



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Identificación de componentes tempranos de la transducción  
de señales lumínicas en *Arabidopsis thaliana* a través del uso de  
técnicas de fosfoproteómica.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área de Ciencias Biológicas

**Lic. Denise Soledad Arico**

Directora:

Dra. María Agustina Mazzella

Director asistente:

Dr. Diego L. Wengier

Consejero de Estudios:

Dr. Guillermo Alonso

Lugar de Trabajo:

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y  
Biología Molecular "Dr. Héctor Torres" (INGEBI)

*Buenos Aires, Marzo 2020*

# ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
AGRADECIMIENTOS	7
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	9
1. La luz como señal inductora de respuestas adaptativas.	9
2. Fitocromos	11
3. Criptocromos	12
4. Fototropinas	13
5. Eventos tempranos de señalización por luz.	13
5.1. De la percepción lumínica a la reprogramación génica.	13
5.2. Eventos Post-transcripcionales regulados por luz.	16
5.3. Eventos Post-traduccionales regulados por luz.	16
5.3.1. Regulación por fosforilación en cascadas de señalización por luz.	16
5.3.2. Rol de las fosfatasa en la transducción de señales lumínicas.	18
6. Crecimiento del hipocótilo: etiolación vs. desetiolación.	19
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Material vegetal.	23
2. Condiciones de crecimiento de las plantas.	24
3. Experimento de fosfoproteómica.	24
3.1. Extracción de proteínas con fenol.	25
3.2. Cuantificación de Proteínas.	26
3.3. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa. LC-MS/MS.	26
3.4. Tratamiento de datos y análisis estadísticos.	27
3.5. Análisis bioinformáticos.	27
4. Ensayos bioquímicos y de biología molecular.	28
4.1. Genotipificación de plantas mutantes por inserción de T-ADN.	28
4.1.1. Extracción de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.	29
4.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	29
4.1.3. Extracción de ARN con Kit QIAGEN y síntesis de ADNc usando Super-Script IV.	30
4.1.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.	30
4.2. PCR cuantitativa en tiempo real (Real time qPCR, RT-qPCR).	31
5. Clonados.	31
5.1. Clonado por restricción y ligada.	31
5.1.1. Amplificación de secuencias por PCR.	31
5.1.2. Restricción de insertos y vectores.	32
5.1.3. Purificación de insertos y vectores.	32
5.1.4. Ligaciones inserto - vector.	33
5.1.5. Transformación de células electro-competentes.	33
5.1.6. Condiciones de cultivo de E. coli.	33
5.1.7. Confirmación de clones positivos.	34
5.1.8. Purificación de plásmidos a partir de colonias bacterianas (Miniprep).	34
5.1.9. Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción.	35
5.1.10. Secuenciación de las construcciones plasmídicas.	35
5.2. Clonado por recombinación Gateway.	35

5.3.	Conservación de cepas bacterianas.	36
5.4.	Cepas y condiciones de cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	36
5.5.	Transformación de bacterias <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	36
6.	Obtención de plantas transgénicas.	37
6.1.	Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	37
6.2.	Selección de plantas transgénicas.	38
7.	Ensayos fisiológicos.	38
7.1.	Mediciones del largo del hipocotilos.	38
7.2.	Estadística en ensayos fisiológicos.	39
8.	Ensayo de tinción GUS (actividad $\beta$ -glucuronidasa).	39
9.	Microscopía Confocal.	40
10.	Ensayos fisiológicos con Orzalina.	40
11.	Ensayos con MG132.	41
12.	Líneas CRISPR-CAS9.	41
13.	Estudio <i>in silico</i> de la expresión del gen CIP7	43
CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL FOSFOPROTEOMA INDUCIDO POR LUZ EN ARABIDOPSIS THALIANA. DEPENDENCIA E INDEPENDENCIA DE FOTORRECEPTORES		45
1.1	Introducción.	45
1.2	Resultados.	49
1.2.1	Diseño del experimento.	49
1.2.2	La luz induce cambios en la fosforilación de 41 fosfopéptidos. 6 en forma dependiente de fotorreceptores.	52
1.2.3	Análisis de los sitios de fosforilación identificados.	60
1.2.4	Fosfopéptidos cuyo estado de fosforilación en luz depende de la presencia de fotorreceptores.	61
1.3	Discusión.	67
1.3.1	El ensayo de fosfoproteómica a gran escala es robusto y permite el descubrimiento de nuevas proteínas señalizadoras.	67
1.3.2	Predicción de quinasas responsables de la fosforilación por luz.	70
1.3.3	Fosfoproteínas que varían por genotipo y no por luz.	74
1.3.4	Fosfoproteínas reguladas por luz y fotorreceptores.	75
CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN DE CIP7 (COP1-INTERACTING FACTOR 7)		76
2.1	Introducción.	76
2.2	Resultados.	79
2.2.1	Estudio del patrón de expresión de CIP7.	79
2.2.1.1	CIP7 se expresa en oscuridad en cotiledones, hipocotilos y raíces.	79
2.2.1.2	La expresión de CIP7 decrece gradualmente con la exposición a la luz.	81
2.2.2	Estudio de la localización subcelular de CIP7.	84
2.2.2.1	CIP7 se localiza en estructuras del citoesqueleto.	84
2.2.2.2	CIP7 colocaliza con marcadores de microtúbulos.	87
2.2.2.3	Tratamientos con orzalina desagregan la unión de CIP7 a los microtúbulos.	89
2.2.2.4	CIP7 presenta 24 motivos putativos de unión a microtúbulos distribuidos en dos dominios estructurales.	90
2.2.2.5	El dominio C-Terminal de CIP7 es necesario para la unión a microtúbulos.	93
2.2.3	Estudio de la función biológica de CIP7.	94
2.2.3.1	CIP7 promueve el crecimiento del hipocótilo en oscuridad.	94
2.2.3.2	CIP7 participaría en la estabilidad de los microtúbulos.	100
2.2.4	CIP7 es una proteína de asociación a microtúbulos que estaría regulada	103

por luz vía proteasoma.	
2.3 Discusión.	108
2.3.1 CIP7 exhibe un patrón de expresión en plántulas etioladas característico de reguladores positivos del crecimiento.	108
2.3.2 CIP7 se expresa en oscuridad y se reprime por la luz.	109
2.3.3 CIP7 es una proteína de asociación a microtúbulos.	110
2.3.4 La promoción del crecimiento en oscuridad regulada por CIP7 involucra la interacción con microtúbulos.	112
2.3.5 ¿Es CIP7 una MAP convencional o multifuncional?	114
2.3.6 Regulación post-traducciona l de CIP7 mediada por 26S proteasoma.	117
2.3.7 Modelo hipotético	118
ANEXO I. ISTL5, UNA PROTEÍNA INVOLUCRADA EN EL TRAFICO VESICULAR CUYA DESFOSFORILACION INDUCIDA POR LUZ DEPENDE DE LOS FOTORRECEPTORES.	121
AI.1 Introducción.	121
AI.2 Resultados.	124
AI.2.1 ISTL5 se expresaría en los ápices meristemáticos de tallos y raíces, y en polen.	124
AI.2.2 ISTL5-YFP se localiza en vesículas pequeñas cuando se expresa heterológamente en células de <i>Nicotiana benthamiana</i> .	124
AI.2.3 ISTL5 actuaría como un regulador negativo de la señalización por luz roja.	126
AI.3 Conclusión.	128
ANEXO II. LAS PLANTAS HETEROCIGOTAS DE LAS MUTANTES POR T-DNA DE CIP7 PRESENTAN HIPOCOTILOS ALTOS EN OSCURIDAD	129
AII.1 Introducción.	129
AII.2 Resultados.	130
AII.2.1 La presencia simultánea de un alelo salvaje y otro mutante por T-ADN de CIP7 exacerba la longitud del hipocótilo.	130
AII.3 Conclusiones.	135
DISCUSIÓN GENERAL	136
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

## RESUMEN

Las modificaciones post-traduccionales proveen mecanismos de respuestas rápidas frente a estímulos en contraste con la reprogramación génica que ocurre en una mayor escala temporal. La fosforilación es una modificación frecuente en la transducción de señales lumínicas en plantas. Con el objetivo de identificar aquellas proteínas cuyo estado de fosforilación cambia en respuesta a la luz, se llevó a cabo un estudio a gran escala de LC-MS/MS sobre el fosfoproteoma de plántulas etioladas de *Arabidopsis thaliana* inducidas por luz a tiempos cortos. Logramos identificar 37 proteínas cuyo estado de fosforilación cambia con la luz. Dado nuestro interés en la transducción de señales mediadas por fotorreceptores, nos enfocamos en 5 de estas proteínas cuya fosforilación es regulada por luz y dependiente de fotorreceptores. Una de ellas es CIP7 (“COP1-INTERACTING PROTEIN 7”), una proteína descrita en un único reporte como un factor de transcripción de localización nuclear que interacciona con el represor de la fotomorfogénesis COP1 (“CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1”), y cuyo transcripto es inducible por luz. En nuestro ensayo, la Serina 915 de CIP7 sufre una desfosforilación inducida por luz en presencia de al menos alguno de los cuatro fotorreceptores más importantes durante la desetiación de plántulas (fitocromo A, fitocromo B, criptocromo 1 y/o criptocromo 2). Para estudiar si CIP7 participa en eventos tempranos de fotomorfogénesis, llevamos adelante su caracterización funcional y fisiológica. Reporteros transcripcionales *pCIP7::GUS* en plántulas etioladas de 5 días, revelaron que el promotor de CIP7 es activo en oscuridad en cotiledones y zonas de elongación de hipocotilo y raíz. Estos ensayos junto con resultados de experimentos RT-qPCR mostraron que la exposición prolongada a la luz inhibe la expresión de *CIP7*. Análisis de co-localización, revelaron que CIP7-YFP se localiza en microtúbulos corticales. También observamos que mutantes por CRISPR-Cas9 de *CIP7* pierden la capacidad de elongar el hipocotilo en oscuridad. Estos resultados difieren de aquel anteriormente propuesto y sugieren que CIP7 sería un promotor del crecimiento del hipocotilo en oscuridad mediante la regulación de la dinámica de microtúbulos.

**Palabras clave:** Fosfoproteoma – Fototransducción de señales – “COP1-INTERACTING-PROTEIN 7” – Microtúbulos.

## ABSTRACT

Post-translational modifications provide rapid response mechanisms against stimuli in contrast to gene reprogramming that occurs on a larger time scale. Phosphorylation is a frequent modification during the phototransduction in plants. In order to identify those proteins whose phosphorylation status changes in response to light, a large-scale study of LC-MS/MS was carried out on the early light-induced phosphoproteome of *Arabidopsis thaliana* etiolated seedlings. We identified 37 proteins that significantly change their phosphorylation state with light. Given our interest in signal transduction mediated by photoreceptors, we focused on 5 of these proteins whose phosphorylation is regulated by light and dependent on photoreceptors. One of them is CIP7 (COP1-interacting protein 7), a protein described in a single report as a nuclear transcription factor that interacts with the COP1 photomorphogenesis repressor (Constitutive photomorphogenesis 1), and whose transcript is light inducible. In our experiments, CIP7 presents a phospho-site, Serine 915, that undergoes a light-induced dephosphorylation in the presence of at least one of the four most important photoreceptors during seedling de-etiolation (phytochrome A, phytochrome B, cryptochrome 1 and/or cryptochrome 2). To study whether CIP7 participates in early photomorphogenesis events, we carried out its functional and physiological characterization. *pCIP7p::GUS* transcriptional reporters in 5-day etiolated seedlings, revealed that the *CIP7* promoter is active in the dark, in cotyledons as well as hypocotyl and root elongation areas. These experiments supported by RT-qPCR assays showed that prolonged exposure to light inhibits the expression of *CIP7*. Co-localization analysis revealed that CIP7-YFP is located in cortical microtubules. We also observed that CRISPR-Cas9 *cip7* mutant lines lose the ability to elongate the hypocotyl in the dark. These results differ from those that were previously reported and suggest that CIP7 would be a promoter of hypocotyl growth in darkness by regulating microtubule dynamics.

**Key words:** Phosphoproteome – Light signaling transduction - COP1-Interacting-Protein 7 – Microtubules.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi directora, la Dra. María Agustina Mazzella, quien ha sabido hacer de sus ideas un gran proyecto.

Ha sabido decidir, cuando mi inexperiencia me lo impedía.

Ha sabido creer, cuando yo ya no creía.

Ha sabido confiarme su proyecto, haciéndome sentir artífice del mismo.

Agradezco a mi co-director el Dr. Diego Wengier, quien de forma altruista, potencia cuanto idea, proyecto y persona esté a su alcance. Es una dicha que hayas sido parte de mi formación científica. Espero sientas lo valioso que sos en un equipo.

Agradezco al Intituto (INGEBI-CONICET) y quienes lo conforman, que ha sido mi lugar durante tantos años y siempre me he sentido apreciada. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, de la que me enorgullece enormemente haber sido alumna y docente.

Y ese lugar del cosmos, que es el 201, donde mate a mate confluyen ideas, ambiciones, frustraciones, discusiones, convicciones... amistad. En ese lugar, donde un minuto de insensatez puede ser la alegría más grande o el advenimiento del caos... Allí están las personas que día a día hacen que todo sea posible. Gracias: Jorge, Leo, Mari, Laura, Lean, Ana, Sofi, Esteban, Lu, Julián, Flor, Fran, Noe, Nacho, Nico... los que siguieron su camino, los que se están incorporando y los compañeros de m<sup>2</sup> FBA.

Eterno agradecimiento a esas personas incondicionales que son mis papás, por sus valores y entereza. Ustedes hacen que todo valga la pena.

*A butterfly flapping its wings in Brazil can produce a tornado in Texas*

Edward Lorenz

Lecture in annual meeting AAAS

December 1972

## **ABREVIATURAS**

CIP7, "COP1-INTERACTING PROTEIN 7"

cry1, criptocromo 1

cry2, criptocromo 2

d, días

ISTL5, "INCREASED SODIUM TOLERANCE-LIKE 5"

LB, Luz blanca

min, minutos

O, Oscuridad

PHOT1, fototropina 1

phyA, fitocromo A

phyB, fitocromo B

RTqPCR, *Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction*

WT, plantas salvajes

YFP, Yellow Fluorescent Protein



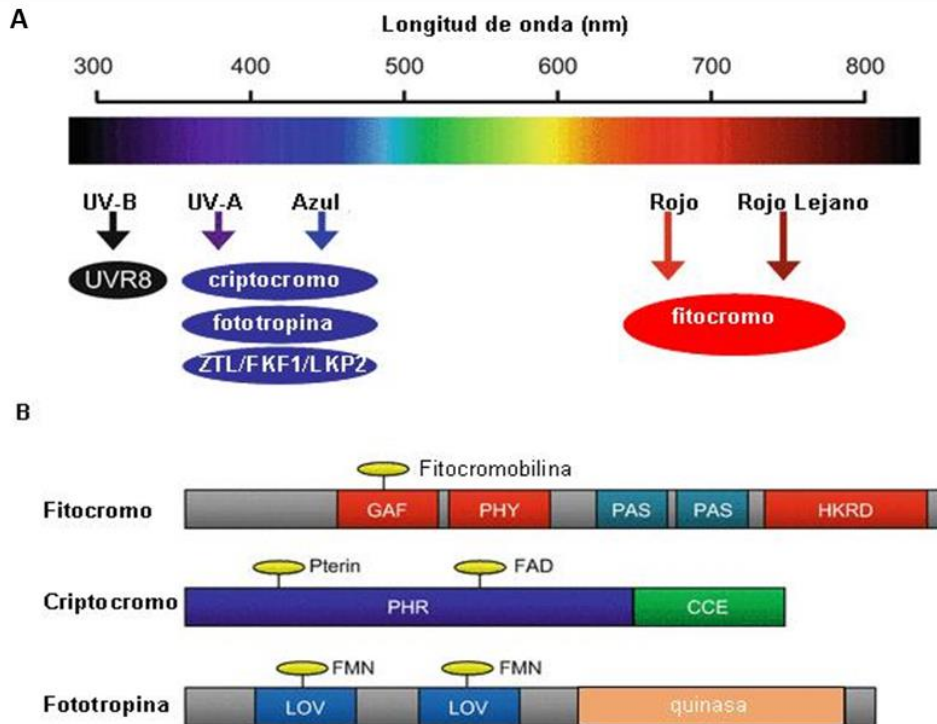
## INTRODUCCIÓN

### 1. La luz como señal inductora de respuestas adaptativas.

El ambiente lumínico es determinante para que las plantas logren cumplir su ciclo de vida exitosamente. La luz no sólo constituye un recurso energético, sino también una fuente de información esencial para que cada planta mantenga su homeostasis. Tener la capacidad de percibir los distintos estímulos lumínicos, transducir esas señales y generar respuestas rápidas, condiciona irrevocablemente la supervivencia y adaptabilidad al entorno.

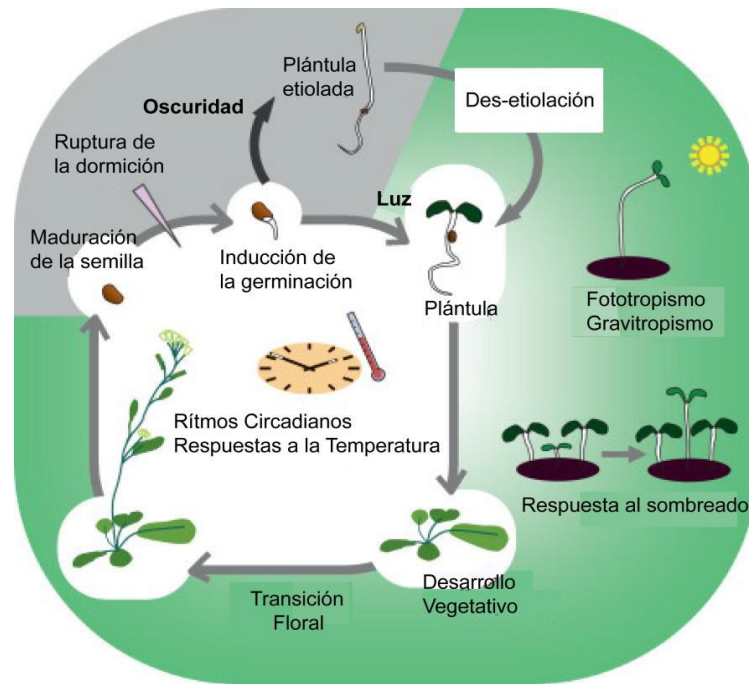
La amplia diversidad de señales lumínicas se basa en la combinación de distintas características: calidad (composición en longitudes de onda), cantidad (flujo e irradiancia), periodicidad (frecuencia de captación del estímulo), duración (tiempo total de exposición) y dirección de la luz. Los fotorreceptores son los responsables de captar los distintos estímulos lumínicos, y en consecuencia desencadenar complejas redes de señalización que resultan en respuestas moleculares, bioquímicas, fisiológicas y morfológicas.

En *Arabidopsis thaliana*, existen cinco fotorreceptores pertenecientes a la familia multigénica de los fitocromos (phyA--phyE) capaces de percibir luz roja ( $\lambda = 600-700\text{nm}$ ) y roja lejana ( $\lambda = 700-800\text{nm}$ ) (Kami et al., 2010). La luz UV-A/azul ( $\lambda = 315-400\text{nm}$ ) es absorbida por criptocromos (cry1, cry2 y cry3), fototropinas (phot1, phot2) y Zeitlupes ("ZEITLUPE", ZTL; "FLAVIN BINDING KELCH REPEAT", FKF1; "LOV KELCH PROTEIN", LKP2) (Kami et al., 2010). La luz UV-B ( $\lambda = 280-315\text{nm}$ ) es monitoreada por el fotorreceptor "UV RESISTANCE LOCUS 8" (UVR8) (Christie et al., 2012; Rizzini et al., 2011) (Fig. I.1).



