la supervivencia de la planta (Mikami y Murata, 2003). Se ha descrito que plantas de tabaco con niveles reducidos de ácidos grasos insaturados, debido al silenciamiento de una ω -3-desaturasa de cloroplastos, fueron más tolerantes a temperaturas mayores a los 33 °C que plantas WT (Murakami *et al.*, 2000), mientras que plantas sobre-expresantes de la misma proteína fueron más tolerantes a las bajas temperaturas que plantas WT (Kodama *et al.*, 1994).

Entre las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* encontramos ERD14, PCap1, COR47 y ANNAT1 (Tabla 5.3) que estarían principalmente involucradas en la tolerancia al frío (Clark *et al.*, 2010; Kawamura y Uemura, 2003; Puhakainen *et al.*, 2004). Si bien a tres de estas proteínas, COR47 (Schramm *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 2008), ERD14 (Kovacs *et al.*, 2008) y ANNAT1 (Cantero *et al.*, 2006), también se las involucró en la tolerancia a altas temperaturas (Tabla 5.3); las principales proteínas de respuesta a altas temperaturas son las Hsp (*heat shock protein*) (Boston *et al.*, 1996; Schoffl *et al.*, 1998).

Recientemente, se ha demostrado que, con tratamientos de bajas relaciones R/RL, el regulón CBF (*C-repeat binding factor*) pueden ser activado y modificar la expresión de genes *CORs* si las plantas crecieron previamente 3 semanas a 16 °C pero no si crecieron a 22 °C (Franklin y Whitelam, 2007). En mutantes simples de *phyB* y *phyD* aclimatados previamente a 16 °C, y en mutantes simples *phyB* crecidos en fotoperiodo largo en comparación con fotoperiodos cortos también se encontró aumentada la expresión de *COR15a* (Franklin y Whitelam, 2007; Lee y Thomashow, 2012). Además, la aclimatación en el mutante *phyD* generó mayor supervivencia a un *shock* de frío (Franklin y Whitelam, 2007) y se consideró al mutante *phyB* crecido en fotoperiodos largos más resistente al frío que el genotipo WT, aunque estas conclusiones están basadas en mediciones de pérdida de iones y no en ensayos de supervivencia (Lee y Thomashow, 2012). Contrariamente a lo que podíamos suponer, considerando el análisis de GO de las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Tabla 5.3), las plántulas cuádruples mutantes *phyA phyB cry1 cry2* fueron más sensibles que las del genotipo WT a tratamientos de congelamiento a -5 °C (Fig. 5.9). Esto no fue debido al daño mecánico que sufrieron estos mutantes durante el proceso de descongelamiento, ya que a) en aquellas plántulas no dañadas la supervivencia también se redujo con respecto al WT, y b) los mismos resultados se obtuvieron con el mutante de *phyB* que es morfológicamente similar al cuádruple mutante (Fig. 5.9 C).

Existen evidencias de que la reducción en el contenido de ácidos grasos trienoicos en los plástidos confiere a las plantas tolerancia a altas temperaturas (Murakami *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005). Nuestros resultados muestran que el crecimiento del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* no se encuentra afectado por un *shock* de 43 °C de 40 min mientras que el peso seco de las plantas WT que recibieron el *shock* es menor que el peso seco de las plantas crecidas a 21 °C (Fig. 5.11 A). Además, la mayor aparición de hojas blancas 5 días después del *shock* de 43 o 44 °C en el genotipo WT comparado con el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* (Fig. 5.11 B) es consistente con el hecho de que a altas temperaturas existe un daño mayor al sistema fotosintético (Berry y Björkman, 1980; Björkman, 1975; Sharkey y Zhang, 2010). Contrariamente a la respuesta que observamos frente a un *shock* de alta temperatura, un estudio reciente reportó que plantas dobles mutantes *phyB cry1* crecidas durante 4 semanas a 28 °C tenían menor peso seco que plantas crecidas a 21 °C (Foreman *et al.*, 2011).

Los efectos del estrés por temperatura en las plantas dependen de la severidad del tratamiento y de la etapa del desarrollo. Las diferencias entre los experimentos anteriormente discutidos y los nuestros podrían explicarse considerando que forman parte de diferentes procesos. Primeramente, los tratamientos citados, tanto de estrés por frío como por calor, fueron realizados en plantas adultas y no en plántulas, y se ha descrito que los diferentes

factores ambientales como la cantidad y calidad de luz y la temperatura son integrados con la fisiología interna y estado hormonal de las plantas para gatillar una respuesta órgano / tejido específica (revisado en Lau y Deng, 2010). Entonces, el efecto de un *shock* de temperatura en una plántula joven, que debe continuar su crecimiento a un estado maduro, podría ser completamente diferente al efecto en una planta adulta al momento en que debe florecer. Segundo, las exposiciones prolongadas y paulatinas de temperatura son para la planta señales ambientales con relevancia ecológica, mientras que un cambio de temperatura repentino no formaría parte de una señal ecológicamente relevante. Tercero, se ha sugerido que tanto en la exposición a bajas como a altas temperaturas, los efectos sobre la planta serían opuestos cuando se utilizan tratamientos de corto plazo o de largo plazo (Routaboul *et al.*, 2012; Routaboul *et al.*, 2000). Nosotros evaluamos cómo los cambios internos en una planta debido a una deficiencia en la percepción de luz pueden amortiguar los cambios repentinos de temperatura. En este trabajo hallamos dos variables alteradas en plántulas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* cuando crece en condiciones normales: un aumento de proteínas relacionadas a la tolerancia a la temperatura (Tabla 5.3) y una reducción en la insaturación de los ácidos grasos de las membranas (Fig. 5.10). En nuestros experimentos, el sólo aumento de los niveles de proteínas involucradas en la tolerancia a bajas temperaturas no fue suficiente para conferirle tolerancia a un *shock* de congelamiento, probablemente porque las plantas no fueron previamente aclimatadas. Por otro lado, la reducción de la insaturación de las membranas en el cuádruple mutante sí es consistente con una mayor sensibilidad a un *shock* de frío y una mayor tolerancia a un *shock* de calor (5.9 y 5.11). En un futuro realizaremos experimentos de aclimatación tanto a altas como a bajas temperaturas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* y mediremos tanto la expresión de genes *CORs* como los niveles de insaturación de sus membranas para tratar de entender la influencia de los distintos factores en la supervivencia de estas plantas.

En resumen, nuestros resultados son consistentes con la deficiencia en la percepción de luz del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. Esto se ve reflejado en el estudio del perfil proteico, en la drástica reducción de la tasa fotosintética y del contenido de clorofila y en el retraso en el crecimiento y desarrollo del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. Además, la ausencia de estos cuatro fotorreceptores genera una situación de estrés en la planta, lo cual se manifiesta a través del aumento en la expresión de proteínas que responden a distintos tipos de estrés como altas y/o bajas temperaturas y sequía. Sin embargo el solo aumento de estas proteínas no permite explicar el comportamiento de las plantas cuando reciben un *shock* de altas o bajas temperaturas, dado que también dependerían de otros componentes fisiológicos. El bajo contenido de ácidos grasos insaturados de las membranas tilacoidales del cuádruple

mutante *phyA phyB cry1 cry2* sería consistente con la mayor tolerancia a un *shock* de altas temperaturas y con la mayor sensibilidad a bajas temperaturas. En condiciones deficientes de luz, como bajo un canopeo denso (o la que percibe el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*), la capacidad fotosintética de la planta se encuentra reducida; por lo tanto la menor insaturación de las membranas tilacoidales protegería a las plantas de un daño mayor en su aparato fotosintético frente a un aumento repentino en la temperatura ambiental que sería una señal ecológicamente irrelevante.

6 Conclusiones finales

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo principal estudiar los mecanismos moleculares y bioquímicos de la transducción de señales lumínicas mediadas por fitocromos y criptocromos durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Dentro de esta gran área de la biología de plantas centramos nuestros estudios en 2 temas: la participación de GPA1 en las vías de señalización de los fotorreceptores *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2*; y el análisis de los cambios en el proteoma del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en relación al patrón de expresión de proteínas en el genotipo WT.

