

Tesis Doctoral

Regulación de la expresión de genes en plantas por fotorreceptores

Rodríguez Batiller, María José

2014-06-27

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:

Rodríguez Batiller, María José. (2014-06-27). Regulación de la expresión de genes en plantas por fotorreceptores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Rodríguez Batiller, María José. "Regulación de la expresión de genes en plantas por fotorreceptores". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-06-27.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Regulación de la expresión de genes en plantas por fotorreceptores

**Tesis Presentada para Optar por el Título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el Área de Química Biológica**

Lic. María José Rodríguez Batiller

Director: Dr. Jorge J. Casal

Director: Dr. Ricardo A. Wolosiuk

Consejero de Estudios: Dr. Ricardo Wolosiuk

Lugar de Trabajo: Fundación Instituto Leloir

Fecha de Defensa: 27 de junio

Buenos Aires, 2014

Regulación de la Expresión de Genes en Plantas por Fotorreceptores

La luz es uno de los factores más importantes en el desarrollo de las plantas. Las mismas poseen sistemas que les permiten percibir la calidad, intensidad, dirección y duración de la luz. Existen fotorreceptores específicos que registran la señal lumínica, la cual es traducida produciendo cambios en la expresión de los genes. Los fitocromos pertenecen al grupo de fotorreceptores que absorben predominantemente longitudes de onda del rojo (R) y rojo lejano (RL). El promotor del gen *Lhcb* es regulado por la luz a través del sistema de los fitocromos, ya que responde a muy bajas fluencias (VLFR) y altas irradiancias (HIR) de luz mediante el fitocromo A, y a bajas fluencias (LFR) de luz mediante el fitocromo B.

El análisis del promotor *Lhcb* reveló un motivo necesario para la respuesta HIR pero no para la respuesta VLFR. Este motivo es a su vez necesario para la unión de la proteína BEL-LIKE HOMEODOMAIN 1 (BLH1) al promotor, lo cual se pudo observar tanto en experimentos *in vitro* como en experimentos de simple híbrido en levaduras. Sustituciones de promotor que aumentaron la unión de BLH1 también aumentaron la respuesta HIR. En contraparte, plantas mutantes *blh1* mostraron una disminución en la respuesta al RL continuo pero mantuvieron valores normales a los pulsos de RL. Esto indica que el factor de transcripción BLH1 regula específicamente el HIR y no la VLFR del fitocromo A. De este modo se pone de manifiesto un mecanismo central de control de la sensibilidad a la luz por las plantas.

Entre las diversas proteínas de la familia BLH se encuentran las proteínas BLH6 y BLH5, las cuales se caracterizan por presentar una alta homología estructural con la proteína BLH1. Se estudió la expresión de *BLH1* y *BLH6* en plantas deficientes en *blh1* y *blh6* y dobles mutantes *blh1 blh6*. Por la medida de expresión del gen β -glucuronidasa se pudo determinar que existe una regulación mutua entre las proteínas BLH1 y BLH6. Estudios fisiológicos sobre múltiples mutantes *blh1*, *blh5* y *blh6*, indicaron una función aditiva de miembros de la familia BLH.

Palabras claves: señalización, modos de acción del fitocromo, genes regulados por luz, factores de transcripción.

Regulation of the Expression of Genes in Plants by Photoreceptors

Light is one of the most important in plant growth factors. Plants possess sensory systems that allow them to perceive quality, intensity, direction and duration of light. Specific photoreceptors perceive selected light signals, which are transmitted to produce changes in the expression of genes. Phytochromes absorb predominantly red light (R) and far-red light (FR). The promoter of the *Lhcb1*2* gene is regulated by light through the system of phytochromes, as phytochrome A mediates the very-low-fluence responses (VLFR) and the high-irradiance responses (HIR), and phytochrome B mediates the low-fluence responses.

*Lhcb1*2* promoter analysis revealed a motif necessary for HIR but not for VLFR. This motif is necessary for binding of the protein BEL-LIKE HOMEODOMAIN 1 (BLH1) to the promoter, as revealed by both in experiments *in vitro* and experiments using the one hybrid system in yeast. Substitutions that increased promoter binding BLH1 also increased HIR. The *blh1* mutant showed a decrease in the response to continuous FR but retained normal to pulses of RL values. This indicates that the transcription factor BLH1 specifically regulates the HIR but not the VLFR of the phytochrome A. This reveals a mechanism of control of sensitivity to light in plants.

Among the various members of the BLH family, the BLH5 and BLH6 proteins are characterized by high structural similarity to BLH1. There is mutual regulation of expression between BLH1 and BLH6 proteins. Physiological studies involving double and triple mutants among *blh1*, *blh5* and *blh6* indicate an additive function of BLH family members.

Keywords: signalling, modes of action of phytochromes, genes regulated by light, transcription factors.

Para mi Tía
A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Casal por su excelente guía y por transmitirme su seguridad al momento de terminar mi tesis.

Al Dr. Roberto Staneloni por permitirme entrar en su equipo de trabajo y confiarme este proyecto de tesis.

Al Dr. Ricardo Wolosiuk y a la Dra Silvia Moreno por sus buenos consejos en los momentos justos.

A todos los compañeros de laboratorio: a los que aún están, a los que se fueron a emprender otros proyectos y a aquellos que se fueron para siempre.

A los chicos que pasaron por los laboratorios 201, 206, 212 y 213, con quienes los almuerzos pasaron a hacer reuniones de trabajo.

A los integrantes de la recepción, de la biblioteca, de soporte informático, del secuenciador, del droguero, y demás áreas compartidas del Instituto.

A mi abuelito que nunca supo de este trabajo y a mi abuelita que no lo pudo ver finalizado.

A mi tía, a mi tío, a mi mamá, a mi papá, y a mi hermana.

Mishi, Gusti, Dani, July...

TRABAJOS PUBLICADOS

Incluidos total o parcialmente en el contenido de esta tesis:

2009 Bell-Like Homeodomain feed-back loop in the high-irradiance response of phytochrome A

Roberto Staneloni, **María José Rodríguez Batiller**, Adamantia Agalou, Pablo Cerdán, Annemarie Meijer, Pieter Ouwerkerk and Jorge Casal

Proceedings of the National Academy of Sciences 2009; 106, 32: 13624-13629

2000 Sustained but Not Transient Phytochrome A Signaling Targets a Region of a *Lhcb1*2* Promoter Not Necessary for Phytochrome B Action

Pablo Cerdán, Roberto Staneloni, Matilde Bunge, **María José Rodríguez Batiller**, Jimena Ortega, Rodolfo Sanchez and Jorge Casal

Plant Cell 2000; 12: 1203-1212

No incluidos en esta tesis pero que son parte del proceso de formación:

2007 Abscisic Acid, High-Light, and Oxidative Stress Down-Regulate a Photosynthetic Gene Via a Promoter Motif Not Involved in Phytochrome-Mediated Transcriptional Regulation

Roberto Staneloni, **María José Rodríguez Batiller** and Jorge Casal

Molecular Plant 2008; 1, 1: 75-83

2003 Phytochrome control of Arabidopsis transcriptome anticipates seedling exposure to light

María Agustina Mazzella, Verónica Arana, Roberto Staneloni, Susana Perelman, **María José Rodríguez Batiller**, Jorge Muschietti, Pablo Cerdán, Kunhua Chen, Rodolfo Sánchez, Tong Zhu, Joanne Chory and Jorge Casal

Plant Cell 2005, 9: 2507-16

ABREVIATURAS FRECUENTES

phyA: fitocromo A

phyB: fitocromo B

Pr: forma inactiva del fitocromo

Pfr: forma activa del fitocromo

RL: rojo lejano

R: rojo

PIF: PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR

COP: CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC

HIR: respuesta de alta irradiancia

VLFR: respuesta de muy baja fluencias

LFR: respuesta de baja fluencias

Lhcb: Light-Harvesting Complex B

pb: pares de bases

3-AT: 3 amino triazol

BLH: BEL1-LIKE HOMEODOMAIN

TALE: Three-aa Loop Extension

KNOX: KNOTTED1-LIKE HOMEBOX

BELL: BEL1-LIKE HOMEBOX

BEL1: BEL1-LIKE

ÍNDICE

Portada.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	3
Dedicatoria.....	4
Agradecimientos.....	5
Trabajos.....	6
Abreviaturas.....	7
ÍNDICE.....	8
INTRODUCCIÓN.....	13
Las Señales Lumínicas.....	14
Los Fotorreceptores.....	14
Los Fitocromos.....	15
Cascada de Señalización Mediada por Fitocromos.....	18
Procesos de Etiolación y Des-etiolación.....	21
Modos de Acción del Fitocromo.....	24
Los Genes <i>Lhcb</i> son Regulados por la Luz.....	28
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
CONSTRUCCIONES GENÓMICAS.....	33
PLÁSMIDOS UTILIZADOS.....	33

	10
pUC19.....	33
pBI101.2.....	34
PREPARACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.....	35
Maxipreparaciones.....	36
Minipreparaciones.....	37
CONSTRUCCIONES UTILIZADAS.....	37
Deleciones del Promotor <i>Lhcb1</i> *2.....	37
Sustituciones en el Promotor de 152 pb.....	39
Sustituciones en el Promotor <i>Lhcb1</i> *2 de 453 pb.....	40
OBTENCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES.....	41
Obtención y Comprobación de los Fragmentos.....	41
Purificación y Ligado de los Fragmentos.....	42
INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS EN BACTERIAS.....	43
<i>Escherichia coli</i> HB 101.....	43
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV 3101.....	44
TRANSFORMACIÓN VÍA <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	45
PLANTAS TRANSGÉNICAS.....	46
Transformación de Plantas.....	46
Cultivo de Plantas.....	47
Preparación de ADN Genómico de Plantas.....	47
ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS.....	48

EXPERIMENTOS FISIOLÓGICOS.....	52
Condiciones de los Experimentos Fisiológicos.....	52
Fuentes de luz.....	53
Medición de β -glucuronidasa.....	53
SIMPLE HÍBRIDO EN LEVADURAS.....	55
"PRIMERS"	58
RESULTADOS.....	59
CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA HIR.....	60
Promotor <i>Lhcb1*2</i> de <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	60
Los Motivos "AAAATCT" y "GATA" son Necesarios para los Tres Modos de Acción del Fitocromo.....	62
El Fragmento de -152 a -134 es Necesario para el HIR.....	64
Identificación de una Secuencia Específica para HIR.....	66
IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PARA HIR.....	69
Identificación de la Proteína BLH1.....	69
El Homeodominio del Factor de Transcripción BLH1 se Une a TGGA.....	72
El Promotor Super Hir Muestra Mayor Unión de BLH1.....	73
HIR Normal Requiere de BLH1.....	77
ANÁLISIS FUNCIONAL DE OTRAS PROTEÍNAS BLH.....	82
Regulación Mutua de la Expresión de Miembros de la Familia BLH.....	83
Función Aditiva de Miembros de la Familia BLH.....	85

DISCUSIÓN	89
El Motivo "TGGA"	90
Identificación de las Proteínas BLH1.....	92
Función de BLH1.....	94
Función de BLH5 y BLH6.....	96
Integración de BLH1 a la Cadena de Transducción del phyA en HIR.....	97
BIBLIOGRAFÍA	100

INTRODUCCIÓN

Las Señales Lumínicas

La supervivencia de organismos, ya sean unicelulares o multicelulares, depende de su capacidad de detectar y de responder correctamente al ambiente extracelular. La luz es un factor ambiental muy importante y muchas especies han desarrollado sofisticados sistemas foto-sensoriales que les permiten responder apropiadamente frente a los estímulos luminosos. Siendo foto-autotróficas, las plantas son particularmente sensibles a esta crucial señal externa.

Las plantas han desarrollado sistemas que les permiten percibir tanto la calidad como la intensidad de la luz mediante fotorreceptores específicos que a su vez transmiten la señal produciendo cambios en la expresión de genes (Quail, 1994). Se pueden dividir los procesos involucrados en la fotomorfogénesis de las plantas en tres etapas: la recepción de la luz por pigmentos, la transducción de la señal luminosa desde los pigmentos a los genes, y la inducción de cambios en el crecimiento y el desarrollo a través de la regulación génica. Dicho esto, cabe notar que algunas vías de acción de los fotorreceptores no pasan por cambios en la expresión de genes.

Los Fotorreceptores

Tomando en cuenta la longitud de onda más efectiva, en *Arabidopsis* se pueden definir tres grupos de fotorreceptores:

- Los fitocromos, que absorben predominantemente longitudes de onda rojo (R) y rojo lejano (RL) (600 – 750 nm) (Briggs and Olney, 2001; Casal, 2000).
- Los criptocromos, los zeitlupes y las fototropinas, que responden frente a luz azul (A) y ultravioleta A (UV-A) (320 - 500 nm) (Lariguet and Dunand, 2005).
- El UVR8, que responde a la radiación ultravioleta B (UV-B) (282 – 320 nm) (Rizzini *et al*, 2011).

El análisis de las respuestas a la luz se dificulta, ya que algunos de estos fotorreceptores presentan cierta redundancia en su función (Chory *et al*, 1996; Deng and Quail, 1999).

En *Arabidopsis*, los criptocromos son flavoproteínas codificadas por los genes *CRY1* y *CRY2*, que participan en la fotomorfogénesis y el control fotoperiódico del tiempo de floración (Lyn *et al*, 1998). Las fototropinas son codificadas por los genes *PHOT1* y *PHOT2* y son las encargadas de controlar el fototropismo, la apertura de los estomas, el movimiento de los cloroplastos, la fase más temprana de la inhibición del crecimiento del hipocotilo y la posición de las hojas (Christie *et al*, 1998). Los zeitlupe, *ZTL*, *LKP2* y *FKF1*, participan en la sincronización del reloj circadiano y están vinculados a la inducción de la vía fotoperiódica de la floración (Baudry *et al*, 2010). Los fitocromos en *Arabidopsis* son codificados por 5 genes llamados *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* y *PHYE* (Clack *et al*, 1994) y se describen en mayor detalle a continuación.

Los Fitocromos

Los fitocromos son cromoproteínas (moléculas que combinan una parte proteica o apoproteína y un cromóforo) diméricas conformadas por dos polipéptidos de aproximadamente 125 KDa. Cada monómero posee dos dominios estructurales: el carboxi terminal que media la dimerización y el amino terminal que está unido covalentemente a un cromóforo, que es el responsable de la absorción de la luz. El cromóforo absorbe principalmente en R o RL, modificando su conformación. La excitación del cromóforo altera la conformación de la apoproteína y, por ende, su capacidad de acción biológica (Quail, 1991).

Utilizando espectroscopía RMN se pudo determinar que el cromóforo presente en el fitocromo es un tetrapirrol, la fitocromobilina (PΦB), unido a un residuo

cisteína ubicado en el dominio N-terminal de la apoproteína (Terry, 1997). La fitocromobilina se sintetiza en el plástido a partir de ácido aminolevulínico y luego en el citoplasma se produce la unión con la apoproteína formando la molécula del fitocromo con la conformación Pr (Terry, 1997).

La molécula del fitocromo tiene la capacidad de interconvertirse reversiblemente en dos conformaciones frente a la absorción de distinta calidad de luz: la conformación Pr, que absorbe máximamente en R, y la conformación Pfr, que absorbe máximamente en RL (Frankhauser and Chory, 1997). Los fitocromos son sintetizados en el citoplasma en la forma Pr y al absorber luz pasan a su forma Pfr para así migrar al núcleo (Nagy *et al*, 2001). Se considera que la forma activa es la Pfr debido a que muchas respuestas fisiológicas son promovidas por la luz roja. Dado que los mutantes de fitocromos no presentan fenotipo visible en oscuridad (donde se encuentran como Pr) se desprende que la forma inactiva es el Pr (**Figura 1.1**).



Figura 1.1: Formas Interconvertibles del Fitocromo.

Ambas se encuentran en equilibrio y son interconvertibles: la R convierte a Pr en Pfr y la RL convierte a Pfr en Pr.

En plántulas crecidas en oscuridad, los fitocromos se encuentran en su forma inactiva Pr. Cuando dichas plántulas son expuestas a R, la conformación Pr se convierte a la forma activa Pfr. Dado que la foto-conversión es foto-reversible, al exponer a las plántulas a RL, se revierte la conformación Pfr a Pr (Wang and Deng, 2003). La interconversión entre las dos conformaciones está dada por un cambio en el isómero de la conformación *cis* (en la forma Pfr) a *trans* (en la forma Pr) (Wang and Deng, 2002; Chen *et al*, 2004) (**Figura 1.2**). El pasaje de la conformación Pfr a Pr puede estar dado, en algunos casos, de una manera más lenta en ausencia de luz (reversión oscura).

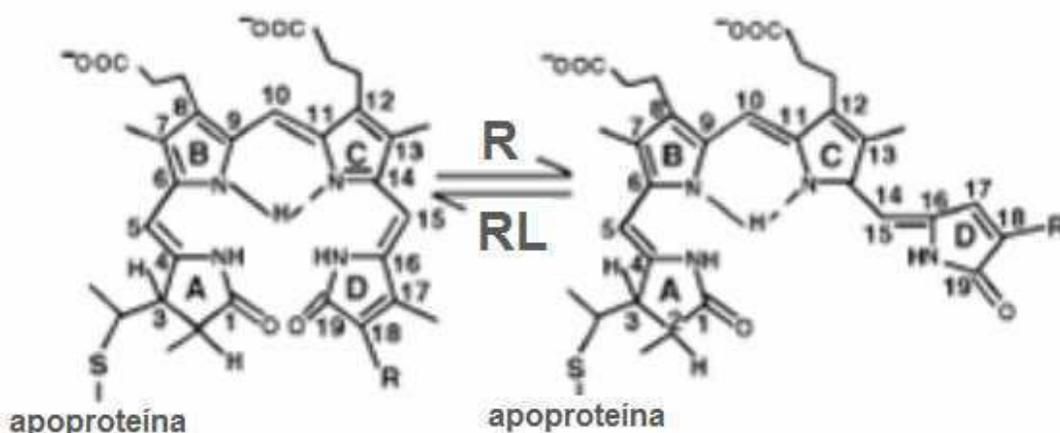


Figura 1.2: Interconversión de las Conformaciones *Cis* y *Trans* del cromóforo de los fitocromos
(Adaptado de Wang and Deng, 2002).

Los espectros de absorción de Pr y Pfr se solapan en buena parte, lo que significa que la forma Pfr coexiste siempre con la forma Pr en un foto-equilibrio dinámico entre dichas conformaciones (**Figura 1.3**). La proporción de Pfr respecto al fitocromo total (porcentaje de Pfr o Pfr/P) depende de la composición espectral de la luz (Mancinelli, 1994). De este modo, la luz monocromática de 660 nm (R) convierte un 87% del fitocromo a la forma Pfr, mientras que luz monocromática de 730 nm (RL) convierte sólo un 3% del fitocromo a la forma Pfr. Por otro lado, el porcentaje de Pfr establecido por la luz policromática solar está determinado principalmente por la proporción R/RL de la luz incidente (Mancinelli, 1994). Cuanto mayor sea la relación R/RL, mayor será el la proporción Pfr/P. A los efectos de esta tesis, es importante notar que si bien la RL establece una proporción baja de Pfr, en casos específicos esta pequeña proporción de Pfr es biológicamente relevante cuando se la compara con la ausencia de Pfr que ocurre en oscuridad total.

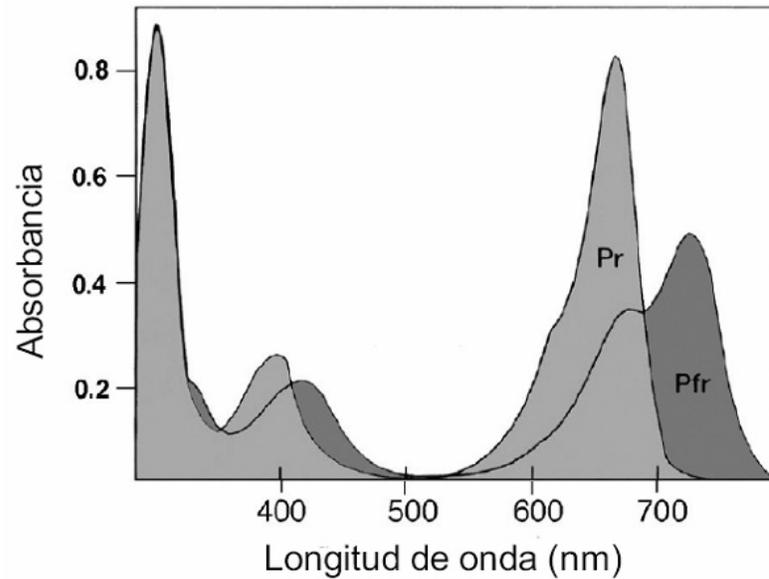


Figura 1.3: Espectro de Absorción de las Conformaciones de los Fitocromos Pfr y Pr

La forma Pr tiene su pico de absorción en 660 nm y la Pfr en 730 nm
(Adaptado de Wang and Deng, 2002).

Cascada de Señalización Mediada por Fitocromos

El fitocromo es el encargado de activar una red de señalización iniciada por la percepción del estímulo lumínico y culminada con la expresión de genes responsables del proceso de fotomorfogénesis (Martínez García *et al*, 2000). Estudios genéticos y moleculares han puesto de manifiesto algunos de los mecanismos y componentes involucrados en la transducción de señales de los fitocromos.

La luz juega un rol fundamental en la traslocación de los fitocromos al núcleo: luego de que los mismos son sintetizados en el citoplasma en su forma Pr, se produce su migración al núcleo al pasar a la forma Pfr debido a la absorción de la luz. (Sakamoto and Nagatani, 1996).

Una vez dentro del núcleo, los fitocromos interactúan directamente con distintos factores de transcripción. Los ensayos de doble híbrido han sido de gran utilidad para poder identificar proteínas que se unen a los fitocromos (Fankhauser *et al*, 1999).

Los miembros de la familia de factores de transcripción llamados PIFs (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS) corresponden a factores de transcripción del tipo bHLH ("Basic Helix-Loop-Helix") que se unen al fitocromo sólo en su conformación activa Pfr (Ni *et al*, 1998). Los mismos interactúan con la forma activa de phyA (PIF1 y PIF3) o phyB (PIF1, PIF3, PIF4, PIF5 y PIF7) a través de la unión al dominio N-terminal de la molécula del fitocromo (Khanna *et al*, 2006). Los PIFs se encuentran constitutivamente en el núcleo y se unen específicamente al motivo de ADN denominado G-Box (CACGTG) presente en los promotores de varios genes regulados por la luz (Shen *et al*, 2007). Se ha demostrado que la unión del fitocromo a los factores PIF1 o PIF3 permite la fosforilación rápida de los mismos y su posterior degradación a través del sistema ubiquitina-proteosoma (Al-Sady *et al*, 2006). Estudios con mutantes múltiples indican que los PIFs son reguladores negativos de la fotomorfogénesis en oscuridad, de modo que su inactivación por fitocromos permite la fotomorfogénesis (Shen *et al*, 2007; Leivar *et al*, 2008). PIF7 se comporta de manera similar, aunque no presenta fosforilación ni degradación significativa cuando se une a phyB (Leivar *et al*, 2008). Se ha demostrado que PIF1 inhibe la germinación y esta ocurre cuando se induce la degradación de PIF1 al unirse con phyA (Huq *et al*, 2004). Estudios de la función de PIF3 a través de la caracterización de mutantes deficientes de *PIF3* y el uso de sobre-expresantes de este gen, mostraron que PIF3 regula negativamente la elongación del hipocotilo y la apertura de los cotiledones mediada por phyB (Monte *et al*, 2004).

Una segunda gran vía de acción de los fotorreceptores involucra a COP1 ("CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1"). COP1 es una proteína de ubicación núcleo-citoplasmática que reprime la fotomorfogénesis en oscuridad,

actuando río abajo de los fitocromos y criptocromos (Deng *et al*, 1991). Este factor tiene actividad E3 ubiquitina ligasa. El efecto represor de COP1 sobre la fotomorfogénesis en oscuridad se produce por su interacción directa con reguladores positivos de la fotomorfogénesis. Por ejemplo, cuando COP1 interacciona con el regulador positivo HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5), el mismo queda ubiquitinado para su posterior degradación por el proteasoma 26S (Holm *et al*, 2002). Ante la percepción lumínica, se induce la localización de COP1 hacia el citoplasma, incrementando la abundancia de factores de transcripción positivos para la fotomorfogénesis en el núcleo, permitiendo así la promoción de las respuestas inducidas por luz (Pacín *et al*, 2014). Los mutantes *cop* junto con los mutantes *det* ("DE-ETIOLATED") (Cabrera y Poch *et al*, 1993) y *fus* ("FUSCA") (Misera *et al*, 1994) conforman el grupo de mutantes fotomorfogénicos que presentan alteraciones en su desarrollo en la oscuridad. La mutante *cop/det/fus* presenta un fenotipo típico de una respuesta fotomorfogénica constitutiva: cotiledones abiertos, hipocotilos cortos, cloroplastos diferenciados, y activación de genes de respuesta a luz (Wei and Deng, 1996). El fenotipo de estos mutantes es un claro indicio de que las proteínas normales COP/DET/FUS actúan como reguladores negativos de la fotomorfogénesis. De este modo, la fotomorfogénesis es reprimida en oscuridad por PIFs y COP1, y la activación de los fitocromos por la luz contribuye a la represión de PIFs y COP1 y al progreso de la fotomorfogénesis.

Experimentos de cuantificación de la expresión génica en respuesta a tratamientos lumínicos han mostrado que dentro del grupo de genes que varía su expresión rápidamente (a la hora de iniciado el tratamiento), el 44% codifica para putativos factores de transcripción (Tepperman *et al*, 2001).

Procesos de Etiolación y Des-etiolación

La luz tiene un papel muy importante en el período entre la germinación y el desarrollo de las primeras hojas verdaderas. Durante este tiempo, la plántula debe alcanzar la capacidad fotosintética (Nemhauser and Chory, 2002). La planta puede adquirir morfologías muy distintas si es crecida en oscuridad (condición que experimenta la plántula antes de emerger) o bajo condiciones de luz (a la que los órganos aéreos son expuestos al emerger).

En oscuridad se lleva a cabo el proceso de etiolación, durante el cual la plántula (tomando como ejemplo *Arabidopsis thaliana*) va a tener un crecimiento caracterizado por un largo hipocotilo, cotiledones cerrados, raíz poco desarrollada y desarrollo de los proplástidos en etioplastos. En contraste, cuando la plántula es expuesta a la luz, se produce el proceso de des-etiolación, en el cual la plántula va a tener un hipocotilo corto, cotiledones abiertos y expandidos, un sistema radicular bien desarrollado y desarrollo de los proplástidos en cloroplastos maduros (**Figura 1.4**) (Chory *et al*, 1996; Wang and Deng, 2003). Este proceso de des-etiolación es el que le permite a la planta alcanzar el estado fotoautótrofo (Franklin and Quail, 2010). En condiciones naturales, cuando los órganos aéreos alcanzan la superficie, la luz activa a los fotorreceptores como el phyA, el phyB y a los criptocromos, y en respuesta a este estímulo los cotiledones se expanden y se desarrolla la capacidad fotosintética. Al mismo tiempo, el hipocotilo, que venía creciendo con una alta tasa, frena su extensión al alcanzar la superficie.