**Figura 1.1.** A. Espectro de acción de los fotorreceptores en plantas. B. Esquema que detalla los dominios más importantes para cada familia de fotorreceptores que aparecen en esta tesis. Abreviaturas: “cGMP SPECIFIC PHOSPHODIESTERASES”, “ADENYNYL CICLASES”, *Fh1A* (GAF); “PHYTOCHROME DOMAIN” (PHY); *PER-Arnt-SIM* (PAS); “HISTIDINE KINASE RELATED DOMAIN” (HKRD); “PHOTOLYASE HOMOLOGOUS REGION” (PHR), “FALVINE ADENINE DINUCLEOTIDE” (FAD), “CRYPTOCHROME C-TERMINAL EXTENSION” (CCE), “LIGHT OXYGEN VOLTAGE” (LOV), “FLAVIN MONONUCLEOTIDE” (FMN). Adaptado de Higuchi y Hisamatsu, 2016.

Cuando las plántulas emergen de la superficie del suelo en búsqueda de un ambiente lumínico favorable, la luz activa el programa de desarrollo fotomorfogénico o desetiación. El *phyA*, *phyB*, *cry1*, y el *cry2* en menor medida, son los fotorreceptores más importantes durante la desetiación. Estos fotorreceptores regulan además la germinación de las semillas (Arana et al., 2014), la apertura del gancho apical (Mazzella et al., 2014), la densidad estomática (Boccalandro et al., 2009; Kang et al., 2009), la elongación de tallos y pecíolos (Kami et al., 2010), la floración y los ritmos circadianos (Kami et al., 2010; Cerdán y Chory, 2003; Sullivan y Deng, 2003; Yanovsky et al., 2000). Además, las fototropinas regulan los procesos de fototropismo, el movimiento del cloroplasto y la apertura de los estomas (Fankhauser and Christie, 2015; Briggs, 2014).



**Figura 1.2. Fotomorfogénesis en Arabidopsis.** El ambiente lumínico provee a la planta de señales durante todo su ciclo de vida. Luego de la germinación bajo la superficie del suelo, las plántulas siguen un patrón de crecimiento etiolado en oscuridad, o se desetiolan y se desarrollan como una planta fotosintéticamente activa. La luz afecta el crecimiento y desarrollo de las plántulas durante todo su ciclo de vida (imagen tomada de Kami et al., 2010).

## 2. Fitocromos.

Los fitocromos son dímeros solubles, cuyo peso molecular es aproximadamente de 250 KDa. Una propiedad sin precedentes que presentan los fitocromos, es la fotorreversibilidad, entendida como la interconversión entre dos conformaciones. Los fitocromos sintetizados en oscuridad en la forma inactiva Pr, son capaces de absorber principalmente luz roja desencadenando cambios conformacionales que llevan a la forma activa Pfr. A su vez, la forma Pfr es capaz de captar principalmente luz de color rojo lejano, revirtiendo a la forma original Pr. Cada subunidad consiste en una holoproteína, formada por una apoproteína y su cromóforo (fitocromobilina) (Fig 1.1). La absorción lumínica provoca una isomerización del cromóforo, para que el extremo proteico C-terminal, conteniendo los dominios de regulación, dimerización y ubiquitinación interactúe con efectores involucrados en diversas cascadas de transducción de señales (Song et al., 2018; Sharrock, 2008; Rockwell et al., 2006).

La estructura del fitocromo ha sido predicha en base a estudios por cristalografía. La región fotosensora está compuesta por los dominios “cGMP SPECIFIC PHOSPHODIESTERASES”, “ADENYNYL CYCLASES”, *Fh1A* (GAF); “PHYTOCHROME DOMAIN” (PHY) y *PER-Arnt-SIM* (PAS) (Fig I.1). El dominio GAF une el cromóforo. La región regulatoria C-terminal está compuesta por el dominio PAS y un dominio “HISTIDINE KINASE RELATED DOMAIN” (HKRD) (Fig I.1). (Revisado en Kami et al., 2010; Sharrock, 2008).

### **3. Criptocromos.**

Los criptocromos se componen de un cromóforo fotoexcitable (“FLAVIN ADENYL DINUCLEOTIDE”, FAD) unido de forma no covalente al extremo N-terminal de una apoproteína, dominio llamado “PHOTOLYASE HOMOLOGOUS REGION” (PHR) también encargado de la homodimerización. En el extremo C-terminal se encuentra el “CRYPTOCHROME C-TERMINAL EXTENSION” (CCE) que corresponde al efector (revisado en Liu et al., 2011) (Fig. I.1). Cabe destacar que secundariamente, el dominio PHR es capaz de unirse a otro cromóforo denominado pterin (Fig. I.1).

Un criptocromo fotoexcitado modifica su estado de fosforilación; hecho imprescindible para su activación, ya que induce cambios conformacionales que promueven interacciones entre el dominio CCE y efectores que actúan río abajo en la cascada de transducción de señales. Asimismo, la fosforilación dependiente de luz azul gatilla la ubiquitinación y posterior degradación de estos fotorreceptores como mecanismo de regulación. *cry2* es el más lábil por lo que actúa a bajos flujos de luz azul (Zuo et al., 2012). *cry1* cumple un rol preponderante en el proceso de desetiación mediada por luz azul, mientras que *cry2* está involucrado en la regulación de la floración en respuesta al fotoperíodo (Liu et al., 2011). *cry3* es una proteína *cry-DASH* (*Drosophila-Arabidopsis-Synechocystis-Human*) que participa en la reparación de daños en el ADN inducidos por luz UV (Pokorny et al., 2008; Selby and Sancar, 2006).

## 4. Fototropinas.

Las fototropinas (phot1 y phot2) son fotorreceptores de luz azul involucrados en respuestas tales como fototropismo, movimiento de cloroplastos, inhibición del crecimiento del hipocótilo y apertura estomática (Christie et.al., 2015). Las fototropinas están compuestas por dos motivos fotosensores *Light-Oxygen-Voltage* (LOV) amino-terminales (LOV1 y LOV2) y un dominio quinasa en el extremo C-terminal (Christie et al., 2015). La luz azul provoca cambios conformacionales en estos fotorreceptores que activan su dominio quinasa provocando su autofosforilación; evento esencial para mediar todas sus respuestas (Petersen et al., 2017). A su vez, la luz induce múltiples fosforilaciones incluyendo las serinas en el *loop* de activación, que constituyen el mecanismo a través del cual las señales lumínicas se transducen en las correspondientes respuestas fototrópicas (Inoue et al., 2011, 2008).

## 5. Eventos tempranos de señalización por luz.

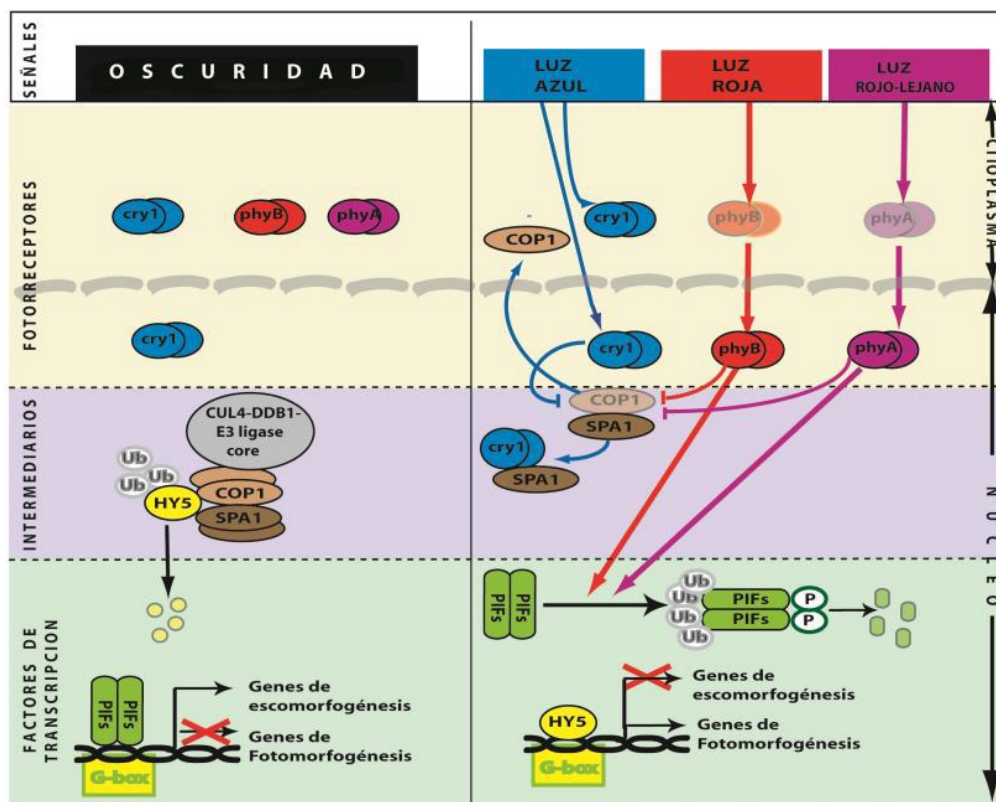
### 5.1. De la percepción lumínica a la reprogramación génica.

En oscuridad, los fotorreceptores se encuentran inactivos. phyA y phyB forman homodímeros de localización exclusivamente citoplasmática, a diferencia de cry1 que se ubica tanto en citoplasma como núcleo (Wu and Spalding, 2007) y cry2 que siempre localiza en núcleo (Guo et al., 1999). En estas condiciones, co-existen dos vías que reprimen la fotomorfogénesis. Una de estas vías de represión está mediada por la E3 ubiquitina ligasa “CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1” (COP1) (Jiao et al., 2007; Saijo et al., 2003) que es un integrador clave de las redes de fototransducción de señales. En oscuridad, COP1 se localiza en el núcleo y forma un complejo activo con las proteínas “SUPPRESSOR OF phyA-105 1” (SPA1) y “CULLIN 4-DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1”(CUL4-DDB1) E3 ligasa (Lau and Deng, 2012), el cual cataliza la unión de ubiquitina a activadores de la desetiación, favoreciendo así su degradación vía proteasoma. Entre sus proteínas blanco más importantes se encuentran: el factor de transcripción que induce la desetiación en plántulas, “ELONGATED HYPOCOTYL 5” (HY5) (Osterlund et al., 2000), “HY5 HOMOLOG” (Holm et al., 2002) y el factor de transcripción que interviene en el escape al sombreado, “LONG HYPOCOTYL IN FAR-

RED 1" (HFR1) (Jang et al., 2005), entre las más importantes (Fig I.3). En concreto, COP1 actúa como un regulador maestro de la transición entre etiolación y desetiolación en plantas, constituyendo un represor central de la fotomorfogénesis (Hoecker, 2017).

Por otro lado, los "PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS" (PIFs) son factores de transcripción que se unen a fitocormos (Al-Sady et al., 2006; Bauer et al., 2004; Khanna et al., 2004; Park et al., 2004). Los PIFs inducen simultáneamente la expresión de genes responsables de la escotomorfogénesis y reprimen aquellos genes de respuesta a la luz (Leivar y Quail, 2011; Duek y Fankhauser, 2005). Los PIFs, en forma de dímeros, se unen a elementos G-box en promotores de sus genes blanco (Zhang et al., 2013; Leivar et al., 2009; Shin et al., 2009; De Lucas et al., 2008). Allí compite con factores de transcripción que activan la fotomorfogénesis, como HY5, ya que ambos se unen a los mismos motivos G-box (Chen et al., 2013; Lee et al., 2007) (Fig I.3).

La percepción de luz provoca la activación de los fotorreceptores y relocalización de los mismos al núcleo (Klose et al., 2015). Una vez allí, fitocromos y criptocromos activos convergen en la desrepresión de la fotomorfogénesis (Fig I.3).



**Figura I.3. Modelo simplificado de la percepción de luz y señalización durante la desetioliación.** En oscuridad (izquierda), los fotorreceptores están inactivos. El HY5, junto a otros factores de transcripción promotores de la fotomorfogénesis, son ubiquitinados por el complejo COP1-SPA1 y degradados. Los PIFs promueven la escotomorfogénesis. La luz (derecha) activa a los fotorreceptores que en su forma activa en el núcleo reducen la actividad de COP1, permitiendo incrementar los niveles de HY5. También en el núcleo los fotorreceptores reducen la actividad de los PIFs. Las líneas con punta de flechas indican activación y las líneas con punta de barra de T indican represión. (Adaptado de Mazzella et al., 2014).

La interacción de phyA y al menos phyB con las proteínas PIFs resulta en su fosforilación y subsecuente degradación por el sistema proteasoma, hecho que reduce la actividad de los PIFs sobre sus promotores blanco (Leivar and Monte, 2014; Pham et al., 2018). Esto permite incrementar la actividad de los factores de transcripción que promueven la desetioliación, como HY5. También, en altos flujos de luz azul, los crys interactúan con PIF5 y regulan negativamente su actividad (Pedmale et al., 2016).

A su vez, en presencia de luz, phyA, phyB y cry1 reprimen la actividad de la proteína COP1 (Podolec and Ulm, 2018; Liu et al., 2011), el complejo COP1- SPA1 se desagrega (Liu et al., 2011) y se favorece la translocación de COP1 hacia el citoplasma (Pacín et al., 2014; Osterlund et al., 1999). De esta manera, los niveles nucleares de reguladores positivos de la fotomorfogénesis aumentan desencadenando la desetioliación. De esta manera, durante el pasaje de la escotomorfogénesis a la fotomorfogénesis, la luz induce una reprogramación masiva del transcriptoma afectando alrededor del 20% de los genes (Pham et al., 2018; Shi et al., 2018; Casal and Yanovsky, 2005; Jiao et al., 2003; Tepperman et al., 2001). En concreto, la percepción lumínica gatilla la represión de las vías represoras mediadas por PIFs y COP1, conduciendo a un cambio drástico en la expresión de genes que activan el programa que gobierna el desarrollo de las plantas en la luz. Además, la señalización por fotorreceptores no sólo conduce a una reprogramación de la transcripción de genes, sino que también tiene efectos regulatorios a nivel post-transcripcional y post-traduccionales.

## **5.2. Eventos Post-transcripcionales regulados por la luz.**

Recientes análisis por secuenciación masiva de ARN (*RNA-seq.*) revelaron que el *splicing* alternativo es relevante en plantas, particularmente en respuesta a cambios ambientales. Se ha demostrado que la luz induce el *splicing* alternativo, y los fitocromos influyen de alguna manera en este evento (revisado en Cheng and Tu, 2018). En *Arabidopsis* los fitocromos regulan el *splicing* alternativo (Shikata et al., 2014) y esto mismo se observó para *Physcomitrella patens* (Shih et al., 2019). A pesar de haber identificado numerosos factores de *splicing* que interaccionan directamente con fitocromos (Xin et al., 2017; Shikata et al., 2012), no se descarta que los efectos sobre el *splicing* alternativo sean una consecuencia metabólica indirecta de la desetiología o una combinación de ambos (Cheng and Tu, 2018; Hartmann et al., 2016). La desetiología viene acompañada no sólo de profundos cambios en la abundancia y *splicing* de transcritos, sino también de efectos a nivel proteico (Legris et al., 2019).

## **5.3 Eventos Post-traduccionales regulados por la luz.**

### **5.3.1 Cascadas de señalización de la luz reguladas por fosforilación.**

La fosforilación de proteínas es un mecanismo reversible que resulta de la acción antagónica entre enzimas que agregan (quinasas) o remueven (fosfatasas) grupos fosfato, principalmente en aminoácidos tales como serina, treonina y/o tirosina. El balance entre ambos tipos de enzimas permite una regulación dinámica de la actividad catalítica, estabilidad, activación, localización y funcionalidad. Se estima que alrededor de un tercio de las proteínas codificadas por el genoma de *Arabidopsis* podrían ser blancos de fosforilación y la sumatoria de sitios fosforilables estaría entre 1 y 2 millones. Sin embargo, solo una pequeña minoría tendría relevancia biológica (Li et al., 2015).

Numerosas redes de señalización involucran cambios en el estado de fosforilación como medio para transducir efectivamente diferentes estímulos. Existen reportes que evidencian casos de regulación de proteínas por fosforilación en respuesta a la luz. Un ejemplo lo constituye la fosforilación diferencial de HY5 que determina su degradación



mediada por COP1. En oscuridad, COP1 tendría mayor afinidad por la forma no fosforilada de HY5 (que es la isoforma con mayor actividad transcripcional) y por lo tanto el sustrato preferido para degradación (Hardtke et al., 2000). En presencia de luz, COP1 se reprime permitiendo que se acumule rápidamente la isoforma no fosforilada y activa de HY5 (Hardtke et al., 2000). En contraste con HY5, HFR1 también es reconocido y degradado por COP1 pero en su versión fosforilada (Duek et al., 2004). La luz también puede regular la localización subcelular de los factores de transcripción a través de la fosforilación. Por ejemplo, la fosforilación mediada por fitocromo del factor de transcripción “COMMON PLANT REGULATORY FACTOR 2” (CPRF2) en el citosol regularía la relocalización del mismo hacia el núcleo (Kircher et al., 1999).

Dado que los eventos de fosforilación proveen un poderoso mecanismo que conecta la percepción de la luz con la respuesta final, la transducción de señales lumínicas podría involucrar la actividad quinasa intrínseca de algunos fotorreceptores. La estructura de los fitocromos presenta un dominio histidina-quinasa (Fig. 1.1), típico de sensores de bacterias (Schneider-Poetsch, 1992). Estudios realizados con fitocromos recombinantes demostraron que los fitocromos serían parálogos de quinasas de histidina, pero con especificidad por Serina/Treonina (Yeh y Lagarias, 1998). El phyA de avena (AsphyA) cataliza su autofosforilación en residuos serina en respuesta a rojo lejano (Lapko et al., 1997). *In vitro*, los fitocromos son capaces de fosforilar otras proteínas como la “PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1” (PKS1) (Fankhauser et al., 1999). Además, estudios *in vivo* demostraron que la luz roja lejana induce la fosforilación y consecuente degradación de PIF3 a través de la actividad intrínseca quinasa de phyA de Arabidopsis. La fosforilación de PIF3 por phyA se vio significativamente inhibida en plantas transgénicas que expresan AsphyA con actividad quinasa deficiente (Shin et al., 2016). A diferencia de los fitocromos, los criptocromos no tienen actividad quinasa, por lo que la fosforilación de proteínas mediada por luz azul sería indirecta. cry1 y cry2 son regulados por fosforilación dependiente de luz azul (Shalitin et al., 2003, 2002). Las quinasas “CASEIN KINASE” 1.3 y 1.4 (CK1.3 y CK1.4) catalizan la fosforilación de CRY2 en Arabidopsis (Tan et al., 2013). Sin embargo, los criptocromos no presentan ningún dominio del tipo quinasa, y no hay datos sólidos que sustenten alguna participación de los criptocromos como quinasas. En contraste, PHOT1 y PHOT2 de Arabidopsis tienen la capacidad de autofosforilarse *in vitro* bajo luz

azul (Inoue et al., 2008; Christie et al., 1998). Además PHOT1 es capaz de fosforilar *in vitro* a la proteína “PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 4” (PKS4) (Demarsy et al., 2012), mientras que tanto phot1 como phot2 también fosforilan *in vitro* a la quinasa “BLUE LIGHT SIGNALING 1” (BLUS1) (Takemiya and Shimazaki, 2016; Takemiya et al., 2013).