Trabajando con extractos proteicos de plántulas mutantes *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* encontramos que sólo aquellos extractos proteicos de mutantes *cry1* tenían reducida la unión de GTP- $\gamma^{35}\text{S}$, a niveles similares a los observados en el mutante *gpa1*, comparado con extractos de plántulas WT. Demostramos que, en presencia de sacarosa en el medio, GPA1 interacciona genéticamente con *cry1* en 2 respuestas: la inhibición de la apertura del gancho apical en oscuridad y la acumulación de antocianinas bajo luz azul. Esta interacción fue independiente del ecotipo y del tipo de mutación en *CRY1*. Los niveles del transcrito y de la proteína de GPA1 no se encontraron alterados en el mutante *cry1*. Sin embargo, al utilizar un anticuerpo generado contra transducina bovina, detectamos en el genotipo WT una banda 8 kDa más pesada que la esperada para GPA1, que no estaba presente en el mutante *gpa1* ni en el mutante *cry1*. A partir de estos resultados propusimos la hipótesis de que *cry1* podría estar participando de la modificación post-traducciona de GPA1 disminuyendo así su actividad. Este trabajo es un aporte al conocimiento de la interacción entre diferentes vías de señalización en plantas; particularmente de las iniciadas por la proteína G heterotrimérica y las iniciadas por el criptocromo 1. Además caracterizamos un fenotipo del mutante *cry1* durante el desarrollo de la apertura del gancho apical en oscuridad no descrito hasta la fecha.

El estudio de los cambios en el proteoma del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* lo llevamos a cabo utilizando la técnica de geles 2D. Analizamos los cambios globales en el patrón de proteínas del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* en comparación con el genotipo WT en plántulas crecidas en luz blanca. En el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* encontramos sub-expresadas proteínas involucradas en la fotosíntesis, generación de precursores de metabolitos y energía y proteínas importantes para la organización de las membranas tilacoides. Esto sumado a la alteración del contenido de ácidos grasos y a los bajos niveles de clorofila permiten entender la baja tasa fotosintética del cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2*. Las proteínas sobre-expresadas en el cuádruple mutante *phyA phyB cry1 cry2* estuvieron involucradas en respuestas a cambios de temperatura y a la sequía. El cuádruple mutante *phyA*

phyB cry1 cry2 fue más sensible a un *shock* de bajas temperaturas y más tolerante a un *shock* de altas temperaturas, lo cual fue consistente con la baja proporción de ácidos grasos insaturados en sus membranas. En ambientes naturales existen constantes fluctuaciones de temperatura, la menor insaturación de los ácidos grasos en las membranas de plantas que crecen bajo un canopy las protegería de un deterioro del aparato fotosintético ante un aumento abrupto de la temperatura.

7 Anexo

Tabla Anexo. Localización subcelular. Datos de las fuentes de los datos de expresión de las proteínas identificadas en la Tabla 5.4.

Spot	ID	GFP	MS/MS	otro método
spots sub-expresados en el mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i>				
889 y 192	AT5G50920	cloroplastos (Annals of Botany 2010, doi:10.1093/aob/mcq05)	cloroplasto (MCP 2010, doi: 10.1074/mcp.M000038-MCP201; Curr. Biol. 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.039 ; MCP 2010, doi: 10.1074/mcp.M900325-MCP200), mitocondrial (The Plant Cell 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.016055)	-----
449	ATCG00490	no hay datos	cloroplastos (MCP 2010, doi: 10.1074/mcp.M900325-MCP200)	cloroplasto (inmunodetección, Plant Phys 2008, doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.122770)
216	AT4G39690	no hay datos	mitocondrial (The Plant Cell 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.016055)	predictores: núcleo (SubLoc), Golgi (WoLFPSORT),
610	AT3G63140	no hay datos	cloroplasto (MCP 2010, doi: 10.1074/mcp.M000038-MCP201; Curr. Biol. 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.039 ; MCP 2010, doi: 10.1074/mcp.M900325-MCP200)	Western Blot (J Exp Bot 2012, doi: 10.1093/jxb/err347)
434	AT5G08670	Mitocondrial (RNA 2009, doi:10.1261/rna.177640)	mitocondrial (Plan Physiol 2011, doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.182352 ; Phytochem 2011, http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.12.004); vacuola (MCP 2007, doi: 10.1074/mcp.M600250-MCP200; Plant Cell Physiol 2004, doi: 10.1093/pcp/pch099); membrana plasmática (J Proteom Res 2009, DOI: 10.1021/pr801044y; Plant Cell Physiol, doi: 10.1093/pcp/pch209), cloroplasto (Curr. Biol. 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.039 ; Plos One 2008, doi:10.1371/journal.pone.0001994)	no hay datos
455	AT4G13930	no hay datos	citosol (J Proteom Res 2011, DOI: 10.1021/pr1009433), membrana plasmática (MCP 2007, doi: 10.1074/mcp.M700099-MCP200)	
612	AT3G56850	nuclear (J Exp Bot 2005, doi: 10.1093/jxb/eri050)		
392	AT3G02090	extra núcleo (MBoC 2005, doi: 10.1091/mbc.E04-09-0791)	nucléolo (MBoC 2005, doi: 10.1091/mbc.E04-09-0791), pared celular (Proteomics 2006, doi: 10.1002/pmic.200500046), cloroplasto (Curr. Biol. 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.039), mitocondrial (Plant Phys 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.033910)	no hay datos
536	AT5G35400	no hay datos	no hay datos	predictores: mitocondrial
411	AT1G48030	no hay datos	mitocondrial (The Plant Cell 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.016055), membrana plasmática (Proteomics 2011, doi: 10.1002/pmic.201000648), cloroplasto (MCP 2010, doi: 10.1074/mcp.M900325-MCP200)	
spots sobre-expresados en el mutante <i>phyA phyB cry1 cry2</i>				
485	AT1G57720	no hay datos	pared celular (Proteomics 2006, DOI: 10.1002/pmic.200500046), citosol (J. Proteome Res. 2011, DOI: 10.1021/pr1009433), vacuola (The Plant Cell, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.027078), membrana plasmática (MCP, doi: 10.1074/mcp.M600429-MCP200)	ensayo de 2 híbridos: interacción con la ciclina CYCA2;3 (AT1G15570) de localización nuclear (doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.140269)

779	AT4G02520	membrana plasmática y baja señal en núcleo (J. Exp. Bot 2009, doi: 10.1093/jxb/ern365), membrana plasmática (The Plant J. 2003, DOI: 10.1046/j.1365-313X.2003.01890.x)	cloroplasto (Plos One 2008, doi:10.1371/journal.pone.0001994), citosol (J. Proteome Res. 2011, DOI: 10.1021/pr1009433), vacuola (The Plant Cell, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.027078)	no hay datos
842	AT2G22230	no hay datos	cloroplasto (MCP2010, doi: 10.1074/mcp.M900325-MCP200), pared celular (Proteomics 2006, DOI: 10.1002/pmic.200500046)	
464	AT5G67630	no hay datos	cloroplasto (Curr. Biol. 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.039), nucléolo (MBoC 2005, doi: 10.1091/mbc.E04-09-0791)	Actividad helicasa /clase de proteína: biogénesis de snoRNP (C/D)
415	AT1G76030	no hay datos	Aparato de Golgi (Plant Phys. 2012, doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.193151), membrana plasmática (MCP 2007, doi: 10.1074/mcp.M700099-MCP200), cloroplasto (Curr. Biol. 2004, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.02.039)	Western blot: núcleo (Cell 2006, doi:10.1016/j.cell.2006.09.028)