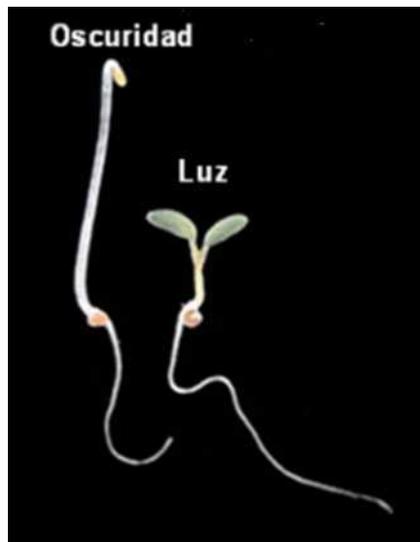


Figura 1.4: Procesos de Etiolación y Des-etiolación

Se muestra el crecimiento de la plántula en presencia de luz, donde se produce el proceso de des-etiolación (derecha), y en ausencia de luz, donde se produce el proceso de etiolación (izquierda).

(Adaptado de Nemhauser and Chory, 2002).

Además del proceso de des-etiolación, la información provista por la luz puede controlar procesos fundamentales del crecimiento y del desarrollo de las plantas. En muchas malezas, la germinación de las semillas es promovida por la exposición a la luz. En muchos casos, exposiciones muy breves, como las que ocurren durante la remoción del suelo, son suficientes como para inducir la germinación de semillas que luego quedan enterradas en la oscuridad del suelo.

Las señales provistas por la luz son también cruciales en etapas posteriores. Cuando la planta se encuentra rodeada o sombreada por plantas vecinas, su ambiente se verá proporcionalmente enriquecido en RL, ya que esta banda espectral es pobremente absorbida por los pigmentos fotosintéticos de las plantas vecinas y es más fuertemente reflejado y transmitido. Un cambio en la relación de R/RL de 1,2 a 0,8 puede alterar radicalmente el hábito de crecimiento de una plántula (Casal, 2013). Una alta relación de R/RL mantiene inhibido el crecimiento del hipocotilo y favorece una posición planófila de las hojas, mientras que una relación baja de R/RL promueve

la elongación del mismo, favorece una posición más erectófila de las hojas y en algunas especies adelanta la floración. Finalmente, el fotoperíodo (número de horas de luz por día) controla el momento de floración en plantas de día largo (como *Arabidopsis* y trigo) o de día corto (como arroz y soja) (Mukherjee and Burglin, 2007).

Se han realizado numerosas caracterizaciones de plántulas de *Arabidopsis* mutantes en determinados fitocromos para visualizar a nivel fenotípico los efectos que poseen cada uno de ellos. En luz blanca, hay una marcada redundancia de la acción de los fitocromos, que se pone de manifiesto al observar que las mutaciones tienen más efecto cuando otros fitocromos ya están mutados (**Figura 1.5**) (Franklin and Quail, 2010).

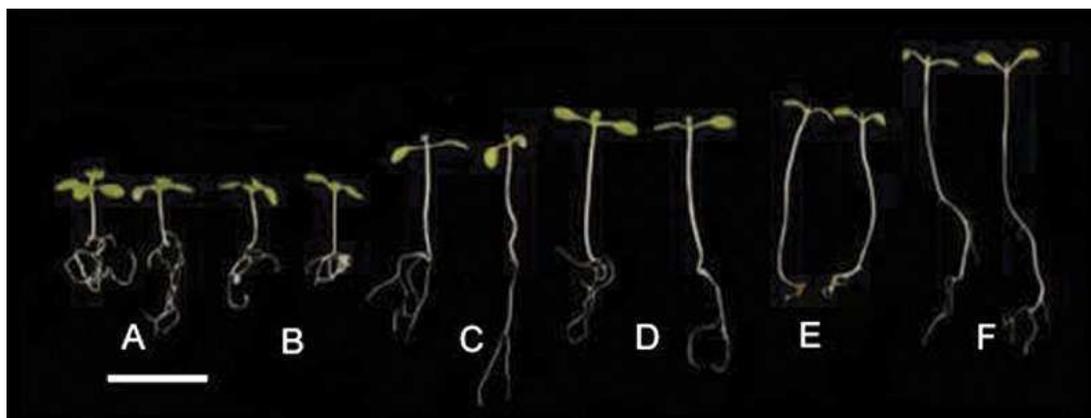


Figura 1.5: Análisis de Distintas Plántulas Mutantes de los Fitocromos

Las plántulas fueron crecidas en fotoperíodos de 8 horas de luz blanca a $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Genotipo salvaje (A), mutante *phyA* (B), mutante *phyB* (C), triple mutante *phyB phyD phyE* (D), triple mutante *phyA phyB phyE* (E) y cuádruple mutante *phyA phyB phyD phyE* (F). La barra representa una escala de 5 mm. (Adaptado de Franklin and Quail, 2010)

En el análisis de la mutante deficiente de *phyA* (mutantes *phyA*), la plántula presenta un fenotipo de des-etiolación similar al observado en la planta salvaje, tanto en luz blanca como en R (**Figura 1.5 B**). Cuando dichas mutantes son crecidas en RL

continuo se caracterizan por presentar un fenotipo completamente etiolado, indicando que la principal función del phyA es el proceso de des-etiolación.

El phyB es el principal regulador de la respuesta frente a luz blanca y R. Las mutantes *phyB* se caracterizan por un largo hipocotilo, reducida expansión de los cotiledones y reducida síntesis de clorofila (**Figura 1.5 C**). Se cree que el phyB y el phyA poseen un rol redundante en la respuesta frente a luz R con respecto a la elongación del hipocotilo y la expansión de los cotiledones. Plántulas deficientes en los phyA y phyB presentan hipocotilos más elongados y cotiledones de menor tamaño cuando se las compara con la plántula deficiente en phyB, lo que estaría indicando que hay determinados roles de phyA que se encuentran enmascarados por la presencia de phyB (**Figura 1.5 D, E y F**).

El phyA es el más abundante en plántulas crecidas en oscuridad, y su nivel disminuye más de 100 veces cuando éstas son expuestas a la luz, por una combinación en la regulación tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, razón por la cual se lo clasifica como fitocromo lábil a la luz (Hirschfeld *et al*, 1996). Por otro lado, en plántulas crecidas en presencia de luz, el phyB es el más abundante (Hirschfeld *et al*, 1996).

Modos de Acción del Fitocromo

El fitocromo media tres tipos de respuestas fotobiológicas, comúnmente llamadas modos de acción del fitocromo: las respuestas a baja fluencia o “low fluence responses” (LFRs), las respuestas a muy baja del fluencia o “very low fluence responses” (VLFRs), y las respuestas a alta irradiancia o “high irradiance responses” (HIRs). Estudios genéticos en mutantes de fitocromo de *Arabidopsis* demuestran que el phyA es el responsable de las respuestas VLFR y HIR, mientras que el phyB es el responsable de la respuesta LFR (Deng and Quail, 1999).

Las LFRs son las respuestas clásicas del fitocromo que presentan reversibilidad de R/RL. El hecho de que una determinada respuesta sea producida por R y revertida por RL es marca incuestionable de la acción del fitocromo como fotorreceptor, ya que existe una relación entre la respuesta y la cantidad de fitocromo en la forma Pfr. Usualmente, comparando contra controles de oscuridad, un pulso de R es suficiente como para inducir una respuesta que puede ser revertida por un pulso de RL. Además, se cumple la ley de reciprocidad, donde la respuesta es la misma cuando (dentro de cierto rango) se aumenta el tiempo de irradiación y se disminuye la intensidad en forma proporcional; es decir cuando se mantiene el número total de fotones (Casal *et al*, 1998).

Las VLFRs no son respuestas reversibles por RL (al menos no totalmente reversibles), debido a que pueden ser inducidas por un amplio espectro de radiación que va desde los 300 nm a los 780 nm. Este tipo de respuestas mediadas por fitocromo son técnicamente irreversibles o sólo parcialmente reversibles, pero no porque no dependan de los niveles de Pfr/P, sino porque se saturan a niveles muy bajos de Pfr: la fuente más pura de RL es capaz de producir niveles suficientes de Pfr como para, en muchos casos, saturar la respuesta VLFR. La germinación de las semillas de *Arabidopsis* es estimulada por R; sin embargo, cuando se grafica el porcentaje de germinación en función del logaritmo de la relación Pfr/P, se obtiene una curva que presenta dos fases (Casal *et al*, 1998): la primera fase se satura a niveles de Pfr/P muy bajos y llega aproximadamente a un 40 % de germinación, mientras que la segunda fase se satura con niveles de Pfr/P más altos y llega casi al 100 % de germinación. La primera fase corresponde a una VLFR, que incluso se satura con un pulso de RL que produce menos del 3% de Pfr (Mancinelli, 1994).

Las HIRs se definen como la diferencia entre el efecto de los tratamientos continuos y pulsos horarios con luz de igual composición espectral y fluencia, donde la luz continua es más eficaz que los pulsos (Casal *et al*. 1998). Es decir, son respuestas que requieren intensidades de luz relativamente altas y tiempos de

exposición prolongados, en las que no se cumple la ley de reciprocidad (salvo que los pulsos de luz sean muy frecuentes) y que se observan principalmente en plantas etioladas (Jordan *et al*, 1995). La zona del espectro del RL es la más efectiva en inducir este tipo de respuesta. Por ejemplo, 18 horas de irradiación con RL producen una fuerte inhibición de la elongación del hipocotilo en plantas etioladas de *Arabidopsis*, pero no puede lograrse el mismo efecto con 18 horas de R (Jordan *et al*, 1995). Ha sido un desafío explicar este tipo de respuestas, donde el RL es más efectivo que el R, teniendo en cuenta las propiedades básicas del fitocromo, ya que *a priori* podría esperarse que la R sea más efectiva que la RL. Sin embargo, no quedan dudas que el fitocromo es el fotorreceptor involucrado y se ha avanzado en el entendimiento de las bases moleculares y celulares de sus características fotobiológicas.

Cuando se cultivan plántulas de genotipo salvaje en RL se observa la apertura de los cotiledones y una inhibición notoria del alargamiento del hipocotilo (respuesta HIR característica). En esas condiciones, mutantes *phyA* muestran un fenotipo similar al de las plantas normales cultivadas en oscuridad (**Figura 1.6**). Sin embargo, cuando ambas son cultivadas en luz blanca, no se observan fenotipos claramente diferenciables entre las plántulas normales y las mutantes *phyA* (Dehesh *et al*, 1993; Parks and Quail, 1993). Las plantas sobre-expresantes de *phyA* muestran una exacerbada respuesta a RL, una respuesta de tipo HIR que inclusive puede observarse en plantas des-etioladas (Whitelam *et al*, 1993; McCormac *et al*, 1992). Fenotípicamente, presentan hipocotilos más cortos a la luz, enanismo, hojas más verdes y senescencia retrasada (Boylan and Quail, 1991; Cherry *et al*, 1991; Jordan *et al*, 1995). En conjunto, todos estos datos demuestran que el *phyA* es el fotorreceptor que percibe las respuestas HIR bajo condiciones de RL.

Las longitudes de onda entre los picos de absorción de Pr y Pfr son las más eficaces para causar HIR. Para lograr una máxima actividad del *phyA*, se necesita del ciclado continuo entre Pr y Pfr (Rausenberger *et al*, 2011). El Pfr se produce por

fotoconversión a partir del Pr citoplasmático. Estando en su forma activa, la molécula del fitocromo se une al complejo proteico FHY1/FHL para migrar al núcleo. En el núcleo, la luz es necesaria para transformar Pfr a Pr y liberarlo del complejo FHY1/FHL. Entonces, la luz es requerida nuevamente para producir la fotoconversión de Pr a Pfr. Por lo tanto, el hecho de que las altas irradiancias permitan la acumulación de Pfr nuclear mediante el aumento de la fotoconversión y la separación del complejo FHY1/FHL, es indicador de la fuerte dependencia que tiene la respuesta HIR de la tasa de fluencia (Rausenberger *et al*, 2011). Por otro lado, como el pico de absorción efectivo y necesario para el ciclado continuo entre Pr y Pfr se encuentra entre los picos de absorción de dichas formas interconvertibles, el RL es más eficiente que el R para la respuesta HIR (Rausenberger, *et al*, 2011).

En resumen:

- Las LFRs se caracterizan por mostrar reciprocidad entre la intensidad y el tiempo de irradiación, además de que son efectivas en tiempos cortos de exposición. Es el caso típico que presenta la reversibilidad R/RL, donde se necesita alto Pfr en corto tiempo lo cual se induce, por ejemplo, por pulsos de R.
- Las VLFRs se inician por intensidades muy bajas (10000 veces menor que la LFR), hay inducción por RL y en consecuencia ausencia de reversibilidad R/RL. Esto se debe a que pequeñas cantidades de Pfr (0.01%) serían suficientes para activar este tipo de respuesta.
- Las HIRs requieren exposiciones prolongadas a la luz de alta fluencia. Dependen de la longitud de onda, irradiancia, y duración del tratamiento lumínico y no muestran reciprocidad R/RL, salvo que los pulsos de luz sean muy frecuentes.

Los tres modos de acción del fitocromo representan tres niveles diferentes de sensibilidad a la luz. El hecho de que las plantas posean un sistema con múltiples

niveles de sensibilidad a la luz, les permite realizar ajustes en los procesos de crecimiento y desarrollo que necesitan ser modificados de acuerdo a las condiciones ambientales imperantes en las que se encuentren (Casal *et al*, 2013).

Los Genes *Lhcb* son Regulados por la Luz

Los primeros genes estudiados que mostraron regulación por la luz fueron los genes *Lhcb*, también conocidos anteriormente como *Cab* (“Chlorophyll a/b-binding proteins”), que codifican para las proteínas LHC (“Light-Harvesting Complex”) (Tobin and Silverthorne, 1985). Se midió la concentración de ARNm en plantas cultivadas a la luz o en oscuridad para dichos genes y se demostró que el incremento de la concentración de ARNm era debido a un aumento de la transcripción, mediada por fitocromo. La concentración de ARNm de los genes *Lhcb* es bastante alta, lo que permitió el clonado y la caracterización de los respectivos ADNc (Tobin and Silverthorne, 1985). Los mismos están codificados en el núcleo y su organización genómica varía entre especies, aunque todos pertenecen a familias de genes.

Las regiones codificantes de estos genes están altamente conservadas, como por ejemplo, el motivo de unión del factor de transcripción CCA1, el cual regula el ritmo circadiano (Wang and Tobin, 1998). Este fue el primer caso reportado donde se pudo ver concretamente una analogía lineal entre la región de código del ADN, el factor de transcripción que se le une y la señal que deriva de dicha unión. El descubrimiento de nuevos factores de transcripción se ve favorecido con la técnica de simple híbrido en levaduras (“one-hybrid”). El “screening” mediante la técnica de simple híbrido en levaduras es un poderoso método para identificar factores de transcripción heterólogos que puedan interactuar consecuencias específicas de ADN regulatorias de interés.

Una de las técnicas empleadas en el estudio de las regiones reguladoras ubicadas “río arriba” de la región codificante del promotor del gen *Lhcb1*2* es la utilización de fusiones con genes reporteros. La β -glucuronidasa (GUS) es una enzima de origen bacteriano, que está ausente en plantas vasculares y es uno de los genes más utilizados como reportero (Jefferson, 1987). La actividad de estos genes sirve como medida de la transcripción mediada por un promotor. Se han realizado numerosos experimentos sometiendo a diferentes tratamientos de luz plantas de tabaco y de *Arabidopsis* que expresaban la construcción *Lhcb:GUS* (promotor del gen *Lhcb* fusionado al gen de la β -glucuronidasa).

Se ha observado que la regulación de la expresión de los genes *Lhcb* ocurre principalmente a nivel transcripcional. La curva de respuesta de los genes *Lhcb* de tabaco a distintas cantidades de R mostró dos fases: la primera corresponde a una VLFR, no reversible por RL (activada por muy baja cantidad de luz) mientras que la segunda se trata de una LFR, reversible por RL (Cerdán *et al*, 1997). Se demostró también que los genes *Lhcb* responden a RL continuo, evidenciando así la existencia de una respuesta del tipo HIR (Cerdán *et al*, 1997). Estos datos en conjunto, indican que los genes *Lhcb* responden a los tres modos de acción del fitocromo (Cerdán *et al*, 1997).

La actividad del promotor del gen *Lhcb1*2* de tabaco fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa responde a la señal lumínica percibida por *phyA* y *phyB* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* o tabaco (Cerdán *et al*, 1999). Las respuestas VLFR y HIR inducidas por pulsos de luz RL y por RL continuo, respectivamente, se encuentran ausentes en mutantes *phyA* pero son normales en plantas mutantes *phyB*. Inversamente, la respuesta de baja fluencia (LFR) inducida por pulsos de luz roja se encuentra ausente en mutantes *phyB* pero es fuerte en las mutantes *phyA* (**Figura 1.7**). La LFR se expresa como la diferencia entre las respuestas a pulsos de R menos los pulsos RL y el HIR como la diferencia entre las respuestas a RL continuo menos pulsos de RL.

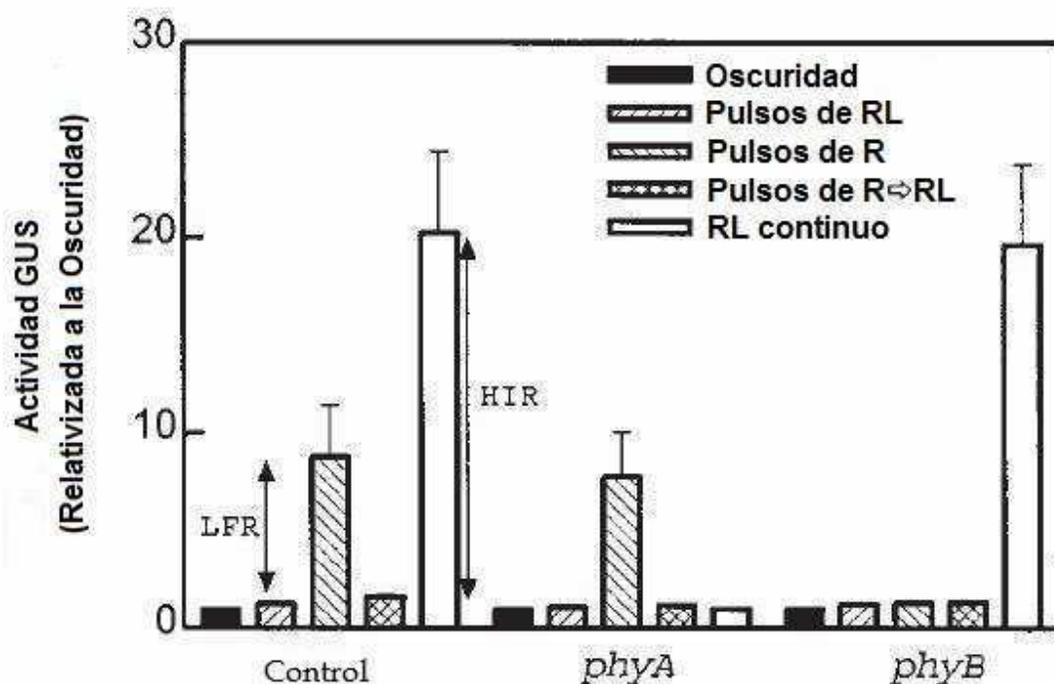


Figura 1.7: Expresión del Promotor *Lhcb1*2* Bajo los Modos de Acción del Fitocromo

Medida de la actividad GUS de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que presentan el fragmento de -752 a +67 del promotor de tabaco *Lhcb1*2* fusionado al gen reportero *gusA* y que fueron expuestas a pulsos de RL, pulsos de R, pulsos de R seguido inmediatamente de RL, RL continuo, o que permanecieron en oscuridad. Fueron inducidas plántulas normales (control) y mutantes *phyA-211* y *phyB-9*. Los datos son los promedios \pm SE de cuatro o cinco repeticiones. Las flechas indican la magnitud de las respuestas LFR y HIR.

Adaptado de Cerdán PD, Staneloni RJ, Ortega J, Bunge MM, **Rodríguez Batiller María José**, Sánchez R and Casal JJ; 2000.

Sin embargo, esta evidencia no es concluyente respecto al punto de convergencia de la señalización de *phyA* y *phyB* en el promotor *Lhcb1*2*. No obstante, resulta evidente que el *phyA* inicia una cascada de señalización independiente de la cadena de transducción iniciada por *phyB* para la LFR, pero se desconoce si las respuestas VLFR y HIR del *phyA* comparten la misma cascada de señalización o si la misma diverge en alguna etapa de la misma.

OBJETIVOS

El objetivo principal es evaluar si existen vías de señalización específicas para las HIR comparadas con las VLFR de phyA

Objetivos específicos:

El primer objetivo específico fue planteado *a priori*, mientras que los dos restantes fueron planteados durante el desarrollo de la tesis, cada uno de ellos como pasos considerados lógicos luego del alcanzar el objetivo previo.

- ❖ Establecer si en el promotor *Lhcb1*2* existen secuencias específicas para HIR: estudiar comparativamente las VLFR, LFR y HIR en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, que expresan diferentes deleciones y sustituciones del promotor del gen *Lhcb1*2* de tabaco fusionadas al gen de la β -glucuronidasa.
- ❖ Identificar factores de transcripción que interactúen con secuencias del promotor *Lhcb1*2* específicas para HIR: realizar un “screening” mediante la técnica de simple híbrido en levaduras para identificar los factores de transcripción buscados.
- ❖ Establecer si el factor de transcripción que interactúa con secuencias del promotor del gen *Lhcb1*2* requeridas para HIR es necesario para HIR: estudiar VLFR, LFR y HIR en mutantes de *Arabidopsis thaliana* de dicho factor de transcripción.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

CONSTRUCCIONES GENÓMICAS

PLÁSMIDOS UTILIZADOS

Las construcciones correspondientes tanto a las deleciones como a las sustituciones del promotor del gen *Lhcb1**2, primero fueron armadas en un plásmido de alto número de copias (pUC19) para luego ser subclonadas en el plásmido de bajo número de copias (pBI101.2) usado para la transformación de las plantas vía *Agrobacterium tumefaciens* (ver más adelante).

pUC19

El plásmido pUC19 (Genbank Accession #109137) presenta las siguientes características (**Figura 2.1**):

- plásmido de 2686 bp
- de alto número de copia
- confiere resistencia a ampicilina
- con origen de replicación Col E1
- contiene un sitio de de clonado múltiple

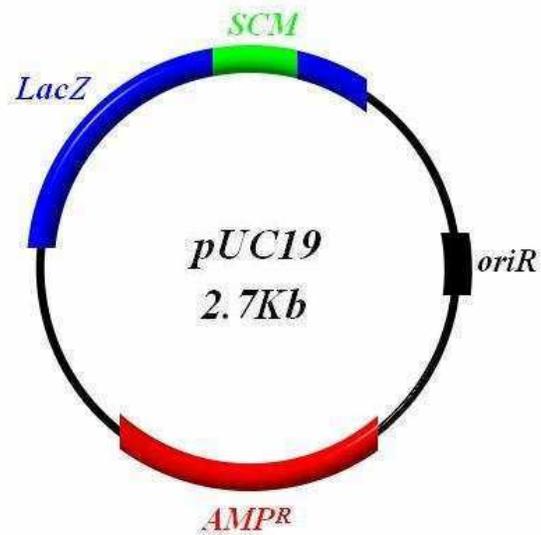


Figura 2.1: Esquema del plásmido pUC19

La franja azul corresponde al gen de *LacZ*, la verde marca el Sitio de Clonado Molecular (SCM), y la roja al gen de resistencia a Ampicilina usado para la selección tanto en *E.coli*. El bloque negro simboliza el origen de replicación (*oriR*)

pBI101.2

El plásmido pBI101.2 (Genbank Accession #U12668) presenta las siguientes características (**Figura 2.2**):

- plásmido de 13,9 kb
- de bajo número de copias
- confiere resistencia a kanamicina
- replica en *Escherichia coli* y en *Agrobacterium tumefaciens*
- es utilizado para la transformación de plantas vía *Agrobacterium*.

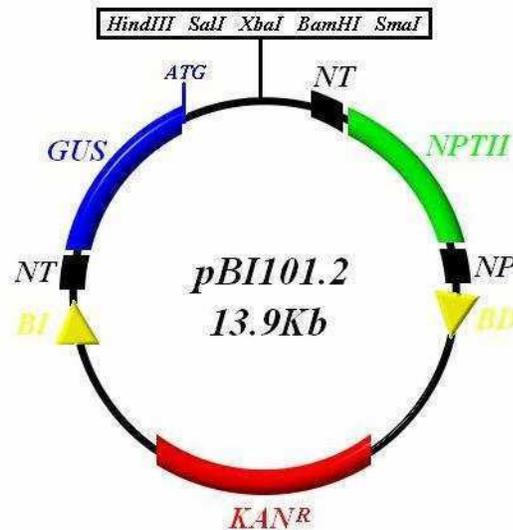


Figura 2.2: Esquema del plásmido pBI101.2

La flechas amarillas simbolizan los bordes derecho e izquierdo, respectivamente. La franja azul corresponde al gen de la β -glucuronidasa (*gusA*), la verde al gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) que le confiere a la planta la resistencia a kanamicina, y la roja al gen de resistencia a kanamicina usado para la selección tanto en *E. coli* como en *A. tumefaciens*. Los bloques negros representan el promotor de la nopalina sintetasa (NP) y sus respectivos terminadores (NT).

PREPARACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

Los plásmidos fueron purificados a partir de cultivos de *Escherichia coli* HB101, según se describió previamente (Sambrook *et al.*, 1989). En todas las preparaciones, las células fueron cultivadas en medio LB a 37 °C toda una noche, con agitación permanente y en presencia de los antibióticos correspondientes: 250 μ g/ml de ampicilina para el pUC19 y sus derivados y 50 μ g/ml de kanamicina para el pBI101.2 y sus derivados.

Maxi-preparaciones

Se utilizaron las maxi-preparaciones para purificar los plásmidos de bajo número de copia, partiendo de 100 ml de cultivo. El protocolo que se siguió fue el siguiente (todos los volúmenes están expresados por cada 50 ml de cultivo):

- Centrifugar el cultivo a 5000 rpm por 5 min a 4 °C. Eliminar el sobrenadante. Resuspender el “pellet” en 2 ml de Solución I e incubar 5 min a temperatura ambiente.

Solución I: 50 mM de Tris-HCl pH 8 y 20 mM de Na₂EDTA.

- Agregar 4 ml de Solución II, mezclar por inversión e incubar 10 min a temperatura ambiente.

Solución II: 0,2 N de NaOH y 0,2 N de SDS 1% (lisis alcalina).

- Agregar 3 ml de Solución III, mezclar por inversión y e incubar 15 min en hielo.

Solución III: 3 M de 7,4 M de Acetato de Amonio.

- Centrifugar los tubos a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. Rescatar el sobrenadante en tubos nuevos. Agregar 10 µl de RNAsa (10 mg/ml) e incubar 20 min a temperatura ambiente.

- Centrifugar a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. Rescatar el sobrenadante en tubos nuevos. Agregar 5 ml de Isopropanol, mezclar por inversión e incubar 20 min a temperatura ambiente.

- Centrifugar a 12000 rpm por 20 min. Descartar el sobrenadante. Secar el precipitado al vacío y resuspenderlo en 50 ml de TE.

TE: 10 mM de Tris-HCl pH 8 y 2 mM de Na₂EDTA pH 8.