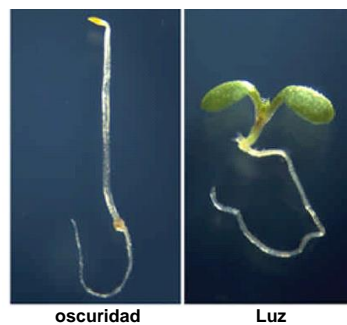
Las múltiples fosforilaciones que sufre PIF3 no pueden ser explicadas únicamente por la intervención directa de los fitocromos actuando como quinasas. Recientemente, se ha identificado a una familia de proteínas quinasas nucleares reguladas por la luz, denominadas “PHOTOREGULATORY PROTEIN KINASES” (PPKs). PPK1 interacciona con PIF3 y phyB en respuesta a la luz, catalizando la transfosforilación *in vivo* de los múltiples sitios que contiene PIF3 (Ni et al., 2017). Además, las PPKs son reclutadas en el “CIRCADIAN-RELATED-EVENING-COMPLEX” (integrado por: “EARLY FLOWERING 4” o ELF4, “EARLY FLOWERING 3” o ELF3, y “LUX ARRHYTHMO” o LUX) de manera dependiente del phyB fotoactivado (Huang et al., 2016) e intervienen también en la regulación de la actividad de cry2 (Liu et al., 2017b). Cabe destacar que otros PIFs, tal como PIF7, interaccionan con phyB aunque sin ser fosforilados ni degradados (Leivar et al., 2008). Esto sugiere diferentes mecanismos de regulación por parte de los fitocromos y que la fosforilación es crítica y específica para desencadenar la respuesta adecuada.

### **5.3.2. Rol de las fosfatasaS en la transducción de señales lumínicas.**

Los eventos de desfosforilación también son relevantes en la regulación y estabilización de intermediarios clave en la transducción de señales lumínicas, aunque menos explorados. Hasta el momento se ha identificado a la proteína “TYPE 1 PROTEIN PHOSPHATASE 4” (TOPP4) como la fosfatasa que desfosforila y estabiliza a PIF5 (Yue et al., 2016). También, se demostró que tanto PIF3 como PIF4 son capaces de interaccionar directamente con los dominios catalíticos FYPP1 y FYPP3 de la fosfatasa “PROTEIN PHOSPHATASE 6” (PP6). Se ha observado que la luz acelera la degradación de PIF4 en las dobles mutantes *fypp1 fypp3*, por lo que la desfosforilación mediada por PP6, aumentaría la actividad de PIF4 en oscuridad, contribuyendo a la represión de la fotomorfogénesis (Yu et al., 2019).

## 6. Crecimiento del hipocótilo: etiolación vs. desetiolación.

Los eventos moleculares anteriormente descritos regulan finalmente la respuesta de las plantas al ambiente lumínico. Tras germinar bajo la superficie del suelo, las plántulas en oscuridad crecen siguiendo un patrón de desarrollo escotomorfogénico. Cada plántula elonga su hipocótilo como única oportunidad de alcanzar la luz. Así, los cotiledones permanecen cerrados formando un gancho apical que protege al meristema apical del vástago. Estas características (sumadas a una corta raíz primaria) describen al fenotipo etiolado que presentan las plántulas en oscuridad; propio de la escotomorfogénesis, y óptimo para emerger a la superficie (Fig. 1.4) (Jaillais y Vert, 2012; Fankhauser y Chory, 1997).



**Figura 1.4.** Etiolación vs. desetiolación. Plántulas de *Arabidopsis* crecidas durante 3 d en completa oscuridad o luz.

Este crecimiento en oscuridad está finamente regulado por factores internos como hormonas y rearrreglos en el citoesqueleto entre los más importantes. Las giberelinas y los brassinosteroides son las principales hormonas que regulan el crecimiento etiolado. Mutantes deficientes en la biosíntesis o señalización de estas fitohormonas presentan un fenotipo desetiolado en oscuridad (Clouse, 2011; Alabadí et al., 2004). La familia de represores nucleares del crecimiento, llamados DELLAs, es represora de la vía de las giberelinas. Las proteínas DELLA interactúan directamente con los PIFs, incluyendo PIF4, reduciendo su actividad (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). En oscuridad, los altos niveles de la hormona giberelina desestabilizan a las DELLAs, promoviendo así el crecimiento del hipocotilo, ya que en esta condición PIF4 puede unirse a sus genes blanco de promoción de la elongación celular. Por otro lado, "BRASSINAZOLE RESISTANT 1" (BZR1) es un factor de transcripción que regula la

escotomorfogenesis en la vía de los brassinosteroides (Wang et al., 2012b). BZR1 es fosforilado e inactivado por la quinasa involucrada en la señalización por brasinosteroides “BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2” (BIN2) (He et al., 2002). Particularmente PIF4 interacciona con BZR1 (Oh et al., 2012) y ambos factores de transcripción comparten los mismos genes blanco involucrados en la elongación celular (Oh et al., 2012). BIN2 también fosforila a PIF4 lo que favorece su degradación vía proteasoma (Bernardo-García et al., 2014). Los brassinosteroides inactivan a BIN2 lo que conduce a la defosforilación de BZR1 y PIF4 promoviendo la elongación celular. Además, las DELLAs también interactúan e inactivan a BZR1 (Bai et al., 2012). Es decir que, las giberelinas, los brasinosteroides y las señales lumínicas están integradas por varias interacciones a través de sus factores de transcripción claves (Oh et al., 2014).

En contraposición al crecimiento etiolado, cuando las plántulas perciben la luz, arrestan la elongación del hipocótilo, abren los cotiledones y desarrollan la raíz para anclarse al suelo (Fig. 1.4) (Monte et al., 2007; Whitelam and Halliday, 2007; Chen et al., 2004). Así ocurre la desetiación y comienza la etapa autotrófica de la planta. Como se mencionó anteriormente (sección 5.1), la luz activa a los principales fotorreceptores que reducen la actividad de los PIFs y COP1 permitiendo la acumulación de HY5 (regulador negativo de la escotomorfogenesis). Además, la luz reduce los niveles de giberelinas (Alabadí et al., 2008; Achard et al., 2007), permitiendo la acumulación de las DELLAs. Así se reprimen tanto PIF4 como de BZR1, dos factores claves para la elongación celular.

Además, la vía de los brassinosteroides y la luz convergen en la regulación de la desetiación. El factor de transcripción “GATA-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR 2” (GATA2) regula positivamente la fotomorfogenesis. En oscuridad, BZR1 reprime la expresión de GATA2 y COP1 promueve la degradación de GATA2 asegurando el crecimiento etiolado (Luo et al., 2010). La luz, inactiva a COP1 permitiendo la acumulación de GATA2. Además, cuando los niveles de BZR1 son disminuidos se produce una sobre-expresión de GATA2, favoreciendo la fotomorfogenesis (Luo et al., 2010).

Este pasaje del desarrollo escotomorfogénico al fotomorfogénico implica un cambio en la tasa de expansión celular del hipocótilo. Dado que el hipocótilo tiene un

origen completamente embrionario, su crecimiento ocurre sólo por expansión celular y es fuertemente dependiente de la condición lumínica. Por esta razón, el hipocotilo de plántulas etioladas es un modelo ideal para estudiar mecanismos y regulación de la expansión celular (Boron and Vissenberg, 2014).

Estudios genéticos y fisiológicos revelaron que los microtúbulos corticales tienen un rol en la regulación de la expansión y elongación celular a través de la orientación de las microfibrillas de celulosa que componen la pared celular (Lloyd, 2011; Buschmann y Lloyd, 2008; Sedbrook y Kaloriti, 2008).

En oscuridad, condición en la que los hipocótilos se encuentran en plena elongación celular, los microtúbulos corticales se orientan de forma transversal en la célula, es decir perpendiculares al eje de crecimiento. En cambio, cuando se arresta la elongación del hipocótilo en luz, los microtúbulos se disponen de manera oblicua o longitudinal en la célula (Li et al., 2011; Lloyd, 2011; Le et al., 2005; Dixit y Cyr, 2004). La reorganización de los microtúbulos de transversales a oblicuos o longitudinales, responde a la luz y consecuentemente inhibe el crecimiento del hipocótilo (Sambade et al., 2012; Le et al., 2005; Ueda y Matsuyama, 2000).

Las proteínas de asociación a microtúbulos (MAPs) regulan la organización y dinámica de los microtúbulos corticales. Se han reportado numerosas MAPs que condicionan el crecimiento del hipocótilo a través de la reorientación de los microtúbulos (Buschmann y Lloyd, 2008; Sedbrook y Kaloriti, 2008; Kaloriti et al., 2007). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen a dicho proceso.

Ya en 1980 con el trabajo de Koornneef et.al., aparecieron las primeras mutantes de fenotipos fotomorfogénicos, a partir de la búsqueda de plantas que exhibían deficiencias en la respuesta del hipocótilo a la luz. Desde allí hasta la fecha, se ha abordado la búsqueda de nuevos componentes que participan en la señalización por luz mediante distintas estrategias principalmente de genética directa y reversa, y transcriptómica. Dado que la fosforilación es un evento temprano que regula la señalización por luz decidimos utilizar las estrategias recientemente desarrolladas de fosfoproteómica para identificar nuevos componentes relevantes en la fototransducción de señales.

## HIPÓTESIS

*La fosforilación/desfosforilación de proteínas es un proceso relevante durante la señalización por luz. Las fosfoproteínas que cambian su estado de fosforilación en respuesta a un pulso de luz blanca, mediante la acción de fotorreceptores, estarían involucradas en eventos tempranos de desetiología.*

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Identificar nuevos componentes tempranos de la transducción de señales inducidas por luz a través de técnicas de fosfoproteómica a gran escala. Caracterizar aquellas fosfoproteínas que hayan cambiado su estado de fosforilación en respuesta a la luz como parte de las vías de señalización desencadenadas por los principales fotorreceptores que intervienen en la desetiología de las plantas.

### Objetivos Específicos

- 1. Obtención y caracterización de perfiles de expresión de fosfoproteínas en respuesta a luz (Capítulo 1)**
  - Experimento a gran escala de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem.
- 2. Identificación de las proteínas diferencialmente fosforiladas (Capítulo 1).**
  - Fosforilación diferencial en respuesta a la luz.
  - Dependencia de fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y/o cry2.
- 3. Caracterización funcional de aquellas proteínas identificadas (Capítulo 2 y Anexo I).**
  - Patrón de expresión.
  - Localización subcelular.
  - Función biológica.
  - Mecanismos de acción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material vegetal.

En los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* según se detalla a continuación:

- Para el ensayo de fosfoproteómica a gran escala que comprende el capítulo 1, se emplearon los siguientes genotipos:

- WT ecotipo *Landsberg erecta* (Ler).
- *phyA phyB cry1 cry2 (phyA-201 phyB-1 cry1-1 fha-1)* (Mazzella et. al., 2001)

Los *loci* de los mutantes utilizados se identifican con los siguientes códigos (AGI, *Arabidopsis gene identifier*): *PHYA*, At1g09570; *PHYB*, At2g18790; *CRY1*, At4g08920; *CRY2*, At1g04400.

- En los experimentos que comprenden el capítulo 2, se utilizará el WT en ecotipo Col y diversas líneas mutantes y transgénicas:

- *cip7-1* (SALK\_120077)
- *cip7-2* (SALK\_015796)

Ambas líneas mutantes por inserción de T-ADN corresponden al locus At3g27430 y fueron obtenidas del *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC, Ohio, EE.UU).

- *cop1-6*
- *cip7-1 cop1-6*

Doble mutante generada a partir de cruces. Ambos alelos se llevaron a homocigosis. La mutante *cop1-6* corresponde al locus At2g32950 y se fue obtenida del ABRC.

- *ist15-1* (SALK\_107893)
- *ist15-2* (SALK\_130226)

Ambas líneas mutantes por inserción de T-ADN corresponden al locus At1g19710 y fueron obtenidas del instituto ABRC de Ohio.

- *cip7\_ed1*
- *cip7\_ed2*
- *cip7\_ed3*

3 líneas mutantes por edición CRISPR-Cas9 generadas como parte del trabajo de la presente tesis.

- *pCIP7::GUS* y control con plásmido vacío (pBG GUS)
- *p35S::CIP7-YFP* (líneas independientes 1 y 2) (pH35GY)

- *p35S::YFP-CIP7* (pH35YG)
- *p35S::YFP* (pH35GS)
- *pCIP7::CIP7-YFP* y control con plásmido vacío (pHGY)
- *p35S::YFP-CIP7<sub>1-386aa</sub>* (pH35YG)
- *p35S::YFP-CIP7<sub>387-1058aa</sub>* (pH35YG)
- *pUBQ10::MDB-mCherry* (Ivanov y Harrison, 2014)
- *pUBQ10::NLS-mCherry* (Ivanov y Harrison, 2014)
- *pHY5::HY5-GFP* (cedidos por el laboratorio del Dr. Casal)
- *p35S::ISTL5-YFP* (pH35GY)

Líneas transgénicas estables generadas como parte del trabajo de la presente tesis, a excepción de las de procedencia especificada. También se realizaron cruza entre cada línea sobre-expresante (*p35S::CIP7-YFP 1*, *p35S::YFP-CIP7* y *p35S::YFP*) y el marcador nuclear (*pUBQ10::NLS-mCherry*), o el marcador de microtúbulos (*pUBQ10::MDB-mCherry*). Los vectores pBG GUS, pH35GY, pH35YG y pHGY se describen en (Kubo et al., 2005).

## 2. Condiciones de crecimiento de las plantas.

Se esterilizaron semillas de los genotipos WT y mutantes durante 2 h 30 min en una atmósfera de Cl<sub>2</sub> generada a partir de la adición de 2,5 ml de HCl 37% a 75 ml de una solución de NaClO (lavandina comercial de 44g/l). Posteriormente, se sembraron en cajas de petri conteniendo medio basal *Murashige & Skoog* (MS) 0,5X pH 5,75 en condiciones de esterilidad. Las cajas fueron mantenidas en oscuridad a 4°C durante 3 días para reducir la dormición de las semillas (estratificación). Pasado ese tiempo, se indujo la germinación mediante un pulso de luz roja o blanca durante 2 h a 22°C y, luego de 24 h de oscuridad a 22°C, se expusieron a luz continua (100 μm m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) o permanecieron en oscuridad según el experimento (se detallará en cada caso).

## 3. Experimento de fosfoproteómica.

Para realizar este experimento, plántulas de genotipo salvaje y cuádruple mutantes *phyAphyBcry1cry2* se cultivaron en cámaras de cultivo a 22°C en completa oscuridad. Luego de la estratificación y el pulso de luz roja, las plántulas se crecieron 5 días en completa oscuridad y la mitad de la población de plántulas de genotipo salvaje y la totalidad de las cuádruples mutantes se expusieron a un pulso de 20 min de luz



blanca ( $100 \mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) para activar fitocromos y criptocromos. La otra mitad de las plántulas salvajes permaneció siempre en oscuridad y se cosecharon inmediatamente en nitrógeno líquido. Es decir, realizamos 3 tratamientos: 1) genotipo salvaje crecido 5 d en oscuridad o **WT O**; 2) genotipo salvaje crecido 5 d en oscuridad y expuesto a 20 min de luz o **WT LB**; y, 3) cuádruple mutante crecido 5d en oscuridad y expuesto a 20 min de luz o **phyAphyBcry1cry2 LB**. El tratamiento phyAphyBcry1cry2 O no fue incorporado en este ensayo por razones que se explican más detalladamente en el capítulo 1.

### 3.1 Extracción de proteínas con fenol.

Se pulverizaron aproximadamente 10 gr de tejido en N<sub>2</sub> líquido con mortero hasta obtener un fino polvo claro. Las muestras se resuspendieron en Buffer de Extracción (BE) frío en una relación de 3 ml de BE por cada gramo de muestra. Se agregó un volumen igual de fenol saturado en Tris-HCl pH 8 y se incubó en agitación a 4 °C durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 5.000 g durante 30 min a 4 °C y para obtener dos fases. La fase superior fenólica contiene proteínas, lípidos y pigmentos, mientras que la fase inferior acuosa (más densa) contiene ácidos nucleicos y carbohidratos. Se tomó la fase fenólica y se le agregó 1 volumen de BE, repitiéndose el protocolo 2 veces más. La última vez que se tomó la fase fenólica se la mezcló con 5 volúmenes de 0,1 M acetato de amonio en metanol frío. La mezcla se incubó a -20°C por 16 horas (*overnight*, ON) para que precipiten las proteínas. Las muestras se centrifugaron a 4°C por 30 min a 5.000 g y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 2 volúmenes de metanol frío para lavar el precipitado, se agitó y se centrifugó a 4°C por 10 min a 5.000 g. Estos lavados se repitieron 2 veces más con metanol. Luego se realizaron 2 lavados con acetona fría siguiendo el mismo esquema que con los lavados de metanol. Las muestras se dejaron secar hasta evaporar la acetona por completo.

- *Buffer* de extracción (BE): 0,7 M sacarosa; 0,1 M KCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 y 50 mM EDTA. Se le agrega 2-mercaptoetanol (2-ME) a una concentración final 2 % (v/v) antes de usar.

### 3.2 Cuantificación de Proteínas.

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

- *Muestras*: 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford + 10  $\mu$ l de la dilución de la muestra.
- *Curva Patrón*: 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford + 10  $\mu$ l de soluciones de BSA de concentración conocida (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) preparadas en el mismo buffer de las muestras.
- *Blanco de Lectura*: 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford + 10  $\mu$ l de buffer de las muestras.

Las lecturas de absorbancia se hicieron a 580 nm en un equipo lector de ELISA. A continuación, se construyó una curva de unidades de absorbancia a A580 nm *versus* masa ( $\mu$ g) de BSA a partir de la cual se obtuvo una regresión lineal para calcular los  $\mu$ g de proteínas presentes en los 10  $\mu$ l de muestra.

### 3.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa.

Los extractos de proteínas liofilizados se enviaron al Departamento de Proteómica de la Universidad de Laval (Québec, Canadá). Las muestras (450 $\mu$ g) se tripsinizaron y se pasaron por una columna de enriquecimiento en fosfopéptidos usando el kit *Pierce™ TiO<sub>2</sub> Phosphopeptide Enrichment and Clean-up Kit*. Para cada muestra, 1/5 de la elución fue inyectada en el equipo de espectrometría de masa (MS) *Thermo Orbitrap Fusion Mass Spectrometer*. Las corridas fueron de 120 minutos con un gradiente de 90 minutos con un detector MS/MS-IT de alta energía de colisión que induce disociación (HCD) en modo DDA (*data dependent acquisition*). Los datos se trataron con la herramienta *MaxQuant/Andromeda* configurando como modificaciones fijas: Oxidación (M) + Fosforilación (STY). Para la identificación de los péptidos, la base de datos empleada fue *UniProt CP\_ArabidopsisThaliana*. La cuantificación se realizó en base a los valores de intensidad de la señal.

### 3.4 Tratamiento de datos y análisis estadísticos.

Se realizaron dos comparaciones: (1) WT LB/WT O y (2) *phyAphyBcry1cry2* LB/WT LB. La primera (1) permite identificar aquellos péptidos que cambian su estado de fosforilación en respuesta a la luz. La segunda (2) permite conocer si el evento de fosforilación/desfosforilación está mediado directa o indirectamente por fotorreceptores. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 1.1 del capítulo 1.

Para nuestro análisis, un fosfopéptido es cuantificable si se pudo detectar al menos en 2 réplicas independientes de una misma condición. En caso contrario, el fosfopéptido se define como no cuantificable (NC). Valores faltantes de intensidad de señal fueron reemplazados por el valor correspondiente al ruido del equipo que corresponde a un percentil de todos los valores de intensidades por muestra. La significancia estadística fue analizada por la prueba de Welch que compara muestras con varianzas diferentes (Welch, 1947). Se emplearon los promedios de 3 réplicas independientes en cada condición para calcular los cocientes (1) y (2). Estos cocientes fueron evaluados por el método de estandarización Z-Score para encontrar valores extremos. Un péptido es considerado variable si cumple  $p\text{-valor} < 0.1$  y  $|Z\text{-Score}| > 1.96$ . Aquellos que no cumplieron con estas condiciones se denominaron no variables (NV). Para los péptidos variables, se estimó la magnitud de la variación para evaluar la abundancia relativa de la isoforma fosforilada en cada condición. Cuando no hay valores numéricos en alguna condición, esta magnitud se reporta cualitativamente como presente (P) o no presente (NP) según haya mayor o menor abundancia del fosfopéptido, respectivamente (Tabla 1.1). Todos los filtros de datos se realizaron con el Software Excel.