8 Bibliografía

- Ahmad, M., y Cashmore, A.R.** (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* *366*, 162-166.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Smirnova, O., y Cashmore, A.R.** (1998). The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol Cell* *1*, 939-948.
- Ahmad, M., Lin, C., y Cashmore, A.R.** (1995). Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J* *8*, 653-658.
- Albrecht, V., Ingenfeld, A., y Apel, K.** (2006). Characterization of the snowy cotyledon 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*: the impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality. *Plant Mol Biol* *60*, 507-518.
- Assmann, S.M.** (2002). Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* *14 Suppl*, S355-373.
- Bae, G., y Choi, G.** (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* *59*, 281-311.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., y Covarrubias, A.A.** (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* *148*, 6-24.
- Bauer, D., Viczian, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K.C., Adam, E., Fejes, E., Schafer, E., y Nagy, F.** (2004). Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *16*, 1433-1445.
- Bensmihen, S., Rippa, S., Lambert, G., Jublot, D., Pautot, V., Granier, F., Giraudat, J., y Parcy, F.** (2002). The homologous ABI5 and EEL transcription factors function antagonistically to fine-tune gene expression during late embryogenesis. *Plant Cell* *14*, 1391-1403.
- Berry, J., y Björkman, O.** (1980). Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol* *31*, 491-543.
- Beyer, A., Hollunder, J., Nasheuer, H.P., y Wilhelm, T.** (2004). Post-transcriptional expression regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a genomic scale. *Mol Cell Proteomics* *3*, 1083-1092.
- Bindschedler, L.V., y Cramer, R.** (2011). Quantitative plant proteomics. *Proteomics* *11*, 756-775.
- Birnboim, H.C., y Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* *7*, 1513-1523.
- Bischoff, F., Molendijk, A., Rajendrakumar, C.S., y Palme, K.** (1999). GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci* *55*, 233-256.
- Björkman, O.** (1975). Thermal stability of the photosynthetic apparatus in intact leaves. *Carnegie Inst Washington Yearb* *74*, 748.
- Blázquez, M.A., Ahn, J.H., y Weigel, D.** (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* *33*, 168-171.
- Boccalandro, H.E., Giordano, C.V., Ploschuk, E.L., Piccoli, P.N., Bottini, R., y Casal, J.J.** (2012). Phototropins but not cryptochromes mediate the blue light-specific promotion of stomatal conductance, while both enhance photosynthesis and transpiration under full sunlight. *Plant Physiol* *158*, 1475-1484.
- Boccalandro, H.E., Rugnone, M.L., Moreno, J.E., Ploschuk, E.L., Serna, L., Yanovsky, M.J., y Casal, J.J.** (2009). Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *150*, 1083-1092.
- Borochoy-Neori, H., Gindin, E., y Borochoy, A.** (1997). Response of melon plants to salt: 3. Modulation of GTP-binding proteins in root membranes. *J Plant Physiol* *150*, 355-361.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V., y Vierling, E.** (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol* *32*, 191-222.

- Botto, J.F., Alonso-Blanco, C., Garzarón, I., Sánchez, R.A., y Casal, J.J.** (2003). The Cape Verde Islands allele of cryptochrome 2 enhances cotyledon unfolding in the absence of blue light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133, 1547-1556.
- Botto, J.F., Ibarra, S., y Jones, A.M.** (2009). The heterotrimeric G-protein complex modulates light sensitivity in *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Photochem Photobiol* 85, 949-954.
- Botto, J.F., Sánchez, R.A., Whitelam, G.C., y Casal, J.J.** (1996). Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 110, 439-444.
- Bouly, J.P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Bakrim, N., Meier, S., Batschauer, A., Galland, P., Bittl, R., y Ahmad, M.** (2007). Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J Biol Chem* 282, 9383-9391.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H., y Chua, N.H.** (1994a). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 77, 73-81.
- Bowler, C., Yamagata, H., Neuhaus, G., y Chua, N.H.** (1994b). Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev* 8, 2188-2202.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., y Gorkach, J.** (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13, 1499-1510.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Browse, J., Roughan, P.G., y Slack, C.R.** (1981). Light control of fatty acid synthesis and diurnal fluctuations of fatty acid composition in leaves. *Biochem J* 196, 347-354.
- Browse, J., y Somerville, C.** (1991). Glycerolipid synthesis - Biochemistry and regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 467-506.
- Bruggemann, E., Handwerger, K., Essex, C., y Storz, G.** (1996). Analysis of fast neutron-generated mutants at the *Arabidopsis thaliana* HY4 locus. *Plant J* 10, 755-760.
- Burney, S., Hoang, N., Caruso, M., Dudkin, E.A., Ahmad, M., y Bouly, J.P.** (2009). Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of *Arabidopsis* cryptochrome. *FEBS Lett* 583, 1427-1433.
- Calikowski, T.T., y Meier, I.** (2006). Isolation of nuclear proteins. *Methods Mol Biol* 323, 393-402.
- Cantero, A., Barthakur, S., Bushart, T.J., Chou, S., Morgan, R.O., Fernandez, M.P., Clark, G.B., y Roux, S.J.** (2006). Expression profiling of the *Arabidopsis* annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 44, 13-24.
- Casal, J.J.** (1995). Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Planta* 196, 23-29.
- Casal, J.J.** (2000). Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem Photobiol* 71, 1-11.
- Casal, J.J., y Boccalandro, H.** (1995). Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 197, 213-218.
- Casal, J.J., Luccioni, L.G., Oliverio, K.A., y Boccalandro, H.E.** (2003). Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochem Photobiol Sci* 2, 625-636.
- Casal, J.J., y Mazzella, M.A.** (1998). Conditional synergism between cryptochrome 1 and phytochrome B is shown by the analysis of phyA, phyB, and hy4 simple, double, and triple mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118, 19-25.
- Casal, J.J., Sánchez, R.A., y Botto, J.F.** (1998). Modes of action of phytochromes. *J Exp Bot* 49, 127:138.
- Cerdán, P.D., y Chory, J.** (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423, 881-885.

- Cerdán, P.D., Staneloni, R.J., Casal, J.J., y Sánchez, R.A.** (1997). A 146 bp fragment of the tobacco Lhcb1*2 promoter confers very-low-fluence, low-fluence and high-irradiance responses of phytochrome to a minimal CaMV 35S promoter. *Plant Mol Biol* 33, 245-255.
- Cerdán, P.D., Staneloni, R.J., Ortega, J., Bunge, M.M., Rodríguez-Batiller, M.J., Sánchez, R.A., y Casal, J.J.** (2000). Sustained but not transient phytochrome A signaling targets a region of an Lhcb1*2 promoter not necessary for phytochrome B action. *Plant Cell* 12, 1203-1211.
- Clack, T., Mathews, S., y Sharrock, R.A.** (1994). The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* 25, 413-427.
- Clack, T., Shokry, A., Moffet, M., Liu, P., Faul, M., y Sharrock, R.A.** (2009). Obligate heterodimerization of Arabidopsis phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* 21, 786-799.
- Clark, G., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., y Roux, S.** (2010). Is annexin 1 a multifunctional protein during stress responses? *Plant Signal Behav* 5, 303-307.
- Colon-Carmona, A., Chen, D.L., Yeh, K.C., y Abel, S.** (2000). Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiol* 124, 1728-1738.
- Colucci, G., Apone, F., Alyeshmerni, N., Chalmers, D., y Chrispeels, M.J.** (2002). GCR1, the putative Arabidopsis G protein-coupled receptor gene is cell cycle-regulated, and its overexpression abolishes seed dormancy and shortens time to flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4736-4741.
- Crombie, W.M.** (1958). Fatty Acids in Chloroplasts and Leaves. *J Exp Bot* 9, 254-261.
- Chakravorty, D., Trusov, Y., Zhang, W., Acharya, B.R., Sheahan, M.B., McCurdy, D.W., Assmann, S.M., y Botella, J.R.** (2011). An atypical heterotrimeric G-protein gamma-subunit is involved in guard cell K(+) channel regulation and morphological development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 67, 840-851.
- Chen, J.G., Gao, Y., y Jones, A.M.** (2006a). Differential roles of Arabidopsis heterotrimeric G-protein subunits in modulating cell division in roots. *Plant Physiol* 141, 887-897.
- Chen, J.G., y Jones, A.M.** (2004). AtRGS1 function in Arabidopsis thaliana. *Methods Enzymol* 389, 338-350.
- Chen, J.G., Willard, F.S., Huang, J., Liang, J., Chasse, S.A., Jones, A.M., y Siderovski, D.P.** (2003). A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* 301, 1728-1731.
- Chen, M., Chory, J., y Fankhauser, C.** (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* 38, 87-117.
- Chen, M., Tao, Y., Lim, J., Shaw, A., y Chory, J.** (2005). Regulation of phytochrome B nuclear localization through light-dependent unmasking of nuclear-localization signals. *Curr Biol* 15, 637-642.
- Chen, Y., Ji, F., Xie, H., Liang, J., y Zhang, J.** (2006b). The regulator of G-protein signaling proteins involved in sugar and abscisic acid signaling in Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol* 140, 302-310.
- Cho, Y.H., Yoo, S.D., y Sheen, J.** (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* 127, 579-589.
- Choi, G., Yi, H., Lee, J., Kwon, Y.K., Soh, M.S., Shin, B., Luka, Z., Hahn, T.R., y Song, P.S.** (1999). Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* 401, 610-613.
- Chory, J.** (2010). Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities. *Plant J* 61, 982-991.
- Chory, J., Peto, C., Feinbaum, R., Pratt, L., y Ausubel, F.** (1989). Arabidopsis thaliana mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light. *Cell* 58, 991-999.
- Christie, J.M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O'Hara, A., Kelly, S.M., Hothorn, M., Smith, B.O., Hitomi, K., Jenkins, G.I., y Getzoff, E.D.** (2012). *Plant UVR8*

- photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* 335, 1492-1496.
- Chun, L., Kawakami, A., y Christopher, D.A.** (2001). Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiol* 125, 1957-1966.
- Deng, X.W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A., y Quail, P.H.** (1992). COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell* 71, 791-801.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J., y Kay, S.A.** (2003). A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133, 1617-1629.
- Ding, Z., Doyle, M.R., Amasino, R.M., y Davis, S.J.** (2007). A complex genetic interaction between Arabidopsis thaliana TOC1 and CCA1/LHY in driving the circadian clock and in output regulation. *Genetics* 176, 1501-1510.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., y Botstein, D.** (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- Ekman, A., Bulow, L., y Stymne, S.** (2007). Elevated atmospheric CO₂ concentration and diurnal cycle induce changes in lipid composition in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* 174, 591-599.
- Falcone, D.L., Ogas, J.P., y Somerville, C.R.** (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of Arabidopsis with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* 4, 17.
- Fankhauser, C., y Casal, J.J.** (2004). Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *Plant J* 39, 747-760.
- Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D., y Chory, J.** (1999). PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science* 284, 1539-1541.
- Ferro, M., Brugière, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C., y Rolland, N.** (2010). AT_CHLORO, a Comprehensive Chloroplast Proteome Database with Subplastidial Localization and Curated Information on Envelope Proteins. *Mol Cell Proteomics* 9, 1063-1084.
- Folta, K.M., y Kaufman, L.S.** (2006). Isolation of Arabidopsis nuclei and measurement of gene transcription rates using nuclear run-on assays. *Nat Protoc* 1, 3094-3100.
- Foreman, J., Johansson, H., Hornitschek, P., Josse, E.M., Fankhauser, C., y Halliday, K.J.** (2011). Light receptor action is critical for maintaining plant biomass at warm ambient temperatures. *Plant J* 65, 441-452.
- Fowler, S., y Thomashow, M.F.** (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14, 1675-1690.
- Franklin, K.A., y Quail, P.H.** (2010). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *J Exp Bot* 61, 11-24.
- Franklin, K.A., y Whitelam, G.C.** (2005). Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann Bot* 96, 169-175.
- Franklin, K.A., y Whitelam, G.C.** (2007). Light-quality regulation of freezing tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nat Genet* 39, 1410-1413.
- Gao, J., y Kaufman, L.S.** (1994). Blue-Light Regulation of the Arabidopsis thaliana Cab1 Gene. *Plant Physiol* 104, 1251-1257.
- Goldsmith, P., Gierschik, P., Milligan, G., Unson, C.G., Vinitsky, R., Malech, H.L., y Spiegel, A.M.** (1987). Antibodies directed against synthetic peptides distinguish between GTP-binding proteins in neutrophil and brain. *J Biol Chem* 262, 14683-14688.

- Guo, H., Duong, H., Ma, N., y Lin, C.** (1999). The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J* 19, 279-287.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., y Lin, C.** (1998). Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science* 279, 1360-1363.
- Halliday, K.J., Salter, M.G., Thingnaes, E., y Whitelam, G.C.** (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *Plant J* 33, 875-885.
- Halliday, K.J., y Whitelam, G.C.** (2003). Changes in photoperiod or temperature alter the functional relationships between phytochromes and reveal roles for phyD and phyE. *Plant Physiol* 131, 1913-1920.
- Han, Y.J., Kim, H.S., Song, P.S., y Kim, J.I.** (2010). Autophosphorylation desensitizes phytochrome signal transduction. *Plant Signal Behav* 5, 868-871.
- Henderson, I.R., y Dean, C.** (2004). Control of Arabidopsis flowering: the chill before the bloom. *Development* 131, 3829-3838.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., y Schafer, E.** (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant Physiol* 128, 194-200.
- Hiltbrunner, A., Tscheuschler, A., Viczian, A., Kunkel, T., Kircher, S., y Schafer, E.** (2006). FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* 47, 1023-1034.
- Hoecker, U.** (2005). Regulated proteolysis in light signaling. *Curr Opin Plant Biol* 8, 469-476.
- Huang, J., Taylor, J.P., Chen, J.G., Uhrig, J.F., Schnell, D.J., Nakagawa, T., Korth, K.L., y Jones, A.M.** (2006). The plastid protein THYLAKOID FORMATION1 and the plasma membrane G-protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 1226-1238.
- Hughes, R.M., Vrana, J.D., Song, J., y Tucker, C.L.** (2012). Light-dependent, dark-promoted interaction between Arabidopsis cryptochrome 1 and phytochrome B proteins. *J Biol Chem* 287, 22165-22172.
- Hurst, J.H., y Hooks, S.B.** (2009). Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins in cancer biology. *Biochem Pharmacol* 78, 1289-1297.
- Isaacson, T., Damasceno, C.M., Saravanan, R.S., He, Y., Catala, C., Saladie, M., y Rose, J.K.** (2006). Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc* 1, 769-774.
- Ishikawa, A., Iwasaki, Y., y Asahi, T.** (1996). Molecular cloning and characterization of a cDNA for the beta subunit of a G protein from rice. *Plant Cell Physiol* 37, 223-228.
- Ito, S., Song, Y.H., y Imaizumi, T.** (2012). LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis. *Mol Plant* 5, 573-582.
- Jaedicke, K., Lichtenthaler, A.L., Meyberg, R., Zeidler, M., y Hughes, J.** (2012). A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12231-12236.
- Jang, I.C., Henriques, R., Seo, H.S., Nagatani, A., y Chua, N.H.** (2010). Arabidopsis PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *Plant Cell* 22, 2370-2383.
- Jiao, Y., Lau, O.S., y Deng, X.W.** (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* 8, 217-230.
- Jiao, Y., Ma, L., Strickland, E., y Deng, X.W.** (2005). Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 3239-3256.
- Jiao, Y., Yang, H., Ma, L., Sun, N., Yu, H., Liu, T., Gao, Y., Gu, H., Chen, Z., Wada, M., Gerstein, M., Zhao, H., Qu, L.J., y Deng, X.W.** (2003). A genome-wide analysis of blue-light regulation of Arabidopsis transcription factor gene expression during seedling development. *Plant Physiol* 133, 1480-1493.

- Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., y Job, D.** (2005). Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiol* 138, 790-802.
- Johnston, C.A., Taylor, J.P., Gao, Y., Kimple, A.J., Grigston, J.C., Chen, J.G., Siderovski, D.P., Jones, A.M., y Willard, F.S.** (2007). GTPase acceleration as the rate-limiting step in Arabidopsis G protein-coupled sugar signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17317-17322.
- Jones, A.M., y Assmann, S.M.** (2004). Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO Rep* 5, 572-578.
- Jones, A.M., Ecker, J.R., y Chen, J.-G.** (2003). A Reevaluation of the Role of the Heterotrimeric G Protein in Coupling Light Responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 131, 1623-1627.
- Jones, A.M., MacLean, D., Studholme, D.J., Serna-Sanz, A., Andreasson, E., Rathjen, J.P., y Peck, S.C.** (2009). Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from Arabidopsis thaliana. *J Proteomics* 72, 439-451.
- Jones, J.C., Temple, B.R., Jones, A.M., y Dohlman, H.G.** (2011). Functional reconstitution of an atypical G protein heterotrimer and regulator of G protein signaling protein (RGS1) from Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* 286, 13143-13150.
- Josse, E.M., y Halliday, K.J.** (2008). Skotomorphogenesis: the dark side of light signalling. *Curr Biol* 18, R1144-1146.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., y Fankhauser, C.** (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* 91, 29-66.
- Kang, C.Y., Lian, H.L., Wang, F.F., Huang, J.R., y Yang, H.Q.** (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 2624-2641.
- Kang, D., Gho, Y.S., Suh, M., y C., K.** (2002). Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* 23, 1511.
- Kato, C., Mizutani, T., Tamaki, H., Kumagai, H., Kamiya, T., Hirobe, A., Fujisawa, Y., Kato, H., y Iwasaki, Y.** (2004). Characterization of heterotrimeric G protein complexes in rice plasma membrane. *Plant J* 38, 320-331.
- Kaundal, R., Saini, R., y Zhao, P.X.** (2010). Combining machine learning and homology-based approaches to accurately predict subcellular localization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 154, 36-54.
- Kawamura, Y., y Uemura, M.** (2003). Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation. *Plant J* 36, 141-154.
- Kelly, A.A., y Dormann, P.** (2004). Green light for galactolipid trafficking. *Curr Opin Plant Biol* 7, 262-269.
- Kim, D.S., Cho, D.S., Park, W.M., Na, H.J., y Nam, H.G.** (2006). Proteomic pattern-based analyses of light responses in Arabidopsis thaliana wild-type and photoreceptor mutants. *Proteomics* 6, 3040-3049.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adam, E., Schafer, E., y Nagy, F.** (2002). Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* 14, 1541-1555.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schafer, E., y Nagy, F.** (1999). Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* 11, 1445-1456.
- Kirkland, P.A., Busby, J., Stevens, S., Jr., y Maupin-Furlow, J.A.** (2006). Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins. *Anal Biochem* 351, 254-259.
- Kleine, T., Lockhart, P., y Batschauer, A.** (2003). An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J* 35, 93-103.

- Knee, E.M., Hangarter, R.P., y Knee, M.** (2000). Interactions of light and ethylene in hypocotyl hook maintenance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Physiol Plant* 108, 208-215.
- Kobayashi, K., Kondo, M., Fukuda, H., Nishimura, M., y Ohta, H.** (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17216-17221.
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M., y Iba, K.** (1994). Genetic Enhancement of Cold Tolerance by Expression of a Gene for Chloroplast [omega]-3 Fatty Acid Desaturase in Transgenic Tobacco. *Plant Physiol* 105, 601-605.
- Koornneef, M., Bentsink, L., y Hilhorst, H.** (2002). Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5, 33-36.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., y van der Veen, J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 229, 57-66.
- Koornneef, M., Rolf, E., y Spruit, C.J.P.** (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Heynh Z Pflanzenphysiol* 100, 147-160.
- Kovacs, D., Kalmar, E., Torok, Z., y Tompa, P.** (2008). Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol* 147, 381-390.
- Krasensky, J., y Jonak, C.** (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot* 63, 1593-1608.
- Kultima, K., Scholz, B., Alm, H., Skold, K., Svensson, M., Crossman, A.R., Bezard, E., Andren, P.E., y Lonnstedt, I.** (2006). Normalization and expression changes in predefined sets of proteins using 2D gel electrophoresis: a proteomic study of L-DOPA induced dyskinesia in an animal model of Parkinson's disease using DIGE. *BMC Bioinformatics* 7, 475.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larkindale, J., Hall, J.D., Knight, M.R., y Vierling, E.** (2005). Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 138, 882-897.
- Larkindale, J., y Vierling, E.** (2008). Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol* 146, 748-761.
- Lau, O.S., y Deng, X.W.** (2010). Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr Opin Plant Biol* 13, 571-577.
- Lau, O.S., y Deng, X.W.** (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci*.
- Laubinger, S., Fittinghoff, K., y Hoecker, U.** (2004). The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 2293-2306.
- Lee, C.M., y Thomashow, M.F.** (2012). Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15054-15059.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I., y Deng, X.W.** (2007). Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* 19, 731-749.
- Lee, Y.R., y Assmann, S.M.** (1999). *Arabidopsis thaliana* 'extra-large GTP-binding protein' (AtXLG1): a new class of G-protein. *Plant Mol Biol* 40, 55-64.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E., y Quail, P.H.** (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* 18, 1815-1823.
- Leivar, P., y Quail, P.H.** (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci* 16, 19-28.
- Lim, C.J., Yang, K.A., Hong, J.K., Choi, J.S., Yun, D.J., Hong, J.C., Chung, W.S., Lee, S.Y., Cho, M.J., y Lim, C.O.** (2006). Gene expression profiles during heat acclimation in *Arabidopsis thaliana* suspension-culture cells. *J Plant Res* 119, 373-383.

- Lin, C., Ahmad, M., Chan, J., y Cashmore, A.R.** (1996). CRY2: A Second Member of the Arabidopsis Cryptochrome Gene Family. *Plant Physiol* 110, 1047.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., y Cashmore, A.R.** (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2686-2690.
- Lintala, M., Allahverdiyeva, Y., Kidron, H., Piippo, M., Battchikova, N., Suorsa, M., Rintamaki, E., Salminen, T.A., Aro, E.M., y Mulo, P.** (2007). Structural and functional characterization of ferredoxin-NADP⁺-oxidoreductase using knock-out mutants of Arabidopsis. *Plant J* 49, 1041-1052.
- Liscum, E., y Hangarter, R.P.** (1993). Light-Stimulated Apical Hook Opening in Wild-Type Arabidopsis thaliana Seedlings. *Plant Physiol* 101, 567-572.
- Liu, B., Zuo, Z., Liu, H., Liu, X., y Lin, C.** (2011). Arabidopsis cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev* 25, 1029-1034.
- Liu, J., Zhang, F., Zhou, J., Chen, F., Wang, B., y Xie, X.** (2012a). Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol* 78, 289-300.
- Liu, L.J., Zhang, Y.C., Li, Q.H., Sang, Y., Mao, J., Lian, H.L., Wang, L., y Yang, H.Q.** (2008). COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 292-306.
- Liu, M.J., Wu, S.H., y Chen, H.M.** (2012b). Widespread translational control contributes to the regulation of Arabidopsis photomorphogenesis. *Mol Syst Biol* 8, 566.
- Liu, X., Yu, F., y Rodermel, S.** (2010). Arabidopsis chloroplast FtsH, var2 and suppressors of var2 leaf variegation: a review. *J Integr Plant Biol* 52, 750-761.
- Lopez, L., Carbone, F., Bianco, L., Giuliano, G., Facella, P., y Perrotta, G.** (2012). Tomato plants overexpressing cryptochrome 2 reveal altered expression of energy and stress-related gene products in response to diurnal cues. *Plant Cell Environ* 35, 994-1012.
- Ma, H., Yanofsky, M.F., y Meyerowitz, E.M.** (1990). Molecular cloning and characterization of GPA1, a G protein alpha subunit gene from Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 3821-3825.
- Ma, L., Gao, Y., Qu, L., Chen, Z., Li, J., Zhao, H., y Deng, X.W.** (2002). Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in Arabidopsis. *Plant Cell* 14, 2383-2398.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., y Deng, X.W.** (2001). Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13, 2589-2607.
- Maere, S., Heymans, K., y Kuiper, M.** (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics* 21, 3448-3449.
- Mancinelli, A.L., Rossi, F., y Moroni, A.** (1991). Cryptochrome, phytochrome, and anthocyanin production. *Plant Physiol* 96, 1079-1085.
- Mao, J., Zhang, Y.C., Sang, Y., Li, Q.H., y Yang, H.Q.** (2005). From The Cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12270-12275.
- Marotti, L.A., Jr., Newitt, R., Wang, Y., Aebersold, R., y Dohlman, H.G.** (2002). Direct identification of a G protein ubiquitination site by mass spectrometry. *Biochemistry* 41, 5067-5074.
- Mathews, S.** (2006). Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Mol Ecol* 15, 3483-3503.
- Mazzella, M.A., Alconada Magliano, T.M., y Casal, J.J.** (1997). Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant Cell Environ* 20, 261-267.
- Mazzella, M.A., Arana, M.V., Staneloni, R.J., Perelman, S., Rodriguez Batiller, M.J., Muschietti, J., Cerdán, P.D., Chen, K., Sánchez, R.A., Zhu, T., Chory, J., y Casal, J.J.** (2005).