Minipreparaciones

Se utilizaron las minipreparaciones para purificar los plásmidos de alto número de copia, partiendo de 5 ml de cultivo. Se siguió el protocolo descrito anteriormente pero variando el volumen de las soluciones:

- 200 µl de Solución I
- 400 µl de Solución II
- 300 µl de Solución III
- 1 µl de RNAsa
- 500 µl de Isopropanol
- 20 µl de TE

CONSTRUCCIONES UTILIZADAS

Las construcciones utilizadas que contienen los fragmentos con las distintas deleciones y sustituciones del promotor *Lhcb1*2*, se amplificaron mediante técnica de PCR y se fusionaron al extremo 5' del gen reportero *gusA* contenido en el plásmido pBI 101.2. Las fusiones en dicho plásmido son, en sentido estricto, traduccionales debido a que conservan el ATG (sitio de iniciación de la traducción) del gen *Lhcb1*2*.

Deleciones del Promotor *Lhcb1*2*

Las deleciones del promotor *Lhcb1*2* de -453 pb (pares de bases), -176 pb y -134 pb (**Figura 2.3**), fueron realizadas por Pablo Cerdán durante su Tesis de Doctorado en el laboratorio (Cerdán *et al*, 2000); la deleción de -152 pb fue realizada como parte de esta tesis. En ambos casos, se utilizó un juego de “primers”: uno que

hibridiza en distintas posiciones del promotor del gen *Lhcb1*2* (-453 pb, -176 pb, -152 pb, y -134 pb) y otro externo que hibridiza sobre el plásmido.

Para cada una de las deleciones, se utilizaron distintos “primers” flanqueantes por el extremo 5’ junto el mismo primer flanqueante por el extremo 3’:

- Primers Gus 5 (ubicado río abajo del sitio de restricción para Bam HI)

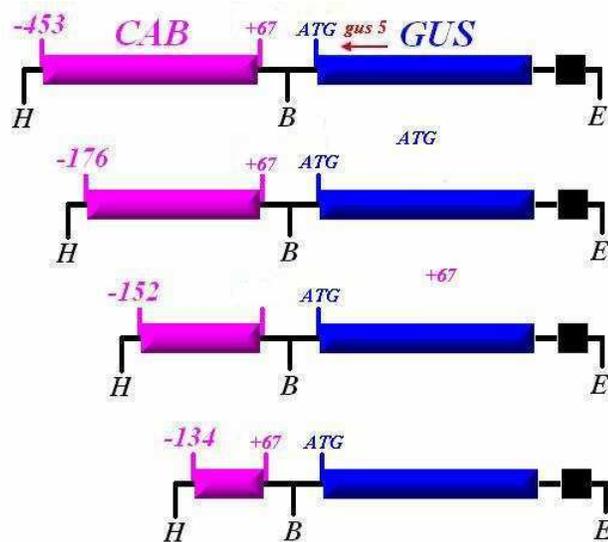


Figura 2.3: Deleciones del Promotor *Lhcb1*2*

Los rectángulos rosados representan los distintos promotores del gen *Lhcb1*2*, mientras que los azules simbolizan el gen *gusA*. Los promotores truncados fueron clonados dentro de los sitios de corte de las enzimas Hind III (H) y Bam HI (B). Las distintas construcciones *Lhcb1*2::GUS* obtenidas están subclonadas dentro de los sitios de corte de las enzimas Hind III (H) y EcoR V (E) en el plásmido pBI101.2 usado para la transformación de plantas vía *Agrobacterium tumefaciens*. La flecha roja indica el primer flanqueante común a todas las deleciones.

Sustituciones en el Promotor de 152 pb

Las sustituciones sobre el promotor de 152 pb se obtuvieron con un solo juego de primers: uno interno, que hibridiza sobre el promotor del gen *Lhcb1*2* y que contiene las secuencias blanco ya sustituidas, y otro externo, que hibridiza sobre el plásmido (**Figura 2.4**).

Para las distintas sustituciones en el promotor de 152 pb, se utilizaron distintos “primers” flanqueantes por el extremo 5’, junto el mismo primer flanqueante por el extremo 3’:

- Primer Gus 5 (ubicado río abajo del sitio de restricción para Bam HI)

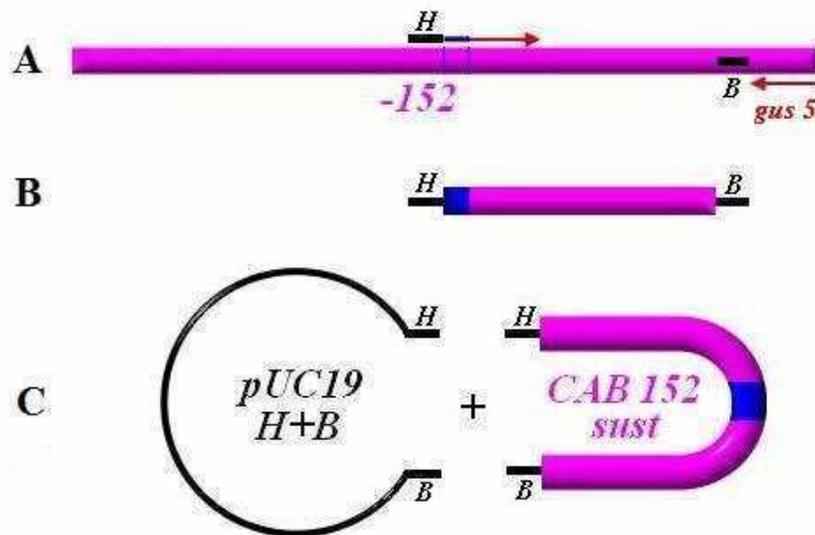


Figura 2.4: Sustituciones en el Promotor de 453 pb

- A) El “primer” H contiene el sitio de restricción para la enzima Hind III en su extremo 5’, seguido por el motivo “CCCC” que va a sustituir las bases que quieren ser modificadas en el promotor del gen *Lhcb1*2*. Se efectuó una PCR por cada sustitución.
- B) El producto obtenido fue cortado con las enzimas HindIII y BamHI.
- C) Luego de aislar y extraer los productos por gel de agarosa, los mismos fueron ligados al plásmido pUC 19, el cual estaba previamente con las enzimas que se encuentran en los extremos de los fragmentos.

Sustituciones en el Promotor *Lhcb1*2* de 453 pb

Las sustituciones dentro del promotor *Lhcb1*2* de 453 pb (**Figura 2.5**) se realizaron con dos juegos de "primers": dos externos, que hibridizan con secuencias del plásmido, y dos internos, que son específicos para cada sustitución y que contienen en su extremo 5' las secuencias blanco sustituidas con un sitio de restricción. El posterior ligado de ambas construcciones permite la reconstrucción del fragmento.

El hecho de usar secuencias de corte para enzimas de restricción con el fin de mutagenizar el promotor simplificó la búsqueda de los clones, ya que los mismos podían ser cortados con la enzima en cuestión antes de ser secuenciados. Se usaron enzimas que reconocieran secuencias de 6 pb y que además dichas secuencias de reconocimiento fueran bien distintas a la secuencia original del promotor del gen *Lhcb1*2*.

Para las distintas sustituciones en el promotor de 453 pb, se utilizaron los mismos "primers" flanqueantes:

- Primer 1233 (ubicado río arriba del sitio de restricción para Hind III)
- Primer Gus 5 (ubicado río abajo del sitio de restricción para Bam HI)

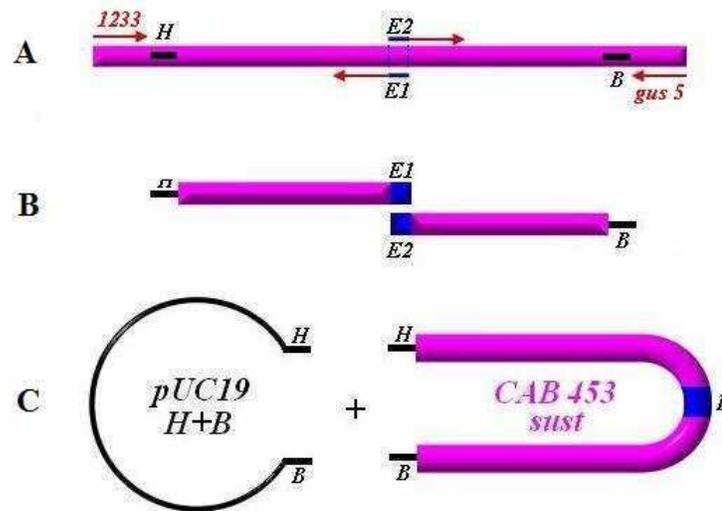


Figura 2.5: Sustituciones en el Promotor de 453 pb

- A) Los “primers” E1 y E2 comparten la secuencia del sitio de restricción en sus extremos 5’ y se posicionan en el lugar donde se modificarán las bases del promotor del gen *Lhcb1*2*. Los “primers” flanqueantes, indicados con una flecha roja, se sitúan por fuera de los sitios de restricción de las enzimas Hind III y Bam HI (H y B), que fueron utilizadas para el subclonado. Se efectuaron dos PCRs por separado usando en cada una de las reacciones un “primer” flanqueante y el correspondiente central que fuera en sentido contrario.
- B) Se obtuvieron dos productos de PCR que fueron cortados con las enzimas HindIII - E1 y BamHI - E2, respectivamente.
- C) Luego de aislar y extraer los productos por gel de agarosa, los mismos fueron ligados al plásmido pUC 19, el cual estaba previamente cortado con las enzimas que se encuentran en los extremos de los fragmentos.

OBTENCIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

Obtención y Comprobación de los Fragmentos

Tanto la obtención de los fragmentos como la comprobación de los mismos se realizaron mediante técnica de PCR. Para la obtención de los fragmentos se utilizaron los “primers” correspondientes para cada construcción y para la comprobación de los mismos se utilizaron los “primers” flanqueantes (1233 y GUS5). Aquellos clones que

resultaron positivos en el análisis por PCR, se utilizaron para preparar ADN plasmídico y para secuenciar; para la secuenciación se utilizaron cualquiera de los dos “primers” flanqueantes (1233 o GUS5).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

“Buffer” de PCR: 20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl

2 mM de $MgCl_2$

200 μ M de cada dNTP

25 pmoles de cada “primer”

1 μ l de plásmido (de una dilución 1/20 de una minipreparación)

2,5 unidades de Taq Polimerasa

Volumen final: 25 μ l

La mezcla de reacción se calentó a 94 °C por 4 min y se sometió a 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C y 30 seg a 72 °C.

Purificación y Ligado de los Fragmentos

Los fragmentos obtenidos en la reacción de PCR fueron purificados con una mezcla de Fenol/Cloroformo para luego ser cortados por las enzimas de restricción correspondientes (generalmente se dejaban incubando toda una noche). Los fragmentos ya cortados fueron corridos en un gel de agarosa al 2 % y fueron extraídas las bandas que contenían a los mismos.

La purificación de los fragmentos a partir de la agarosa se realizó de la siguiente manera:

- Una vez cortadas las bandas de DNA del gel de agarosa, las mismas se pesan y de esta forma se calcula el volumen.
- Se agregan 4,5 volúmenes de NaI 3 M y se incuba a 55 °C hasta disolver completamente la agarosa (unos 10 min).
- Se deja enfriar a temperatura ambiente y se agregan 7 µl de una suspensión de sílica. Se deja 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifuga 5 segundos a máxima velocidad y se descarta el sobrenadante.
- Se lava el precipitado 3 veces con 400 µl de solución de lavado. Después de cada lavado se centrifuga por 5 segundos a máxima velocidad.
Solución de Lavado: 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 50 % de Etanol, 10 mM de TrisCl pH 7.5.
- Se resuspende el precipitado en 10 µl de agua estéril e incubar a 55 °C por 3-5 min.
- Se centrifuga 5 segundos a máxima velocidad y salvar el sobrenadante

Finalmente los fragmentos cortados se ligan a los plásmidos previamente cortados mediante con la enzima T4 DNA Ligasa y su correspondiente “buffer”.

INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS EN BACTERIAS

***Escherichia coli* HB 101**

La introducción del plásmido pUC19 con las diferentes construcciones de interés en la cepa de *Escherichia coli* HB 101 se realizó mediante “shock” térmico, para lo cual se prepararon células de *E. coli* competentes para dicho fin. La selección se realizó mediante la resistencia a ampicilina (marcador del plásmido) en 150 mg/L de Ampicilina.

***Agrobacterium tumefaciens* GV 3101**

La introducción del plásmido pBI101.2 con las diferentes construcciones de interés en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 se realizó mediante electroporación. Se prepararon células de *Agrobacterium* competentes para electroporación y se procedió según está previamente descrito (Hooykaas and Shilperoort, 1992). La selección se realizó mediante la resistencia a kanamicina (marcador del plásmido) y a gentamicina y rifampicina (marcadores específicos de la cepa GV 3101)

- Kanamicina: 50 mg/L
- Gentamicina: 25 mg/L
- Rifampicina: 100 mg/L

TRANSFORMACIÓN VÍA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Agrobacterium tumefaciens es una especie bacteriana patógena de plantas con amplio rango de huésped, principalmente gimnospermas y dicotiledóneas. El síntoma característico es un callo producido a causa del crecimiento descontrolado de las células de la planta en el lugar mismo de la infección. Las cepas capaces de infectar a las plantas llevan un plásmido de unas 250 kb llamado plásmido Ti (“Tumor induction”). Dicho plásmido contiene una región conocida como “T-ADN”, la cual es transferida a la planta durante la infección. El crecimiento anormal de células se debe a que el T-ADN contiene genes que son capaces de expresarse en plantas y que codifican para las enzimas del metabolismo hormonal.

El T-ADN se encuentra flanqueado por dos bordes repetidos e imperfectos, de unas 25 bp, conocidos como borde derecho y borde izquierdo. Dichos bordes son los únicos elementos en *cis* necesarios para la transferencia (Tinland, 1996). Sin embargo, la transferencia del T-ADN requiere de la acción en *trans* de los genes *Vir* (“Virulencia”), los cuales se codifican fuera del T-ADN pero dentro del plásmido Ti. Los genes *Vir* son necesarios para que se produzca el proceso de infección y para que el T-ADN sea transportado desde la bacteria hacia el núcleo de la célula vegetal.

Las proteínas encargadas de escindir una de las cadenas del T-DNA del plásmido Ti son las proteínas VirD1 y VirD2 (Tinland, 1996). La proteína VirD2 permanece unida covalentemente al extremo 5’ del T-ADN simple cadena a la vez que la proteína VirE se une cooperativamente, formando así un complejo nucleoproteico que protege al ADN del ataque de las nucleasas. VirD2 es importante para que la unión del borde derecho sea perfecta, es decir, para que no se produzcan deleciones en el T-ADN. En cambio, en el borde izquierdo suelen producirse deleciones durante la transferencia del T-ADN (Tinland, 1996).

Se denomina sistema binario porque coexisten dos plásmidos en *A. tumefaciens*:

- Un plásmido Ti desarmado que no tiene el T-ADN pero que presenta la región Vir intacta
- Otro plásmido que lleva los bordes del T-ADN flanqueando los genes que se quieren introducir en la planta.

De esta forma, los productos de los genes Vir actúan en trans para que el T-ADN sea transferido a las células vegetales. Para que esto ocurra, el plásmido que lleva el T-ADN modificado debe ser capaz de replicar en *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, 1984).

PLANTAS TRANSGÉNICAS

Transformación de Plantas

Las plantas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*, ecotipo Columbia) se transformaron mediante el método de infiltración, que consiste en introducir las inflorescencias de la planta en un cultivo de *Agrobacterium* en presencia de una solución de infiltración que contiene el detergente Silwet L-77 (Bechtold *et al.*, 1993).

Las semillas cosechadas de las plantas que fueron infiltradas fueron puestas a germinar sobre un medio con kanamicina para identificar aquellas plántulas que habían incorporado la construcción (**Figura 2.6**).



Figura 2.6: Análisis de Plantas Transgénicas por Presencia de Kanamicina
La flecha roja indica la plántula resistente a kanamicina que luego fue transplantada a tierra para obtener sus semillas.

Cultivo de Plantas

Las plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas a 22-25 °C, con ciclos de 16 h de luz blanca y 8 h de oscuridad, en una mezcla 1:1:1 de turba, vermiculita y perlita, y regadas cada 7 días con solución nutritiva. Las semillas se cosecharon una vez secas en tubos Eppendorf, donde permanecieron dos semanas a temperatura ambiente para completar la postmaduración. Luego se conservaron en heladera a 4 °C.

Preparación de ADN Genómico de Plantas

Se preparó ADN de plantas de *Arabidopsis thaliana* mediante el método del CTAB (Murray and Thompson, 1980) para ser usado como templado de PCR para el posterior análisis de las plantas transgénicas. El método consiste en:

- Machacar 5 mg de tejido fresco con 100 μ l de “buffer” CTAB en tubos Kontes.
“Buffer” CTAB: 3 % de CTAB, 1,4 M de NaCl, 0,2 % de β -mercaptoetanol, 20 mM de EDTA, 100 mM de TrisCl pH 8.
- Se adicionan otros 200 μ l de “buffer” CTAB y se calienta en baño a 60 °C por 30 min.
- Se adicionan 300 μ l de Cloroformo y se mezclan las fases por inversión.
- Se centrifuga a 6000 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se transfiere la fase acuosa a un tubo nuevo.
- Se adiciona igual volumen de Isopropanol (300 μ l) y se deja precipitar el ADN por 15 min a temperatura ambiente.
- Se centrifuga a 6000 rpm por 15 min a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante.
- El precipitado se lava dos veces con Etanol al 70 % y una vez con Etanol Absoluto.
- Luego de secar el precipitado, el mismo se resuspende en 25 μ l de TE.

ANÁLISIS DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

La confirmación de que los fragmentos de promotor eran los correctos se realizó por PCR; se utilizaron los “primers” flanqueantes 1233 y GUS descritos anteriormente. Los fragmentos obtenidos en todas las líneas transgénicas utilizadas coincidieron con el tamaño esperado (**Figura 2.7**).

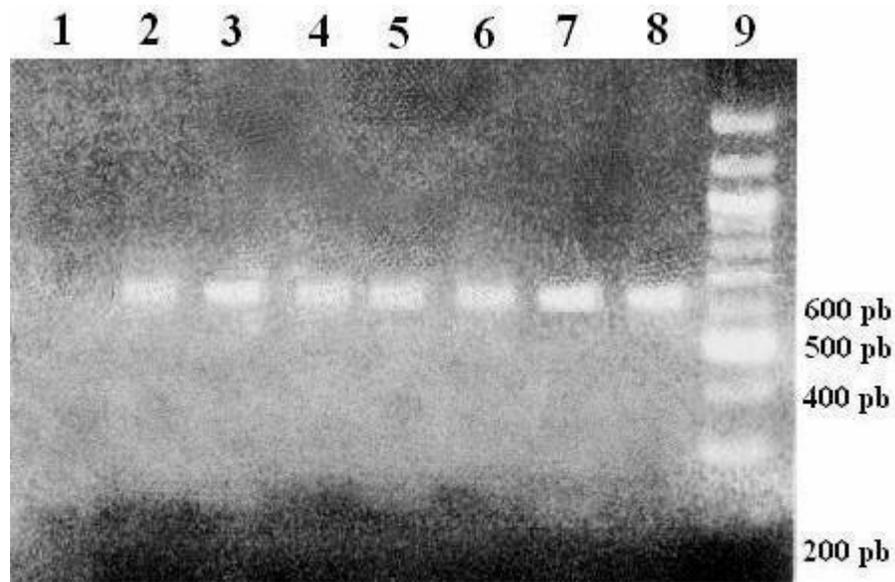


Figura 2.7: Análisis por PCR Plantas Transgénicas

Se corrieron los productos en un gel de agarosa al 2 % y luego se lo tiñó con Bromuro de Etidio. La calle 1 corresponde al control negativo, las calles 2-7 corresponden a los fragmentos amplificados con los “primers” 1233 y Gus 5 con los cuales se obtuvo el fragmento esperado de aproximadamente 600 pb, la calle 8 es el control positivo de la reacción y en la calle 9 se sembró el marcador de peso molecular (100 b Ladder de Gibco)

En el caso de las sustituciones, los productos de PCR se cortaron con las enzimas de restricción correspondientes para cada caso y los fragmentos liberados fueron del tamaño esperado (**Figura 2.8**). Finalmente se secuenciaron los productos de PCR y de este modo se confirmó que las plantas estaban transformadas con las construcciones de interés.

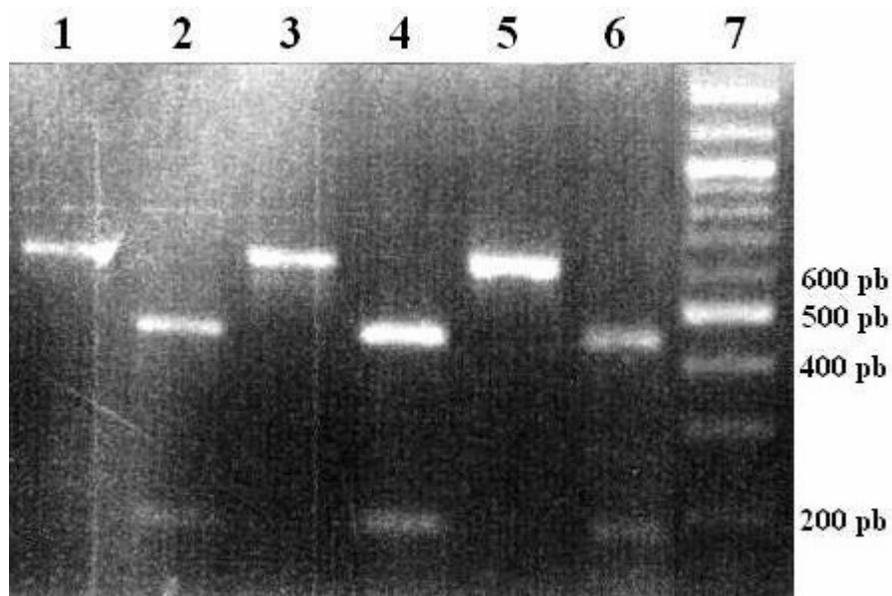


Figura 2.8: Análisis por Corte por Enzima de Restricción de Plantas Transgénicas

Se toma como ejemplo las líneas independientes de plantas de *Arabidopsis* que tiene sustituciones en el “GATA box” del promotor del gen *Lhcb1*2* (ver más adelante). Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% el cual fue teñido con Bromuro de Etidio. En las calles impares están sembrados los productos de PCR sin cortar, que en todos los casos tiene el tamaño aproximado de 600 pb, y en las pares los productos obtenidos del corte con enzimas de restricción, donde se liberan los fragmentos esperados de 400 pb y 200 pb aproximadamente. En la última calle se sembró el marcador de peso molecular (100 bp Ladder de Gibco)

El análisis del número de inserciones del transgén se realizó por genética clásica mediante la segregación 3:1 del fenotipo de resistencia a kanamicina. Para ello se sembraron cierto número de semillas obtenidas de las líneas independientes provenientes de la transformación de plantas de *Arabidopsis* vía *Agrobacterium* (F1) en un medio con kanamicina y se observó la segregación. Las líneas transgénicas utilizadas fueron las que estrictamente presentaron una segregación 3:1 (**Figura 2.9**). El mismo análisis se realizó para el gen reportero de la β -glucuronidasa mediante una reacción histoquímica para el mismo (Jefferson *et al*, 1987).

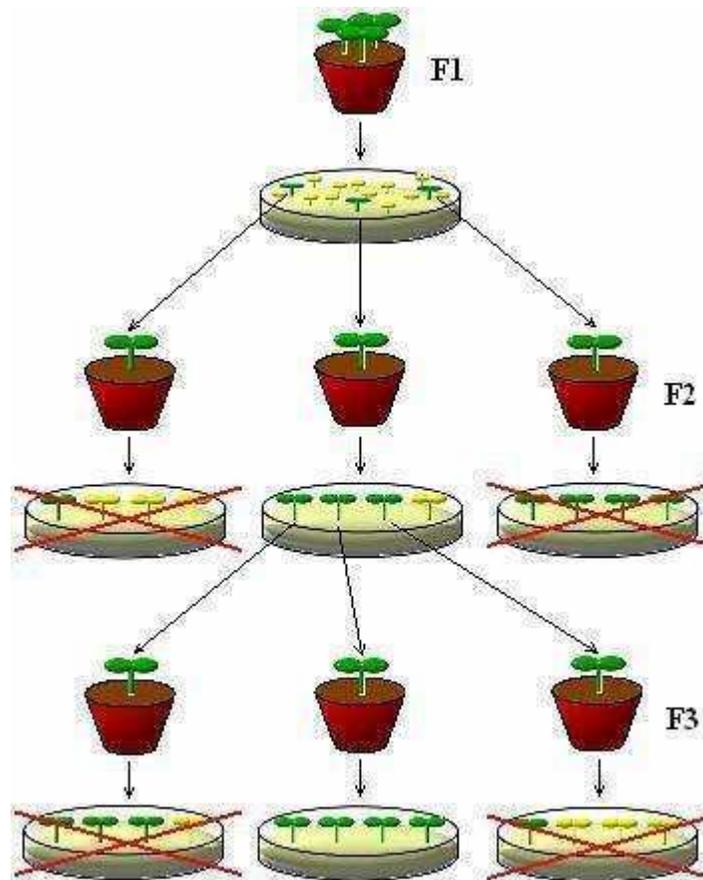


Figura 2.9: Esquema del Análisis de la Segregación de Plantas Transgénicas

F1: Alrededor de 1000 semillas obtenidas de la transformación vía *Agrobacterium* fueron sembradas en medio con el correspondiente marcador de selección (kanamicina), de las cuales aproximadamente 3 % fueron resistentes.

F2: 32 semillas provenientes de cada línea independiente obtenida fueron sembradas nuevamente en medio con kanamicina y se observó su patrón de segregación: se seleccionaron solamente aquellas que presentaban estrictamente una segregación 3:1. De este modo, se aseguró tener una sola inserción del transgén.

F3: Aproximadamente 10 plántulas resistentes por cada línea independiente que pertenecían a los grupos que presentaba la segregación 3:1, fueron transplantadas y sus semillas fueron colectadas. Se sembraron nuevamente 32 semillas en un medio con kanamicina y se observó su segregación: se seleccionaron aquellas que precisamente no presentaban ningún tipo de segregación. De este modo se aseguró tener la planta homocigota para el transgén.

EXPERIMENTOS FISIOLÓGICOS

Condiciones de los Experimentos Fisiológicos

Para las mediciones de GUS, las plantas de *Arabidopsis thaliana*, se sembraron de 50 a 100 semillas en cajas de plástico con un soporte de agar al 0.8%, como se describió previamente. Las semillas fueron incubadas a 4 °C en oscuridad por tres días, inducidas a germinar con 30 min de luz R e incubadas en oscuridad a 22 °C por 48 horas, donde comenzaron los tratamientos por 24 horas. Finalmente, las plántulas fueron cosechadas al tercer día de la germinación.

Para los experimentos de longitud de hipocotilo, se sembraron 15 semillas de cada mutante junto con el genotipo salvaje en cajas transparentes de plástico con un soporte de agar al 0.8 %. Las semillas fueron inducidas a germinar con 30 min de luz R e incubadas en oscuridad a 22 °C por 24 horas. Luego, durante 3 días seguidos las cajas se expusieron a los distintos tratamientos lumínicos o fueron mantenidas en oscuridad como control. El largo del hipocotilo se midió con regla con una precisión de 0,5 mm y se promediaron los valores de las 10 plántulas más altas.