### 3.5 Análisis bioinformáticos.

Para la construcción del gráfico Volcán de la figura 1.2 se utilizó la herramienta informática R con el siguiente *script*:

```
setwd ("C:/Users/denise/OneDrive/Documentos/R/mis datos")
r1<-read.table("phospho ratio1.txt",sep="\t",dec=",")
ratio<-as.factor(r1$V1)
pvalue<-as.factor(r1$V2)
levels(ratio)
levels(pvalue)
str(r1)
na.omit(r1)
R1<-na.omit(r1)
```

```

R1
str(R1)
Ratio1<-as.data.frame(R1)
write.csv(Ratio1,"nuevoRatio1.csv")
library(ggplot2)
IR<-log10(Ratio1$V1)
lpv<-log10(Ratio1$V2)
z<-abs(Ratio1$V3)
LvsD<-data.frame(IR,lpv,z)
LvsD$Threshold=as.factor(abs(LvsD$IR)>0&LvsD$lpv>1&z>1.96)
LvsD
LvsD$Fold_Change_1=as.character("A","B","C", length(IR))
for (i in 1:length(IR)){
  if (LvsD$IR[i]>0 & LvsD$lpv[i]>-log10(0.1)&LvsD$z[i]>1.96){
    LvsD$Fold_Change_1[i]<-"Appeared"
  }else{
    if(LvsD$IR[i]<0 & LvsD$lpv[i]>-log10(0.1)&LvsD$z[i]>1.96){
      LvsD$Fold_Change_1[i]<-"Disappeared"
    }else{
      LvsD$Fold_Change_1[i]<-"NV"
    }
  }
}
which(LvsD$Fold_Change_1=="Disappeared")
g0<-plot(LvsD$IR,LvsD$lpv,xlab=("log10(Ratio1)"),ylab="-log10(p-valor)")
grafR1<- ggplot(LvsD,aes(IR,lpv))+
  geom_point(aes(colour=Fold_Change_1),size=1.5)+
  xlab("log10(WT LIGHT/WT DARK)")+
  ylab("-log10(p-valor)")+
  scale_colour_manual(values = c("Appeared"="red","Disappeared"="blue","NV"="black"))
grafR1

```

Para la determinación de los motivos consensos enriquecidos entre los sitios de fosforilación identificados, utilizamos el algoritmo *Motif-X* (Schwartz and Gygi, 2005) estableciendo los parámetros tal como lo hicieron en (Ning et al., 2016). Contamos con la asistencia de la Dra. Paula Beati para estos análisis que involucran alineamientos de secuencias y manejo de gran volumen de datos.

## 4. Ensayos bioquímicos y de biología molecular.

### 4.1 Genotipificación de plantas mutantes por inserción de T-ADN

Para verificar los genotipos de las plantas mutantes por inserción de T-ADN (*cip7-1*, *cip7-2*, *ist15-1* y *ist15-2*) y así seleccionar las plantas homocigotas mutantes se siguieron los protocolos que se describen a continuación.

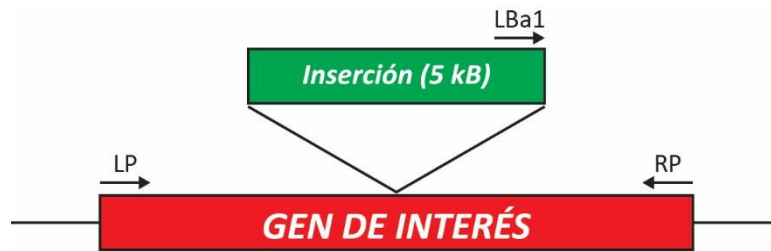
#### 4.1.1 Extracción de ADN genómico de plantas de Arabidopsis.

Se cortó una hoja de una planta con 6 o más hojas en su roseta y se machacó en un microtubo de 1,5 ml con un émbolo de cabeza cónica. Se agregaron 300 µl de *buffer* de lisis al machacado y se continuó homogeneizando brevemente. Las muestras se incubaron a 65°C durante 10 min y luego se dejaron antes del agregado de 300 µl de cloroformo. Las muestras se agitaron por inversión 5-10 veces y se centrifugaron 5 min a 10.000 *g*. Se tomaron 200 µl de los sobrenadantes, se transfirieron a tubos nuevos conteniendo 200 µl de isopropanol y nuevamente se mezclaron por inversión. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 10.000 *g*. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets se lavaron con 500 µl de etanol 70%. Para eliminar el etanol, las muestras se centrifugaron 5 min a 10.000 *g* y los sobrenadantes se descartaron con pipeta automática. Los pellets se dejaron secar a temperatura ambiente antes del agregado de agua. Las muestras se conservaron a – 20 °C.

- *Buffer* de lisis: 2% Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1% polivinil pirrolidona, 100 mM Tris-HCl pH 8, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA

#### 4.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

A partir del ADN genómico extraído de las plantas a genotipificar, se realizaron amplificaciones de fragmentos de los genes de interés mediante la técnica de PCR utilizando la polimerasa Taq (Invitrogen, California, USA) según las indicaciones del proveedor. Para la genotipificación de cada línea mutante de inserción se diseñaron dos oligonucleótidos iniciadores o *primers* (Tabla M.1) específicos para la secuencia flanqueante a la inserción. Para determinar la presencia del alelo WT (sin la inserción) o mutante (con la inserción) se efectuaron dos reacciones de PCR en paralelo. La primera reacción con los *primers* LP + RP (Fig. M1) genera una banda de 900-1100 bases en plantas WT y heterocigotas. La segunda reacción con los *primers* RP + LBa1 o LBb1.3 (no mostrado en la Fig. M1; ambos hibridan con el borde izquierdo del T-ADN) genera una banda de peso molecular menor que la de LP + RP en plantas homocigotas mutantes y heterocigotas. La estrategia de genotipificación está basada en [signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html](http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html).



**Figura M.1** Esquema de la disposición de *primers* para genotipificar la inserción de ADN-T. En rojo se representa el fragmento de ADN genómico donde se inserta el ADN-T (en verde). Con flechas se señalan las regiones a las que se unen los *primers*. Modificado de la tesis doctoral de la Dra. Romina Fox.

#### 4.1.3 Extracción de ARN con *Kit* QIAGEN y síntesis de ADNc usando *Super-Script IV*.

Las plántulas fueron cosechadas, congeladas en N<sub>2</sub> líquido y pulverizadas con mortero. Para cada muestra se partió de 200 mg de material vegetal. La extracción de ARN se llevó a cabo usando el *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se corroboró la integridad del ARN por gel de agarosa y se estimó su concentración por absorción de UV a 260 y 280 nm utilizando un *Nanodrop*. Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2 µg de ARN previamente tratados durante 15 min con DNasa RQ1 RNasa-Free (Promega, Madison, WI, USA). La transcripción reversa se llevó a cabo con 2 µg de ARN para cada muestra en un volumen total de 20 µl de reacción utilizando *primers* oligodT y la enzima *Super-Script IV* siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Las muestras se guardaron a -80°C hasta el momento de su uso.

#### 4.1.4 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Para la separación y visualización de los ácidos nucleicos (ARN, ADN y ADNc) se realizaron electroforesis en geles de agarosa 1-1,5 % en TAE 1X conteniendo bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Las muestras de ADN se sembraron con *Buffer* de siembra 6x. En el caso de ARN, se preparó una mezcla de ARN:*Buffer*:formamida en relación 1:1:1. Las corridas se realizaron a 80 V constante en TAE 1X.

- Stock de TAE 50X: 242 g de Tris Base, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8 en 1 L de agua destilada. Para preparar los geles y llevar adelante las corridas, el *buffer* se diluyó 50 veces.

- *Buffer* de siembra 6x: Azul de bromofenol (BPB) 0,25% (p/v), xilencianol 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v) en agua.

## 4.2 PCR cuantitativa en tiempo real (*Real time qPCR*, RT-qPCR).

Las reacciones de RT-qPCR fueron llevadas a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Waltham, MA, USA), utilizando el cóctel 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia). La mezcla de reacción (20 µl) consistió de: cóctel de qPCR 1X, primers 0,4 µM cada uno y 5 µl de ADNc diluido 1:10. El gen EF-1α (Elongation Factor 1α, At5g60390) fue empleado como control para relativizar la expresión e independizarse de diferencias en la eficiencia de la reacción de retrotranscripción. Se utilizaron los *primers forward* y *reverse*: RT-qPCR2 cip7 F y RT-qPCR2 cip7 R (Tabla M.1) diseñados con el programa Primer3 (primer3plus.com/). El protocolo de RT-qPCR fue 15 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 32 seg a 72°C y 3 seg a 75°C (lectura), seguidos de una curva de desnaturalización de 64 a 90°C con lecturas por cada grado centígrado. Antes de proseguir con el análisis, verificamos que todas las reacciones produjeran un solo amplicón en la curva de desnaturalización. Los valores de CT fueron calculados usando el programa Opticon. Para el análisis de los resultados se utilizó el método del ΔCT. La eficiencia de la PCR (E) se obtuvo de una curva de calibración donde se representó el Log<sub>10</sub> del número de copias en función del Ct. Para establecer los valores de expresión del gen de interés (gen) relativo al gen de referencia (ref) se utilizó la siguiente fórmula:

$$Expresión(gen) = \frac{E(gen) \times Ct(gen)}{E(ref) \times Ct(ref)}$$

## 5. Clonados.

### 5.1. Clonado por restricción y ligada.

#### 5.1.1. Amplificación de secuencias por PCR.

Las secuencias se amplificaron con la enzima polimerasa Q5 (New England Biolabs, Massachusetts, EE.UU.), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante y con los

buffers suministrados. En cada reacción se utilizaron 30-100 ng de ADN como molde, 1X buffer, 0.5  $\mu$ M de cada *primer*, 200  $\mu$ M dNTPs totales (50  $\mu$ M de cada uno) y 1 unidad de ADN polimersa Q5, en 50  $\mu$ l de volumen de reacción. El protocolo de PCR fue de 3 min a 95°C (desnaturalización inicial), seguidos de 35 ciclos 30 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de annealing para cada par de *primers* ( $T_a$ ), 30 seg/kB a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C. Para el cálculo de la  $T_a$ , en todos los casos se calculó la temperatura de melting ( $T_m$ ) de cada primer utilizando el sitio web [idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer](http://idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer) y se utilizó una  $T_a$  5°C menor que la del primer con menor  $T_m$ . Los productos de PCR se analizaron por electroforesis.

Para las distintas amplificaciones del gen *CIP7*, se utilizaron las siguientes combinaciones de oligonucleótidos iniciadores (ver Tabla M.1):

- Locus: gCIP7F + cCIP7-stop R
- Promotor: gCIP7F + CIP7pR
- Gen con codón de terminación: cCIP7F + cCIP7+stop R
- Gen sin codón de terminación: cCIP7F + cCIP7-stop R
- CIP7 1-386aa: cCIP7F + CIP7 1-386 R
- CIP7 387-1058aa: CIP7 387-1058 F + cCIP7+stop R

### 5.1.2 Restricción de insertos y vectores.

Los productos de PCR y vector pENTR-D-TOPO fueron digeridos con las enzimas de restricción NotI-HF y Ascl (New England BioLabs), siguiendo las condiciones sugeridas por los fabricantes. Los vectores de clonado digeridos fueron además tratados con la enzima fosfatasa alcalina termosensible TSAP siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI, USA). La TSAP remueve el grupo 5'-fosfato del ADN, impidiendo su recircularización y religación.

### 5.1.3. Purificación de insertos y vectores.

Los productos de PCR y vectores digeridos se identificaron por electroforesis en gel de agarosa en buffer TAE 1X (Sección M4.1.4). Las bandas correspondientes se



cortaron del gel de agarosa con hoja de bisturí y el ADN se purificó utilizando el *kit* comercial *QIAEXII Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania) de acuerdo al protocolo del fabricante.

#### **5.1.4 Ligaciones inserto - vector.**

Las secuencias amplificadas por PCR y los productos de restricción (insertos o vectores) purificados fueron ligados con la enzima T4 ligasa (Promega, Madison, WI, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se utilizaron de 20 a 100 ng de vector en reacciones molares inserto:vector 3:1 para todas las construcciones. Se utilizaron 10 unidades de enzima en un volumen final de reacción de 10  $\mu$ l. Las reacciones se incubaron a 4°C durante toda la noche.

#### **5.1.5 Transformación de células electro-competentes.**

Se utilizaron 50  $\mu$ l de bacterias electrocompetentes (*E. coli* cepa DH10 $\beta$ ) y 1 o 2  $\mu$ l de muestra de ADN (vectores, ligadas o recombinaciones, ver más abajo) por cada transformación. Las bacterias y ADN se mezclaron bien y la mezcla se traspasó a una cubeta de electroporación de 0,1 cm de paso previamente enfriada. La cubeta conteniendo la mezcla se colocó en el electroporador *Micro pulser* (Bio-Rad, California, EE.UU.) y se dio un pulso a 1,8 kV. Inmediatamente se agregó 250  $\mu$ l de SOC (2% peptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 20 mM glucosa) sin agente selectivo, las bacterias se resuspendieron suavemente y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Luego, se rastrillaron 50 y 100  $\mu$ l de la solución bacteriana en placas de Petri con LB conteniendo 1% de agar (LB agar) y el agente selectivo requerido en la concentración adecuada.

#### **5.1.6 Condiciones de cultivo de *E. coli*.**

Los cultivos líquidos de *E. coli* se incubaron a 37°C en medio LB (peptona de caseína o triptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, y NaCl 5 g/l) con agitación a 250 revoluciones por minuto (rpm). Los cultivos sólidos se realizaron en medio LB agar en cajas de Petri. De acuerdo con la resistencia conferida por cada

vector, el medio de cultivo se suplementó con ampicilina (100 mg/l), kanamicina (50 mg/l), estreptomina (100 mg/l), espectinomicina (100 mg/l) o cloranfenicol (30 mg/l).

#### **5.1.7. Confirmación de clones positivos.**

Se analizaron al menos 10 colonias de las placas de transformación mediante PCR. Como muestra de ADN se repicó con palillo cada colonia dentro de cada reacción de PCR (*colony PCR*). Se utilizó la enzima Taq Polimerasa Recombinante (Invitrogen, Brasil) y los mismos *primers* específicos indicados para amplificar el inserto. Las condiciones de reacción fueron 1X buffer (conteniendo 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> final), 0.5 μM de cada *primer*, 200 μM dNTPs totales (50 μM de cada uno) y 1 unidad de Taq, en 15 μl de volumen de reacción. El protocolo de PCR fue de 5 min a 95°C (desnaturalización inicial), seguidos de 35 ciclos 30 seg a 95°C, 30 seg a la Ta específica para cada par de *primers*, 1 min/kB a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C.

#### **5.1.8. Purificación de plásmidos a partir de colonias bacterianas (Miniprep).**

Las colonias conteniendo las construcciones apropiadas se repicaron en medio fresco para purificar los plásmidos que portaban. Los cultivos se incubaron durante 16 horas a 37°C en un tubo de 15 ml tipo *Falcon* conteniendo 4 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 minutos a 3500 g. El pellet de células fue resuspendido en 100 μl de solución GTE (50 mM glucosa; 25 mM Tris-Cl, pH 8; 10 mM EDTA) y se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 200 μl de solución de lisis (0,2 N NaOH; 1 % P/V de dodecilsulfato sódico), preparada inmediatamente antes de ser utilizada. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 150 μl de solución de neutralización (acetato de potasio 5M pH 4,8), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 10.000 g durante 3 minutos, de forma de sedimentar los restos celulares y el ADN no plasmídico. Se tomaron los 400 μl del sobrenadante y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga limpio, se agregó 1 μl de enzima ARNasa A (20 ng/ml) y se incubó a

temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se precipitó el ADN con 0,8 ml de etanol 96% y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 10 min a 10.000 *g*. Se descartó el sobrenadante, se lavó el sedimento con 1 ml de etanol 70 % y se centrifugó nuevamente la muestra durante 1 minuto a 10.000 *g*. El sobrenadante se descartó y el pellet se dejó secar a 37°C durante 10 minutos. Una vez seco, el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua, obteniendo entonces una solución de ADN plasmídico purificado.

### **5.1.9 Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción.**

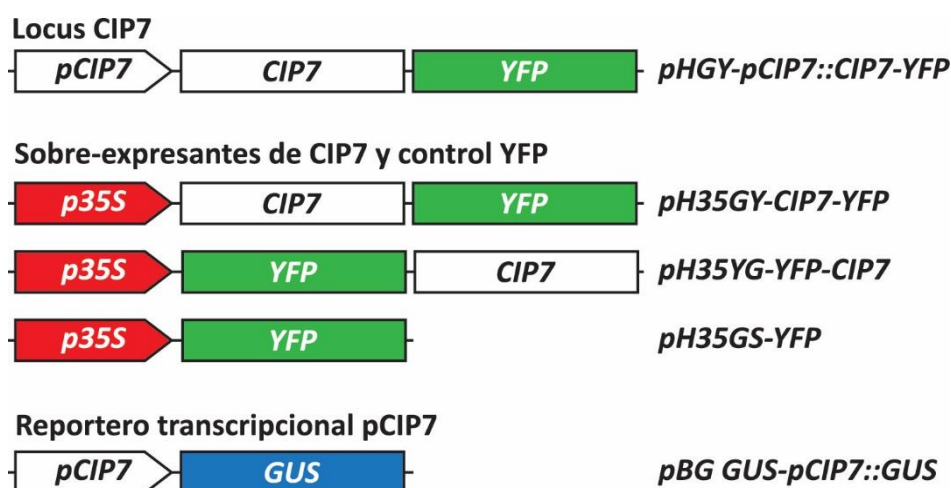
Tanto para los clonados como para la confirmación de las construcciones, se corroboró la presencia de los insertos de interés mediante la digestión con las mismas enzimas de restricción previamente utilizadas para el clonado y electroforesis en geles de agarosa 1%.

### **5.1.10. Secuenciación de las construcciones plasmídicas.**

A partir de los plásmidos confirmados por *colony PCR* y restricción, se corroboró la secuencia de los insertos de interés mediante secuenciación en MacroGen Inc., Corea del Sur. Los análisis de secuencias obtenidas se realizaron utilizando el sitio web BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)).

## **5.2. Clonado por recombinación Gateway.**

La estrategia que diseñamos se basó en el clonado del locus completo de CIP7, el promotor, el gen con y sin codón de terminación y sus versiones delecionadas N y C terminal en el vector pENTR-D-TOPO (en los sitios NotI y AscI). Una vez obtenidas las construcciones de interés, se generaron vectores binarios por recombinación Gateway® con la enzima LR recombinasa siguiendo el protocolo propuesto por los fabricantes (Invitrogen, California, USA). Los vectores de entrada pENTR-D-TOPO se recombinaron con los vectores de destino binarios pHGY, pH35GY, pH35YG, pH35GS y pBG GUS para obtener las construcciones presentadas en la Figura M.2.



**Figura M.2** Construcciones con las que se transformaron plantas de *Arabidopsis* generando transgénicas estables y se seleccionaron líneas independientes de cada una para los experimentos.

### 5.3 Conservación de cepas bacterianas.

En el caso de clones bacterianos positivos, se mezcló en un tubo Eppendorf un volumen de cultivo crecido durante toda una noche con una solución de glicerol estéril, hasta alcanzar una concentración final de 10-20% de glicerol. Los stocks bacterianos se guardaron a -80°C.

### 5.4 Cepas y condiciones de cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se utilizaron las cepas EHA105 o GV3101 para transformar *Arabidopsis thaliana*. EHA105 tiene resistencia genómica a rifampicina; y GV3101 a rifampicina y gentamicina, respectivamente. Los cultivos de *A. tumefaciens* se realizaron en medio LB suplementado con rifampicina (50 mg/l) y los antibióticos correspondientes a los vectores de interés en presencia de gentamicina (30 mg/l) en caso de ser necesario. Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación (250 rpm) durante toda la noche.