- Phytochrome control of the Arabidopsis transcriptome anticipates seedling exposure to light. *Plant Cell* 17, 2507-2516.
- Mazzella, M.A., Bertero, D., y Casal, J.J.** (2000). Temperature-dependent internode elongation in vegetative plants of Arabidopsis thaliana lacking phytochrome B and cryptochrome 1. *Planta* 210, 497-501.
- Mazzella, M.A., y Casal, J.J.** (2001). Interactive signalling by phytochromes and cryptochromes generates de-etiolation homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* 24, 155-161.
- Mazzella, M.A., Cerdán, P.D., Staneloni, R.J., y Casal, J.J.** (2001). Hierarchical coupling of phytochromes and cryptochromes reconciles stability and light modulation of Arabidopsis development. *Development* 128, 2291-2299.
- McConn, M., y Browse, J.** (1998). Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of Arabidopsis. *Plant J* 15, 521-530.
- Meyerowitz, E.M.** (2001). Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant Physiol* 125, 15-19.
- Mikami, K., y Murata, N.** (2003). Membrane fluidity and the perception of environmental signals in cyanobacteria and plants. *Prog Lipid Res* 42, 527-543.
- Mizoguchi, T., Wright, L., Fujiwara, S., Cremer, F., Lee, K., Onouchi, H., Mouradov, A., Fowler, S., Kamada, H., Putterill, J., y Coupland, G.** (2005). Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2255-2270.
- Mockler, T.C., Guo, H., Yang, H., Duong, H., y Lin, C.** (1999). Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* 126, 2073-2082.
- Moglich, A., Yang, X., Ayers, R.A., y Moffat, K.** (2010). Structure and function of plant photoreceptors. *Annu Rev Plant Biol* 61, 21-47.
- Moshkov, I.E., Mur, L.A., Novikova, G.V., Smith, A.R., y Hall, M.A.** (2003). Ethylene regulates monomeric GTP-binding protein gene expression and activity in Arabidopsis. *Plant Physiol* 131, 1705-1717.
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H., y Iba, K.** (2000). Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* 287, 476-479.
- Muschietti, J.P., Martinetto, H.E., Coso, O.A., Farber, M.D., Torres, H.N., y Flawia, M.M.** (1993). G-protein from Medicago sativa: functional association to photoreceptors. *Biochem J* 291 (Pt 2), 383-388.
- Nagatani, A.** (2010). Phytochrome: structural basis for its functions. *Curr Opin Plant Biol* 13, 565-570.
- Nagatani, A., Chory, J., y Furuya, M.** (1991). Phytochrome B Is Not Detectable in the hy3 Mutant of Arabidopsis, Which Is Deficient in Responding to End-of-Day Far-Red Light Treatments. *Plant Cell Physiol* 32, 1119-1122.
- Nagatani, A., Reed, J.W., y Chory, J.** (1993). Isolation and Initial Characterization of Arabidopsis Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol* 102, 269-277.
- Nagy, F., Kircher, S., y Schafer, E.** (2001). Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *J Cell Sci* 114, 475-480.
- Neff, M.M., y Chory, J.** (1998). Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol* 118, 27-35.
- Neuhaus, G., Bowler, C., Kern, R., y Chua, N.H.** (1993). Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* 73, 937-952.
- Newman, D.W.** (1971). The effect of red and far red light on the desaturation of Fatty acids in barley leaves. *Plant Physiol* 48, 300-302.
- Nishiuchi, T., Nakamura, T., Abe, T., Kodama, H., Nishimura, M., y Iba, K.** (1995). Tissue-specific and light-responsive regulation of the promoter region of the Arabidopsis thaliana chloroplast omega-3 fatty acid desaturase gene (FAD7). *Plant Mol Biol* 29, 599-609.
- Offermanns, S.** (2003). G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol* 83, 101-130.

- Ohgishi, M., Saji, K., Okada, K., y Sakai, T.** (2004). Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2223-2228.
- Okamoto, H., Matsui, M., y Deng, X.W.** (2001). Overexpression of the heterotrimeric G-protein alpha-subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Cell* *13*, 1639-1652.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E., y Browse, J.** (1994). Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* *6*, 147-158.
- Oyama, T., Shimura, Y., y Okada, K.** (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev* *11*, 2983-2995.
- Pandey, S., y Assmann, S.M.** (2004). The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell* *16*, 1616-1632.
- Pandey, S., Chen, J.G., Jones, A.M., y Assmann, S.M.** (2006). G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiol* *141*, 243-256.
- Pandey, S., Nelson, D.C., y Assmann, S.M.** (2009). Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in Arabidopsis. *Cell* *136*, 136-148.
- Parks, B.M., y Quail, P.H.** (1993). hy8, a new class of arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* *5*, 39-48.
- Perfus-Barbeoch, L., Jones, A.M., y Assmann, S.M.** (2004). Plant heterotrimeric G protein function: insights from Arabidopsis and rice mutants. *Curr Opin Plant Biol* *7*, 719-731.
- Persson, S., Wei, H., Milne, J., Page, G.P., y Somerville, C.R.** (2005). Identification of genes required for cellulose synthesis by regression analysis of public microarray data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 8633-8638.
- Peschke, F., y Kretsch, T.** (2011). Genome-wide analysis of light-dependent transcript accumulation patterns during early stages of Arabidopsis seedling deetiolation. *Plant Physiol* *155*, 1353-1366.
- Peterman, T.K., Ohol, Y.M., McReynolds, L.J., y Luna, E.J.** (2004). Patellin1, a novel Sec14-like protein, localizes to the cell plate and binds phosphoinositides. *Plant Physiol* *136*, 3080-3094; discussion 3001-3082.
- Pfeiffer, A., Nagel, M.K., Popp, C., Wust, F., Bindics, J., Viczian, A., Hiltbrunner, A., Nagy, F., Kunkel, T., y Schafer, E.** (2012). Interaction with plant transcription factors can mediate nuclear import of phytochrome B. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 5892-5897.
- Phee, B.K., Park, S., Cho, J.H., Jeon, J.S., Bhoo, S.H., y Hahn, T.R.** (2007). Comparative proteomic analysis of blue light signaling components in the Arabidopsis cryptochrome 1 mutant. *Mol Cells* *23*, 154-160.
- Puhakainen, T., Hess, M.W., Makela, P., Svensson, J., Heino, P., y Palva, E.T.** (2004). Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* *54*, 743-753.
- Qi, Y., Armbruster, U., Schmitz-Linneweber, C., Delannoy, E., de Longevialle, A.F., Ruhle, T., Small, I., Jahns, P., y Leister, D.** (2012). Arabidopsis CSP41 proteins form multimeric complexes that bind and stabilize distinct plastid transcripts. *J Exp Bot* *63*, 1251-1270.
- Rabe, C., y Kutschera, U.** (1998). Sucrose metabolism during apical hook opening in sunflower hypocotyls. *Plant Physiol Biochem* *36*, 389-394.
- Raz, V., y Ecker, J.R.** (1999). Regulation of differential growth in the apical hook of Arabidopsis. *Development* *126*, 3661-3668.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M., y Chory, J.** (1994). Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant Physiol* *104*, 1139-1149.

- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., y Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* 5, 147-157.
- Reiland, S., Grossmann, J., Baerenfaller, K., Gehrig, P., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Grissem, W., y Baginsky, S. (2011). Integrated proteome and metabolite analysis of the de-etiolation process in plastids from rice (*Oryza sativa* L.). *Proteomics* 11, 1751-1763.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schafer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., y Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 332, 103-106.
- Robson, P., Whitelam, G.C., y Smith, H. (1993). Selected Components of the Shade-Avoidance Syndrome Are Displayed in a Normal Manner in Mutants of Arabidopsis thaliana and Brassica rapa Deficient in Phytochrome B. *Plant Physiol* 102, 1179-1184.
- Rockwell, N.C., y Lagarias, J.C. (2006). The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *Plant Cell* 18, 4-14.
- Romero, L.C., y Lam, E. (1993). Guanine nucleotide binding protein involvement in early steps of phytochrome-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1465-1469.
- Romero, L.C., Sommer, D., Gotor, C., y Song, P.S. (1991). G-proteins in etiolated Avena seedlings. Possible phytochrome regulation. *FEBS Lett* 282, 341-346.
- Rosler, J., Jaedicke, K., y Zeidler, M. (2010). Cytoplasmic phytochrome action. *Plant Cell Physiol* 51, 1248-1254.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A., y Pappin, D.J. (2004). Multiplexed Protein Quantitation in Saccharomyces cerevisiae Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-1169.
- Routaboul, J.-M., Skidmore, C., Wallis, J.G., y Browse, J. (2012). Arabidopsis mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids. *J Exp Bot* 63, 1435-1443.
- Routaboul, J.M., Fischer, S.F., y Browse, J. (2000). Trienoic fatty acids are required to maintain chloroplast function at low temperatures. *Plant Physiol* 124, 1697-1705.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2010). The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent E. Coli: "Ultra-Competent" Cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2006, pdb.prot3944.
- Sancar, A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 103, 2203-2237.
- Sanchez, S.E., Petrillo, E., Beckwith, E.J., Zhang, X., Rugnone, M.L., Hernando, C.E., Cuevas, J.C., Godoy Herz, M.A., Depetris-Chauvin, A., Simpson, C.G., Brown, J.W., Cerdan, P.D., Borevitz, J.O., Mas, P., Ceriani, M.F., Kornblihtt, A.R., y Yanovsky, M.J. (2010). A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature* 468, 112-116.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., y Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schoffl, F., Prandl, R., y Reindl, A. (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol* 117, 1135-1141.
- Schramm, F., Ganguli, A., Kiehlmann, E., Englich, G., Walch, D., y von Koskull-Doring, P. (2006). The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 60, 759-772.
- Schramm, F., Larkindale, J., Kiehlmann, E., Ganguli, A., Englich, G., Vierling, E., y von Koskull-Doring, P. (2008). A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant J* 53, 264-274.
- Selby, C.P., y Sancar, A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17696-17700.

- Sellaro, R., Hoecker, U., Yanovsky, M., Chory, J., y Casal, J.J.** (2009). Synergism of red and blue light in the control of Arabidopsis gene expression and development. *Curr Biol* *19*, 1216-1220.
- Seo, H.S., Watanabe, E., Tokutomi, S., Nagatani, A., y Chua, N.H.** (2004). Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev* *18*, 617-622.
- Seo, H.S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L., y Chua, N.H.** (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* *423*, 995-999.
- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C., y Lin, C.** (2002). Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* *417*, 763-767.
- Shalitin, D., Yu, X., Maymon, M., Mockler, T., y Lin, C.** (2003). Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 1. *Plant Cell* *15*, 2421-2429.
- Sharkey, T.D., y Zhang, R.** (2010). High temperature effects on electron and proton circuits of photosynthesis. *J Integr Plant Biol* *52*, 712-722.
- Sharrock, R.A., y Quail, P.H.** (1989). Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev* *3*, 1745-1757.
- Shen, Y., Zhou, Z., Feng, S., Li, J., Tan-Wilson, A., Qu, L.J., Wang, H., y Deng, X.W.** (2009a). Phytochrome A mediates rapid red light-induced phosphorylation of Arabidopsis FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 in a low fluence response. *Plant Cell* *21*, 494-506.
- Shen, Z., Li, P., Ni, R.J., Ritchie, M., Yang, C.P., Liu, G.F., Ma, W., Liu, G.J., Ma, L., Li, S.J., Wei, Z.G., Wang, H.X., y Wang, B.C.** (2009b). Label-free quantitative proteomics analysis of etiolated maize seedling leaves during greening. *Mol Cell Proteomics* *8*, 2443-2460.
- Shin, D.H., Cho, M.H., Kim, T.L., Yoo, J., Kim, J.I., Han, Y.J., Song, P.S., Jeon, J.S., Bhoo, S.H., y Hahn, T.R.** (2010). A small GTPase activator protein interacts with cytoplasmic phytochromes in regulating root development. *J Biol Chem* *285*, 32151-32159.
- Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I.S., Bae, G., Lee, C.H., Lee, D., y Choi, G.** (2009). Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 7660-7665.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Chory, J., y Furuya, M.** (1994). The Induction of Seed Germination in Arabidopsis thaliana Is Regulated Principally by Phytochrome B and Secondarily by Phytochrome A. *Plant Physiol* *104*, 363-371.
- Smith, H.** (2000). Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature* *407*, 585-591.
- Smyth, G.** (2005). Limma: Linear Models for Microarray Data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V.J. Carey, W. Huber, R.A. Irizarry, and S. Dudoit, eds. (Springer New York), pp. 397-420.
- Smyth, G.K.** (2004). Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. In *Stat Appl Genet Mol Biol* (Germany, 'DE GRUYTER'), pp. 1-25.
- Smyth, G.K., y Speed, T.** (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods* *31*, 265-273.
- Somers, D.E., Sharrock, R.A., Tepperman, J.M., y Quail, P.H.** (1991). The hy3 Long Hypocotyl Mutant of Arabidopsis Is Deficient in Phytochrome B. *Plant Cell* *3*, 1263-1274.
- Stasyk, T., Morandell, S., Bakry, R., Feuerstein, I., Huck, C.W., Stecher, G., Bonn, G.K., y Huber, L.A.** (2005). Quantitative detection of phosphoproteins by combination of two-dimensional difference gel electrophoresis and phosphospecific fluorescent staining. *Electrophoresis* *26*, 2850-2854.
- Strasser, B., Sanchez-Lamas, M., Yanovsky, M.J., Casal, J.J., y Cerdan, P.D.** (2010). Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 4776-4781.