Para los experimentos en que se estudió la morfología de la roseta, plántulas de 7 días de edad crecidas en placas de Petri con un soporte de agar al 0.8 %, fueron transplantadas en potes de plástico con mezcla. Se las cultivó 22-25 °C con ciclos de 16 h de luz blanca y 8 h de oscuridad hasta que alcanzaron los 28 días de edad, momento en el cual se midió el diámetro de la roseta con regla.

Fuentes de luz

Las fuentes de luz utilizadas en la mayor parte de los experimentos fueron las siguientes (en casos especiales, se detalla oportunamente):

- Fuente de luz RL: $P_{fr}/P = 10 \%$, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; lámparas incandescentes de 150 W en combinación con un filtro de agua de 8 cm, dos acetatos rojos y seis filtros de acrílico azules (“La Casa del Acetato”; Paolini 2031, Buenos Aires, Argentina) (Casal, 1995).
- Fuente de luz R: $P_{fr}/P = 87 \%$, $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, máxima emisión a 662 nm; tubos fluorescentes rojos de 40W (Phillips 40/15) (Casal *et al*, 1991).

Los espectros de emisión y los cálculos de P_{fr}/P fueron publicados anteriormente (Casal *et al*, 1991; Casal, 1995).

Se utilizaron pulsos horarios de 3 min de RL para inducir VLFR en comparación con los controles de oscuridad, pulsos horarios de 3 min de R para inducir LFR en comparación con los pulsos horarios de RL, y RL continuo para generar HIR en comparación con los pulsos de RL.

Medición de β -glucuronidasa

Las plantas de *Arabidopsis thaliana*, una vez cosechadas fueron homogeneizadas en tubos Kontes (uno por cada caja) con 50 μ l de “buffer” de extracción en frío (50 mM de “buffer” fosfato pH7, 10 mM de Na₂EDTA, 10mM de β -mercaptoetanol, 0,1 % de Sarcosyl y 0,1 % de Tritón). Los extractos fueron centrifugados a 4 °C a máxima velocidad por 10 min y los sobrenadantes guardados en tubos nuevos a -70 °C hasta su empleo (usualmente menos de una semana).

- La actividad β -glucuronidasa se midió según lo descrito por Jefferson (Jefferson *et al*, 1987), con 4- methylumbelliferone (MU) como sustrato y utilizando 5 μ l de extracto.
- La concentración de proteínas fue medida utilizando el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951), modificado para microplaca y utilizando de 3 μ l de extracto.

SIMPLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

En el “screening” mediante la técnica del simple híbrido en levaduras, bibliotecas de ADNc son analizadas usando genes reporteros específicos de levaduras. La detección de la interacción entre un factor de transcripción y la secuencia “bait” se produce por el crecimiento positivo debido a la activación del marcador de selección HIS3 (Sambrook *et al.* 1989) (**Figura 2.10**).

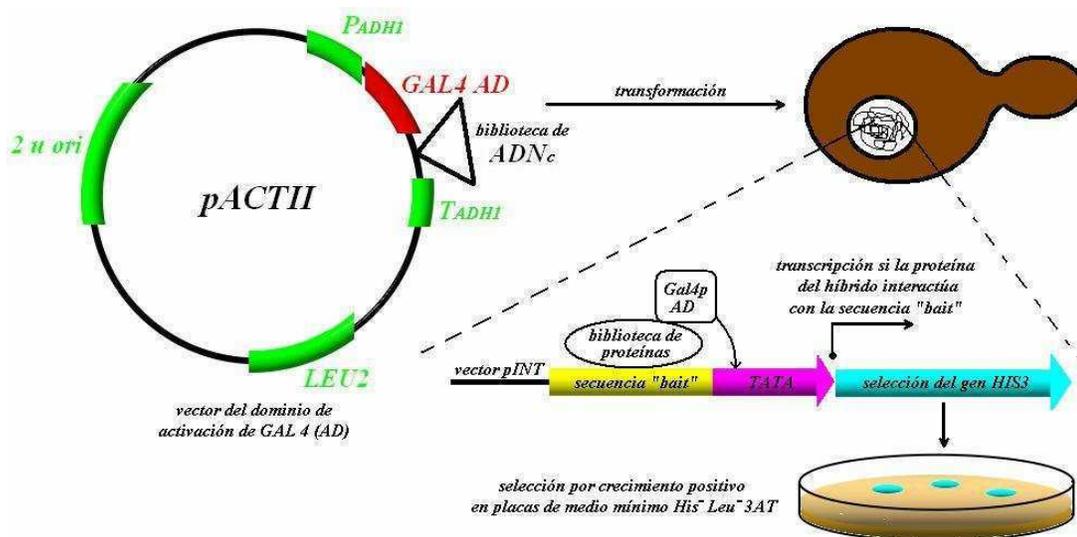
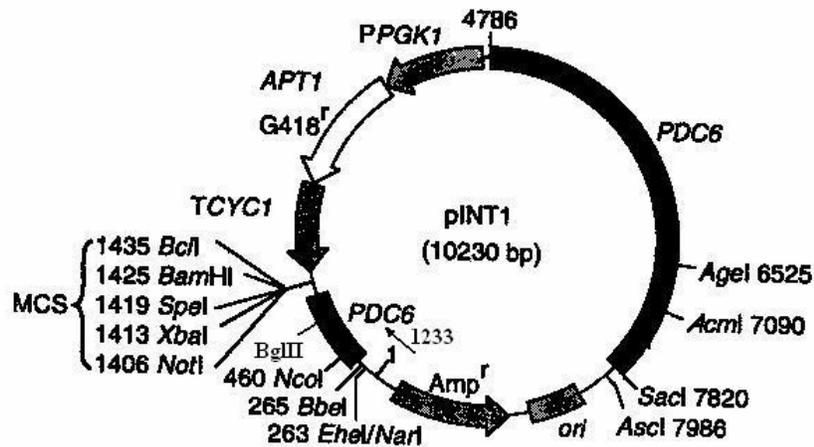


Figura 2.10: Descripción Esquemática del Método de Simple Híbrido en Levaduras para la Identificación de Factores de Transcripción u Otras Proteínas de Unión a ADN

Se necesita una biblioteca de expresión de ADN dentro de un vector “shuttle” de expresión tanto en *E. coli* como en levaduras. El ADNc se expresa bajo el promotor de levadura *ADH1* y está unido a la secuencia del dominio de activación (AD) del factor de transcripción *Gal4p*. Con una biblioteca de ADNc unidireccional, una tercera parte de los clones producen fusiones en marco con la secuencia de código del AD (proteínas híbridas). La detección de la interacción se da vía la activación del marcador del crecimiento *HIS3*. El reconocimiento y la unión de un factor de transcripción de la secuencia “bait” clonada río arriba del gen *HIS3*, resultará en la expresión de *HIS3*. Esto se complementa con la mutación cromosomal *his3*, de modo tal de permitir la formación de colonias en un medio deficiente de histidina. El marcador *LEU2* en el vector de la biblioteca de ADN complementa para una mutación cromosómica en el gen *leu2*.

El reportero de levaduras se construye usando un sistema de vectores de dos componentes: pHIS3/pINT. La secuencia “bait” es clonada río arriba del gen reportero HIS3 en el vector pHIS3 y los “cassettes” que contienen el reportero HIS3 con la secuencia “bait” son transferidos al vector de integración pINT (Sambrook *et al.* 1989) (**Figura 2.11**).



Clonado del Gen Reportero HIS3 en el SCM del Plásmido pINT

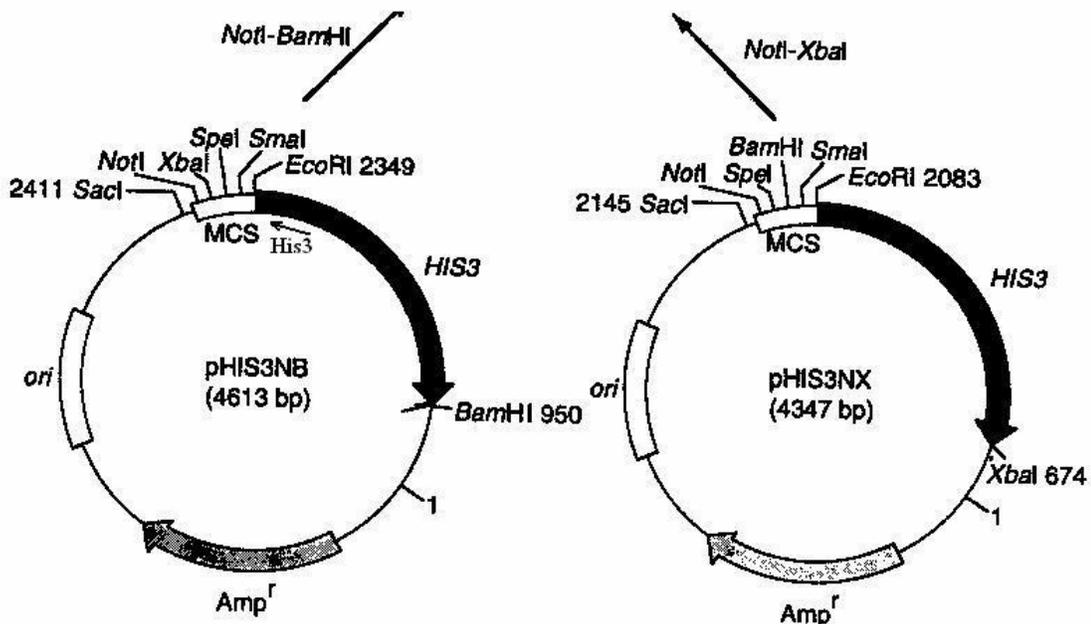


Figura 2.11: Sistema del Vector de Dos Componentes pHIS3/pINT1 para la Construcción del reportero de levadura para el Procedimiento de Simple Híbrido.

Los plásmidos pHIS3NB y pHIS3NX del reportero HIS3 se basan en el plásmido SK II Bluescript (Stratagene). El gen HIS3 es precedido por su propio promotor mínimo y un sitio de clonado múltiple con varios sitios únicos para la inserción de la secuencia “bait”. Los insertos se secuencian usando el “primer” reversa del M13 (1233). El plásmido pINT1 se basa en el plásmido pUC29 y contiene las secuencias necesarias para la integración en levaduras en el locus PDC6 mediante un doble entrecruzamiento. La selección para la integración se da mediante el marcador de selección dominante APT1 que confiere resistencia al antibiótico G418 (también llamado gentamicina G418 o geneticina) o a ampicilina en *E. coli*. El gen APT1 es controlado por el promotor de levadura PGK1 y el terminador CYC1. APT1 deriva del transposon bacteriano Tn *gO3* y codifica para una aminoglicósido-fosfotransferasa (Hadfield y col, 1990). Varios sitios de restricción únicos están presentes río abajo del “cassette” de expresión APT1, que se pueden utilizar para el clonado unidireccional de una construcción “bait”-HIS3 que derive de pHIS3NB o de pHIS3NX. Para la integración de pINT1 en el locus PDC6, se aisló un fragmento que carece de secuencias del pUC29 con las enzimas de restricción con NcoI (alternativamente BbeI, EbeI o NarI) y SacI (alternativamente AseI, XcmI, o AgeI).

Debido a que algunas secuencias confieren cierta transactivación al gen HIS3, que es suficiente como para hacer crecer a las levaduras en un medio sin histidina, se le agrega al medio un inhibidor para minimizar el crecimiento inespecífico. Como inhibidor se usa el 3-amino-1,2,4-triazol o 3-AT, que es un inhibidor competitivo de la enzima His3p de la biosíntesis de histidina. La concentración ideal de 3-AT se estableció realizando una curva de crecimiento, transformando las levaduras que tienen integradas las secuencias “bait” con el vector pACTII vacío y haciéndolas crecer en medio mínimo Leu⁻ (auxotrofia del vector pACTII donde está clonada la biblioteca) y His⁻ (auxotrofia del vector de integración pINT) con distintas concentraciones de 3-AT (1mM, 2mM, 5mM, 10mM). La menor concentración de 3-AT donde ya no se observaba crecimiento inespecífico fue de 2mM (Sambrook *et al.* 1989).

"PRIMERS"

1233: 5'- AGCGGATAACAATTTACACACAGGA -3'

GUS 5: 5'- CACGGGTTGGGGTTTCTAC -3'

ATCT-mut: 5'- CGCTCTAGATTGATGGATTACAAAG -3'

5'- GGCTCTAGAAAGATTTTTACTACTG -3'

GATA 1-mut: 5'- CCGGGTACCTTACAAAGTGCCATG -3'

5'- GCCGGTACCAATTTTCCAAG -3'

GATA 2-mut: 5'- CGGGGTACCAGTGCCATGTCAAC -3'

5'- GCCGGTACCTCCATCAATTTTC -3'

-152: 5'- CCGAAGCTTGGAAAATTGATGGA -3'

-145: 5'- CCGAAGCTTCCCCAATTGATGGA -3'

-143: 5'- CCGAAGCTTGGCCCCTTGATGGA -3'

-139: 5'- CCGAAGCTTGGAAAACCCCTGGATTAC -3'

-135: 5'- CCGAAGCTTGGAAAATTGACCCCTTACAAAG -3'

-131: 5'- CCGAAGCTTGGAAAATTGATGGACCCCAAAGTGC -3'

-127: 5'- CCGAAGCTTGGAAAATTGATGGATTACCCCTGCCATGT -3'

-123: 5'- CCGAAGCTTGGAAAATTGATGGATTACAAAGCCCATGTCA -3'

-143: 5'- TCTTTCTAGATTGATGGATTACAA -3'

-139: 5'- TCTTGGAAGGTACCTGGATTACAA -3'

-135: 5'- TCTTGGA AAAATTGGTACCTTACAA -3'

-129: 5'- TCTTGGA AAAATTGATGGAGGTACC -3'

-123: 5'- CCGTCTAGAATGTCAACAAGA ACT -3'

5'- CCGTCTAGATTGTAATCCATCAAT -3'

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA HIR

Promotor *Lhcb1*2* de *Nicotiana plumbaginifolia*

La región intergénica del gen *Lhcb1*2* de *Nicotiana plumbaginifolia* usado en este trabajo tiene aproximadamente 1700 pb (1,7 Kb). Este promotor fue elegido para aprovechar la información obtenida previamente por el grupo de trabajo (Cerdán *et al*, 2000). En la **Figura 3.2**, se muestra la secuencia de un fragmento de aproximadamente 453 pb del promotor *Lhcb1*2* donde se marcan los sitios de relevancia. La región 5' no codificante del gen *Lhcb1*2* contiene secuencias comunes a los promotores eucarióticos como son los “CAAT y TATA boxes” (Wang *et al*, 1997). Entre estos dos elementos hay tres “GATA boxes” en tándem, secuencias que se encuentran altamente conservadas entre los genes *Lhcb* de diversas especies (Anderson *et al*, 1997).

Para estudiar cuáles secuencias son importantes en la regulación del gen *Lhcb1*2*, deleciones y sustituciones de dicha región intergénica fueron fusionados al gen reportero *gusA* de *Escherichia coli*. Las construcciones *Lhcb1*2-gusA* fueron introducidas en plantas de *Arabidopsis* vía *Agrobacterium tumefaciens* y las líneas transgénicas independientes fueron usadas en experimentos de inducción de los modos de acción del fitocromo. Las plántulas de *Arabidopsis* fueron sometidas a tratamientos de luz a 25 °C durante 24 horas. Los tratamientos que generalmente se utilizaron fueron: oscuridad como control, pulsos horarios de RL (3 min a 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), RL continuo (100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$), y pulsos horarios de R (3 min a 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$).

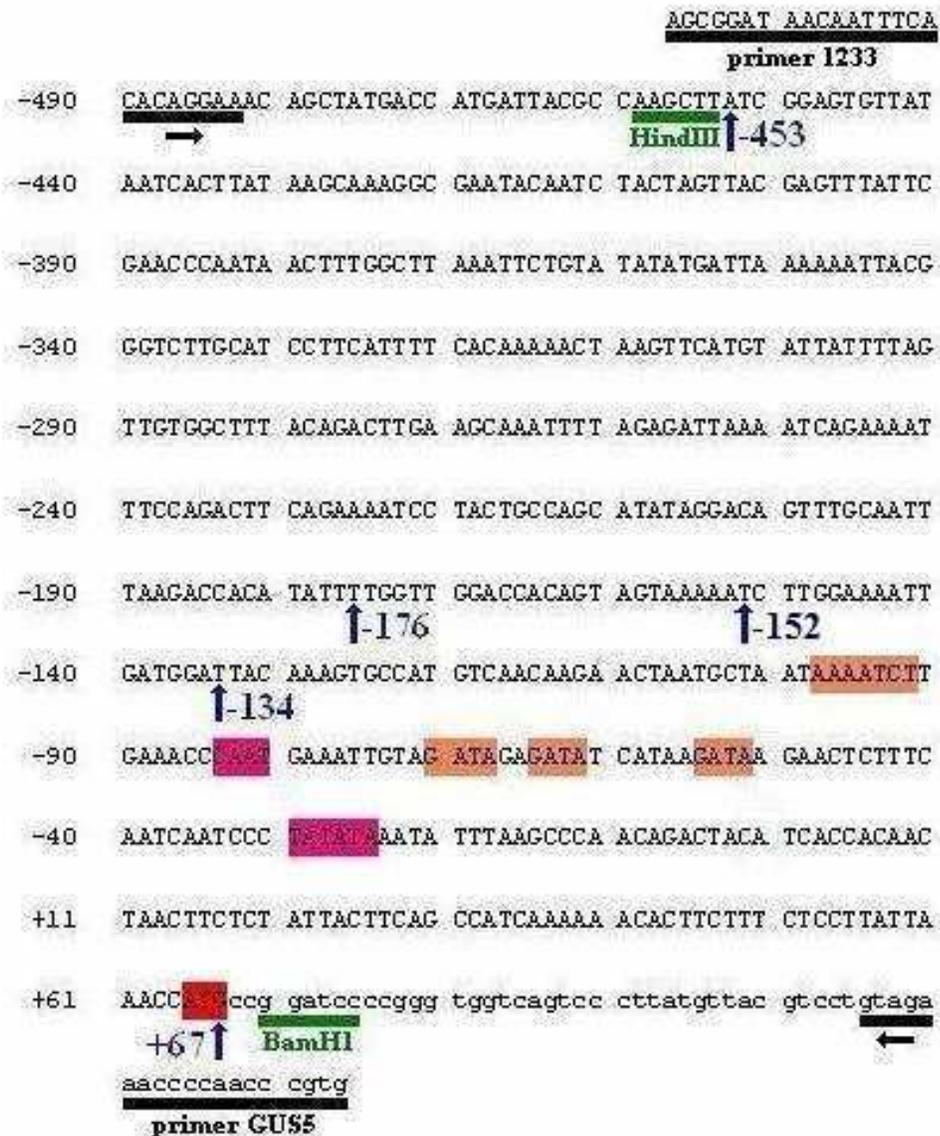


Figura 3.2: Fusión del Promotor *Lhcb 1*2* de *Nicotiana plumbaginifolia* con el Gen Reportero *GusA*

Se muestra un fragmento del promotor *Lhcb1*2* fusionado al gen reportero. Los sitios de inicio de la transcripción (-1) y de la traducción (ATG) se resaltan en rojo. En rosa se resaltan los “CAAT y TATA boxes” mientras que en naranja se resaltan los tres “GATA box”. Las flechas azules indican el inicio de las deleciones descritas (-453, -176, -152, -134) y la finalización de las mismas (+67). Para la amplificación y secuenciación de los distintos fragmentos se utilizaron los “primers” 1233 en el extremo 5’ (“primer” universal del M13/pUC) y Gus5 en el extremo 3’ (hibridiza con el gen GUS). Las enzimas utilizadas para el clonado de los fragmentos fueron HindIII y BamHI.

Los Motivos AAAATCT y GATA son Necesarios para los Tres Modos de Acción del Fitocromo

El promotor del tabaco *Lhcb1*2* contiene un motivo “AAAATCT” entre -98 y -92 que corresponde al sitio de unión del factor de transcripción Myb CCA1 (Wang *et al.*, 1997), que está implicado en la regulación del ritmo circadiano de expresión (Wang and Tobin, 1998). El promotor también tiene un tándem de tres “GATA box” entre -55 y -52 (GATA₁), -65 y -62 (GATA₂), y -71 y -68 (GATA₃). El factor CGF-1/GT-1 se une a los motivos “GATA” y es importante para las respuestas agudas frente a un pulso de R reguladas por phyA y phyB (Anderson *et al.*, 1997).

Para tener una primera aproximación acerca de cuáles son las secuencias regulatorias necesarias para la vía de señalización de los fitocromos, se realizaron sustituciones que afectaban dichos motivos en el contexto de un fragmento de -453 a +67 del promotor *Lhcb1*2* (**Figura 3.3**). Estas construcciones fueron fusionadas al gen *gusA* y finalmente se introdujeron en plantas de Arabidopsis.

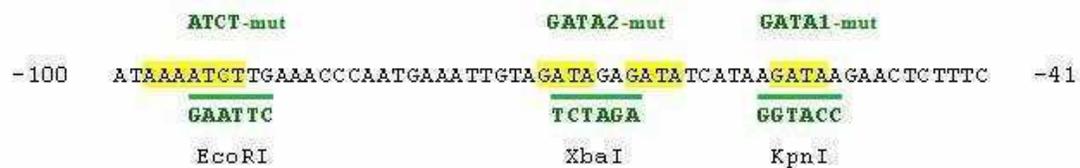


Figura 3.3: Esquema de las Sustituciones que Afectan los Motivos AAAATCT y GATAbbox

En amarillo se marcan los motivos sustituidos y en verde se señala la secuencia por la cual fueron sustituidos (se utilizaron secuencias correspondientes a cortes de enzimas de restricción que se indican en cada caso). Se realizaron sustituciones en los motivos AAAATCT (AAAATCT-M), GATA₁ (GATA₁-M), y GATA₂ y GATA₃ (GATA_{2,3}-M).

Plantas transgénicas de Arabidopsis de tres días de edad fueron sometidas a los siguientes tratamientos lumínicos: oscuridad, pulsos de RL, RL continuo, y pulsos

de R. A las 24 horas fueron cosechadas y se midió la actividad de β -glucuronidasa a partir de los extractos obtenidos.

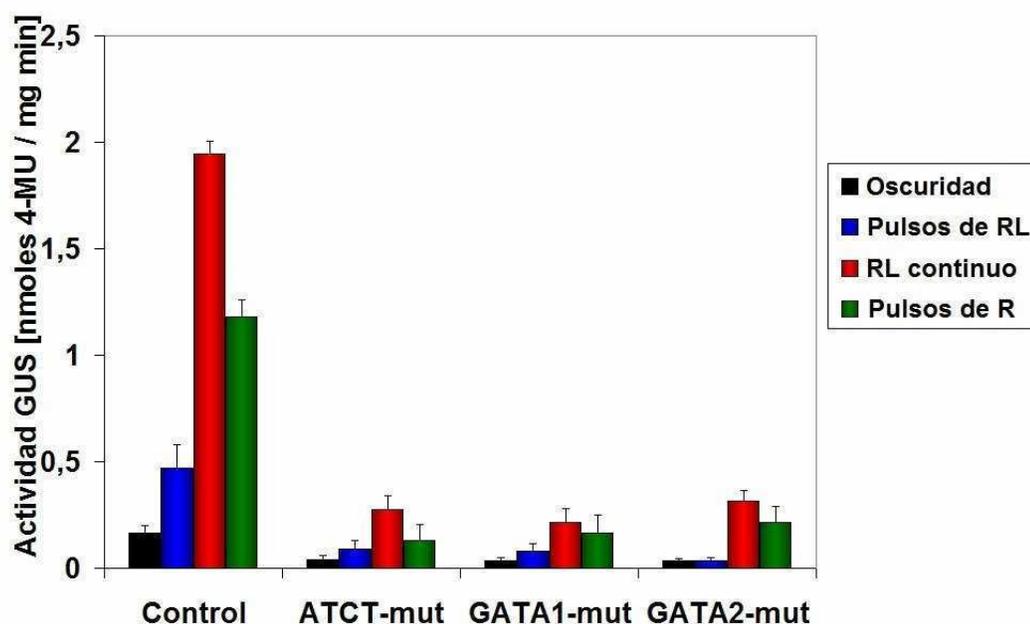


Figura 3.4: Sustituciones que Afectan los Motivos AAAATCT o GATAbbox Reducen las Respuestas VLFR, LFR, y HIR

Las plántulas de *Arabidopsis* transformadas con un fragmento de -453 a +67 del promotor *Lhcb1*2* con las sustituciones descritas anteriormente y fusionado al gen *gusA*, fueron expuestas a pulsos de RL, RL continuo, pulsos de R, o permanecieron en oscuridad. El control se refiere a las plántulas de *Arabidopsis* que contienen la construcción *Lhcb1*2:GUS* con el promotor sin sustituir. Los datos son los promedios \pm SE de cinco a ocho líneas transgénicas independientes.

Cada una de estas construcciones demostró tener disminuidas las respuestas HIR, VLFR y LFR, respecto del control sin sustituir de 520 pb (fragmento de -453 a +67 del promotor *Lhcb1*2*) (Figura 3.4). Esta observación indica que la región entre -100 y -41 contiene los elementos que necesarios para los tres modos de acción del fitocromo. Por otra parte, demuestra que no todas las reducciones que tienen la capacidad de responder a la luz, resultan en la disminución selectiva de la respuesta HIR, observación que será importante para la interpretación de resultados presentados en párrafos siguientes.

El Fragmento de -152 a -134 es Necesario para el HIR

Para investigar si la señalización del fitocromo bajo condiciones de VLFR, LFR, y HIR converge en la misma región promotor *Lhcb1*2*, se realizaron deleciones progresivas desde el extremo 5' de dicho promotor fusionadas al reportero GUS, las cuales fueron usadas para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Plantas transgénicas de *Arabidopsis* de 3 días de edad fueron sometidas a pulsos de RL, RL continuo, y pulsos de R; a las 24 horas fueron cosechadas y se midió la actividad de β -glucuronidasa. Se estudió la respuesta de fragmentos del promotor *Lhcb1*2* de distintos tamaños (**Figura 3.5**).



Figura 3.5: Esquema de las Deleciones de *Lhcb1*2* Fusionadas al Gen *gusA*
 X representa los extremos 5' variables utilizados en este conjunto de experimentos: -453, -176, -152, -134.

Se encontró que la delección de -134 a -31 del promotor *Lhcb1*2* elimina la respuesta HIR sin afectar las respuestas VLFR y LFR (**Figura 3.6**). Esto indicaría que luego de la activación continua con RL, el phyA inicia una cascada de señalización que se desvía de la cascada de señalización de phyB y de la que el phyA inicia bajo pulsos de RL, y que dicha divergencia se extiende hasta el promotor del gen *Lhcb1*2*.

Por otro lado, las respuestas a R y RL mediadas por el fragmento de 218 pb (de -152 a +67) indican que el mismo es capaz de conferir regulación por los tres modos de acción del fitocromo (HIR, VLFR y LFR) al gen reportero *gusA* (**Figura 3.6**). Además, dejando de lado la delección -134 (que pierde totalmente el HIR), se observa una disminución lineal en el tratamiento con RL continuo a medida que aumenta el tamaño de la delección, discriminando la respuesta HIR sobre las

respuestas VLFR y LFR. Podría decirse que el HIR es proporcional al tamaño del fragmento del promotor *Lhcb1*2*, mientras que esto no parece influir a las VLFR o LFR. Si el aumento de la delección es simplemente una forma de reducir el número de sitios de unión disponibles a factores comunes a los tres modos de acción, entonces no tendría que existir dicha discriminación hacia la respuesta HIR. Sin embargo, pese a tener 18 pb más del sitio donde se elimina la respuesta a RL continuo (-134), la delección -152 mantiene un considerable HIR.