### 5.5 Transformación de bacterias *Agrobacterium tumefaciens*.

Una alícuota de 1,5 ml de cultivo de *A. tumefaciens* crecido toda la noche a 28-30°C en medio LB suplementado con los respectivos antibióticos fue centrifugado

durante 5 min a 2.800 g. El pellet fue lavado con 1 ml de agua estéril. La centrifugación y lavado se repitió sucesivamente con 500  $\mu$ l y 250  $\mu$ l de agua. Luego de una última centrifugación, se resuspendió en 150  $\mu$ l de agua. Se transfirieron 50  $\mu$ l de bacterias y 1-2  $\mu$ l de ADN a una cubeta de electroporación. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador *Micro pulser* (Bio-Rad, California, EE.UU.) y se aplicó un pulso de 2,5 kV con capacitancia de 25  $\mu$ F y una resistencia de 600  $\Omega$ . A continuación se adicionó 1 ml de medio LB, se lo pasó a un microtubo de 1,5 ml y se incubó durante dos horas a 28°C. Transcurrida la incubación se realizó una centrifugación de 5 minutos a 2.800 g a temperatura ambiente, el pellet de células fue resuspendido en 100  $\mu$ l de medio LB y finalmente se sembró en placas de medio LB sólido que contenían 50 mg/l de rifampicina, 30 mg/l de gentamicina (dependiendo la cepa) y el antibiótico específico según la resistencia que confiere el vector (ver Tabla M.2). Las placas se incubaron durante dos días a 28°C.

## **6. Obtención de plantas transgénicas.**

### **6.1 Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

La transformación de plantas de *A. thaliana* fue realizada mediante la técnica de “floral-dip” (Zhang et al., 2006). Se cultivaron bacterias *A. tumefaciens* transformadas con los distintos plásmidos binarios en 5 ml de LB líquido conteniendo los antibióticos adecuados a 28°C durante dos días. Se agregó 1 ml de este cultivo a 100 ml de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes, y se incubó a 28°C por una noche, hasta llegar a una DO600 cercana a 2. Se cosecharon las células por centrifugación a 5.000 g durante 7 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en un medio con 5 % (p/v) sacarosa, 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.05% (v/v) de Silwet L-77. Las inflorescencias de plantas de *A. thaliana* regadas el día anterior fueron sumergidas en la suspensión de células durante 30 segundos. Luego de escurrir el exceso de medio de cultivo, se colocaron las plantas en posición horizontal dentro de bolsas plásticas para conservar la humedad. Luego de 24 horas se sacaron de las bolsas y se prosiguió con el cultivo en la cámara de crecimiento hasta la maduración de las semillas.

## 6.2 Selección de plantas transgénicas.

Las líneas transgénicas que portan construcciones en los plásmidos pHGY, pH35GY, pH35YG y pH35GS fueron seleccionadas en placas de MS 0.5X con agar 0,8% y el antibiótico Hygromicina 50mg/l. Las plantas transgénicas transformadas con el vector pBG GUS fueron sembradas en tierra y seleccionadas rociándolas periódicamente con BASTA a una concentración 120µg/ml. Las líneas independientes obtenidas fueron confirmadas por PCR en su primera generación (T1) y se llevaron a homocigosis con sucesivas selecciones hasta llegar a la generación T3.

## 7. Ensayos fisiológicos.

### 7.1 Mediciones del largo del hipocotilos.

Para los ensayos de largo de hipocotilo que comprende el capítulo 2, las semillas (de los genotipos especificados en cada experimento) se sembraron en cajas transparentes cuadradas (12cm x 12cm) con MS 0,5X con agar 0,8 %. Se sembraron un máximo de 8 genotipos por placa. Luego del pulso de luz blanca para inducir la germinación, se guardaron en oscuridad (envueltas en papel aluminio) verticalmente a 22 °C. Al cabo de 5 d de oscuridad, se midieron 10 plántulas de cada genotipo en cada placa y la media de dichas mediciones se consideró una réplica biológica. Cada tratamiento se realizó como mínimo por triplicado (Fankhauser y Casal, 2004).

Para los ensayos de largo de hipocotilo que comprende el Anexo I, las semillas (de los genotipos especificados en el experimento) se sembraron en cajas de Petri con MS 0,5X con agar 0.8%. Luego de inducir la germinación con un pulso de luz blanca, se envolvieron en papel aluminio por 24h y se conservaron a 22°C. Seguidamente se expusieron a luz roja continua ( $3 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ), a excepción de las placas control que se conservaron en oscuridad. Al cabo de 3 d se midió largo de hipocotilo según se detalló previamente. Para cada genotipo, las mediciones de las plántulas que crecieron en luz se relativizaron con las correspondientes en oscuridad, con el fin de evaluar la respuesta de cada genotipo al tratamiento de luz independientemente de posibles efectos que estén dados por el *background* genético *per se*.

En el análisis de segregación que comprende el Anexo II, se realizaron mediciones de largo de hipocotilo (según se describe en esta sección para los ensayos del capítulo 2) sobre 169 plántulas etioladas de 5 d, correspondientes a la generación F2 de *cip7-1*

+/- . Inmediatamente luego de la medición, se extrajo genómico de cada plántula individual, siguiendo el protocolo de la sección M4.1. pero ajustando a un volumen de resuspensión del ADN genómico extraído de 10 $\mu$ l y utilizando 5 $\mu$ l como ADN molde para cada reacción de PCR. Esto nos permitió asociar cada medición a su correspondiente genotipo.

## **7.2 Estadística en ensayos fisiológicos.**

Los datos se analizaron mediante *t-test* o Análisis de la Varianza (ANOVA) de 1 o 2 factores según corresponda (se indica en cada experimento), seguidos de la prueba *α posteriori* de *Tuckey* para comparaciones múltiples. La homocedacea de los datos se comprobó mediante la prueba de *Levene's* y Normalidad se ensayó mediante la Prueba *Shapiro-Wilks* modificada. El análisis estadístico de los resultados fue realizado usando el programa *GraphPad Prism* versión 6.00 (*GraphPad Software*, La Jolla California, EE.UU.). Los resultados obtenidos en todos los experimentos se muestran como media  $\pm$  error estándar. En todos los casos que se realiza estadística se cumplen los supuestos necesarios. En los casos donde se evaluaron las desviaciones de frecuencias esperadas, se utilizó la prueba  $\chi^2$ .

## **8. Ensayo de tinción GUS (actividad $\beta$ -glucuronidasa).**

Se realizaron ensayos cualitativos de tinción GUS de plántulas etioladas expuestas a distintos tratamientos de luz según se detalla en cada experimento. La tinción se realizó según el protocolo detallado por *Jefferson* 1985. Brevemente, las plántulas fueron teñidas con X-Gluc (0,5 mg/mL ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucurónico en dimetil sulfoxido, 1 mM ferrocianuro de potasio, 1 mM ferricianuro de potasio y 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0) por 24h a 37°C en oscuridad. Luego se hicieron 3 lavados sucesivos con etanol 70% hasta alcanzar la decoloración total. Finalmente, se enjuagaron en agua y las plántulas fueron montadas en solución de *Hoyer* (*Anderson*, 1954) para la confección de preparados semipermanentes. Se tomaron imágenes con un aumento de 200X en un microscopio *Leica DM2500* equipado con iluminación de contraste de interferencia diferencial (DIC) y una cámara de alta resolución.

## 9. Microscopía Confocal.

Los análisis de localización subcelular de las proteínas de fusión CIP7-YFP y YFP-CIP7 fueron hechas con el microscopio confocal Leica SPE en las instalaciones del INGEBI. Parámetros de configuración: Láser de excitación: 488nm. Longitud de onda de emisión: 530nm. Objetivos de inmersión en aceite: 40X/AN 0.8, 63X/ AN 1.3, (AN es la apertura numérica). Ganancia: 700-900 (en caso de observar líneas sobre-expresantes o con promotor endógeno, respectivamente). Las imágenes se tomaron en tres canales: uno para la detección de la señal YFP, otro correspondiente a la luz transmitida y el tercero para la detección en plántulas desetiadas de la autofluorescencia de la clorofila que se excita con láser de 488nm y se detecta en una ventana de 600 a 700 nm. En los casos que se realizó la adquisición de imágenes en XYZ (*stack*), se tomaron 18 secciones consecutivas cada 1,5 $\mu$ m. En todos los casos, cada sección fue el resultado del promedio de tres detecciones consecutivas. Las imágenes de las muestras tratadas con MG132 se realizaron con el mismo protocolo.

Los análisis de co-localización y oryzalina, se llevaron a cabo en el Instituto Fundación Leloir, utilizando el microscopio invertido Zeiss LSM 880 Indimo AxioObserver con la asistencia del técnico en microscopía, el Dr. Andrés Rossi. Parámetros de configuración para detectar señal YFP: Láser de excitación: 514nm. Longitud de onda de emisión: 542nm. Objetivo de aire: 20X/ AN 0.8. Ganancia: 680. Parámetros de configuración para detectar señal de mCherry: Láser de excitación: 543nm. Longitud de onda de emisión: 653nm. Objetivo de aire: 20X/ AN 0.8. Ganancia: 950. Imágenes adquiridas con una profundidad de 1.8 $\mu$ m.

## 10. Ensayos fisiológicos con Oryzalina.

Para los ensayos de largo de hipocotilo con oryzalina, cultivamos plántulas durante 5d en oscuridad en placas verticales como se detalla en la sección M2. El medio donde crecieron las plántulas (de los genotipos especificados en el experimento) fue suplementado con 0.25 $\mu$ M de oryzalina (Supelco-Sigma, Missouri, EE.UU.). Como control se suplementó el medio con 0.25 $\mu$ M de etanol, ya que la oryzalina fue disuelta en dicho solvente. Se midió largo de hipocotilo según se detalla en la sección M7. Para cada genotipo, a la medición del largo de hipocotilo en la situación control se le restó



la correspondiente medición del tratamiento, con el fin de conocer el grado de respuesta.

Para los ensayos de estabilidad de microtúbulos frente a oryzalina en microscopía confocal, se tomaron imágenes de hipocotilos de plántulas (genotipos especificados en cada experimento) que al cabo de crecer 5d en oscuridad, fueron incubadas durante 30 min en una solución acuosa 10  $\mu$ M de etanol (control) o 10  $\mu$ M oryzalina (tratamiento). Se adquirieron imágenes de por lo menos 3 plántulas por genotipo en cada condición y el experimento se repitió 3 veces.

## **11. Ensayos con MG132.**

Las plántulas crecieron durante 2 d en oscuridad según se detalla en la sección M2 y al tercer día se sustrajeron cuidadosamente para ser incubadas en MS 0.5X líquido suplementado con 100  $\mu$ M de MG132 (Calbiochem, USA) o 100  $\mu$ M de DMSO como control (ya que fue el solvente empleado para resuspender el MG132). Estas incubaciones se realizaron tanto en luz como oscuridad. Se tomaron imágenes de hipocotilos (genotipos especificados en el experimento) de al menos 3 plántulas por cada genotipo en cada condición y el experimento se repitió 2 veces.

## **12. Líneas CRISPR-CAS9.**

Contamos con una guía vacía de ARN dirigida por el promotor AtU6 en un plásmido con resistencia a ampicilina que contiene un cassette de expresión constitutiva de mCherry en plantas y es compatible con el sistema Gateway (desarrollado por el Dr. Diego Wengier, INGEBI-CONICET). La estrategia de clonado está basada en el protocolo presentado en (Miao et al., 2013). Dentro de la guía de ARN, existen dos sitios de restricción para la enzima Bsal donde se clona la secuencia blanco del gen a editar como una secuencia doble cadena producto de la hibridación de dos oligonucleótidos complementarios de 25 bases de longitud. Una vez obtenida la construcción, el vector se recombina con un plásmido binario Gateway que contiene a la endonucleasa Cas9 bajo el control de un promotor constitutivo. El vector binario final transfiere la guía de ARN, el cassette de selección visual, el gen de Cas9 y un gen selector a las plantas.

Se diseñaron las guías de ARN con la herramienta informática CRISPR-P2.0 ([crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/](http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/)), para dirigir a la enzima CAS9 hacia el extremo 5' del gen *CIP7*. Los oligonucleótidos correspondientes a la secuencia de *CIP7* blanco de la enzima CAS9 fueron sintetizados por MacroGen Inc. (Corea del Sur). Estos oligonucleótidos, además de los 20 nucleótidos específicos de la secuencia blanco, poseen 4 bases complementarias a los extremos cohesivos que quedan remanentes en el plásmido luego de la restricción con *Bsa*I; y una **G** (oligonucleótido *Forward*) o **C** (oligonucleótido *Reverse*) para que sea compatible con cualquier secuencia blanco obtenida con CRISPR2.0. La hibridación de los oligonucleótidos y la fosforilación de la doble cadena se realizó como se describe en Miao et.al., 2013. La reacción de fosforilación se diluyó 1:160 y 1 µl se usó en la reacción de ligación con 100 ng del plásmido previamente digerido con *Bsa*I. La reacción de ligación se llevó adelante por 1 h a temperatura ambiente y se procedió a transformar *E. coli*. Las colonias se evaluaron por *colony PCR* usando los *primers* CIP7 CR6 F y el *primer* universal M13R presente en el vector, y se confirmaron por secuenciación. Uno de los clones confirmados se recombinó con el vector binario de destino M3T-UBQp-CAS9-GW (generado en el laboratorio del Dr. Jeff Dangl, Universidad de Carolina del Norte, EE.UU.) con resistencia a kanamicina como se especifica en la sección M5.2.

Finalmente se transformaron plantas de *Arabidopsis* WT (sección M6.1) y se obtuvieron 23 líneas independientes en T1 (sección M6.2) por selección en medio MS 0.5X suplementado con 50mg/l kanamicina. Para detectar si habían ocurrido ediciones, se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 1 kb flanqueando el sitio de edición usando ADN genómico de las líneas T1 como templado y los *primers* cCIP7F y CRISPR CR6 rv. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa y los fragmentos se purificaron como se detalló antes. La electroforesis en gel de agarosa además permitió detectar la delección ocurrida en *cip7\_ed1*. Los fragmentos de PCR se secuenciaron y se buscaron ediciones en la zona blanco. Las semillas (T2s) de las plantas T1s que mostraron ediciones se volvieron a sembrar en placas de Petri, pero esta vez se seleccionaron plantas que no presentaran fluorescencia de mCherry. Estas plantas corresponden a aquellas que no llevan el gen Cas9 y, por lo tanto, no pueden producir nuevas ediciones en caso de ser cruzadas con otro genotipo. La presencia de edición

de *CIP7* se evaluó por secuenciación como antes y se conservaron líneas homocigotas mutantes.

### **13. Estudio *in silico* de la expresión del gen *CIP7*.**

Para determinar el patrón de expresión del gen *CIP7* en los diferentes tejidos de *Arabidopsis thaliana*, se consultó la base de datos de microarreglos disponible en *Genevestigator* (<http://genevestigator.com/gv>) y se generó el *heatmap* correspondiente. Complementariamente, el análisis también fue realizado empleando la herramienta *eFP Browser (Electronic Fluorescent Pictograph)* ([bar.utoronto.ca](http://bar.utoronto.ca); Winter et al., 2007) a partir del transcriptoma de los estadíos de desarrollo de *Arabidopsis* (Klepikova et. al., 2016).

Primer	Uso	Secuencia 5' - 3'
gCIP7F	Amplif. c/ <u>sitio NotI</u>	ATAT <u>GCGGCCGC</u> GCGAATCCTCTGGATGAGAC
CIP7pR	Amplif. c/ <u>sitio Ascl</u>	ATAT <u>GGCGCGCC</u> TAAAGAACCCACAACAAGCAAAAAA
cCIP7F	Amplif. c/ <u>sitio NotI</u>	ATAT <u>GCGGCCGC</u> A ATGGATCCAAGAACAAGACTTGAC
cCIP7-stop R	Amplif. c/ <u>sitio Ascl</u>	ATAT <u>GGCGCGCC</u> C CTTTTCTTCCGAACATAAGAAGC
cCIP7+stop R	Amplif. c/ <u>sitio Ascl</u>	ATAT <u>GGCGCGCC</u> TTACTTTTCTTCCGAACATAAGA
CIP7 1-386 R	Amplif. c/ <u>sitio Ascl</u>	ATAT <u>GGCGCGCC</u> TTAGATAACCACTTTCCTGGATT
CIP7 387-1058 F	Amplif. c/ <u>sitio NotI</u>	ATAT <u>GCGGCCGC</u> A ATG <b>CGCA</b> ACATAAATTATATAA
CIP7 300pb	Secuenciación	GTGTGTCGGCGTACATAACG
CIP7 seq1	Secuenciación	GGAGATTGAGCAGATCGAGG
CIP7 seq2	Secuenciación	GGAAACTCTATGGATGCCTCG
CIP7 seq3	Secuenciación	GTGAGAAAAGAGAGAACCGCC
YFP N seq	Secuenciación	GCTGACCCTGAAGTTCATCTGC
YFP-Fw_seq	Secuenciación	CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC
CRISPR CR6 rv	Secuenciación	GATGGAGACTGTGGAAGA
CIP7 CR6 F	Guía para CAS9	GATT <u>G</u> TATGTAGGAAACGAGTTGGG
CIP7 CR6 R	Guía para CAS9	AAACCCCAACTCGTTTCCTACAT <u>A</u> C
LP salk_120077	Genotipificación	TGGTCCAGAAACAGATCCAAG
RP salk_120077	Genotipificación	CCACGAAGCATTACTCAGAGG
LP salk_015796	Genotipificación	GAAGCAAGTTGATGCACTTCC
RP salk_015796	Genotipificación	CTATTCGCAGGCAGAGATGTC
LBb1.3	Genotipificación	ATTTTGCCGATTCGGAAC
LBa1	Genotipificación	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG
RT-qPCR2 cip7 F	RT-qPCR	TCACCAGCGGTCTCAGAGAT
RT-qPCR2 cip7 R	RT-qPCR	CCAAGGCAACGGCTAAAGTC
EF-1a_F	RT-qPCR	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA
EF-1 $\alpha$ _R	RT-qPCR	TGTAACAAGATGGATGCCACCACC

**Tabla M.1. Tabla de los oligonucleótidos utilizados en esta Tesis.**

Vector	Resistencia en Bacteria	Resistencia en planta
pENTR-D-TOPO	Kanamicina 50mg/l	no corresponde
pBG GUS	Espectinomicina 100mg/l	BASTA 120 $\mu$ g/ml
pHGY	Espectinomicina 100mg/l	Hygromicina 50mg/l
pH35GY	Espectinomicina 100mg/l	Hygromicina 50mg/l
pH35YG	Espectinomicina 100mg/l	Hygromicina 50mg/l
pH35GS	Espectinomicina 100mg/l	Hygromicina 50mg/l

**Tabla M.2. Tabla con el detalle de los antibióticos usados.**

# CAPÍTULO 1 . ESTUDIO DEL FOSFOPROTEOMA INDUCIDO POR LUZ EN *ARABIDOPSIS THALIANA*. DEPENDENCIA E INDEPENDENCIA DE FOTORRECEPTORES

## 1.1 Introducción.

La transición del crecimiento en oscuridad al desarrollo fotomorfogénico en luz, es uno de los procesos más drásticos por los que atraviesa una planta a lo largo de su ciclo de vida. Este fenómeno se conoce como desetiación, y la incapacidad de llevarlo a cabo conduce irrevocablemente a la muerte. Por esta razón, la desetiación ha sido ampliamente estudiada, y el análisis de la expresión génica fue una de las primeras aproximaciones utilizadas (Kuno and Furuya, 2000; Fankhauser and Chory, 1997; Terzaghi and Cashmore, 1995). Un estudio de microarreglos basado en marcadores de secuencia expresadas (EST, del inglés *Expressed Sequence Tag*) comparó patrones de expresión de plántulas de 6 d cultivadas tanto en oscuridad como en luz; y reportó que aproximadamente un tercio del genoma completo de *Arabidopsis* es regulado por luz blanca (Ma et al., 2001). Con el advenimiento de las técnicas de microarreglos de ADN, se han podido investigar los perfiles de expresión de genes característicos de distintos procesos, entre ellos, la regulación de la expresión génica mediada por luz roja (Tepperman et al., 2004), luz roja lejana (Tepperman et al., 2001), y luz azul (Wang et al., 2001). Los patrones transcripcionales de plantas expuestas a luz roja, rojo lejano y azul son similares, lo que sugiere convergencia en las vías de señalización (Peschke and Kretsch, 2011; Ma et al., 2001). Sin embargo, muchos de los cambios de expresión de genes de respuesta temprana a la luz se pierden cuando se observan los efectos de la luz a largo plazo, como 6 o 24 h (Tepperman et al., 2004). Una de las principales conclusiones a las que se arribó con el análisis de los cambios en el transcriptoma de *Arabidopsis* inducidos a tiempos cortos de luz de 1 h es que las respuestas rápidas a señales lumínicas involucran principalmente alteraciones en la expresión de factores de transcripción (Casal and Yanovsky, 2005; Jiao et al., 2003; Tepperman et al., 2001). La regulación transcripcional, post-traducciona y degradación de estos factores de transcripción son determinantes para el desarrollo fotomorfogénico (Jiao et al., 2007). También se identificaron los cambios en el patrón del transcriptoma inducidos por

cada fotorreceptor phyA, phyB, cry1 y cry2 (Tepperman et al., 2004; Folta et al., 2003) y/o la combinación entre ellos (Mazzella et al., 2005; Perelman et al., 2003).