- Temple, B.R., y Jones, A.M.** (2007). The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annu Rev Plant Biol* 58, 249-266.
- Tepperman, J.M., Hudson, M.E., Khanna, R., Zhu, T., Chang, S.H., Wang, X., y Quail, P.H.** (2004). Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *Plant J* 38, 725-739.
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.S., Wang, X., y Quail, P.H.** (2001). Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9437-9442.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Thelen, J.** (2007). Introduction to Proteomics: a Brief Historical Perspective on Contemporary Approaches Plant Proteomics. In, J. Šamaj, and J. Thelen, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1-13.
- Thomashow, M.F.** (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50, 571-599.
- Tian, Q., Stepaniants, S.B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M.C., Doyle, M.J., Yi, E.C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J.P., Gunter, B., Linseley, P.S., Stoughton, R.B., Aebersold, R., Collins, S.J., Hanlon, W.A., y Hood, L.E.** (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3, 960-969.
- Tu, S.-L., y Lagarias, J.C., eds.** (2005). The Phytochromes, in *Handbook of Photosensory Receptors* (Weinheim, FRG, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).
- Uemura, M., Joseph, R.A., y Steponkus, P.L.** (1995). Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiol* 109, 15-30.
- Ullah, H., Chen, J.G., Temple, B., Boyes, D.C., Alonso, J.M., Davis, K.R., Ecker, J.R., y Jones, A.M.** (2003). The beta-subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell* 15, 393-409.
- Ullah, H., Chen, J.G., Wang, S., y Jones, A.M.** (2002). Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol* 129, 897-907.
- Ullah, H., Chen, J.G., Young, J.C., Im, K.H., Sussman, M.R., y Jones, A.M.** (2001). Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science* 292, 2066-2069.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11632-11637.
- Unser, G., y Mohr, H.** (1970). Phytochrome-mediated increase of galactolipids in mustard seedlings. *Naturwissenschaften* 57, 358-359.
- Usami, T., Mochizuki, N., Kondo, M., Nishimura, M., y Nagatani, A.** (2004). Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light. *Plant Cell Physiol* 45, 1798-1808.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., y Coupland, G.** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303, 1003-1006.
- Von Arnim, A.G., y Deng, X.W.** (1994). Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* 79, 1035-1045.
- Von Arnim, A.G., y Deng, X.W.** (1996). Light Control of Seedling Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 215-243.
- Von Arnim, A.G., Osterlund, M.T., Kwok, S.F., y Deng, X.W.** (1997). Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 114, 779-788.

- Wallis, J.G., y Browse, J.** (2002). Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Prog Lipid Res* 41, 254-278.
- Wan, L., Ross, A.R., Yang, J., Hegedus, D.D., y Kermod, A.R.** (2007). Phosphorylation of the 12 S globulin cruciferin in wild-type and *abi1-1* mutant *Arabidopsis thaliana* (thale cress) seeds. *Biochem J* 404, 247-256.
- Wang, L., Uilecan, I.V., Assadi, A.H., Kozmik, C.A., y Spalding, E.P.** (2009). HYPOTrace: image analysis software for measuring hypocotyl growth and shape demonstrated on *Arabidopsis* seedlings undergoing photomorphogenesis. *Plant Physiol* 149, 1632-1637.
- Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A.M., y Assmann, S.M.** (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292, 2070-2072.
- Wang, Y., Marotti, L.A., Jr., Lee, M.J., y Dohlman, H.G.** (2005). Differential regulation of G protein alpha subunit trafficking by mono- and polyubiquitination. *J Biol Chem* 280, 284-291.
- Warpeha, K.F., Kaufman, L.S., y Briggs, W.R.** (1992). A flavoprotein may mediate the blue light-activated binding of guanosine 5'-triphosphate to isolated plasma membranes of *Pisum sativum*. *Photochem Photobiol* 55, 595-603.
- Warpeha, K.M., Hamm, H.E., Rasenick, M.M., y Kaufman, L.S.** (1991). A blue-light-activated GTP-binding protein in the plasma membranes of etiolated peas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8925-8929.
- Warpeha, K.M., Lateef, S.S., Lapik, Y., Anderson, M., Lee, B.S., y Kaufman, L.S.** (2006). G-protein-coupled receptor 1, G-protein Galpha-subunit 1, and prephenate dehydratase 1 are required for blue light-induced production of phenylalanine in etiolated *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140, 844-855.
- Warpeha, K.M., Upadhyay, S., Yeh, J., Adamiak, J., Hawkins, S.I., Lapik, Y.R., Anderson, M.B., y Kaufman, L.S.** (2007). The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 1590-1600.
- Wei, Q., Zhou, W., Hu, G., Wei, J., Yang, H., y Huang, J.** (2008). Heterotrimeric G-protein is involved in phytochrome A-mediated cell death of *Arabidopsis* hypocotyls. *Cell Res* 18, 949-960.
- Whippo, C.W., y Hangarter, R.P.** (2006). Phototropism: bending towards enlightenment. *Plant Cell* 18, 1110-1119.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S., y Harberd, N.P.** (1993). Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5, 757-768.
- Wu, G., y Spalding, E.P.** (2007). Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18813-18818.
- Xu Li, Yuejun Yang, Y.L., y Jie Wang and XiaoJuan Xiao, e.a.** (2009). Protein identification and mRNA analysis of phytochrome-regulated genes in *Arabidopsis* under red light. *Sci China C Life Sci* 52.
- Yan, S.P., Zhang, Q.Y., Tang, Z.C., Su, W.A., y Sun, W.N.** (2006). Comparative Proteomic Analysis Provides New Insights into Chilling Stress Responses in Rice. *Mol Cell Proteomics* 5, 484-496.
- Yang, Y.J., Zuo, Z.C., Zhao, X.Y., Li, X., Klejnot, J., Li, Y., Chen, P., Liang, S.P., Yu, X.H., Liu, X.M., y Lin, C.T.** (2008). Blue-light-independent activity of *Arabidopsis* cryptochromes in the regulation of steady-state levels of protein and mRNA expression. *Mol Plant* 1, 167-177.
- Yanovsky, M.J., Casal, J.J., y Whitelam, G.C.** (1995). Phytochrome A, phytochrome B and HY4 are involved in hypocotyl growth responses to natural radiation in *Arabidopsis*: weak de-etiolation of the *phyA* mutant under dense canopies. *Plant Cell Environ* 18, 788-794.
- Yeh, K.C., y Lagarias, J.C.** (1998). Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13976-13981.

- Yi, C., y Deng, X.W.** (2005). COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 15, 618-625.
- Yu, F., Fu, A., Aluru, M., Park, S., Xu, Y., Liu, H., Liu, X., Foudree, A., Nambogga, M., y Rodermel, S.** (2007a). Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant Cell Environ* 30, 350-365.
- Yu, J.W., Rubio, V., Lee, N.Y., Bai, S., Lee, S.Y., Kim, S.S., Liu, L., Zhang, Y., Irigoyen, M.L., Sullivan, J.A., Lee, I., Xie, Q., Paek, N.C., y Deng, X.W.** (2008). COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Mol Cell* 32, 617-630.
- Yu, X., Klejnot, J., Zhao, X., Shalitin, D., Maymon, M., Yang, H., Lee, J., Liu, X., Lopez, J., y Lin, C.** (2007b). Arabidopsis cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell* 19, 3146-3156.
- Zhang, L., Wei, Q., Wu, W., Cheng, Y., Hu, G., Hu, F., Sun, Y., Zhu, Y., Sakamoto, W., y Huang, J.** (2009). Activation of the heterotrimeric G protein alpha-subunit GPA1 suppresses the ftsh-mediated inhibition of chloroplast development in Arabidopsis. *Plant J* 58, 1041-1053.
- Zhang, M., Barg, R., Yin, M., Gueta-Dahan, Y., Leikin-Frenkel, A., Salts, Y., Shabtai, S., y Ben-Hayyim, G.** (2005). Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct omega-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *Plant J* 44, 361-371.
- Zhu, D., Maier, A., Lee, J.H., Laubinger, S., Saijo, Y., Wang, H., Qu, L.J., Hoecker, U., y Deng, X.W.** (2008). Biochemical characterization of Arabidopsis complexes containing CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 and SUPPRESSOR OF PHYA proteins in light control of plant development. *Plant Cell* 20, 2307-2323.
- Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X., y Lin, C.** (2011). Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in Arabidopsis. *Curr Biol* 21, 841-847.