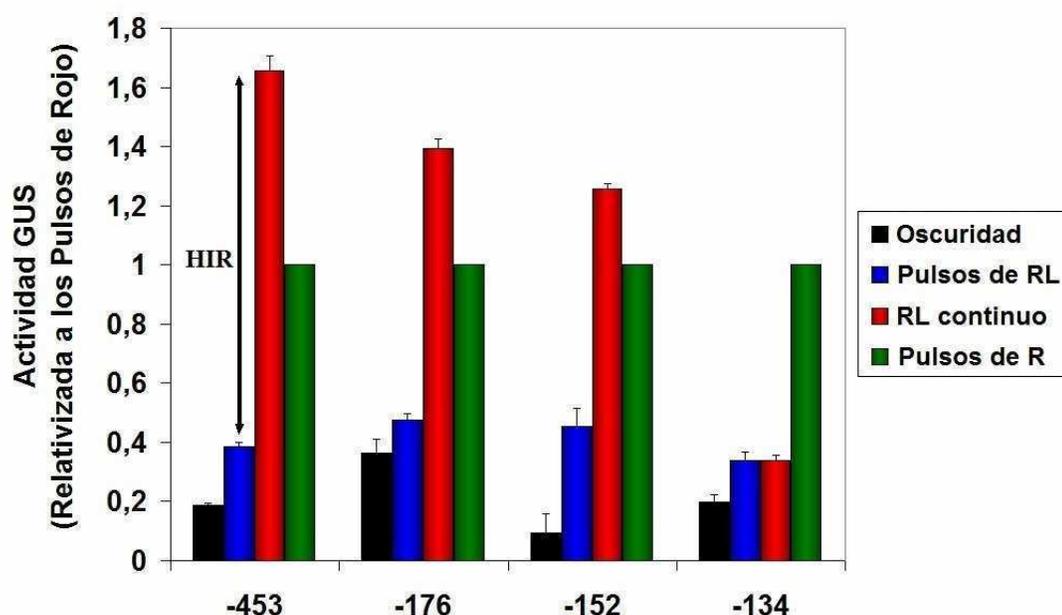


Figura 3.6: Actividad GUS de las Delecciones del Promotor *Lhcb1*2*

Las plantas etioladas que presentan las diferentes delecciones del promotor *Lhcb1*2* fusionado al gen *gusA*, fueron expuestas a pulsos de RL, RL continuo, pulsos de R, o permanecieron en oscuridad. Los datos son los promedios \pm SE de 6 a 10 líneas transgénicas independientes de *Arabidopsis*. Para cada línea, la actividad se relativizó a los valores obtenidos después del tratamiento con pulsos R. Los promedios \pm SE de la actividad de GUS (nmol 4-MU/mg min) bajo el tratamiento de R fueron: -453 = 1.39 ± 0.09 ; -176 = 1.07 ± 0.07 ; -152 = 1.06 ± 0.08 ; -134 = 1.08 ± 0.08 .

Por lo tanto, la secuencia de pares de bases entre -152 y -134 ha resultado ser esencial para la respuesta HIR mediada por phyA. Esto último indicaría que los

elementos río arriba del fragmento de -134 pb del promotor del gen *Lhcb1*2* son necesarios para el modo de acción HIR, mientras que las respuestas VLFR y LFR necesitan de elementos que se encuentran dentro de dicho fragmento. El objetivo propuesto a partir de esta información es identificar la secuencia involucrada con el modo de acción HIR.

Identificación de una Secuencia Específica para HIR

Dado que se observa HIR con la delección -152 y no con la -134, la zona de búsqueda de la secuencia responsable de la respuesta se acotó entre -152 y -134. Se realizaron sustituciones de secuencias de 4 pb con el motivo “CCCC” dentro del contexto de un fragmento de -152 a +67 del promotor *Lhcb1*2* de tabaco desde -149 hasta -134 (**Figura 3.7**).

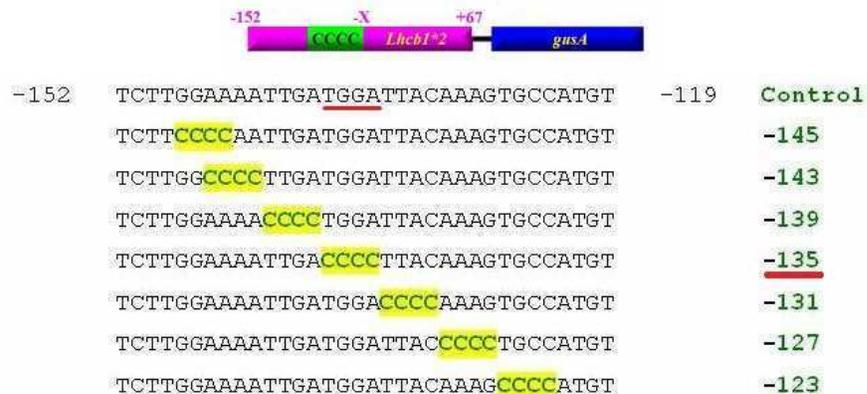


Figura 3.7: Esquema de las Sustituciones Realizadas entre -148 y -134 del promotor *Lhcb1*2* en el Entorno -152

En amarillo se resalta el sitio donde se realizaron las sustituciones y en verde se colocó la secuencia por la cual fueron sustituidas. Cada construcción se denomina según la posición de la primera base que fue sustituida desde el extremo 3’.

Cuando se realizó la comparación entre el promotor control (fragmento de -152 a +67 del promotor *Lhcb1*2* sin sustituir) y aquellos que fueron sustituidos en las

zonas indicadas en la **Figura 3.7**, únicamente se observó una gran disminución en la respuesta HIR en la sustitución denominada -135 (**Figura 3.8**). Dicha sustitución afecta la secuencia específica de nucleótidos entre -135 y -138, que corresponde al motivo “TGGA”. Cuando dicho motivo se encuentra sustituido no se percibe respuesta al RL continuo por encima de aquella producida por pulsos horarios de RL, es decir, no se observa el modo de acción HIR. De hecho, los valores de HIR obtenidos sustituyendo el motivo “TGGA” son menores aún a los vistos previamente con la delección -134. El resto de las sustituciones no parecen afectar la respuesta HIR ni ninguna de las restantes respuestas (VLFR y LFR), por lo menos bajo las condiciones estudiadas.

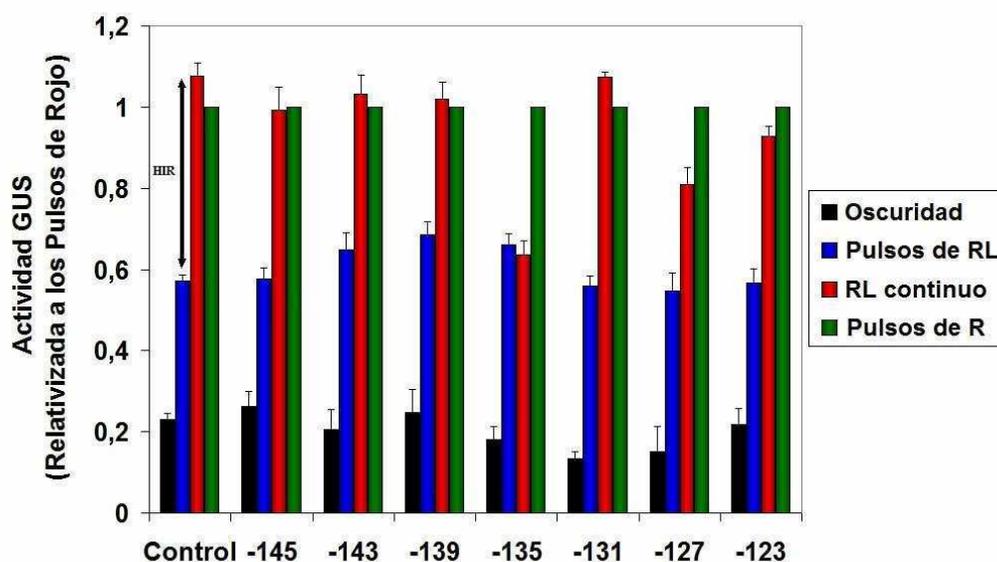


Figura 3.8: Actividad GUS de las Sustituciones del Promotor *Lhcb1*2* en el Entorno -152

Las plantas etioladas que presentan las diferentes sustituciones del promotor *Lhcb1*2* fusionado al gen *gusA*, fueron expuestas a pulsos de RL, RL continuo, pulsos de R, o permanecieron en oscuridad. El control se refiere a las plántulas de *Arabidopsis* que contienen la construcción *Lhcb1*2:GUS* con el promotor sin sustituir. Los datos son los promedios \pm SE de 6 a 10 líneas transgénicas independientes de *Arabidopsis*. Para cada línea, la actividad se relativizó a los valores obtenidos después del tratamiento con pulsos R. Los promedios \pm SE de la actividad de GUS (nmol 4-MU / mg min) bajo el tratamiento de R fueron: Control = 0.97 ± 0.07 ; -145 = 0.95 ± 0.04 ; -143 = 0.95 ± 0.03 ; -139 = 0.82 ± 0.07 ; -135 = 0.98 ± 0.04 ; -131 = 0.97 ± 0.12 ; -127 = 1.01 ± 0.09 ; -123 = 0.89 ± 0.13 .

Por lo tanto, podemos inferir que el motivo “TGGA” es necesario para inducir una respuesta HIR dado que cuando se encuentra mutado, reduce la actividad de GUS bajo el tratamiento con RL continuo y se observa severamente deteriorada la dependencia de la tasa de fluencia típica de HIR (**Figura 3.9**). Una de las vías de señalización para el modo de acción HIR iniciada por *phyA*, independientemente de la de los restantes fotorreceptores, finalizaría en el/los factor/es de transcripción con sitio de unión en el motivo “TGGA” del promotor regulable por luz *Lhcb1*2*. El motivo “TGGA” que se encuentra entre -135 y -138 resultó ser esencial para la respuesta HIR mediada por *phyA*. Sin embargo, la sustitución 145 que afecta parcialmente otro motivo “TGGA” ubicado entre -146 y -149, no parece afectar la respuesta HIR (**Figuras 3.7 y 3.8**). Esto podría indicar que no sólo es necesaria la secuencia TGGA para inducir una HIR, sino que también es importante el sitio donde ésta se encuentre.

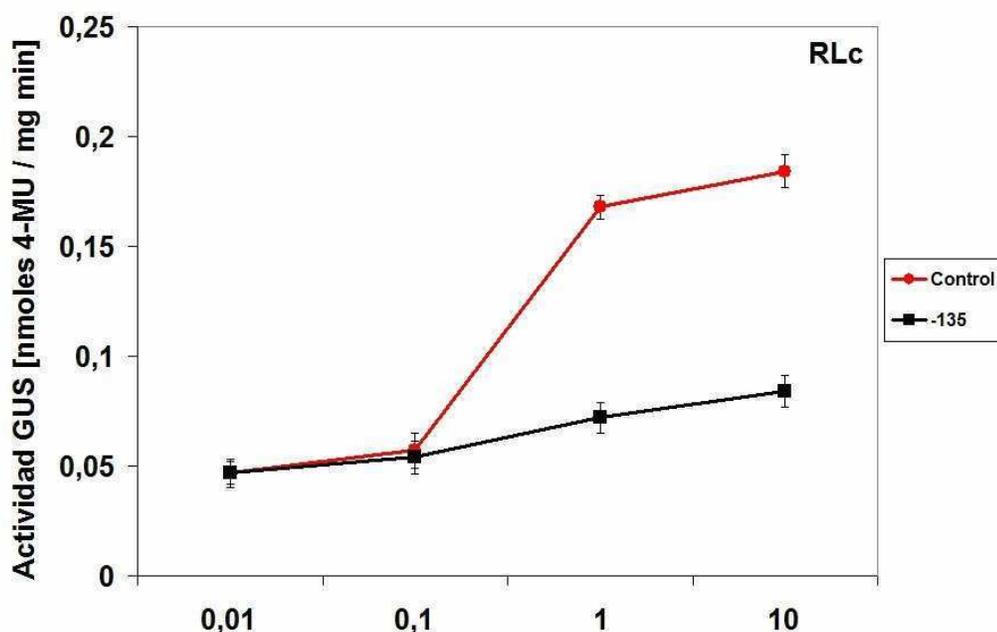


Figura 3.9: Dependencia de la Tasa de Fluencia Típica de HIR

Se observa la reducción a la tasa de fluencia a RL continuo de la actividad del promotor *Lhcb1*2* con el motivo TGGA mutado (-135). Los datos son los promedios \pm SE de 3 réplicas de 1 control (promotor sin sustituir) y 1 línea -135 (promotor sustituido) seleccionadas para sus similares niveles de expresión en la oscuridad.

IDENTIFICACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PARA HIR

Identificación de la Proteína BLH1

El siguiente paso fue el estudio de los posibles factores de transcripción que se unieran al motivo “TGGA” responsable de la respuesta HIR mediada por phyA; para ello se recurrió a la técnica de simple híbrido en levaduras. El primer paso para realizar el “screening” por simple híbrido en levaduras fue la construcción del plásmido reportero pINT-HIS3 equipado con la secuencia “bait” predeterminada por los experimentos bioquímicos. Puede inferirse que el factor de transcripción que vaya a unirse al motivo “TGGA” entre -135 y -138 necesite de las bases cercanas al mismo para su reconocimiento. La comparación de secuencias de distintos promotores *Lhcb* reveló que existen secuencias altamente conservadas y de conservación parcial entre -141 y -119, zona que contiene el motivo “TGGA”, sin el cual no se tiene respuesta HIR. Se eligió como “bait” la secuencia de 23 pb del promotor *Lhcb1**2 entre -141 y -119, a la cual se le dio el nombre de “secuencia Hir” (**Figura 3.11**).

```

Hir1  -141  TGATGGATTACAAAGTGCCATGT  -119
Hir4  TGATGGATTACAAAGTGCCATGT  TGATGGATTACAAAGTGCCATGT
      TGATGGATTACAAAGTGCCATGT  TGATGGATTACAAAGTGCCATGT
Pal   TGATGGATTACAATAATCCATCA  TGATGGATTACAATAATCCATCA
      TGATGGATTACAATAATCCATCA  TGATGGATTACAATAATCCATCA
  
```

Figura 3.11: Secuencias “Bait” para el Ensayo de Simple Híbrido

En amarillo se resalta el motivo “TGGA” en cada construcción. Hir1 contiene una simple copia de la secuencia Hir, mientras que Hir4 presenta cuatro copias de la misma. También se incluyó en el estudio un palíndromo de la secuencia Hir (Pal).

Se diseñaron pares de oligos, complementarios entre sí, para las construcciones descritas en la **Figura 3.11**. Las secuencias “bait” fueron flanqueadas por las bases correspondientes a los productos de corte de las enzimas

utilizadas para el clonado en el vector de dos componentes pINT (Not1 y Xba1, respectivamente). Los oligos fueron introducidos en la reacción de ligación con la cual se transformaron células de *E. Coli* competentes; mediante PCR de colonias y posterior secuenciación de los productos, se confirmó la correcta ligación de las construcciones en el vector pINT. Finalmente se transformaron levaduras Y187 con los plásmidos pINT que expresaban las distintas construcciones para obtener las levaduras llamadas Hir1, Hir4 y Pal.

Para el aislamiento de clones correspondientes a posibles factores de transcripción de HIR, las levaduras Hir1, Hir4 y Pal fueron transformadas con una biblioteca de expresión de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en oscuridad y en medio mínimo $\text{Leu}^-/\text{His}^-$ con 2mM de 3-AT (también se transformaron con el plásmido pACTII como control negativo). Con la levadura Pal (palíndrome) se identificó en dos experimentos independientes un clon de 1.5 kb que luego de secuenciarlo y de comparar su secuencia en el “BLAST” se determinó que correspondía al gen At2g35940 que codificaba para el factor de transcripción de *Arabidopsis* “BEL1-LIKE HOMEODOMAIN” o BLH1 (pACT-BLH1).

Para verificar la especificidad de este factor por la secuencia Hir, todas las levaduras (Hir1, Hir4, y Pal) fueron transformadas con el clon *BLH1* aislado y con el plásmido pACTII vacío como control negativo. Las levaduras transformadas fueron incubadas en medio mínimo $\text{Leu}^-/\text{His}^-$ en concentraciones crecientes de 3-AT (**Figura 3.12**).

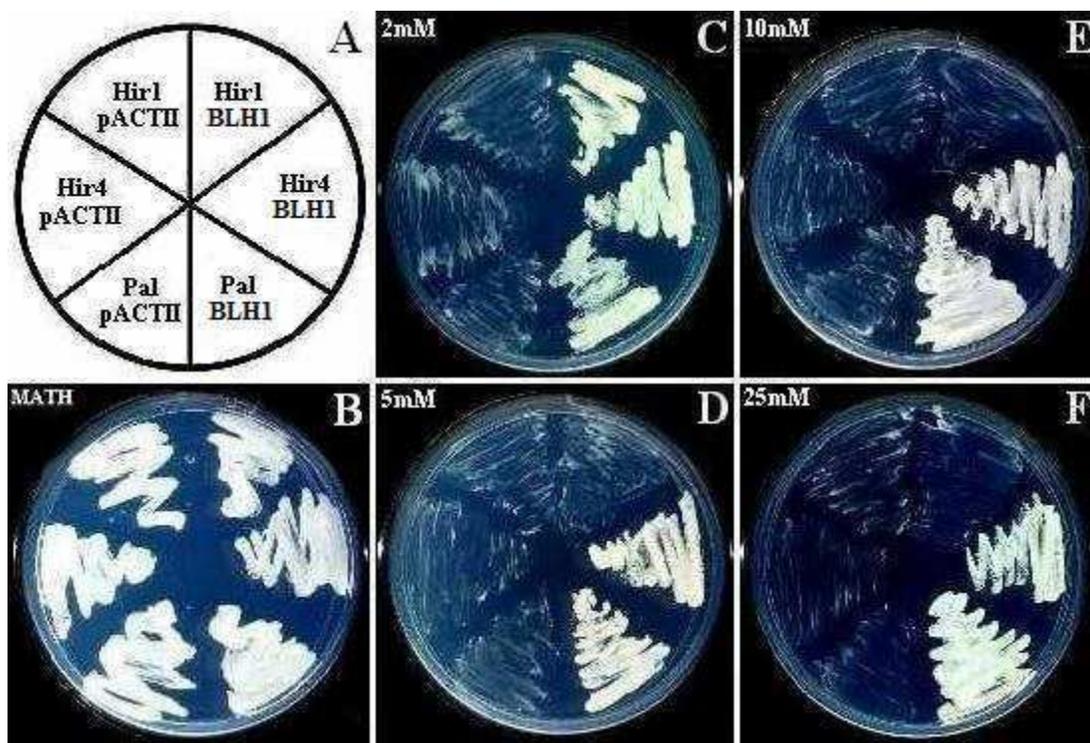


Figura 3.12: Especificidad de BHL1 por la Secuencia HIR

- A) Esquema indicando lo sembrado en las placas: en la mitad izquierda de la placa se encuentran los controles negativos y a la derecha las levaduras transformadas con el clon del factor de transcripción BHL1.
- B) Control de viabilidad: todas las levaduras transformadas sembradas en medio mínimo $\text{Leu}^-/\text{His}^+$.
- C) a F) Las levaduras transformadas se hicieron crecer en medio mínimo $\text{Leu}^-/\text{His}^-$ en concentraciones crecientes de 3-AT: 2 mM, 5 mM, 10 mM, y 25 mM.

En la **Figura 3.12**, puede observarse que el factor de transcripción BHL1 en todos los casos reconoce la secuencia Hir, ya sea que las levaduras presenten una sola copia (Hir1) o varias (Hir4 y Pal) de ella. Con la levadura Hir1, no puede verse crecimiento a altas concentraciones de inhibidor; sin embargo, a las levaduras Hir 4 y Pal, esta condición no parece afectarles, ya que puede verse crecimiento a concentraciones de 25 mM de 3-AT. Esto podría indicar que la supervivencia de las levaduras depende de la cantidad de sitios de unión que se encuentren disponibles para el factor BHL1.

El Homeodominio del Factor de Transcripción BLH1 se Une a TGGA

Según los experimentos de análisis de actividad del promotor *Lhcb1**2, el sitio de unión de BLH1 responsable del modo de acción HIR sería el motivo “TGGA”, ya que si el mismo se encuentra mutado no se observa HIR. Para corroborar esta hipótesis mediante la técnica de simple híbrido en levaduras, se realizaron sustituciones secuenciales de 4 pb con el motivo “CCCC” sobre la secuencia Hir usada como “bait” (similares a las que se hicieron para introducir en plantas de *Arabidopsis* con el fin de medir la actividad el gen reportero GUS) (**Figura 3.13**).

Hir	-146	AAAATTGATGGATTACAAAGTGCCATGTAGAT	-115
142		AAAACCCC TGGATTACAAAGTGCCATGTAGAT	
138		AAAAGTGA CCCC TTACAAAGTGCCATGTAGAT	
134		AAAAGTGATGGAC CCCC AAAGTGCCATGTAGAT	
130		AAAAGTGATGGATTAC CCCC TGCCATGTAGAT	
126		AAAAGTGATGGATTACAAAG CCCC ATGTAGAT	
122		AAAAGTGATGGATTACAAAGTGCC CCCC AGAT	

Figura 3.13: Sustituciones con el Motivo “CCCC” en la Secuencia HIR.

En todos los casos, cada construcción se denomina según la posición de la base que fue sustituida desde el extremo 5'. Cabe destacar que la construcción que tiene sustituido el motivo “TGGA” es la llamada 138.

En la **Figura 3.14**, se observa que únicamente no hay crecimiento en las levaduras que integraron las construcción 138, es decir, en aquellas que tenían mutado el motivo “TGGA”. Puede decirse que existe interacción DNA-proteína cuando el extracto de BHL1 está en presencia del Hir normal (secuencia Hir que no tiene el motivo “TGGA” sustituido) pero la misma se pierde cuando está en presencia del Hir mutado (secuencia Hir que tiene el motivo “TGGA” sustituido). Por otro lado, sustituciones en el entorno del motivo “TGGA” no parecen afectar la unión del factor de transcripción.

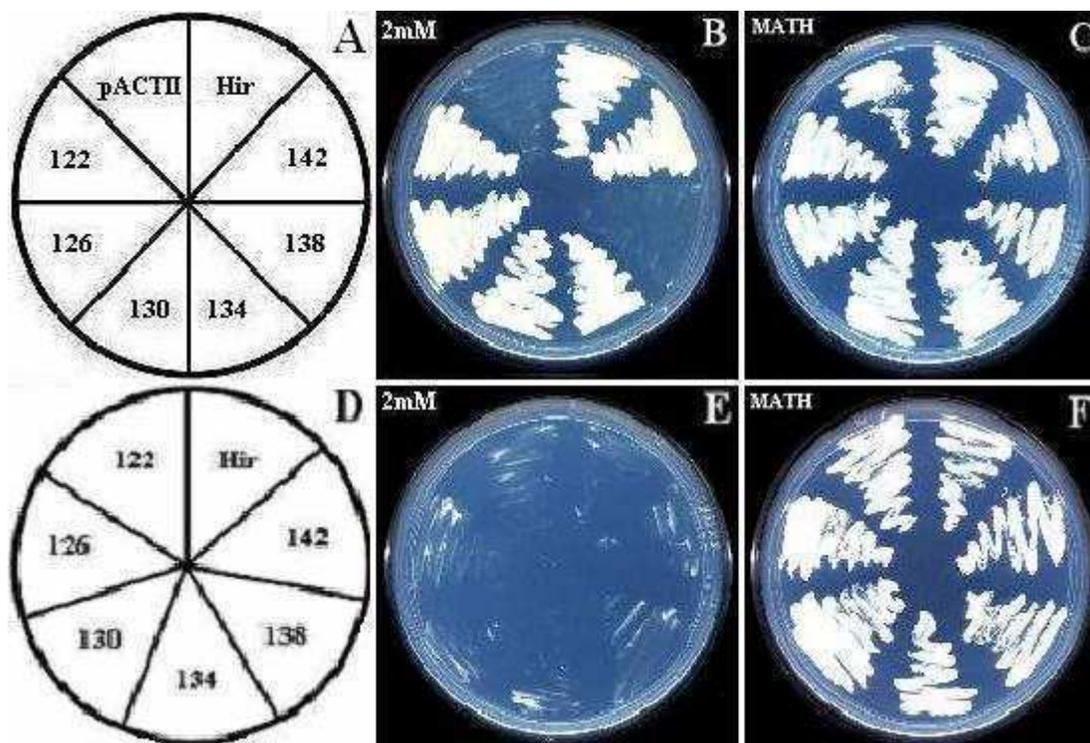


Figura 3.14: Reconocimiento de BHL1 del motivo "TGGA".

- A) Esquema indicando lo sembrado en las placas de las figuras B) y C).
- B) Las levaduras transformadas con pACT-BLH1 no pueden crecer en un medio $\text{Leu}^-/\text{His}^-$ con 2 mM de 3-AT si el constructo tiene sustituido el motivo TGGC entre -138 y -135 con la secuencia CCCC.
- C) Control de viabilidad: levaduras transformadas con pACT-BLH1 crecidas en un medio $\text{Leu}^-/\text{His}^+$.
- D) Esquema indicando lo sembrado en las placas de las figuras E) y F).
- E) Las levaduras transformadas con el vector pACT vacío no pueden crecer en un medio $\text{Leu}^-/\text{His}^-$ en presencia de 2 mM de 3-AT.
- F) Control de viabilidad: levaduras transformadas con el vector pACT crecidas en un medio $\text{Leu}^-/\text{His}^+$.

El Promotor Super Hir Muestra Mayor Unión de BLH1

Las mutaciones de cuatro pares de bases de la secuencia del promotor por CCCC permitieron definir con precisión la secuencia requerida para la respuesta HIR. Sin embargo, en experimentos preliminares se habían realizado sustituciones secuenciales de 6 pb con el sitio de corte para enzimas de restricción, según se

describe en “Materiales Y Métodos” (Figura 2.5), dentro del contexto de un fragmento de -453 a +67 del promotor *Lhcb1*2* de tabaco, desde -148 hasta -129 (Figura 3.15). Algunos resultados inesperados de estos experimentos resultaron de gran utilidad para sustanciar la evidencia a favor del papel de BLH1.