Desde otra perspectiva, las modificaciones post-traduccionales proveen mecanismos de respuestas frente a estímulos, para los cuales la reprogramación génica excede la ventana temporal óptima de acción. Complementariamente a la transcriptómica empezaron a abordarse desde la proteómica comparativa procesos como la desetiología, con el objetivo de encontrar las proteínas que podrían estar involucradas en la traducción de las señales lumínicas. Los primeros estudios emplearon técnicas de electroforesis en dos dimensiones (2D) para identificar proteínas que cambian su abundancia en respuesta a la luz (Yang et al., 2007; Wang et al., 2006). Esta estrategia 2D fue utilizada para comparar patrones de expresión de proteínas entre plántulas que crecían en distintas condiciones lumínicas: oscuridad, luz roja, rojo lejano y azul (Kim et al., 2006) o para comparar al genotipo WT con distintos genotipos mutantes como *phyAphyB* (Li et al., 2009b), *cry1cry2* (Yang et al., 2008), *cry1* (Phee et al., 2007), *phyA phyB cry1 cry2* (Fox et al., 2015) en *Arabidopsis*; o sobre-expresantes de CRY2 en tomate (Lopez et al., 2012). Todos estos trabajos convergen en que la percepción lumínica altera preferentemente la abundancia de proteínas involucradas en el metabolismo celular y la fotosíntesis. A pesar de ser una estrategia cuantitativa y de bajo costo, esta técnica presenta limitaciones tanto en la cantidad de proteínas posibles de identificar; como en la detección de proteínas de muy baja abundancia (como factores de transcripción), de tamaños extremadamente pequeños o grandes, y aquellas de difícil extracción (por ejemplo, por estar ancladas en membrana) (Garfin, 2003). Luego, la detección masiva por espectrometría de masas ha permitido realizar estudios de proteómica a gran escala. Al ser independiente de la electroforesis 2D, ha demostrado ser un método muy efectivo en la identificación de proteínas minoritarias.

Los primeros estudios a gran escala, en lo que respecta a la desetiología, identificaron un amplio panel de proteínas cuyas funciones estarían potencialmente involucradas en dicho proceso, por ejemplo en maíz (Shen et al., 2009) y en arroz (Hamamoto et al., 2012; Kleffmann et al., 2007). Como las modificaciones post-traduccionales son eventos muy minoritarios del proteoma, se han desarrollado

técnicas de enriquecimiento de las proteínas modificadas. Como mencionamos en la sección 5.3.1 de la introducción, la fosforilación es frecuente en la transducción de señales lumínicas y al ser de carácter reversible, constituye un poderoso mecanismo de regulación. Dado que la fracción de péptidos fosforilados en una muestra proteica es muy pequeña (alrededor del 30%), el avance en las técnicas de enriquecimiento en fosfopéptidos permitió la identificación de numerosos sitios de fosforilación en *Arabidopsis* (Meyer et al., 2012; Bayle et al., 2011), arroz (Zhang et al., 2012), alfalfa (Grimsrud et al., 2010), y soja (Meyer et al., 2012; Nguyen et al., 2012).

Empleando técnicas de proteómica a gran escala, se identificaron cambios en el estado de fosforilación de intermediarios clave de la fotomorfogénesis. Los criptocromos sufren fosforilaciones inducidas por luz que regulan su actividad y abundancia. Particularmente, el cry2 fotoactivado es fosforilado en 24 sitios distintos (Liu et al., 2017b). Las PPKs catalizan la fosforilación de cry2 dependiente de luz azul, teniendo efectos sobre la activación y desestabilización de dicho fotorreceptor (Liu et al., 2017b). Como se expuso previamente en la sección 5.3.1 de la introducción, las proteínas PPK también interactúan y fosforilan a PIF3 (Ni et al., 2017), que constituye otro ejemplo de proteína con múltiples fosforilaciones inducidas por luz. Contrariamente a PIF, HY5, se encuentra predominantemente fosforilado en su dominio de unión a COP1 en oscuridad. La luz induce su desfosforilación, exacerbando así la isoforma con mayor actividad y menor estabilidad (desfosforilada) (ver sección 5.3.1 de introducción).

Mediante ensayos cuantitativos de espectrometría de masas, también se han logrado encontrar los sitios de fosforilación para phot1 y phot2, que sufren múltiples fosforilaciones inducidas por luz azul (Inoue et al., 2011, 2008).

En un estudio de fosfoproteómica a gran escala, realizado con el objetivo de estudiar el cambio de las fosforoproteínas durante la desetiolación en hojas de maíz, compararon plantas cultivadas en oscuridad con plantas expuestas a 6 o 12 h de luz blanca (Ning et al., 2016). Así reportaron 107 proteínas fosforiladas en oscuridad, 49 al cabo de 6 h de exposición a la luz y 73 luego de 12 h de luz (Ning et al., 2016). También, lograron identificar numerosas fosfoproteínas de abundancia minoritaria que antes habían escapado a la detección por técnicas convencionales. Sus resultados

revelaron que durante la desetiología de las hojas de maíz, ocurren modificaciones en el estado de fosforilación de proteínas regulatorias tales como factores de transcripción, quinasas y demás proteínas relacionadas con la transducción de señales (Ning et al., 2016). Sin embargo, los tratamientos de luz de larga duración empleados en este diseño experimental (6 h o 12 h), no se independizaron de los efectos transcripcionales producto del desencadenamiento de la desetiología y la maquinaria fotosintética en plena actividad. Además, los cambios en el estado de fosforilación medidos a largo plazo revelarían no solo los cambios tempranos en fosfoproteínas directamente asociados al tratamiento de luz, sino también aquellos cambios indirectos. Es decir, no se podría discriminar entre proteínas cuya expresión o degradación se induzca por luz, de aquellas que son des/fosforiladas como respuesta directa al tratamiento de luz. En este contexto, nos propusimos identificar nuevos componentes que potencialmente participen en eventos tempranos y directos de la desetiología, a través de técnicas de proteómica a gran escala que involucran el enriquecimiento de las muestras en fosfopéptidos, seguido de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en *tandem* (LC-MS/MS).



## 1.2 Resultados.

### 1.2.1 Diseño del experimento.

Dado que el único trabajo centrado en el estudio de la fosforilación diferencial de todas las proteínas inducidas por luz, no se independizó de los efectos transcripcionales; nos propusimos llevar a cabo un estudio de fosfoproteómica a gran escala a tiempos cortos de luz. Para comenzar a ver los efectos tempranos de la transcripción se han realizado experimentos de microarreglos utilizando tratamientos de luz como mínimo de 45min - 1 h (Peschke and Kretsch, 2011; Tepperman et al., 2001). Decidimos entonces utilizar 20 min de exposición a la luz para nuestros análisis, ya que phot1 satura sus múltiples sitios de fosforilación en plántulas etioladas de *Arabidopsis thaliana* luego de ser expuestas a 20 min de luz azul (Deng et al., 2014). Otro ejemplo que avala la factible detección de cambios en el estado de fosforilación en ese rango ha sido descrito para PIF3, para los que se han identificado 16 fosforilaciones inducidas por 10 min de luz roja (Ni et al., 2013).

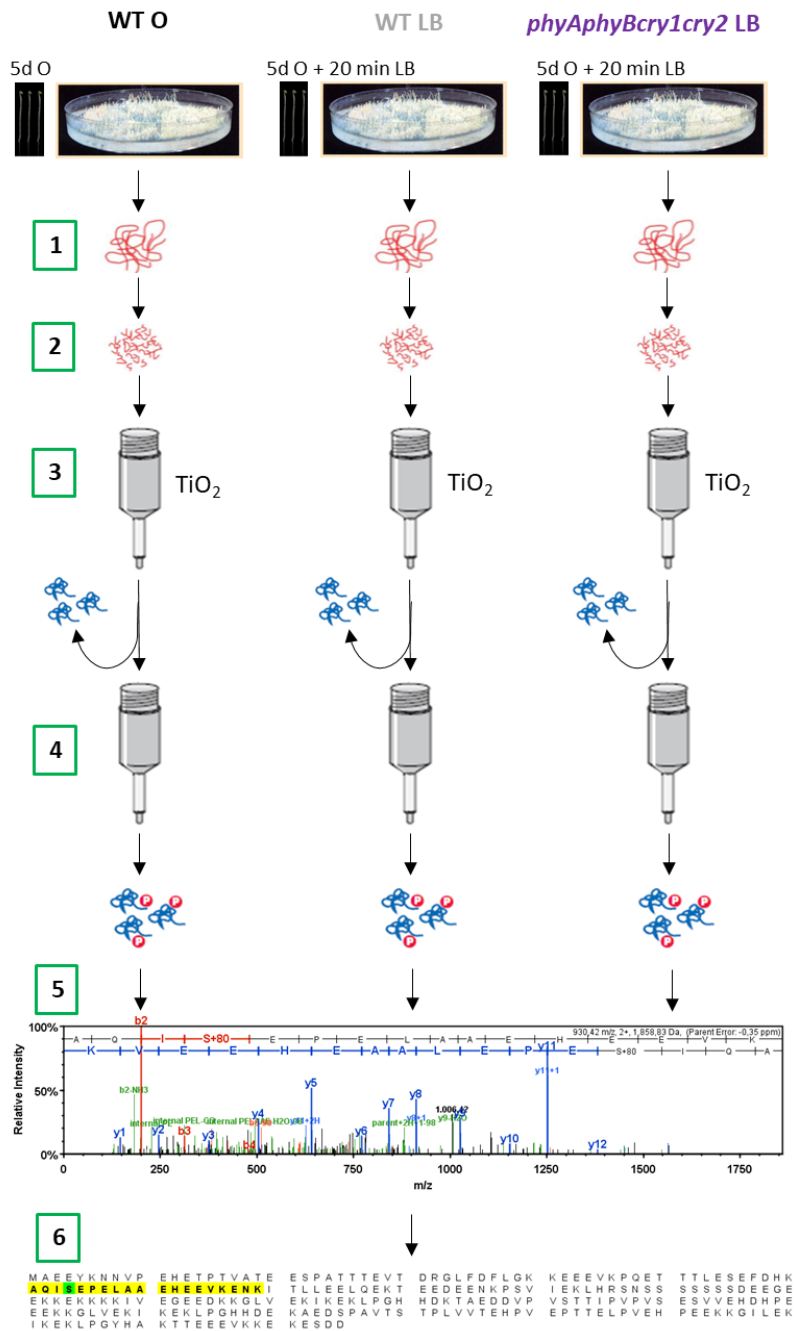
Para cumplir nuestro objetivo de identificar a las proteínas diferencialmente fosforiladas por luz en forma temprana, realizamos un diseño experimental donde se evaluaron 3 condiciones (ver figura 1.1): **WT O**, plántulas que se desarrollaron 5 d en completa oscuridad; **WT LB**, plantas que crecieron 5 d en oscuridad y fueron expuestas a 20 min de luz blanca previo a su cosecha; y **phyAphyBcry1cry2 LB**, plantas cuádruple mutantes cultivadas 5 d en oscuridad y sometidas al tratamiento de 20 min de luz blanca antes de su cosecha. Teniendo en cuenta el alto costo por muestra que requiere este experimento, se excluyó el tratamiento del cuádruple mutante en oscuridad (**phyAphyBcry1cry2 O**); apoyándonos en análisis transcripcionales y proteómicos anteriores que mostraron que los únicos cambios de expresión entre plántulas etioladas WT y cuádruples mutantes *phyAphyBcry1cry2*, ocurren en proteínas de reserva en las semillas (Fox et al., 2015; Mazzella et al., 2005). No obstante, no se descarta que se vea alterado el estado de fosforilación de algunas proteínas por el genotipo, lo que será necesario corroborar por medio de otras estrategias de rutina.

Como se detalla en la sección 3 de materiales y métodos, se extrajeron proteínas totales de 3 réplicas independientes para cada tratamiento: WT O, WT LB y

*phyAphyBcry1cry2* LB. Los extractos fueron enviados al centro de proteómica de la Universidad de Laval (Québec, Canadá) donde se trataron con la enzima Tripsina para generar péptidos. Mediante cromatografía de afinidad en columnas con  $\text{TiO}_2$ , se enriquecieron las muestras en fosfopéptidos que luego se procesaron por LC-MS/MS (Fig.1.1).

La comparación entre WT O y WT LB permite la identificación de fosfoproteínas con fosforilación diferencial condicionada por luz, mientras que la comparación entre WT LB y *phyAphyBcry1cry2* LB nos permite conocer los fosfopéptidos cuyo estado de fosforilación cambia en presencia/ausencia de alguno de los fotorreceptores en estudio (Fig 1.2).

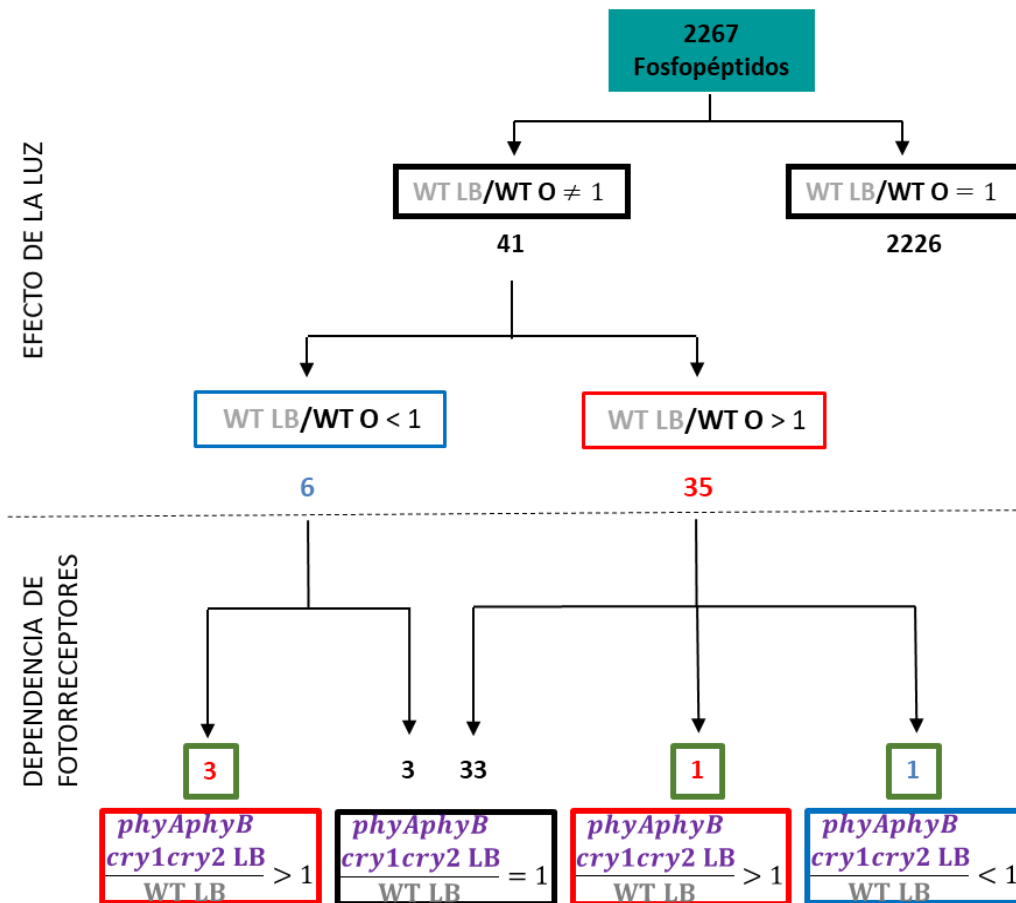
El procesamiento de las muestras resultó en un total de 3296 péptidos identificados. De éstos, el 68.8% correspondió a 2267 fosfopéptidos pertenecientes a 1152 fosfoproteínas.



**Figura 1.1** Procedimiento de obtención y procesamiento de muestras: **WT O**, plántulas que se desarrollaron 5 d en completa oscuridad (5 d O); **WT LB**, plantas que crecieron 5 d en oscuridad y fueron expuestas a 20 min de luz blanca a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (5 d O + 20 min LB); y ***phyAphyBcry1cry2* LB**, plantas cuádruples mutantes cultivadas 5 d en oscuridad y sometidas al mismo tratamiento de 20 min de luz blanca. **1.** Extracción de proteínas totales según se detalla en la sección 3.1 de materiales y métodos. **2.** Tratamiento con la enzima Tripsina para generar péptidos. **3.** Enriquecimiento de las muestras en fosfopéptidos mediante cromatografía de afinidad con dióxido de Titanio ( $\text{TiO}_2$ ). Por afinidad de cargas, los péptidos fosforilados permanecen retenidos en la columna mientras que eluyen los péptidos no fosforilados. **4.** Elución de los fosfopéptidos. **5.** Fraccionamiento de las muestras y procesamiento por LC-MS/MS. **6.** Análisis bioinformáticos e identificación de los fosfopéptidos y sitios de fosforilación.