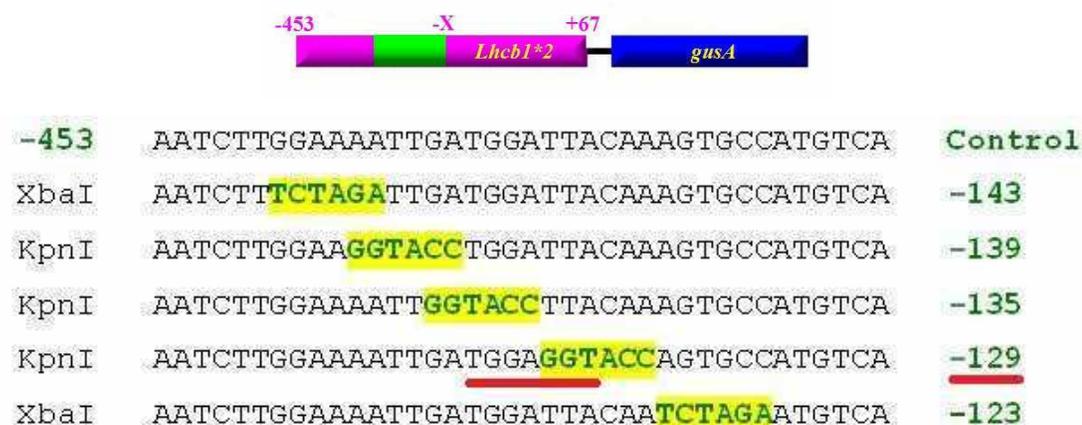


Figura 3.15: Esquema de las Sustituciones Realizadas entre -148 y -129 del promotor *Lhcb1*2* en el Entorno -453

En amarillo se resalta el sitio donde se realizaron las sustituciones y en verde se colocó la secuencia por la cual fueron sustituidas. Cada construcción se denomina según la posición de la primera base que fue sustituida desde el extremo 3'. A la izquierda se señala la enzima de restricción que se usó en cada caso.

Se observó que cuando la sustitución que afectaba el motivo “TGGA” se encontraba dentro un promotor de 520 pb (de -453 a +67), había una disminución de la respuesta HIR, aunque ésta no era eliminada de manera completa (Figura 3.16). Probablemente esto se deba a la presencia de otra secuencia TGGA en -146 a -149, cercana al motivo "TGGA" en -135 y -138.

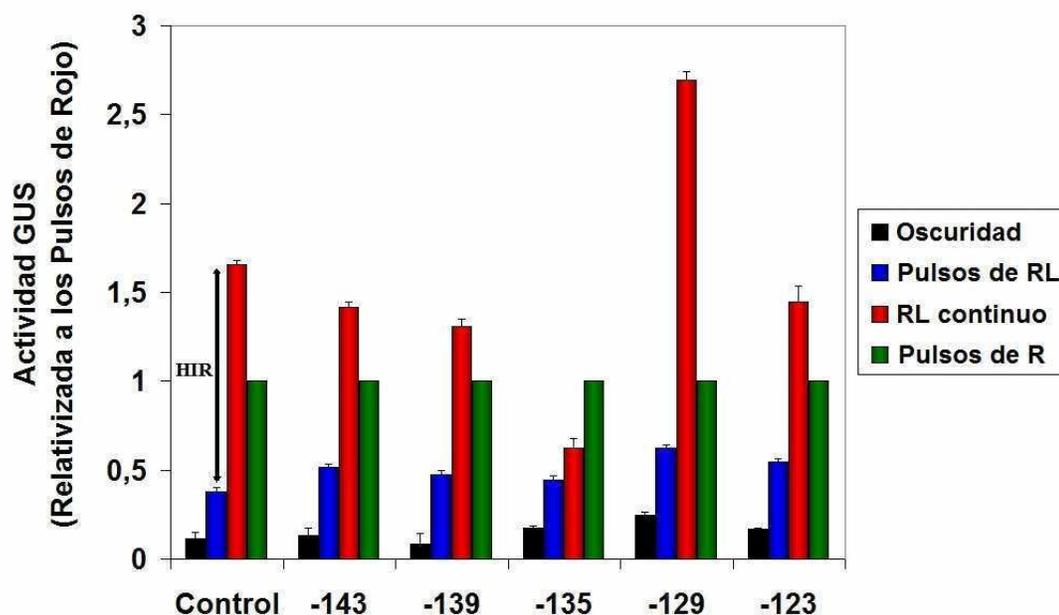


Figura 3.16: Actividad GUS de las Sustituciones del Promotor *Lhcb1*2* en el Entorno -453

Las plantas etioladas que presentan las diferentes sustituciones del promotor *Lhcb1*2* fusionado al gen *gusA*, fueron expuestas a pulsos de RL, RL continuo, pulsos de R, o permanecieron en oscuridad. El control se refiere a las plántulas de *Arabidopsis* que contienen la construcción *Lhcb1*2:GUS* con el promotor sin sustituir. Los datos son los promedios \pm SE de 6 a 10 líneas transgénicas independientes de *Arabidopsis*. Para cada línea, la actividad se relativizó a los valores obtenidos después del tratamiento con pulsos R. Los promedios \pm SE de la actividad de GUS (nmol 4-MU / mg min) bajo el tratamiento de R fueron: Control = 1.7 ± 0.2 ; -143 = 1.0 ± 0.2 ; -139 = 1.3 ± 0.2 ; -135 = 1.3 ± 0.3 ; -129 = 1.4 ± 0.2 .

Por otro lado, la sustitución -129 mostró un HIR de una magnitud de más del doble comparada con el HIR del promotor control (**Figura 3.16**). Al estudiar la sustitución en -129, se observó que el sitio de corte para la enzima de corte KpnI incorpora una secuencia GGTACC entre -134 y -129 (**Figura 3.15**), creando una secuencia TGGAGGT entre -137 y -132, lo cual podría explicar la intensificación de HIR a través de una unión más fuerte del factor de transcripción. A la secuencia TGGAGGT que incrementa el HIR se la llamó motivo "super Hir". Para poner a prueba esta interpretación, se realizaron experimentos con la técnica del simple híbrido en levaduras para estudiar el comportamiento del factor de transcripción

aislado frente al motivo super Hir; para lo cual se transformaron levaduras con una nueva secuencia "bait" que contiene cuatro copias de dicho motivo super Hir (**Figura 3.17**).

```

Hir1   -141   TGATGGATTACAAAGTGCCATGT   -119
Hir4   TGATGGATTACAAAGTGCCATGT TGATGGATTACAAAGTGCCATGT
         TGATGGATTACAAAGTGCCATGT TGATGGATTACAAAGTGCCATGT
Pal   TGATGGATTACAATAATCCATCA TGATGGATTACAATAATCCATCA
         TGATGGATTACAATAATCCATCA TGATGGATTACAATAATCCATCA
SHir  TGATGGAGGTCAAAGTGCCATGT TGATGGAGGTCAAAGTGCCATGT
         TGATGGAGGTCAAAGTGCCATGT TGATGGAGGTCAAAGTGCCATGT

```

Figura 3.17: Secuencias “Bait” para el Estudio del Motivo Super Hir

En amarillo se resalta el motivo “TGGA” en cada construcción. Hir1 contiene una simple copia de la secuencia Hir, Hir4 presenta cuatro copias de la misma, Pal presenta cuatro copias del palíndromo de la secuencia Hir, y la nueva secuencia "bait" SHir se construyó con cuatro copias de la secuencia super Hir

Todas las levaduras disponibles (Hir1, Hir4, Pal y SHir) fueron transformadas con pACT-BLH1 y el vector pACT vacío, para luego ser crecidas en un medio Leu⁻/His⁻ con concentraciones crecientes de 3-AT (**Figura 3.18**). Consistentemente con lo visto en los experimentos de medición de GUS, la combinación de pACT-BLH1 con la construcción que contiene la secuencia TGGAGGT (super Hir) permite un mayor crecimiento de la levadura bajo concentraciones crecientes de 3-AT en comparación con la secuencia TGGA (Hir) (**Figura 3.18**). Con este resultado se puede concluir que la unión del factor de transcripción BLH1 se encuentra aumentada con la presencia de la secuencia super Hir.

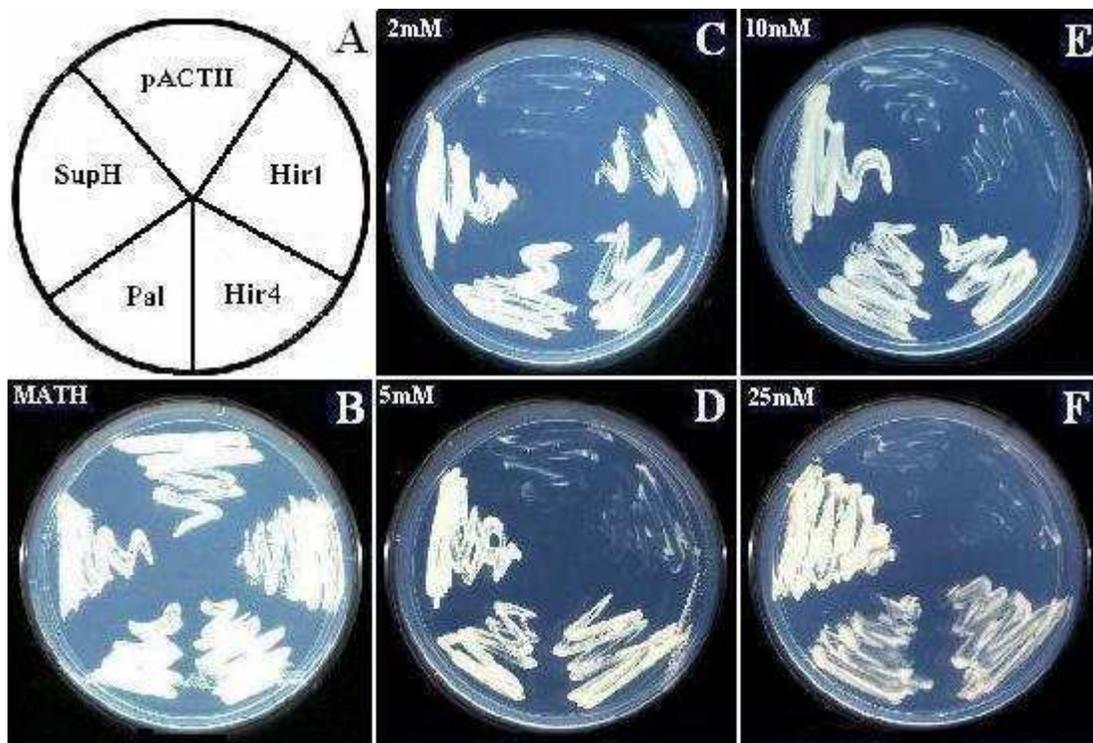


Figura 3.18: Especificidad de BHL1 por la Secuencia Hir

A) Esquema indicando lo sembrado en las placas.

B) Control de viabilidad: todas las levaduras transformadas crecidas en medio $\text{Leu}^-/\text{His}^+$.

C) a F) Las levaduras transformadas crecidas en medio $\text{Leu}^-/\text{His}^-$ en concentraciones crecientes de 3-AT: 2 mM, 5 mM, 10 mM, y 25 mM.

HIR Normal Requiere de BLH1

Para investigar el significado fisiológico de BLH1, se obtuvieron plántulas homocigotas mutantes *blh1-1* y *blh1-5*, que muestran una expresión de *BLH1* severamente reducida, junto con sus correspondientes pares de *BLH1* salvaje, que muestran una expresión de *BLH1* normal. A tal efecto se seleccionaron mutantes de *blh1* de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) generados por inserciones de T-DNA (ABRC), según se describe en la **Figura 3.19**.

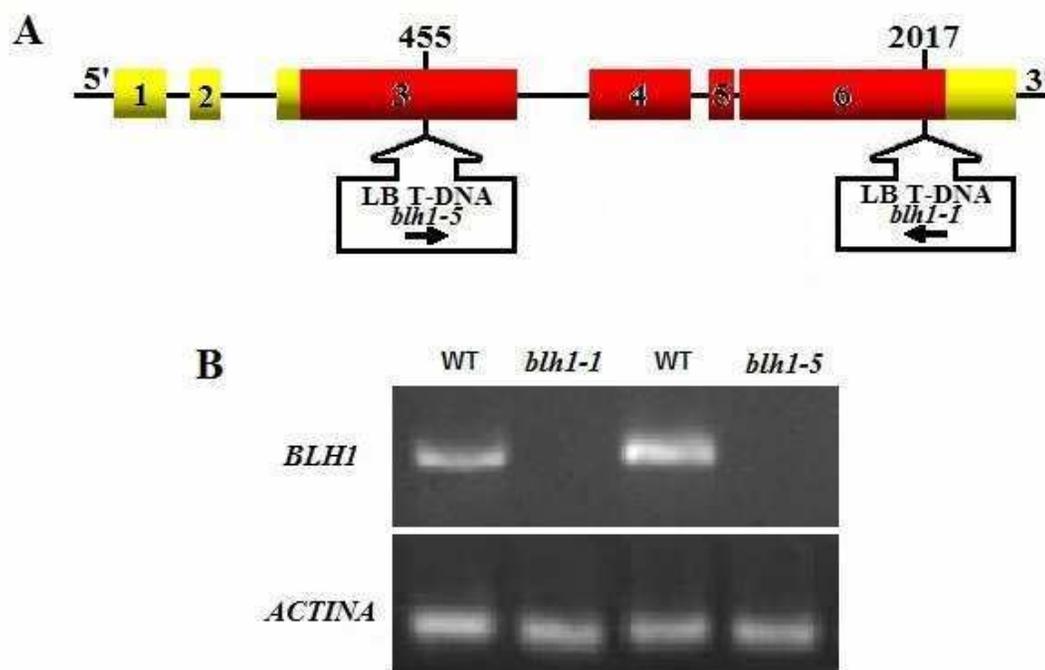


Figura 3.19: Obtención de Mutantes *blh1*

- A) Alelos *blh1* mutantes:** posición y orientación del inserto del T-DNA en los alelos *blh1* (At2g35940). La región genómica alrededor de las inserciones fueron secuenciadas para confirmar la posición. Las líneas representan los intrones y los rectángulos los exones. LB es el borde izquierdo de la secuencia.
- B) Expresión of *BLH1* determinada por RT-PCR:** las semillas provenientes de plantas de Arabidopsis salvajes (WT) y mutantes fueron crecidas por 3 días en oscuridad seguido por 6 horas de tratamiento con RL continuo antes de ser cosechadas. Las semillas homocigotas para los alelos *blh1-1* o *BLH1* fueron seleccionadas de una población segregante usando el "primer" LBb1 (ABRC) con los "primers" 5'-TTTCCAGCCGCTTAAGCATACA-3' y 5'-AGCCCAATGGCGGACACTAAT-3', respectivamente. Del mismo modo, las semillas homocigotas para los alelos *blh1-5* o *BLH1* fueron seleccionadas de un población segregante usando el "primer" LBb1 (ABRC) con los "primers" 5'-TACTAAGTTTTGCTTTCTTCATCTGTATTT-3' y 5'-CAACTACTAATTATACATAGATGGCTGCTT-3', respectivamente. Como controles se usaron los genes de actina.

Los mutantes *blh1* seleccionados fueron transformados con las construcciones *Lhcb1*2:GUS* que contienen el promotor de -453 a -67 pb sin sustituir (control) y sustituido en -135 a -140 (-135) que fueron estudiados anteriormente (ver **Figuras 3.7** y **3.8**). Se observó que en *blh1*, la actividad del promotor *Lhcb1*2* fue igual al control

bajo las condiciones de oscuridad, pulsos de R y pulsos de RL; sin embargo, mostró una disminución significativa de la respuesta al RL continuo, reduciendo entonces el HIR de manera específica (**Figura 3.20**)

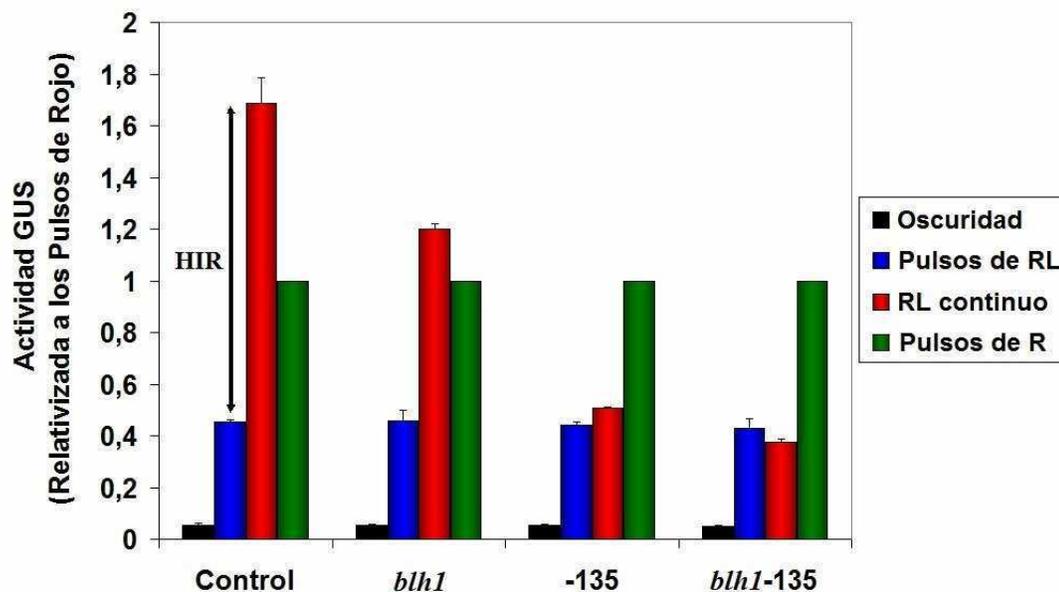


Figura 3.20: Actividad del promotor *Lhcb1*2* en *blh1*

Las plantas etioladas que presentan el promotor *Lhcb1*2* sin sustituir y sustituido en la posición -135 fusionado al gen *gusA*, fueron expuestas a pulsos de RL, RL continuo, pulsos de R, o permanecieron en oscuridad. El control se refiere a las plántulas de *Arabidopsis* normales que contienen la construcción *Lhcb1*2:GUS*. Las plantas etioladas fueron expuestas a pulsos de RL, RL continuo, pulsos de R, o permanecieron en oscuridad. Los datos son los promedios \pm SE de 6 a 10 líneas transgénicas independientes de *Arabidopsis*. Para cada línea, la actividad se relativizó a los valores obtenidos después del tratamiento con pulsos R. Los promedios \pm SE de la actividad de GUS (nmol 4-MU/mg min) bajo el tratamiento de R fueron: Control = 3.2 ± 0.2 ; *blh1* = 3.3 ± 0.1 ; -135 = 3.2 ± 0.2 ; *blh1-135* = 3.2 ± 0.1 .

Por lo tanto, podemos inferir que el HIR requiere de un BLH1 normal para inducir una respuesta HIR, dado que las mutantes *blh1* reducen la actividad de GUS bajo el tratamiento con RL continuo y presentan una dependencia reducida a la tasa de fluencia (**Figura 3.21**).

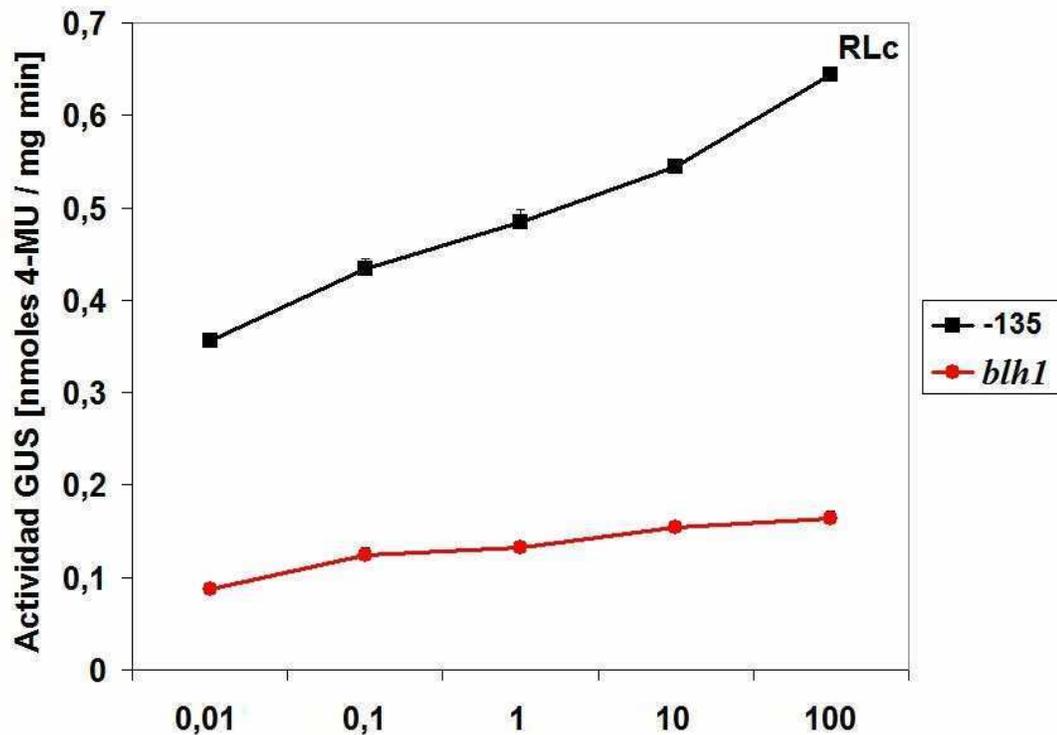


Figura 3.21: Dependencia de la Tasa de Fluencia Típica de HIR en *blh1*

La tasa de fluencia a RL continuo de la actividad del promotor *Lhcb1*2* con el motivo "TGGA" mutado (-135) en *blh1* es nula. Los datos son los promedios \pm SE de 3 réplicas de 1 control y 1 línea transgénica *blh1*-135 seleccionadas para sus similares niveles de expresión en la oscuridad.

En concordancia con estos resultados de expresión del gen fotosintético, experimentos de medición del hipocotilo en plántulas de *Arabidopsis thaliana* salvajes y mutantes *blh1* mostraron una disminución significativa en la respuesta (inhibición del largo de hipocotilo) en *blh1* frente al tratamiento con RL continuo (**Figura 3.22**). Así mismo, no se observaron cambios en el largo del hipocotilo con respecto a las plantas salvajes cuando las mutantes *blh1* fueron sometidas a tratamientos de oscuridad y pulsos de RL y R,. Esto indica que en *blh1* las respuestas mediadas por phyA presentan una HIR deteriorada mientras que la VLFR y la LFR son normales.

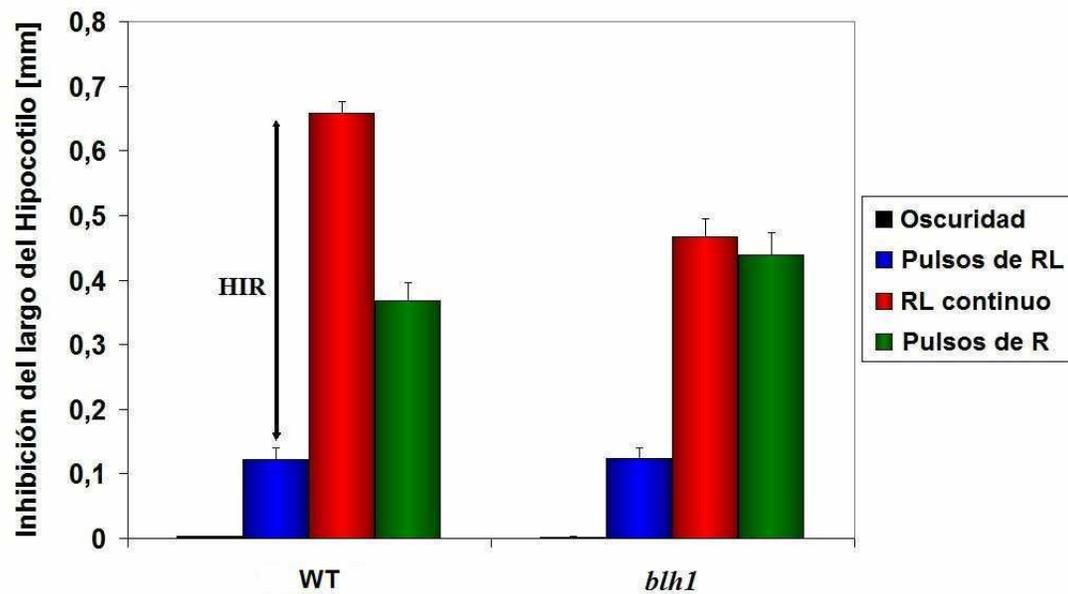


Figura 3.22: Inhibición del Largo de Hipocotilo en *blh1*

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* con genotipo salvaje (WT) y mutantes *blh1* de un día de edad fueron crecidas por 3 días bajo condiciones de oscuridad pulsos de RL, RL continuo y pulsos de R antes de proceder a sus mediciones.

ANÁLISIS FUNCIONAL DE OTRAS PROTEÍNAS BLH

Las proteínas BLH pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción con homeodominios TALE (*Three-aa Loop Extension*), caracterizada por la presencia de tres residuos aminoacídicos adicionales en el "loop" entre las dos primeras hélices, mediante el cual forma complejos con el ADN (Bolduc *et al*, 2008). En esta superfamilia se encuentran dos clases de proteínas que poseen un papel fundamental en la regulación del desarrollo en plantas: la clase I se denomina KNOX (KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN) y la clase II se denomina BELL (BEL1-LIKE HOMEODOMAIN) (Hackbusch *et al*, 2005). En *Arabidopsis thaliana*, la familia de las BELL está compuesta por 13 proteínas: BLH1 – BLH11, BELL1 y ATH1. La proteína BLH1 (At2g35940) en particular, carece de los 50 aa del extremo amino-terminal y de los 168 aa del extremo carboxi-terminal, pero conserva el dominio Bell, el homeodominio (HD) y secuencias de pobre similitud respecto de otras proteínas BLH (Becker *et al*, 2002) (Figura 3.23).

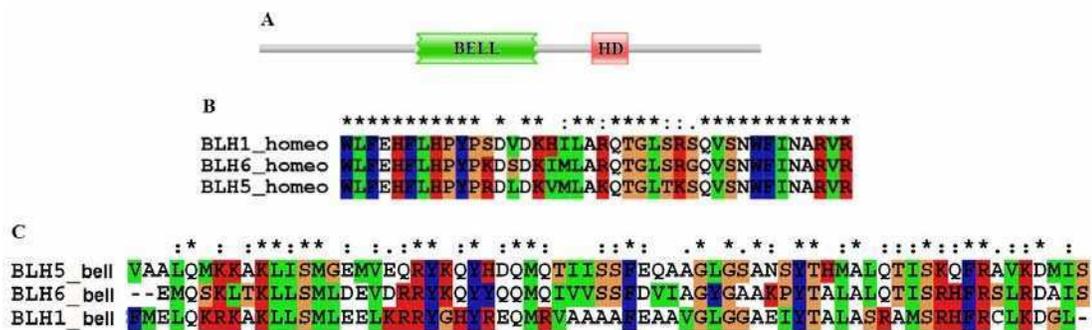


Figura 3.23: Comparación de Secuencias de Algunas Proteínas BLH

- A) Esquema de las secuencias de mayor similitud de las proteínas BLH: en verde está representado el dominio Bell y en rojo el dominio HD.
- B) Comparación de secuencias del dominio HD de BLH1, BLH5 y BLH6.
- C) Comparación de secuencias del dominio Bell de BLH1, BLH5 y BLH6.

Cuando se realizó la comparación de secuencias de las 11 proteínas BLH, se observó que todas ellas presentaban el homeodominio de unión a ADN altamente

conservado (**Figura 3.23B**); sin embargo, presentaban ciertas diferencias cuando se comparaba el dominio Bell. Las proteínas BLH que tenían un dominio Bell con mayor similitud de secuencias respecto de BLH1 son BLH5 (At2g27220) y BLH6 (At4g34610) (**Figura 3.23C**).

Dado que las proteínas BLH6 y BLH5 presentan un alto grado de similitud a nivel estructural con respecto a BLH1, se podría pensar que poseen un rol redundante, lo cual suele verse en las proteínas TALE (Byrne *et al*, 2002; Selleri *et al*, 2004). A continuación se muestran análisis funcionales de estos genes que indican que el gen *BLH6* se expresa en respuesta a luz roja lejana continua, mientras que el gen *BLH5* mostró una respuesta similar a *BLH1*. Mutantes de ambos genes, *BLH6* y *BLH5*, mostraron una respuesta HIR reducida, como en el caso de la mutante *blh1*.

Regulación Mutua de la Expresión de Miembros de la Familia BLH

Para estudiar si existe interdependencia entre BLH1 y BLH6, se llevaron a cabo experimentos de inducción de HIR sobre plantas homocigotas de *Arabidopsis thaliana* salvaje (WT), deficientes de *BLH1* (*blh1*), deficientes de *BLH6* (*blh6*) y doble mutante para *blh1blh6*, que contenían las construcciones *BLH1:GUS* y *BLH6:GUS* (estas mutantes fueron obtenidas por María Regina Scarpin como parte de su Tesina de Licenciatura). Plantas transgénicas de *Arabidopsis* de 3 días de edad fueron sometidas a los tratamientos de oscuridad y RL continuo; a las 24 horas fueron cosechadas y se midió la actividad de β -glucuronidasa a partir de los extractos obtenidos (**Figura 3.24**).

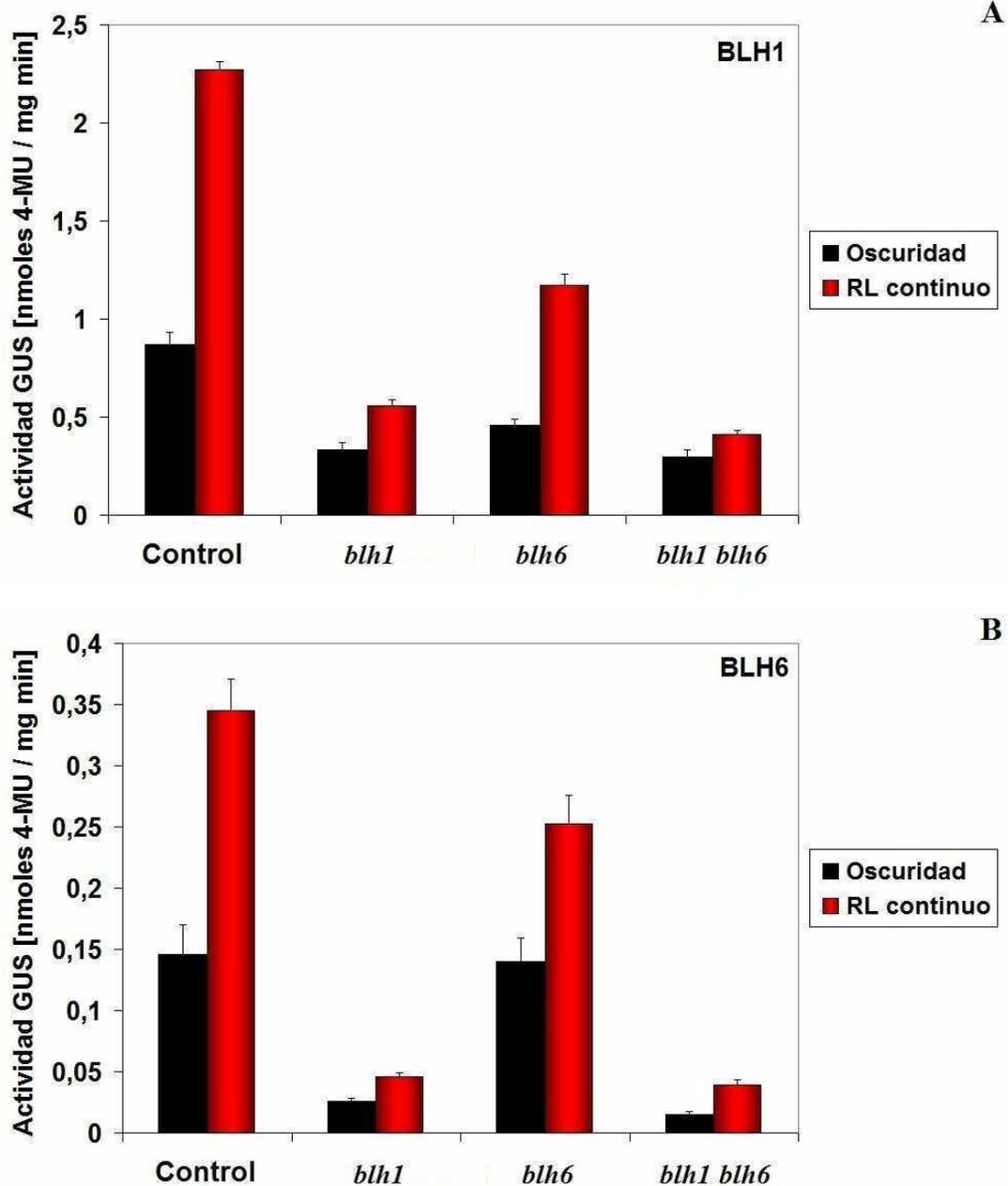


Figura 3.24: Actividad GUS de las Mutantes *blh1*, *blh6* y *blh1blh6* Bajo la Regulación de los Promotores de *BLH1* y *BLH6*

Las plantas etioladas fueron expuestas a RL continuo o permanecieron en oscuridad. Los datos son los promedios \pm SE de 5 líneas transgénicas independientes de *Arabidopsis* para cada genotipo.

A) *BLH1*:GUS en WT, *blh1*, *blh6* y *blh1blh6*.

B) *BLH6*:GUS en WT, *blh1*, *blh6* y *blh1blh6*.

En primer lugar, se puede observar que en todos los casos el tratamiento RL continuo regula positivamente tanto al promotor *BLH1* como al *BLH6*, dado que se observa una mayor actividad de GUS en esta condición, con respecto al control de oscuridad. Por otro lado, analizando cada uno de los fondos genéticos se obtiene una mayor expresión para el correspondiente a la plántula salvaje con respecto a las plántulas mutantes. Analizando más en detalle, se puede observar que la mutante *blh6* presenta una mayor expresión con respecto a la mutante *blh1* y que la doble mutante *blh1 blh6* presenta expresión similar a *blh1* (**Figura 3.24**).

En conjunto, los resultados obtenidos en la **Figura 3.24**, indican que existe una regulación mutua entre los miembros estudiados de la familia BLH, dado que *BLH1* regula a *BLH6* del mismo modo que *BLH6* regula a *BLH1*.

Función Aditiva de Miembros de la Familia BLH

Para estudiar el rol fisiológico de las proteínas BLH, se realizaron experimentos de medición de hipocotilo en plantas mutantes *blh1*, *blh5*, *blh6*, doble mutantes *blh1 blh5*, *blh1 blh6*, *blh5 blh6*, y triple mutante *blh1 blh5 blh6*. Dichas mutantes fueron obtenidas por cruces por María Regina Scarpin como parte de su Tesina de Licenciatura, pero su genotipo e identificación fue realizada como parte de esta tesis.

Plantas homocigotas de *Arabidopsis thaliana* de un día de edad con genotipo salvaje y las mutantes mencionadas en el párrafo anterior, fueron crecidas por 3 días bajo condiciones de oscuridad y RL continuo antes de proceder a sus mediciones (**Figura 3.25**).

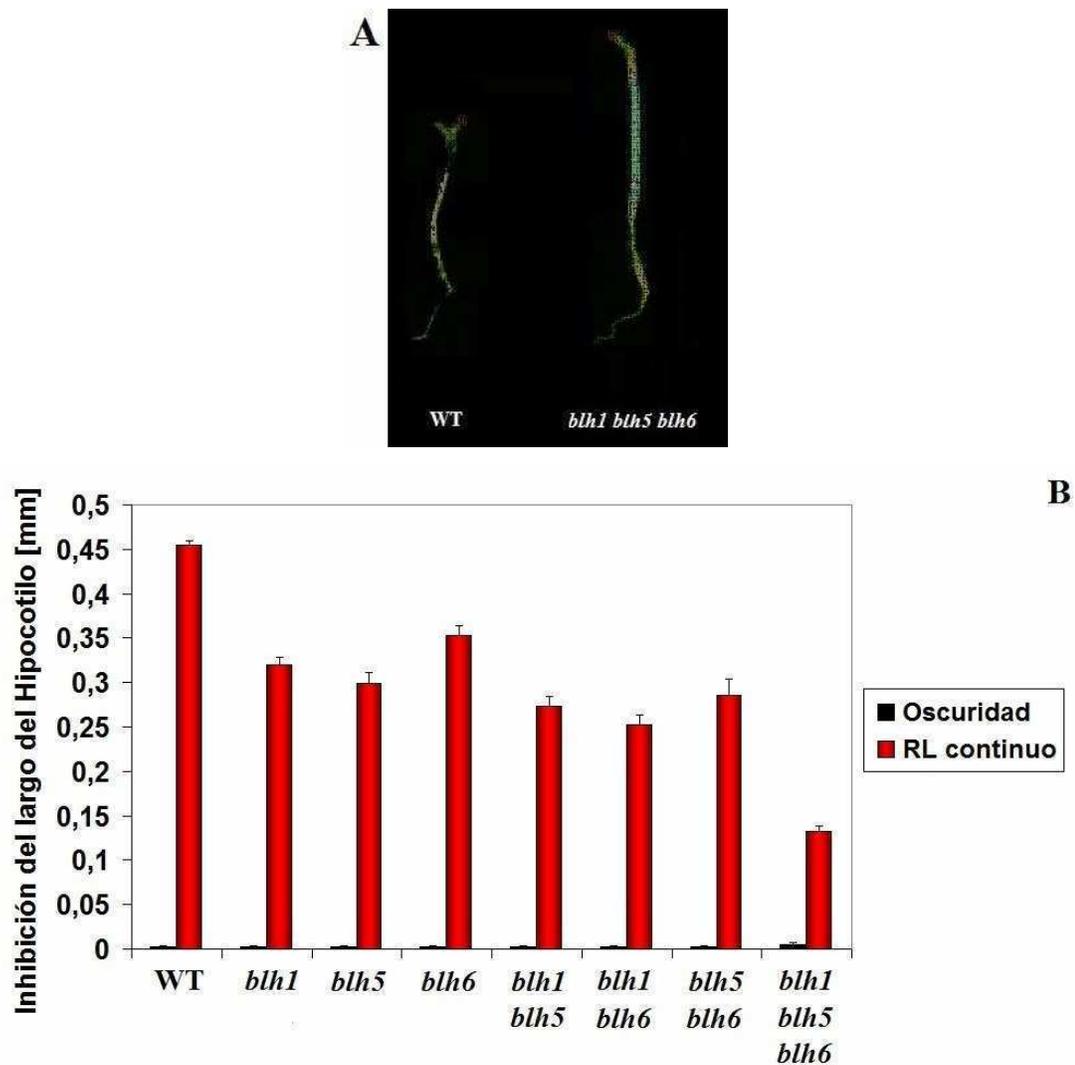


Figura 3.25: Inhibición del Largo del Hipocotilo en *blh1*, *blh5*, *blh6*, *blh1blh5*, *blh1blh6*, *blh5blh6* y *blh1blh5blh6*

Plántulas etioladas de *Arabidopsis* fueron expuestas a RL continuo o permanecieron en oscuridad. Los datos son los promedios \pm SE de 3 repeticiones independientes usando de 2 a 3 líneas mutantes homocigotas independientes para cada genotipo ($P < 0,001$). Los alelos mutantes fueron identificados usando el "primer" LBb1 (ABRC) con los "primers" correspondientes para cada inserción:

Para *blh1*: 5'- TTTCCAGCCGCTTAAGCATACA -3'

5'- AGCCCAATGGCGGACACTAAT -3'

Para *blh5*: 5'-TCTACTTGAAAGCGGCTCAAG-3'

5'-TACCTTATCCAAATCCCTCGG-3'

Para *blh6*: 5'-GTGCTCTTTGCTATCATGCAG-3'

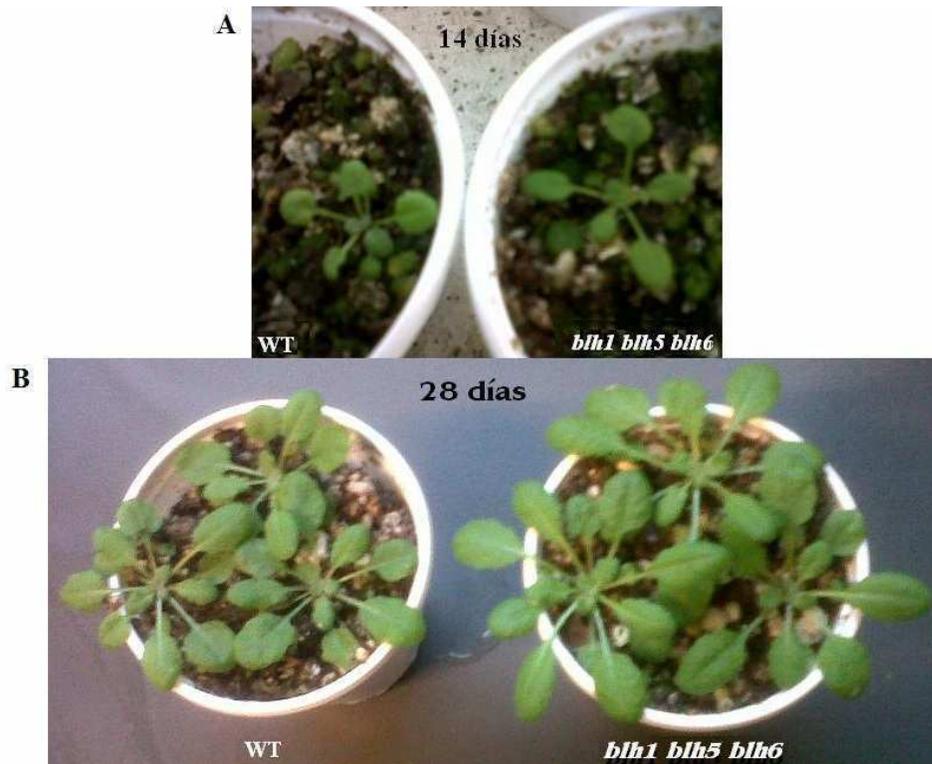
5'-ATGCTAGCAAGACAAACGGG-3'

A) Foto comparando el fenotipo salvaje con el fenotipo *blh1-blh5-blh6*.

B) Inhibición del largo del hipocotilo de la plántula salvaje y las distintas múltiples mutantes estudiadas.

Comparando el genotipo salvaje con las múltiples mutantes de *blh1*, *blh5* y *blh6*, se observó una menor inhibición del largo del hipocotilo en las simples (*blh1*, *blh5*, *blh6*) y las dobles mutantes (*blh1 blh5*, *blh1 blh6*, *blh5 blh6*), que se hizo más evidente en la triple mutante *blh1 blh5 blh6* (**Figura 3.25**).

El fenotipo de estas plantas mutantes no se vio limitado a las respuestas de plántulas durante la des-etiolación. En experimentos en que se midió el diámetro de la roseta sobre plántulas adultas de *Arabidopsis thaliana*, de genotipo salvaje y de las múltiples mutantes *blh1*, *blh5* y *blh6*, el diámetro de la roseta de la triple mutante *blh1 blh5 blh6* se ve significativamente aumentado cuando se lo compara con la planta salvaje (**Figura 3.26**). Las mutantes simple (*blh1*, *blh5*, *blh6*) y dobles (*blh1 blh5*, *blh1 blh6*, *blh5 blh6*), también presentan un aumento en el diámetro de su roseta, aunque no es tan importante como en la triple mutante (*blh1 blh5 blh6*).



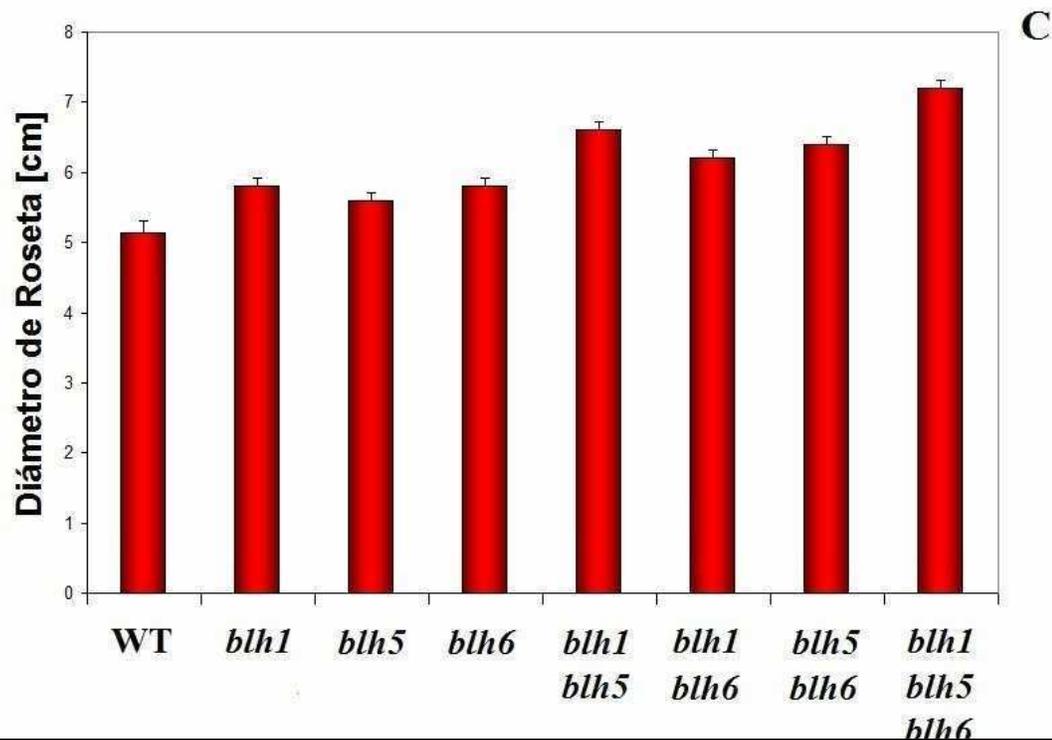


Figura 3.25: Diámetro de la Roseta en Plantas Adultas *blh1*, *blh5*, *blh6*, *blh1 blh5*, *blh1 blh6*, *blh5 blh6* y *blh1 blh5 blh6*

Plántulas etioladas de *Arabidopsis* fueron expuestas a RL continuo o permanecieron en oscuridad. Los datos son los promedios \pm SE de 3 repeticiones independientes usando de 2 a 3 líneas mutantes homocigotas independientes para cada genotipo ($P < 0,001$).

- A) Diámetro de la roseta en plantas salvajes y *blh1 blh5 blh6* a los 14 días de edad (momento en el cual las plántulas comenzaron a mostrar una evidente diferencia a nivel morfológico).
- B) Diámetro de la roseta en plantas salvajes y *blh1 blh5 blh6* a los 28 días de edad (momento previo a que comenzara a emerger el tallo de la plántula y a partir del cual se comenzó con la medición del diámetro de la roseta).
- C) Diámetro de la roseta de la plántula salvaje y las distintas múltiples mutantes estudiadas.

En base a los experimentos fisiológicos y morfológicos llevados a cabo sobre las múltiples mutantes de *blh1*, *blh5* y *blh6* aquí estudiadas, se puede concluir que BLH1, BLH5 y BLH6 actúan fisiológicamente de una manera aditiva sobre HIR inducido por RL continuo y sobre la morfología de las hojas.

DISCUSIÓN

El Motivo "TGGA"

Las plantas poseen distintos niveles de sensibilidad a la luz percibida por los fitocromos, que se manifiestan en tres llamados “modos de acción”: VLFR, LFR y HIR. Estos son imprescindibles para poder responder de modo diferencial a la luz en distintos contextos ambientales y de desarrollo (Casal *et al*, 2013). El objetivo principal de este trabajo era investigar la posible existencia de vías de señalización específicas para las HIR respecto de las VLFR de phyA. Para ello se procedió a determinar la ocurrencia de secuencias específicas para HIR en el promotor del gen *Lhcb1*2* de tabaco, que es un blanco compartido por VLFR, HIR y LFR previamente estudiado por nuestro laboratorio (Cerdán *et al*, 2000).

Mediante el estudio de deleciones sucesivas del promotor *Lhcb1*2* fusionado al gen de la β -glucuronidasa se pudo determinar una zona de 18 pb, que se encuentra entre las posiciones -152 y -134, donde se pierde la respuesta HIR pero se mantienen tanto las VLFR como las LFR (**Figura 3.6**). La realización de un estudio más exhaustivo mediante el uso de sustituciones consecutivas de 4 pb dentro de dicha región de 18 pb, permitió determinar que una secuencia de 4 pb, que corresponde al motivo "TGGA", localizada entre -135 y -138 en el promotor *Lhcb1*2* era imprescindible para la respuesta HIR, mientras que su mutación no afectaba ni la VLFR del phyA ni la LFR de phyB (**Figura 3.8**).

El estudio comparativo de la secuencia de promotores de genes *Lhcb* de distintas especies, indica que las secuencias más conservadas entre genes *Lhcb* corresponden a las denominadas "CAATbox", "TATAbox" y "GATAbboxes" en tándem (**Figura 4.1**). Las mutaciones en los sitios "AAAATCT", sitio de unión del factor CCA1 (Wang *et al*, 1997) y "GATAbboxes", sitios de unión del factor CGF-1 (Anderson *et al*, 1997), demostró que los mismos son necesarios para las tres respuestas del fitocromo: la LFR del phyB y las VLFR y HIR del phyA (**Figura 3.4**),

sugiriendo que los factores CCA1 y CGF-1 podrían participar de las respuestas de phyA (VLFR y HIR) y phyB (LFR).

Por otro lado, se observó que el motivo "TGGA" se encuentra altamente conservado en las secuencias de los promotores estudiados, en una posición también relativamente conservada respecto de los motivos "CAATbox" y "GATAbbox"; lo cual sugiere que el motivo "TGGA" o "motivo Hir" podría ser un sitio de unión conservado por selección natural (Wray *et al*, 2003).

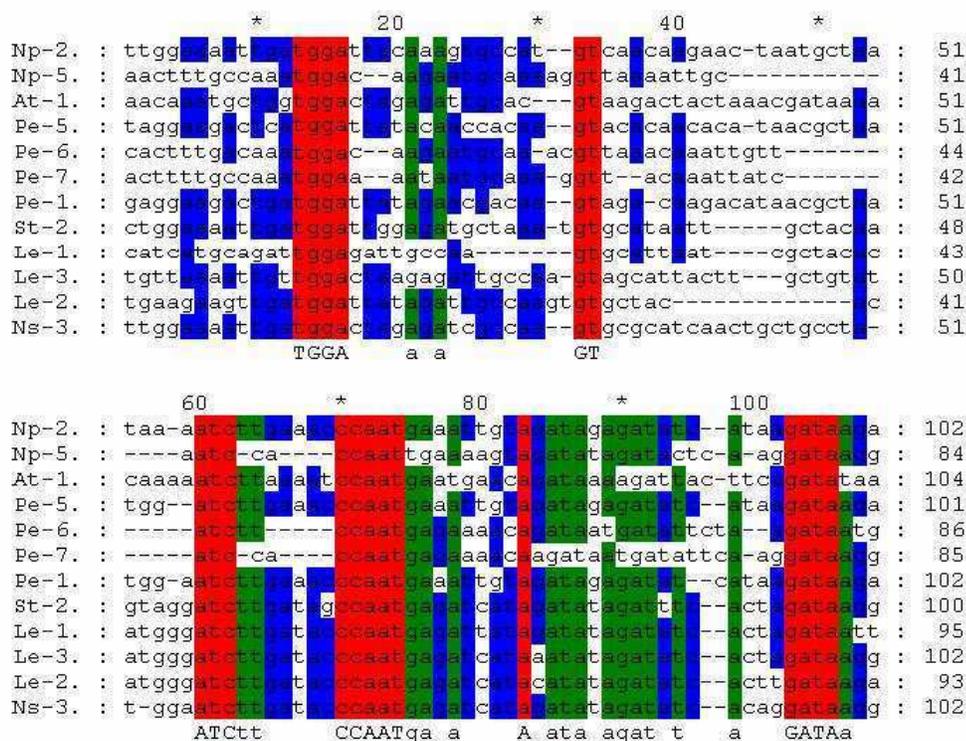


Figura 4.1: Comparación de Regiones Reguladoras de Diversos Genes *Lhcb*

Se muestra la presencia y la posición relativa del motivo "TGGA" en promotores de genes *Lhcb* de *Nicotiana plumbaginifolia* (Np), *Arabidopsis thaliana* (At), *Petunia* (Pe), *Solanum tuberosum* (St), *Solanum lycopersicon* (Le), y *Nicotiana sylvestris* (NS).

La comparación de secuencias se realizó con el programa CLUSTAL.

De este modo, se puede concluir que mientras existen secuencias consenso, necesarias para múltiples respuestas mediadas por los fitocromos, el motivo "TGGA" es necesario y específico para el HIR. También se puede inferir que existe más de un grupo de factores de transcripción para phyA: uno que es responsable de la HIR, que necesita la secuencia TGGA, y otro que es responsable de ambas, VLFR y HIR, que necesita de los motivos "CAATbox" y "GATAbox".

Identificación de la Proteína BLH1 Como el Factor de Transcripción que Interactúa con el Motivo Hir

Habiendo demostrado la existencia de un motivo específico para HIR en la zona regulatoria del promotor *Lhcb1*2* (primer objetivo de esta tesis), se procedió a buscar los factores de transcripción que podían unirse al motivo Hir en cadena de transducción para phyA responsable para la respuesta a RL continuo. Para ello se realizaron ensayos en simple híbrido en levaduras usando como "bait" varias combinaciones del motivo Hir, junto a una biblioteca de ADNc proveniente de plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en oscuridad. Utilizando una de dichas secuencias se identificó el factor de transcripción BLH1, que pertenece a la superfamilia de homeodominios TALE. Mediante posteriores experimentos en el sistema de levaduras se verificó la especificidad de este factor BLH1 por la secuencia Hir (**Figura 3.14**).

Cuando se realizó la comparación de secuencias de las 11 proteínas BLH, se observó que presentaban ciertas diferencias cuando se comparaba el dominio Bell, mientras que todas ellas presentaban el homeodominio de unión a ADN altamente conservado (**Figura 3.23B**). El sitio de unión de BLH1 presenta una alta correspondencia a la secuencia TGATXXATTA, la cual ha sido descrita como el sitio de unión de otros factores de transcripción con homeodominio (Wray *et al*, 2003).

Cuando se realizaron los experimentos para la confirmación de la interacción específica entre BLH1 y TGGGA, se observó que la supervivencia de las levaduras dependía de la cantidad de sitios de unión disponibles para el factor BHL1 (**Figura 3.12**). Esta observación se vio reforzada con el hecho de que cuando se reemplazaron las bases contiguas al motivo "TGGGA", obteniendo la secuencia TGGAGGT (nótese que esta secuencia suma otro sitio de unión TGGGA con sentido 3' a 5'), denominada motivo "super Hir" porque tiene una respuesta fisiológica del tipo HIR mayor a la normal (**Figura 3.16**), la misma manifestó conferir una unión para BLH1 en levaduras también mayor a la normal (**Figura 3.18**).