### 1.2.2 La luz induce cambios en la fosforilación de 41 fosfopéptidos. 6 en forma dependiente de fotorreceptores.

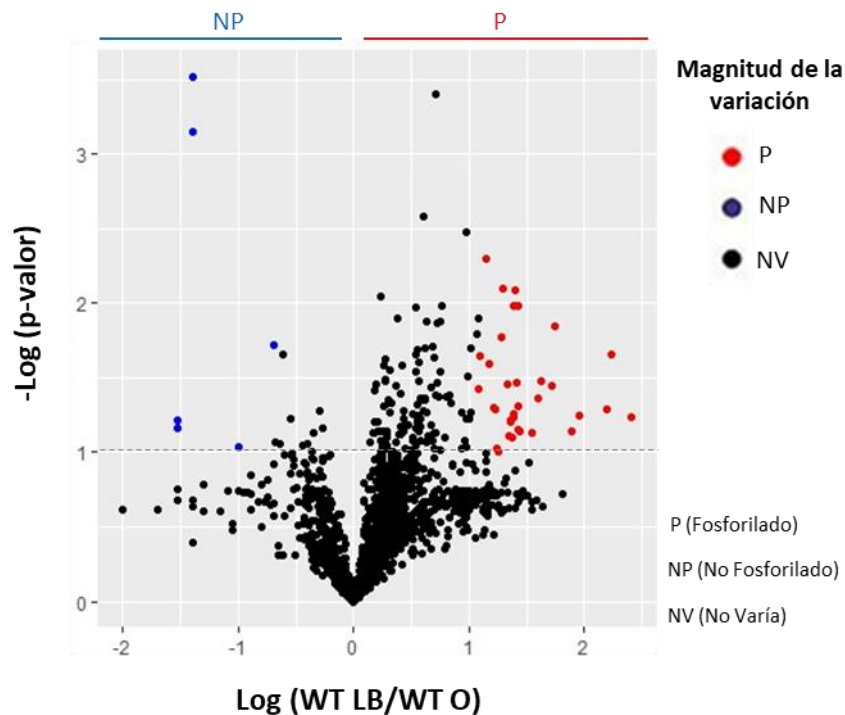
Con el fin de reconocer las fosfoproteínas cuyo estado de fosforilación cambia por luz, se comparó la abundancia relativa de las isoformas fosforiladas para cada fosfopéptido en las muestras WT LB respecto de WT O (Fig. 1.2). La relación WT LB/WT O representa la magnitud del cambio en la abundancia de cada fosfopéptido en dichas muestras. Dado un fosfopéptido, si WT LB/WT O = 1 (o en escala logarítmica, 0) entonces no existiría variación en su estado de fosforilación entre luz y oscuridad. Si WT LB/ WT O > 1 (en escala logarítmica, positivo), dicho fosfopéptido se fosforilaría en respuesta a la luz; en caso contrario, si WT LB/WT O < 1 (o negativo en escala logarítmica) indicaría una posible desfosforilación inducida por luz. Para analizar si las diferencias entre WT LB/ WT O eran significativas realizamos la prueba estadística de Welch, y consideramos valores absolutos del parámetro z mayores a 1,96 ( $|z| > 1,96$ ) en la prueba de estandarización para descartar posibles falsos positivos. Los casos previamente reportados de proteínas cuyo estado de fosforilación cambia por luz, fueron considerados como controles positivos en nuestros análisis. Así, encontramos para CRY2 un sitio de fosforilación regulado por luz, la Treonina 604 (p-valor = 0.0167) (ver Tabla 1.1 fila 26), previamente reportado por Liu et al., 2017b. También, encontramos para PHOT1 los sitios correspondientes a las serinas 13 (p-valor = 0.0141), 23 (p-valor = 0.008), 376 (p-valor = 0.0621), 382 (p-valor = 0.0514), 410 (p-valor = 0.0220) (Tabla 1.1 filas 12-16), 58 (p-valor = 0.1953), 350 (p-valor = 0.1177) y 450 (p-valor = 0.1552) fosforiladas en el tratamiento de WT LB. Varios de estos sitios de fosforilación han sido reportados antes: S<sup>376</sup>, S<sup>410</sup>, S<sup>58</sup> y S<sup>350</sup> (Deng et al., 2014; Inoue et al., 2008; Sullivan et al., 2008). Considerando los ejemplos anteriormente expuestos, varios de los cambios en el estado de fosforilación observados se condicen con los reportados en los trabajos citados, y algunas de ellos presentan p-valores entre 0,05 y 0,1.



**Figura 1.2** Esquema que detalla las comparaciones secuenciales realizadas a partir de los 2267 fosfopéptidos identificados. En rojo se destacan los fosfopéptidos fosforilados por luz y/o fotorreceptores; en azul se destacan los fosfopéptidos desfosforilados por la luz y/o fotorreceptores. Se recuadran en verde los fosfopéptidos significativos para ambas comparaciones.

Dada estas evidencias, establecimos un umbral de significancia menos restrictivo para nuestro análisis ya que de lo contrario podrían quedar excluidas del análisis proteínas de interés. Para este análisis consideramos significativo un cambio en la fosforilación de un fosfopéptido, si cumple simultáneamente dos requisitos: a) un p-valor  $< 0,1$  en la prueba estadística de Welch y b) valores absolutos del parámetro z mayores a 1,96 ( $|z| > 1,96$ ). El gráfico tipo Volcán de la figura 1.3 muestra la magnitud del cambio en función de su significancia para cada fosfopéptido, con valores de  $-\log_{10}$  (p-valor) en ordenadas versus  $\log_{10}$  (WT LB/WT O) en abscisas. Cuarenta y un fosfopéptidos pertenecientes a 37 fosfoproteínas distintas, variaron significativamente su estado de fosforilación. De los 41 fosfopéptidos, 35 se fosforilaron por el pulso de

luz mientras que 6 resultaron desfosforilados (Fig. 1.3, Tabla 1.1). En la tabla 1.1 se especifican los sitios de fosforilación que se fosforilaron/desfosforilaron diferencialmente por luz, para cada uno de los 41 fosfopéptidos seleccionados. Cabe destacar, que tomando los valores con un umbral de significancia más restrictivo ( $p$ -valor  $< 0.05$ ), de los 41 fosfopéptidos mostrados en la tabla 1.1, quedarían remanentes 22.



**Figura 1.3** Gráfico Volcán de los 2267 fosfopéptidos identificados. Los puntos ubicados en el 0 del eje X corresponden a fosfopéptidos que presentan la misma abundancia de sus isoformas fosforiladas en WT LB y WT O. Los puntos posicionados en los cuadrantes positivos del eje X corresponden a los fosfopéptidos que cumplen  $WT\ LB / WT\ O > 1$ ; y los ubicados en los cuadrantes negativos cumplen con la condición  $WT\ LB / WT\ O < 1$ . En el eje Y se grafica  $-\log(p\text{-valor})$  que surge de la prueba estadística de Welch que compara la diferencia entre WT LB y WT O. El umbral de significancia está determinado en 1. Los puntos que superaron dicho umbral y pasaron la prueba de estandarización para descartar falsos positivos, corresponden a los 41 fosfopéptidos que cambian significativamente su estado de fosforilación en respuesta a la luz. En rojo, los 35 que se fosforilan (P) y en azul los 6 que se desfosforilan en luz (NP). En negro, los que no variaron (NV).

Para discriminar entre aquellos fosfopéptidos cuyo cambio en la fosforilación por luz fuera dependiente o independiente de la presencia de los fotorreceptores, comparamos la abundancia de esos 41 fosfopéptidos en las muestras

*phyAphyBcry1cry2* LB, respecto de WT LB (Fig. 1.2). Nuevamente, si *phyAphyBcry1cry2* LB/ WT LB = 1 entonces el cambio en la fosforilación inducido por luz sería independiente de los fotorreceptores en estudio. Este fue el caso para 36 de los 41 fosfopéptidos (en blanco en la tabla 1.1), de los cuales 3 se desfosforilan y 33 se fosforilan (Fig. 1.2, tabla 1.1). Si la luz induce un evento de fosforilación que es dependiente de la presencia de fotorreceptores, entonces esperamos que la relación de la abundancia del fosfopéptido en *phyAphyBcry1cry2* LB/ WT LB sea < 1 ya que la ausencia de los fotorreceptores sería equivalente a que se encuentren inactivos en oscuridad. Caso contrario, si la luz induce un evento de desfosforilación que es mediado por fotorreceptores, esperamos que la isoforma fosforilada esté más representada en *phyAphyBcry1cry2* LB, con lo cual *phyAphyBcry1cry2* LB/ WT LB sería > 1. De los 41 fosfopéptidos que cambiaron su estado de fosforilación por luz, 5 mostraron cocientes distintos de 1, o sea que su fosforilación depende de alguno de los fotorreceptores activos (ver recuadros en verde en la Fig 1.2 y los resaltados en verde en la tabla 1.1). Entre estos 5 fosfopéptidos, 3 se desfosforilan y 2 se fosforilan. Interesantemente, los 3 fosfopéptidos que se desfosforilan por luz estarían negativamente regulados por los fotorreceptores, ya que *phyAphyBcry1cry2* LB/ WT LB es > 1. Estos fueron los casos de LFDDVSpTSPASYHEPDPHAK (Tabla1.1 fila 38) perteneciente a "INCREASED SODIUM TOLERANCE PROTEIN 1-LIKE 5" (ISTL5, At2g19710); QVDALPAVASpVDDFK (Tabla1.1 fila 40) correspondiente a "COP1-INTERACTING PROTEIN 7" (CIP7, At4g27430); y NDSHEENTIHALSQSISpFGK (Tabla1.1 fila 39) correspondiente a una proteína no caracterizada que se identifica con el gen At3g27350. Por otro lado, los 2 péptidos que se fosforilan por luz tienen diferentes relaciones con los fotorreceptores. Uno de los fosfopéptidos (RNSLDIPVSpPEPNVPR, Tabla1.1 fila 41) pertenece a la proteína "SWITCH-ASSOCIATED PROTEIN 70" (SWAP70, At2g30880), cuya isoforma fosforilada se encuentra predominantemente en luz (muestras WT LB) y está particularmente enriquecida en ausencia de los principales fotorreceptores (muestras *phyAphyBcry1cry2* LB). Esto sugiere que la fosforilación de SWAP70 sería inducida por luz pero, por lo menos alguno de los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y/o cry2 fotoactivados, podría tener un efecto inhibitorio sobre dicha fosforilación. El otro fosfopéptido corresponde a AESpETGTKEVEVTNVNSDGDQSDINSK perteneciente a la fosfoproteína "PROTEIN CROWDED NUCLEI 1" (CRWN1, At1g67230)

(Tabla 1.1 fila 37). Este péptido se fosforila por luz de una forma dependiente de los fotorreceptores.

**Tabla 1.1 Lista de los 41 fosfopéptidos fosforilados diferencialmente en luz (a continuación).** En blanco, la lista de los 36 fosfopéptidos que cambian su estado de fosforilación independientemente de los fotorreceptores en estudio. En verde los 5 que se fosforilan/ desfosforilan de manera dependiente de la presencia de dichos fotorreceptores. Se detalla para cada fosfopéptido (en orden de izquierda a derecha): Código de identificación del gen en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, nombre de la proteína a la que pertenecen, secuencia del fosfopéptido (marcado en rojo el sitio de fosforilación), parámetro *Score* o Puntuación (los valores más altos corresponden a los péptidos mejor identificados), valores correspondientes al cociente WT LB/WT O; magnitud de la variación y p-valor, valores correspondientes al cociente *phyAphyBcry1cry2* LB/WT LB, magnitud de la variación y p-valor, localización en la proteína del sitio de fosforilación especificando el aminoácido que sufriría dicha modificación post-traduccional. Referencias: La magnitud de la variación indicada con un valor numérico o la letra P (fosforilado) en rojo, corresponde a mayor abundancia de la isoforma fosforilada en WT LB respecto WT O y en *phyAphyBcry1cry2* LB respecto WT LB según la comparación. La magnitud de la variación indicada con la letra NP (no fosforilado) en azul, corresponde a menor abundancia de la isoforma fosforilada en WT LB respecto WT O y en *phyAphyBcry1cry2* LB respecto WT LB según la comparación. La magnitud de la variación indicada con la letra NV (no varía) en negro, corresponde a igual abundancia de las isoformas en las condiciones en estudio. NC (no cuantificable) en negro, significa que el fosfopéptido no se ha logrado cuantificar en por lo menos 2 réplicas de una condición (ver criterios en Materiales y Métodos 3.4).



Gen	Proteína	Fosfopéptido	Puntuación WT <sub>LE</sub> /WT <sub>O</sub>	Magnitud de la variación	p-valor Welch	phyAphyB enrich2/LBI 10 <sup>4</sup> TLB	Magnitud de la variación	p-valor Welch	Sitio de fosforilación
1	Ai3953930	PROTEIN KINASE SUPERFAMILY PROTEIN	84,69	0,04	0,0003	13,82	NV	0,1406	S(265)
2	Ai3901490	PROTEIN KINASE SUPERFAMILY PROTEIN	99,16	0,10	0,0919	-	NC	-	S(43)
3	Ai3917850	PROBABLE S/T PROTEIN KINASE IREH1	85,47	0,20	0,0191	2,31	NV	0,0597	S(663)
4	Ai2934680	OUTER ARM DYNEIN LIGHT CHAIN 1 (AIR9)	79,94	26,83	0,0701	0,82	NV	0,5822	S(91)
5	Ai1011100	60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P-1	124,28	17,94	0,0997	17,94	NV	0,5539	S(86)
6	Ai5957290	60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P-3	176,17	24,41	0,0585	24,41	NV	0,3639	S(106)
7	Ai1064110	P-LOOP CONTAINING NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE HYDROLASES SUPERFAMILY PROTEIN (DAA1)	96,17	16,29	0,0497	3,19	NV	0,3445	S(243)
8	Ai1061100	DISEASE RESISTANCE PROTEIN (TR class)	93,91	41,87	0,0332	0,73	NV	0,3102	S(598)
9	Ai1054270	EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4A-2 (EIF 4A-2)	110,38	23,62	0,0803	0,15	NV	0,0867	S(4)
10	Ai1009730	CYSTEINE PROTEINASES SUPERFAMILY PROTEIN (ASP1) (ULP2B)	84,87	27,84	0,0720	0,41	NV	0,1766	S(36)
11	Ai3913920	EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4A-2 (EIF 4A-1)	94,31	24,47	0,0556	0,45	NV	0,1875	S(4)
12			187,74	23,10	0,0621	0,71	NV	0,3966	S(376)
13			147,51	55,30	0,0141	1,02	NV	0,9675	S(13)
14	Ai3945780	PHOTOTROPIN 1	107,34	170,62	0,0220	1,88	NV	0,0154	S(410)
15			81,31	24,84	0,0082	0,75	NV	0,4888	S(23)
16			135,10	155,39	0,0514	0,31	NV	0,0846	S(382)
17	Ai2930930	Uncharacterized Protein	143,93	19,66	0,0079	2,01	NV	0,4728	S(18)/T(81)
18	Ai2941840	40S RIBOSOMAL PROTEIN S2-3 (RPS2C)	99,07	90,26	0,0573	0,35	NV	0,1050	S(275)
19	Ai2907360	SH3 DOMAIN CONTAINING PROTEIN	133,15	257,30	0,0578	0,33	NV	0,1070	S(110)
20	Ai3904630	PROTEIN WW/D2-LIKE 1 (WDL1)	100,22	14,89	0,0255	0,59	NV	0,5061	T(32)
21	Ai1024560	PARAMYOSIN	82,15	26,96	0,0105	0,27	NV	0,0586	S(12)
22	Ai3907810	RNA BINDING (RRMRB/RNP MOTIFS) FAMILY PROTEIN	101,39	12,01	0,0126	1,05	NV	0,8484	S(195)
23	Ai4922670	FAM10 FAMILY PROTEIN	117,09	35,08	0,0738	1,00	NV	0,9973	S(190)
24	Ai5903040	IQD2	98,45	52,79	0,0361	0,32	NV	0,0573	S(33)
25	Ai3916060	KINESIN-LIKE PROTEIN	155,47	16,67	0,0510	0,35	NV	0,0786	S(594)
26	Ai1044400	CRYPTOCHROME 2	160,64	18,82	0,0167	0,20	NV	0,0104	T(604)
27	Ai1012360	SNARE-INTERACTING PROTEIN KEULE	86,26	24,33	0,0104	0,31	NV	0,0082	S(682)
28	Ai5906160	SPlicing FACTOR SF3a60 HOMOLOG (ATO)	78,55	17,53	0,0935	0,23	NV	0,1139	S(373)
29	Ai1019870	PROTEIN IQ-DOMAIN 32	124,10	13,98	0,0050	0,43	NV	0,0781	S(93)
30	Ai3916620	ANSLOCASE OF CHLOROPLAST 120 (TOC120)	84,62	12,57	0,0225	0,11	NV	0,0244	S(322)
31	Ai5947210	RGG REPEATS NUCLEAR RNA BINDING PROTEIN C	72,21	26,81	0,0486	0,79	NV	0,6569	S(355)
32	Ai5902770	PROTEIN MODIFIER OF SNC1 11 (MOS11)	50,20	23,19	0,0604	0,88	NV	0,6973	S(76)
33	Ai2935880	PROTEIN WW/D2-LIKE 4 (WDL4)	80,10	21,23	0,0352	5,41	NV	0,0123	S(239)
34	Ai2942320	NUCLEOLAR PROTEIN GAR2-LIKE PROTEIN (MHK10.4)	90,37	12,21	0,0379	0,26	NV	0,0385	S(630)
35	Ai4911660	HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR B-2b	82,36	25,86	0,0337	0,70	NV	0,2384	T(224)
36	Ai4924370	POSITIVE REGULATOR OF SKD1 (PROS)	122,46	22,12	0,0776	1,34	NV	0,4288	S(37)
37	Ai1067230	PROTEIN CROWDED NUCLE11 (CRWN11)	69,15	39,59	0,0435	0,03	P	0,0442	S(851)
38	Ai21019710	INCREASED SODIUM TOLERANCE PROTEIN 1-LIKE 5 (ISTL5)	72,77	0,03	0,0610	46,77	NP	0,0004	S(598)
39	Ai3927350	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR ATRX-LIKE PROTEIN	99,10	0,03	0,0690	94,22	NP	0,0022	S(36)
40	Ai4927430	COP1 INTERACTING PROTEIN 7 (CIP7)	52,37	0,04	0,0007	9,18	NP	0,2557	S(915)
41	Ai2930980	SWAP70	96,10	0,03	0,1786	50,04	NV	0,0106	S(915)
			131,67	76,85	0,0729	2,31	NV	0,0915	S(485)
			82,86	-	-	48,95	NC	0,0005	S(485)

Por otro lado, para aquellos casos en los que la luz NO tuvo un efecto en la fosforilación de proteínas (WT LB/ WT O = 1) realizamos la comparación del cuádruple mutante *phyAphyBcry1cry2* LB con WT LB, encontrando 44 fosfopéptidos que variaban su estado de fosforilación (Tabla 1.2). Estos cambios vienen dados en su mayoría por el genotipo y no se deben al tratamiento de luz. Consistentemente con los datos previamente reportados, estos fosfopéptidos correspondieron en general a proteínas de reserva de semilla (Fox et al., 2015; Mazzella et al., 2005).

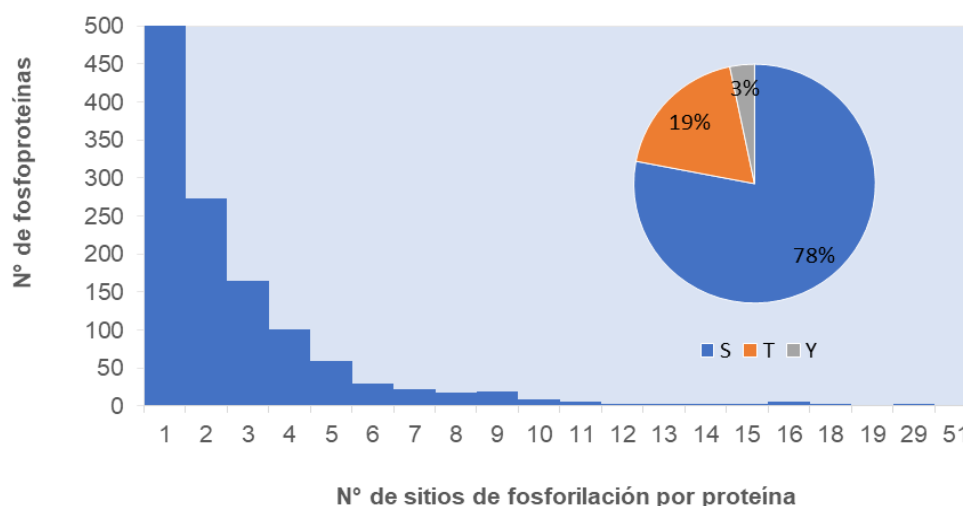
En resumen, los 41 fosfopéptidos diferencialmente fosforilados por luz correspondieron a un total de 37 fosfoproteínas únicas. Entre ellas, 5 revelaron que esta modificación post-traducciona l tendría lugar en presencia de al menos uno de los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y/o cry2 fotoactivados. En 3 de ellas (CIP7, ISTL5 y At3g27350), ocurriría una desfosforilación inducida por luz, mientras que las 2 restantes (CRWN1 y SWAP70) se fosforilarían en esas condiciones.