La fuerte interacción de BLH1 con la secuencia TGGAGGT (super Hir) es en sí misma interesante. Puede hipotetizarse que la unión de una molécula de BLH1 al motivo "TGGGA" con orientación 5' a 3', promueve formación de un dímero con otra molécula de BLH1, la cual termina uniéndose al motivo "TGGGA" con orientación 3' a 5'. De este modo, se conformaría un complejo BLH1-BLH1 unido a la secuencia casi palindrómica TGGAGGT; esta unión cooperativa entre proteínas BLH1 podría explicar el aumento en la respuesta al RL continuo (**Figura 4.2**). Esta idea se basa en un sistema para animales, donde se ha propuesto un modelo similar para la oncoproteína ETS-1, la cual transactiva el promotor de estromelisina-1 de ratas a través de la unión a una región palindrómica: la unión de la primer molécula de ETS-1 a la primera mitad del palíndrome ayuda al posicionamiento otra molécula de ETS-1 en la segunda mitad del palíndrome (Baillat *et al*, 2002). Por otro lado, existe evidencia de una posible homodimerización entre las proteínas BLH1: modelos por computación sugieren que una secuencia de aminoácidos en el N-terminal del homeodominio BEL1 (BEL1-LIKE) puede formar una α -hélice anfipática que podría estar implicada en las interacciones proteína-proteína (Reiser *et al*, 1995).

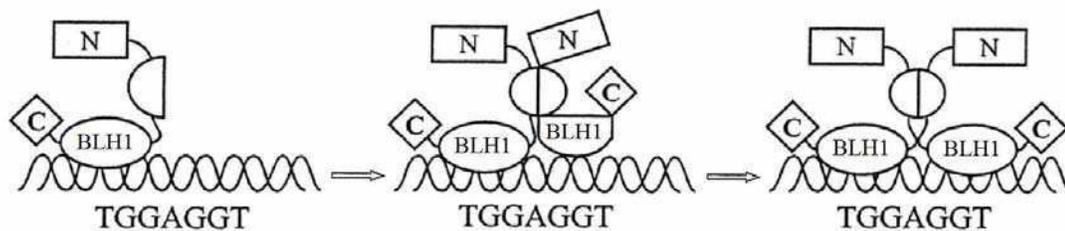


Figura 4.2: Modelo Propuesto para la Unión Cooperativa de las Proteínas BLH1 al Motivo "Super HIR"
Adaptado de Baillat *et al*, 2002

Función de BLH1

Conociendo que la HIR de *Lhcb1*2* requiere el motivo Hir (TGGA) y que el factor de transcripción BLH1 se pega al promotor de *Lhcb1*2* de manera dependiente de la presencia del motivo Hir, se procedió a estudiar si BLH1 era necesario para el HIR. Para ello se realizaron experimentos fisiológicos y bioquímicos, induciendo las respuestas LFR, VLFR y HIR en mutantes *blh1* de *Arabidopsis thaliana*. Bajo el tratamiento con RL continuo, se observó que la expresión del gen *Lhcb1*2* se encontraba disminuida en las mutantes *blh1*, respecto de la expresión en la planta salvaje. Por otro lado, la mutante *blh1* transformada con la construcción que tiene mutada el motivo "TGGA", presenta una respuesta HIR prácticamente nula (**Figura 3.20**). Es importante marcar el hecho de que cuando se expusieron las mutantes *blh1* a los tratamientos de oscuridad, pulsos de RL y R, presentaron valores normales tanto para la expresión de *Lhcb1*2* como para las VLFR y LFR de ese gen (**Figura 3.20**). En conjunto, los datos proveen evidencia a favor del impacto de BLH1 sobre la HIR del gen blanco a través del motivo "TGGA", no sólo por experimentos de pérdida de función (mutaciones del promotor que reducen el pegado de BLH1 o mutaciones del gen *BLH1* que reducen la respuesta HIR), sino también por la ganancia de función

(mutaciones del promotor que refuerzan el pegado de BLH1 al gen blanco que aumentan HIR).

El presente trabajo fue realizado con el promotor *Lhcb1*2* de tabaco expresado en *Arabidopsis thaliana*. Para investigar si BLH1 tiene efectos sobre los blancos propios de *Arabidopsis thaliana*, se evaluó la inhibición del alargamiento del hipocotilo, como una respuesta que no depende del reportero para su evaluación. Las mutantes *blh1* mostraron una menor HIR de inhibición del largo del hipocotilo pero valores normales de crecimiento en oscuridad, VLFR y LFR (**Figura 3.22**). Con estos resultados, se concluye que el HIR requiere BLH1, dado que plantas deficientes de dicho factor tienen específicamente afectada la respuesta HIR del phyA, sin presentar alteraciones para las VLFR mediadas por phyA o las LFR mediadas por phyB.

Como se había dicho anteriormente, las proteínas BELL, junto con las proteínas KNOX (KNAT para *Arabidopsis*), pertenecen a las proteínas TALE. Dichas proteínas son muy importantes para el desarrollo en diversos organismos, interactúan entre ellas y su modo de acción ha sido muy estudiado especialmente en insectos y animales (Banerjee-Basu S and Baxevanis, 2001; Mukherjee and Burglin, 2007).

En vegetales, la principal función de las proteínas KNOX es la arquitectura de la planta. En *Arabidopsis* existen ocho genes *KNOX*, los cuales se dividen en dos clases, basados en los patrones de expresión de los mismos. En la clase I se encuentran los genes *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*), *KNAT1* (*KNOTTED1-LIKE ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 1*), *KNAT2* y *KNAT6*, que se expresan principalmente en los meristemas, mientras que la clase II está formada por los genes *KNAT3*, *KNAT4*, *KNAT5* y *KNAT7*, involucrados en el desarrollo de la raíz (Reiser *et al*, 2000). Las proteínas KNOX se unen al ADN como heterodímeros con las proteínas BELL. Las proteínas BELL y KNOX comparten la misma secuencia consenso de unión al ADN, y cuando éstas se dimerizan, su afinidad por el ADN se ve aumentada (Bolduc *et al*, 2008), indicando que esta interacción sea probablemente

necesaria para cumplir su función biológica. En *Arabidopsis*, *BEL1* puede interactuar solamente con algunas pocas proteínas *KNOX*, lo que podría indicar que la formación de los distintos pares estaría relacionado con diferentes vías del desarrollo vegetal.

La familia de proteínas *BELL* se encuentra compuesta en *Arabidopsis* por 13 proteínas (*BLH1* – *BLH11*), *BELL1* y *ATH1*. Los genes *BELL* se encuentran expresados de manera relativamente general en la planta, tanto en meristemas como en tejidos diferenciados. Las proteínas *BELL* tienen dos motivos muy característicos: el homeodominio (HD) y el dominio Bell. El HD, muy conservado en las proteínas *TALE*, está representado por 90 aminoácidos que forman 3 α -hélices de unión al ADN; mientras que el dominio Bell es el que le da la característica principal a esta familia de proteínas. Es un dominio de 90 aminoácidos formado por 2 α -hélices, una mayor y una menor, que les permite interactuar con las proteínas *KNAT*. La formación de heterodímeros afecta en forma marcada la unión al ADN y la estabilidad de estas proteínas. Recientemente se ha reportado la interacción de *BLH1* con la proteína *KNAT3*; este complejo regula positivamente las respuestas mediadas por el ácido abscísico (fitohormona que regula las respuestas al stress hídrico de la planta, entre otras) al unirse y posteriormente activar el promotor *ABI3* (Kim *et al*, 2013).

Función de *BLH5* y *BLH6*

La comparación de las secuencias correspondientes al motivo Bell de las proteínas *BELL* de *Arabidopsis* indica que los motivos Bell de las proteínas *BLH5* y *BLH6* resultaron ser los más similares a los de *BLH1* (**Figura 3.23**). En los experimentos de inducción de HIR sobre las simples mutantes *blh1* y *blh6* y la doble mutante *blh1 blh6*, que contenían las construcciones *BLH1:GUS* y *BLH6:GUS*, se pudo observar que existe una regulación mutua entre los miembros de la familia *BLH*, dado que *BLH1* regula a *BLH6* del mismo modo que *BLH6* regula a *BLH1* bajo

condiciones de RL continuo (**Figura 3.24**). Por otro lado, experimentos fisiológicos y morfológicos sobre las múltiples mutantes de *blh1*, *blh5* y *blh6*, demostraron que BLH1, BLH5 y BLH6 tienen una función aditiva sobre HIR (**Figura 3.25**).

Integración de BLH1 a la Cadena de Transducción del phyA en HIR

El propósito de esta sección es incorporar los resultados sobre BLH1-motivo "TGGA"-respuesta HIR presentados en esta tesis al modelo actual de las respuestas HIR. El phyA es el fotorreceptor más abundante en la oscuridad (Hirschfeld *et al*, 1996), lo cual hace que sea uno de los más importantes en el proceso de la fotomorfogénesis. En oscuridad, el phyA se encuentra en su forma inactiva Pr, el cual en presencia de la luz se activa a Pfr. Luego, el Pfr interactúa con los factores FHY1 y FHL, los cuales median su ingreso al núcleo (Hiltbrunner *et al*, 2006, Genoud *et al*, 2008). Dos factores de transcripción, FHY3 y FAR1, determinan la expresión de *FHY1* y *FHL* (Kami *et al*, 2010). Una vez en el núcleo, la luz RL producen la fotoconversión del Pfr a Pr y la liberación de dicha forma inactiva del complejo FHY1-FHL. La forma libre e inactiva cambia nuevamente su conformación a Pfr frente a un nuevo evento absorción de luz (el tercero de la secuencia) (Rausenberger *et al*, 2011).

Dentro del núcleo, la molécula de phyA, activa y libre, interacciona con diversos factores de regulación de la fotomorfogénesis. La interacción con el factor PIF3 permite la fosforilación rápida del mismo y su posterior degradación a través del sistema ubiquitina-proteosoma (Al-Sady *et al*, 2008). Por otro lado, el factor HY5 tiene un importante rol en la respuesta de las plantas a la luz. En oscuridad, HY5 interacciona con COP1, lo cual produce la degradación de HY5 en el proteosoma (Osterlund *et al*, 2000). De este modo, el phyA media la salida de COP1 desde el núcleo hacia el citoplasma y permite la abundancia de HY5 en el núcleo (Osterlund and Deng, 1998). Este factor promueve la fotomorfogénesis interaccionando, de

forma directa o indirecta, con promotores de genes regulados por la luz y con otros factores de transcripción (Osterlund and Deng, 1998). Éstas serían dos vías de acción centrales del phyA durante las HIR, pero no exclusivas de phyA ni de HIR. Sin embargo, además de contribuir de manera directa a las HIR y a otras respuestas a la luz, al menos HY5 también contribuiría de manera más específica a las HIR vía BLH1. En efecto, el promotor del gen *BLH1* es un blanco directo de HY5 (Lee *et al*, 2007) y recientemente se ha encontrado que en las mutantes *hy5* está disminuida la expresión de *BLH1* (Dr Roberto Staneloni, comunicación personal), lo cual indicaría que es necesaria la presencia de HY5 para la expresión de *BLH1*. En consecuencia, se podría inferir que también es necesaria la presencia de phyA en el núcleo para inducir la expresión de *BLH1*.

Al final de la cadena de transducción de phyA, BLH1 interactúa con el motivo "TGGA" del gen *Lhcb1*2* y así induce la respuesta HIR, ya sea por unión simple o formando dímeros con otros factores de transcripción. En conclusión, existe suficiente evidencia que permite integrar a BLH1 en la cadena de transducción de señales iniciada por phyA bajo condiciones de HIR (**Figura 4.3**). Cabe destacar que dicha integración por lo menos es parcialmente diferente de la VLFR regulada por phyA y de la LFR regulada por phyB. De este modo, se puede concluir que algunos miembros de las proteínas TALE son reguladores específicos de las respuesta HIR mediadas por phyA en plantas.

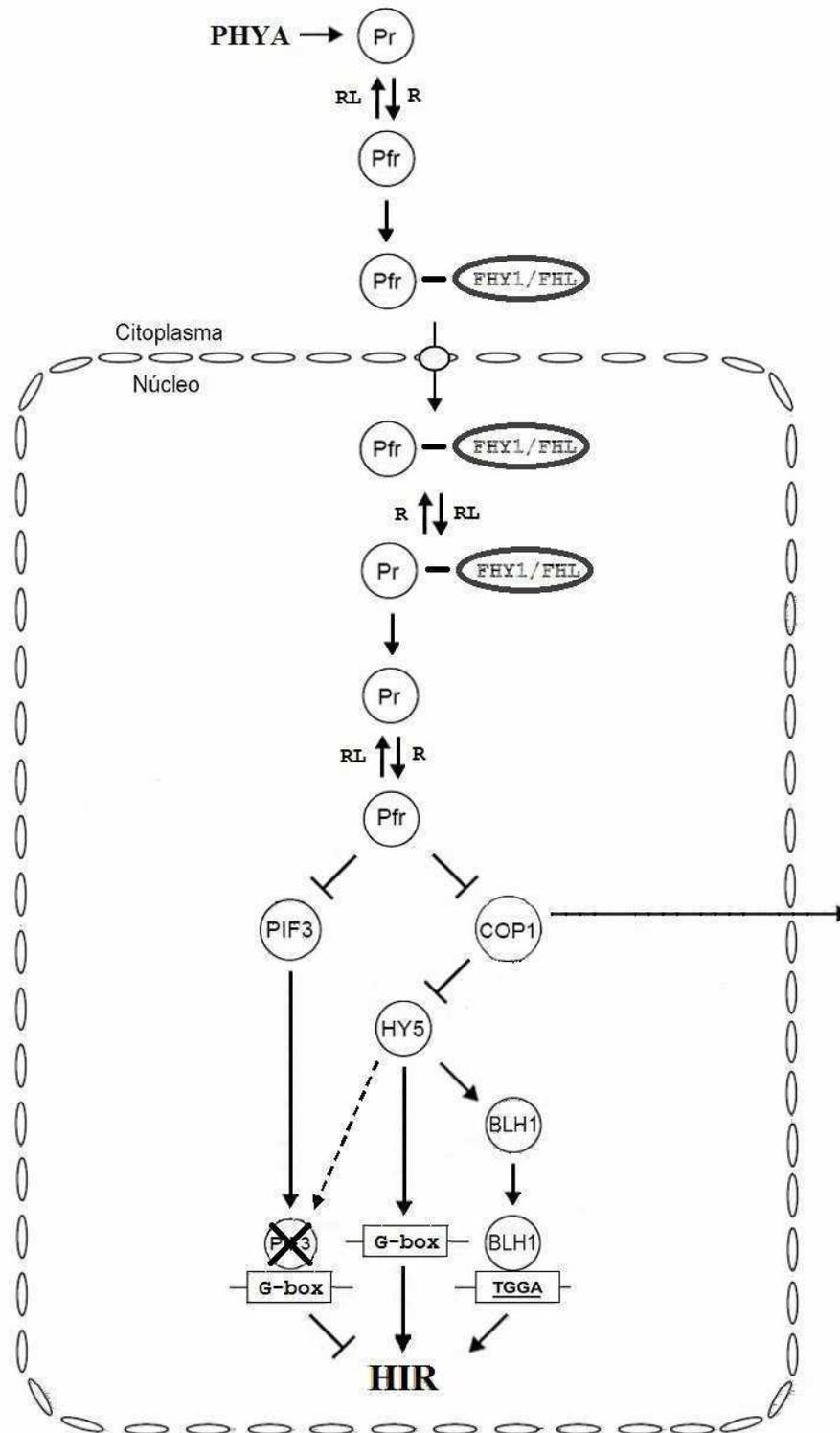


Figura 4.3: Esquema de la Putativa Cascada de Señalización de phyA para la Respuesta HIR

BIBLIOGRAFÍA

Al-Sady B, Ni W, Kircher S, Schafer E and Quail PH (2006). Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome mediated degradation. *Mol Cell* 4: 439-446.

Anderson SL, Somers DE, Millar AJ, Hanson K, Chory J and Kay SA (1997). Attenuation of phytochrome A and B signaling pathways by the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* 9: 1727–1743.

Baillat D, Begue A, Stehelin D and Aumercier M (2002). ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition. *J Biol Chem* 277: 29386–29398.

Banerjee-Basu S and Baxevanis AD (2001). Molecular evolution of the homeodomain family of transcription factors. *Nucleic Acids Res* 29: 3258-3269 (2001).

Baudry A, Ito S, Song YH, Strait AA, Kiba T, Lu S, Henriques R, Pruneda-Paz JL, Chua NH, Tobin EM, Kay SA and Imaizumi T (2010). F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *Plant Cell* 22: 606-622.

Bechtold N., Ellis J and Pelletier G (1993). In planta *Agrobacterium* mediates gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sel Paris* 316: 1194-1199.

Becker A, Bey M, Bürglin TR, Saedler H and Theissen G (2002). Ancestry and diversity of BEL1-like homeobox genes revealed by gymnosperm (*Gnetum gnemon*) homologs. *Dev Genes Evol* 212:452–457.

Bevan M (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12 (22): 8711–8721.

Bolduc N, Hake S and Jackson D (2008) Dual functions of the KNOTTED1 homeodomain: sequence-specific DNA binding and regulation of cell-to-cell transport. *Sci Signal* 1: e28.

Boylan MT and Quail PH (1991). Phytochrome A overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10806-10810.

Briggs WR and Olney MA (2001). Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol* 125: 85-88.

Byrne ME, Simorowski J and Martienssen RA (2002). ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis. *Devel* 129:1957–1965.

Cabrera y Poch H, Peto C and Chory J (1993). A mutation in the Arabidopsis DET3 gene uncouples photoregulated leaf development from gene expression and chloroplast biogenesis. *Plant J* 4: 6671–6682.

Casal JJ (1995). Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in Arabidopsis. *Planta* 196: 23–9.

Casal JJ (2000). Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem Photobiol* 71: 1-11.

Casal JJ (2013). Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu Rev Plant Biol* 64: 403-427.

Casal JJ, Candia AN and Sellaro R (2013). Light perception and signalling by phytochrome A. *J Exp Bot*: doi 10.1093

Casal JJ, Sanchez RA and Botto JF (1998). Modes of action of phytochromes. *J Exp Bot* 49: 127-138

Casal JJ, Sánchez RA, Di Benedetto AH and De Miguel LC (1991). Light promotion of seed germination in *Datura ferox* is mediated by a highly stable pool of phytochrome. *Photochem Photobiol* 53: 249–254.

Casal JJ, Yanovsky MJ and Luppi JP (2000). Two photobiological pathways of phytochrome A activity, only one of which shows dominant negative suppression by phytochrome B. *Photochem Photobiol* 71: 481–486.

Cerdán PD, Staneloni RJ, Casal JJ and Sánchez RA (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 PD, Staneloni RJ, Ortega J, Bunge MM, Rodríguez-Batiller MJ, Sánchez RA and Casal JJ (2000). Sustained but not transient phytochrome A signaling targets a region of a *Lhcb1*2* promoter not necessary for phytochrome B action. *Plant Cell* 12:1203–1211.

Cerdán PD, Yanovsky MJ, Reymundo FC, Nagatani A, Staneloni RJ, Whitelam GC and Casal JJ (1999). Regulation of phytochrome B signaling by phytochrome A and FHY1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18: 499–507.

Chen M, Chory J, and Fankhauser C (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* 38: 87-117.

Cherry JR, Hershey HP and Vierstra RD (1991). Characterization of tobacco expressing functional oat phytochrome. *Plant Physiol* 96: 775-785.

Chory J, Chatterjee M, Cook RK, Elich T, Fankhauser C, Li J, Nagpal P, Neff M, Pepper A, Poole D, Reed J and Vitart V (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12066-12071.

Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E and Briggs WR (1998). Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282: 1698-1701.

Clack T, Matthews S and Sharrock R (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: The sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. *Plant Mol Biol* 25: 413-417.

Dehesh K, Franci C, Parks BM, Seeley KA, Short TW, Tepperman JM and Quail PH (1993). Arabidopsis hy8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* 5: 1081-1088.

Deng XW and Quail PH (1999). Signalling in light-controlled development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 121-129.

Deng XW, Caspar T and Quail PH (1991). Cop1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev* 5: 1172-1182.

Fankhauser C and Chory J (1997). Light control of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 203-29.

Franklin KA and Quail PH (2010). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *J. Exp. Bot.* 61: 11-24.

Genoud T, Schweizer F, Tscheuschler A, Debrieux D, Casal JJ, Schäfer E, Hiltbrunner A and Fankhauser C (2008). FHY1 Mediates Nuclear Import of the Light-Activated Phytochrome A Photoreceptor. *PLoS Genetics*: DOI 10.1317.

Hackbusch J, Richter K, Muller J, Salamini F and Uhrig, J.F (2005). A central role of Arabidopsis thaliana ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proc Natl Acad Sc. USA* 102: 4908-4912.

Hiltbrunner A, Tscheuschler A, Viczián A, Kunkel T, Kircher S and Schäfer E (2006). FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* 47: 1023–1034.

Hirschfeld M, Tepperman JM, Clack T, Quail PH and Sharrock RA (1996). Coordination of phytochrome levels in phyB mutants of Arabidopsis as revealed by apoprotein-specific monoclonal antibodies. *Genetics* 149, 523-535.

Holm M, Ma LG, Qu LJ and Deng XW (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev* 16: 1247–1259.

Hooykaas PJJ and Shilperoort RA (1992). Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* 19: 15-38.

Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K and Quail PH (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 305: 1937–1941.

Jefferson, RA (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.

Jefferson RA, Kavanagh TA and Bevan MW (1987). GUS fusions: b-Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901–3907.

Jordan ET, Hatfield PM, Hondred D, Talon M, Zeevaart JAD and Vierstra RD (1995). Phytochrome A overexpression in transgenic tobacco. *Plant Physiol* 107: 797-805.

Kami C, Lorrain S, Hornitschek P and Fankhauser C (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* 91: 29-66.

Khanna R, Shen Y, Toledo-Ortiz G, Kikis E, Johannesson H, Hwang YS and Quail PH (2006). Functional profiling reveals that only a small number of phytochrome-regulated early-response genes in Arabidopsis are necessary for optimal deetiolation. *Plant Cell* 18: 2157–2171.

Kim D, Cho YH, Ryu H, Kim Y, Kim TH and Hwang I (2013). BLH1 and KNAT3 modulate ABA responses during germination and early seedling development in Arabidopsis. *Plant J* 76: 755-66.

Lariguet P and Dunand C (2005). Plant photoreceptors: phylogenetic overview. *J Mol Evol* 61: 559-569.

Lee J, He K, Stolc V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I and Deng XW (2007). Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* 19: 731-749.

Leivar P, Monte E, Al-Sady B, Carle C, Storer A, Alonso JM, Ecker JR and Quail PH (2008). The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* 20: 337–352.

Lin C, Yang H, Guo H, Mockler T, Chen J and Cashmore AR (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc Natl Acad Sci. USA* 95: 2686-2690.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.

Mancinelli, AL (1994). The physiology of phytochrome action. *Photomorphogenesis in Plants*.

Martínez-García JF, Huq E and Quail PH (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288: 859–863.

McCormac AC, Whitelam GC, Boylan MT, Quail PH and Smith H (1992). Contrasting responses of etiolated and light-adapted seedlings to red:far-red ratio: a comparison of wild type, mutant and transgenic plants has revealed differential functions of members of the phytochrome family. *J Plant Physiol* 140: 707-714.

Misera S, Müller J A, Weiland-Heidecker U and Jürgens G (1994). The FUSCA genes of Arabidopsis: negative regulators of light responses. *Mol Gen Genet* 244: 242-252.

Monte E, Tepperman JM, Al-Sady B, Kaczorowski KA, Alonso JM, Ecker JR, Li X, Zhang Y and Quail PH (2004). The phytochrome-interacting transcription

factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16091–16098.

Mukherjee K and Burglin TR (2007). Comprehensive analysis of animal TALE homeobox genes: new conserved motifs and cases of accelerated evolution. *J. Mol. Evol.* 65: 137-153.

Murray MG and Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–4325.

Nagy F, Kircher S and Schäfer E (2001). Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *J Cell Sci* 114: 475-480.

Nemhauser J and Chory J (2002). Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*.

Ni M, Tepperman JM and Quail PH (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 95: 657–667.

Osterlund MT and Deng XW (1998). Multiple photoreceptors mediate the light-induced reduction of GUS-COP1 from Arabidopsis hypocotyl nuclei. *Plant J* 16: 201–208.

Osterlund MT, Hardtke CS, Wei N and Deng XW (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* 405: 462–466.

Pacín M, Legris M and Casal JJ (2014). Rapid decline in nuclear COP1 abundance anticipates the stabilisation of its target HY5 in the light. *Plant Physiology*: pp 113.234245.

Parks BM and Quail PH (1993). *Hy8*, a new class of Arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* 5: 39-48.

Quail PH (1991). Phytochrome: a light- activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annu Rev Genet* 25: 389-409.

Quail, PH (1994). Photosensory perception and signal transduction in plants. *Curr Op Gen Dev* 4: 652-661.

Rausenberger J, Tscheuschler A, Nordmeier W, Wüst F, Timmer J, Schäfer E, Fleck C and Hiltbrunner A (2011). Photoconversion and nuclear trafficking cycles determine phytochrome A's response profile to far-red light. *Cell* 146: 813–825.

Reiser L, Modrusan Z, Margossian L, Samach A, Ohad N, Haughn GW and Fischer RL (1995). The BELL1 gene encodes a homeodomain protein involved in pattern formation in the Arabidopsis ovule primordium. *Cell* 83: 735-742.

Reiser L, Sánchez-Baracaldo P and Hake S (2000). Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes. *Plant Mol Biol* 42: 151-166.

Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F and Ulm R (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 Protein. *Science* 332: 103-106.

Sakamoto K and Nagatani A (1996). Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J* 10: 859–868.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*.

Selleri L, DiMartino J, van Deursen J, Brendolan A, Sanyal M, Boon E, Capellini T, Smith KS, Rhee J, Pöpperl H, Grosveld G and Cleary ML (2004). The TALE homeodomain protein Pbx2 is not essential for development and long-term survival. *Mol Cell Biol* 24: 5324–5331.

Shen Y, Khanna R, Carle CM and Quail PH (2007). Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant Physiol* 145: 1043–1051.

Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X and Quail PH (2001). Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9437-9442.

Terry MJ (1997). Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant Cell Environ* 20, 740-745.

Tinland B (1996). The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci* 1: 178–183.

Tobin, EM and Silverthorne, J (1985). Light regulation of gene expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 569-593.

Wang ZY, Kenigsbuch D, Sun L, Harel E, Ong MS and Tobin EM (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis *Lhcb* gene. *Plant Cell* 9: 491–507.

Wang ZY and Tobin EM (1998). Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93(7): 1207-17.

Wang H and Deng XW (2002). Phytochrome signaling mechanism. *The Arabidopsis Book*.

Wang H and Deng XW (2003). Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci* 8: 172-178.

Wei N and Deng XW (1996). The role of the COP/DET/FUS genes in light control of arabidopsis seedling development. *Plant Physiol* 112: 871-878.

Whitelam GC, Johnson E, Peng J, Carol P, Anderson ML, Cowl JS and Harberd NP (1993). Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5: 757-768.

Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M, Rockman MV and Romano LA (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 20: 1377-1419.