**Tabla 1.2 Lista de los fosfopéptidos que variaron solamente por el genotipo independientemente del tratamiento de luz (a continuación).** Se detalla para cada fosfopéptido (en orden de izquierda a derecha): Código de identificación del gen en el genoma de *Arabidopsis thaliana*, nombre de la proteína a la que pertenecen, secuencia del fosfopéptido y resaltado el sitio de fosforilación, parámetro *Score* o Puntuación (los valores más altos corresponden a los péptidos mejor identificados), valores correspondientes al cociente *phyAphyBcry1cry2* LB/WT LB, magnitud de la variación y p-valor, localización en la proteína del sitio de fosforilación especificando el aminoácido que sufriría dicha modificación post-traducciona l. Referencias: La magnitud de la variación indicada con la letra P (fosforilado) o valor numérico en rojo, corresponde a mayor abundancia de la isoforma fosforilada en y en *phyAphyBcry1cry2* LB respecto WT LB. La magnitud de la variación indicada con la letra NP (no fosforilado) o valor numérico en azul, corresponde a menor abundancia de la isoforma fosforilada en *phyAphyBcry1cry2* LB respecto WT LB.

Gen	Proteina	Fostopéptido	Puntuación	phyAphyBery1ery2 LB/ WT LB	Magnitud de la variación	p-valor	Sitio de fosforilación
1	A12g27720	60S acidic ribosomal protein P2-1	201,72	0,06	0,06	0,0402	S 105;S1;117;120;88;101
2	A14g27320	PHOS34	138,46	35,29	35,29	0,0166	S 30
3	A15g09960	SH3 domain protein	121	36,87	36,87	0,0581	S 93
4	A14g28520	12S seed storage protein CRC	268,5	58,36	58,36	0,0942	S 259
5	A12g40170	Em-like protein GEA6	224,58	334,77	334,77	0,0738	S 29
6	A12g40170	Em-like protein GEA6	193,73	470,78	470,78	0,0689	S 66
7	A12g40170	Em-like protein GEA6	89,201	377,71	P	0,0795	S 25
8	A13g13300	VCS Enhancer of mRNA-decapping protein 4	64,422	41,37	P	0,0960	S 701
9	A14g12780	Auxilin-related protein 1	111,56	82,52	P	0,0379	S 285
10	A15g09250	RNA polymerase II transcriptional coactivator KIWI	98,376	178,34	P	0,0042	S 15
11	A12g34357	ARM repeat superfamily protein	100,23	56,51	P	0,0753	S 1101
12	A15g52300	LT165 Low-temperature-induced 65 kDa protein	101,53	70,98	P	0,0702	S 363
13	A14g27150	AT2S4 2S seed storage protein 2	185,61	57,46	P	0,0305	T 117;113
14	A14g27160	AT2S3 2S seed storage protein 3	133,48	156,28	P	0,0027	T 110
15	A11g35160	GRF4 14-3-3-like protein GF14 phi	65,887	100,31	P	0,0048	S 248
16	A15g64850	MXK3.7	94,886	40,76	P	0,0530	S 49
17	A12g30060	RANBP1B	138,36	93,52	P	0,0225	S 5
18	A11g26630	ELF5A-2	107,63	53,07	P	0,0851	S 76
19	A14g17950	AHL13 AT-hook motif nuclear-localized protein 13	65,375	60,48	P	0,0743	S 376
20	A15g63640	MBK5.12	91,1	58,08	P	0,0733	S 353
21	A15g54740	SESA5 2S seed storage protein 5	101,3	38,49	P	0,0700	S157 T154
22	A15g66780	MUD21.2	228,9	254,71	P	0,0824	S 71
23	A15g66780	MUD21.2	142,55	55,46	P	0,0821	S 62
24	A11g16730	F17F16.6 Unknown Protein 6	98,967	84,86	P	0,0774	S 50
25	A11g19870	IQD32 Protein IQ-DOMAIN 32	82,362	52,49	P	0,0265	S 87
26	A11g47820	T2E6.7	67,553	48,78	P	0,0354	S 71
27	A15g16840	BPA1 Binding partner of ACD11.1	115,34	393,73	P	0,0672	Y 246
28	A15g16780	DOT2 SART-1 family protein DOT2	88,241	47,92	P	0,0133	S 606;607 Y T609
29	A12g04880	WRKY1 WRKY transcription factor 1	52,642	52,50	P	0,0319	S 76
30	A11g12080	Vacuolar calcium-binding protein-like protein	170,04	0,02	NP	0,0065	T 103
31	A11g12080	Vacuolar calcium-binding protein-like protein	115,74	40,20	P	0,0434	T 115
32	A11g16610	SR45 Serine/arginine-rich splicing factor SR45	85,064	74,04	P	0,0093	S 300
33	A14g11740	PUX8 Plant UB3 domain-containing protein 8	62,848	658,19	P	0,0663	S 313
34	A15g46870	MSD23.5	98,552	36,23	P	0,0140	S 266
35	A11g75240	ZHD5 Zinc-finger homeodomain protein 5	68,192	53,43	P	0,0403	S 58
36	A11g15940	T24D18.4	59,359	51,62	P	0,0053	S 768
37	A13g09670	Tudor/PWWP/MBT superfamily protein F11F8_26	111,33	49,76	P	0,0095	S 606
38	A13g14172	GPI-anchored adhesin-like protein	84,297	0,07	NP	0,0629	S 300;330;338
39	A11g21630	Calcium-binding EF hand family protein	70,908	0,08	NP	0,0277	S 1102; T 1103
40	A11g21630	Calcium-binding EF hand family protein	98,582	0,03	NP	0,0859	S 1115;1137;1144;1166
41	A13g05900	uncharacterized protein	82,483	0,04	NP	0,0153	S 456;429
42	A13g19770	VPS9A Vacuolar protein sorting-associated protein 9A	117,14	0,03	NP	0,0340	S 194
43	A14g26450	Uncharacterized protein	130,62	0,05	NP	0,0803	S 385 T 386
44	A15g63420	emb2746	102,63	0,08	NP	0,0057	S 805

### 1.2.3 Análisis de los sitios de fosforilación identificados.

El patrón de distribución de los 3460 sitios de fosforilación reconocidos en las 1152 fosfoproteínas identificadas en este estudio, muestra que la mayoría de las fosfoproteínas presentan escasos sitios fosforilables (de 1 a 3), pero existen casos minoritarios que presentan múltiples fosforilaciones (Fig. 1.4). Por ejemplo, la proteína de asociación a microtúbulos “PROTEIN IQ-DOMAIN 32” o IQD32 (At1g19870) presentó 29 sitios de fosforilación. Otro caso es el de CRWN1, a quien identificamos con una fosforilación inducida por luz y fotorreceptores (Tabla 1.1 fila 37). En nuestros resultados, CRWN1 presentó en total 19 sitios de fosforilación. A su vez, las frecuencias de aminoácidos fosforilados (Serina, Treonina y Tirosina) fueron consistentes con los valores esperados conservados en eucariotas.



**Figura 1.4** Distribución de los sitios de fosforilación en las fosfoproteínas identificadas (histograma) y frecuencia de aminoácidos fosforilados (gráfico de torta). S = Serina; T = Treonina; Y = Tirosina.

Con el objetivo de explorar la identidad de las quinasas que podrían fosforilar los sitios que hemos identificado en este estudio, realizamos una búsqueda de motivos consenso que flanqueen las S, T e Y fosforiladas. Se alinearon los fosfopéptidos según el aminoácido fosforilado y se analizaron con el algoritmo *Motif-X* (Schwartz and Gygi, 2005) para determinar los motivos mayormente representados. Los motivos lineales suelen tener entre 2 y 8 aminoácidos, por lo que se estableció una ventana de

búsqueda de 15 aminoácidos (7 aminoácidos flanqueando el residuo fosforilado a ambos lados) para minimizar el riesgo de excluir motivos (utilizando una ventana muy pequeña) o favorecer motivos espurios (ventana muy grande). No fue posible registrar ningún motivo que presente un p-valor significativo al analizar el subconjunto de fosfopéptidos que variaron en respuesta a la luz (Tabla 1.1), lo que podría sugerir que son diversas las quinasas responsables de las fosforilaciones que sufrieron dichos fosfopéptidos. No obstante, 41 son escasos fosfopéptidos para llevar a cabo este tipo de análisis.

#### **1.2.4 Fosfopéptidos cuyo estado de fosforilación en luz depende de la presencia de fotorreceptores.**

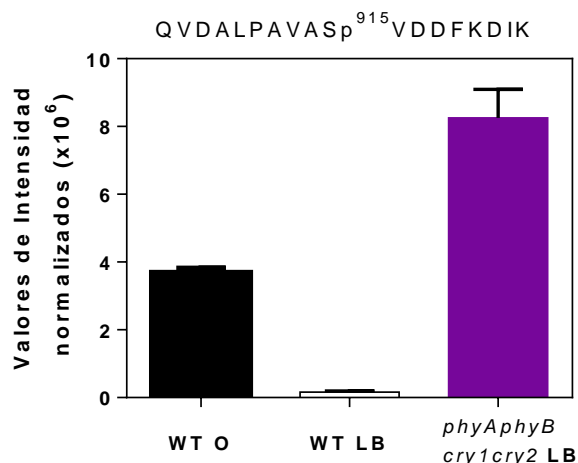
El experimento a gran escala que se presentó en este capítulo fue realizado con el objetivo de conocer la identidad de proteínas que se fosforilan o desfosforilan tempranamente y exclusivamente por luz, para comenzar a estudiar su función durante el desarrollo vegetal. Para esto buscamos información de aquellas 4 fosfoproteínas (CIP7, ISTL5, At3g27350 y CRWN1) con el fin de seleccionar con cual/es de ella/s continuar el estudio en profundidad. Exceptuamos a SWAP70 por su patrón de fosforilación extraño.

CIP7 ha sido descrita como un factor de transcripción que promueve la desetiología, induce la síntesis de antocianinas en luz blanca y azul, e interacciona con COP1 (Yamamoto et al., 1998). Los niveles transcripcionales de *CIP7* aumentan en la mutante *cop1*, sugiriendo que COP1 regula negativamente a *CIP7* en oscuridad (Yamamoto et al., 1998). Hasta la fecha no hay reportes de la regulación por fosforilación de CIP7 y los estudios realizados en 1998 no contaban con mutantes nulas para estudiar su función. En el presente estudio, hemos identificado 4 fosfopéptidos pertenecientes a CIP7, pero solo uno de ellos conteniendo a la Ser<sup>915</sup> exhibió regulación por luz, mientras que los otros 3 no varían de forma significativa (Fig. 1.5). Esto sugiere que la variación en la abundancia del fosfopéptido que contiene a la Ser<sup>915</sup> no puede ser explicada simplemente por un efecto transcripcional ya que en ese caso hubieran variado todos los fosfopéptidos encontrados.

**A**

Proteína	Gen	Fosfopéptidos	WT LB/ WT O	<i>phyAphyBcry1cry2</i> LB/ WT LB
CIP7	At4g27430	QVDALPAVASp <sup>915</sup> VDDFK	NP	P
		HYSEDVGEVQASQEKPVSppK	NV	NV
		SVELSRDPSpLEIK	NV	NV
		DNDSpEPELLR	NV	NV

**B**



**Figura 1.5** **A.** Tabla que detalla los fosfopéptidos identificados para CIP7. El fosfopéptido QVDAIPAVASpVDDFK presenta la S<sup>915</sup> que se desfosforila en luz en presencia de los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y/o cry2. **B.** Gráfico que muestra los valores de intensidades normalizados de la señal del MS para la isoforma fosforilada del fosfopéptido (n=3). Es mayoritariamente abundante en las muestras WT O y *phyAphyBcry1cry2* LB que en las WT LB. P (fosforilado) NP (no fosforilado) y NV (no varía).

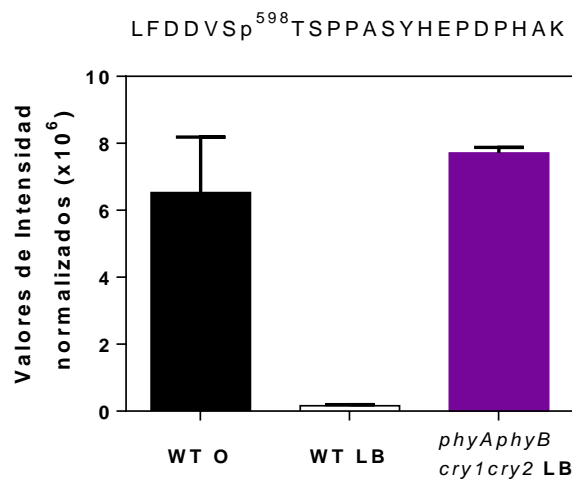
ISTL5 es un regulador de la “ATPasa SUPRESOR OF K<sup>+</sup> TRANSPORT GROWTH DEFECT 1” (SKD1) o “VACUOLAR PROTEIN SORTING 4” (VPS4) involucrada en el tráfico endosomal de los cuerpos multivesiculares (MVB). Este sistema participa en el transporte de proteínas hacia la membrana plasmática mediante la vía secretoria y la remoción de proteínas por la vía endocítica. Proteínas que han sido ubiquitinadas en su sitio citoplasmático se empaquetan en los MVBs por el complejo ESCRT (por “ENDOSOMAL SORTING COMPLEX REQUIRED TRANSPORT”), y posteriormente son degradadas cuando los lisosomas se fusionan a los MVBs. SKD1 proporciona la energía necesaria para la disociación de ESCRT de los MVBs, liberando el complejo para iniciar un nuevo ciclo de reciclado. Hasta la fecha no se conoce ciertamente la función de

ISTL5 (Buono et al., 2016). En el presente estudio, encontramos un sitio de fosforilación de ISTL5, la Ser<sup>598</sup>, cuya desfosforilación por luz depende de los fotorreceptores (Fig. 1.6). Interesantemente, encontramos en nuestros datos que PROS, un regulador positivo de SKD1 (Reyes et al., 2014), es una de las fosfoproteínas que se fosforilan en respuesta a la luz independientemente de la acción de los fotorreceptores (Tabla 1.1 fila 36). Es decir, dos proteínas que participan en las mismas vías de tráfico endosomal pero con efectos opuestos sobre SKD1, presentan regulación post-traducciona por luz. ISTL5 se desfosforilaría mientras que PROS se fosforilaría en esas condiciones (Tabla 1.1).

**A**

Proteína	Gen	Fosfopéptidos	WT LB/WT O	phyAphyBcry1cry2 LB/WT LB
ISTL5	At2g19710	LFDDVSp <sup>598</sup> TSPASYHEPDPHAK	NP	P
		VNHDDSpEEKLPTR	NV	NV
		ESFSEDHVSpPR	NV	NV
		MPVSASpSEDEEEVER	NV	NV
		QDSpTQSHISSASVNL	NC	NC

**B**



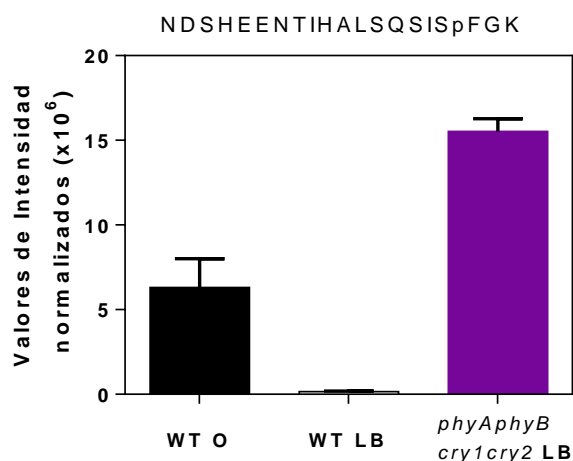
**Figura 1.6 A.** Tabla que detalla los fosfopéptidos identificados para ISTL5. El fosfopéptido IFDDVSpTSPASYHEPDPHAK presenta la S<sup>598</sup> que se desfosforilaría en luz en presencia de los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y/o cry2. **B.** Gráfico que muestra los valores de intensidades normalizados de la señal del MS para la isoforma fosforilada del fosfopéptido (n=3). Es mayoritariamente abundante en las muestras WT O y phyAphyBcry1cry2 LB que en las WT LB. P (fosforilado), NP (no fosforilado), NV (no varía) NC (no cuantificable).

En cuanto a la proteína no caracterizada codificada por el gen At3g27350 detectamos un sitio de fosforilación, la S<sup>36</sup>, que se desfosforilaría por luz y fotorreceptores, al igual que ocurre con CIP7 e ISTL5. Esta proteína sería un regulador transcripcional tipo “ATP-DEPENDENT X-LINKED HELICASE II” (ATRX-like) (Fig. 1.7). En un trabajo que empleó técnicas de fosfoproteómica cuantitativa para identificar proteínas de membrana que responden a elicitores bacterianos/ fúngicos, detectaron el mismo péptido fosforilado NDSHEENTIHALSQSI<sup>S</sup>pFGK en muestras de células de Arabidopsis expuestas a flagelina (Benschop et al., 2007). Dado que la percepción de elicitores inicia cascadas de señalización que involucran cambios en el estado de fosforilación de proteínas, es posible que At3g27350 cumpla un rol en la interacción planta-patógeno que desencadene mecanismos de defensa.

**A**

Proteína	Gen	Fosfopéptidos	WT LB/ WTO	phyAphyBcry1cry2 LB/ WT LB
No caracterizada	At3g27350	NDSHEENTIHALSQSI <sup>S</sup> pFGK	NP	P

**B**



**Figura 1.7 A.** Tabla que detalla los fosfopéptidos identificados para la proteína no caracterizada codificada por el gen At3g27350. El fosfopéptido NDSHEENTIHALSQSI<sup>S</sup>pFGK presenta la S<sup>36</sup> que se desfosforilaría en luz en presencia de los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y/o cry2. **B.** Gráfico que muestra los valores de intensidades normalizados de la señal del MS para la isoforma fosforilada del fosfopéptido (n=3). Es mayoritariamente abundante en las muestras WT O y phyAphyBcry1cry2 LB que en las WT LB. P (fosforilado), NP (no fosforilado).



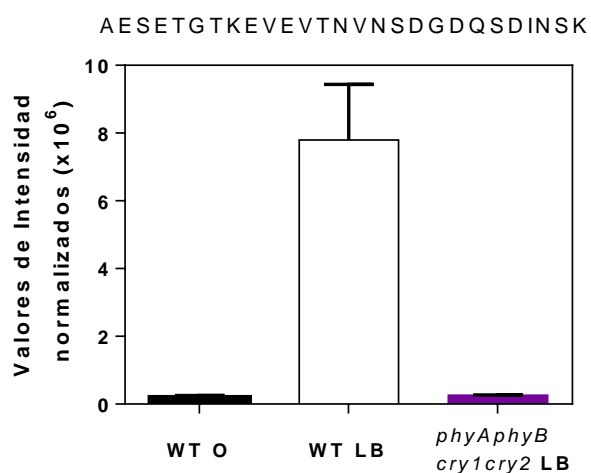
Por último, la fosfoproteína CRWN1 presenta una regulación inversa a las proteínas anteriormente especificadas. Se fosforilaría en respuesta a la luz en presencia de fotorreceptores (Fig. 1.8). CRWN1 es una proteína nuclear que está involucrada en la determinación de la estructura nuclear en plantas (Sakamoto and Takagi, 2013). Los genes *CRWN*, antiguamente llamados LINC (“LITTLE NUCLEI”), codifican para una familia de proteínas “NUCLEAR MATRIX CONSTITUENT PROTEIN” (NMCP) que son esenciales en el control de la arquitectura y morfología del núcleo. Mutantes deficientes en diferentes combinaciones de los cuatro parálogos *CRWN* exhiben organización nuclear alterada que comprende tamaño reducido de núcleos, forma nuclear aberrante y organización espacial anormal de la heterocromatina (Wang et al., 2013). Además, estos mutantes son hipersensibles al ácido absólico (ABA) y presentan altos niveles del factor de transcripción “ABA INSENSITIVE 5” (ABI5) comparadas con el genotipo salvaje (Zhao et al., 2016). Se ha reportado en *Arabidopsis*, que las proteínas CRWN participan en el control de la germinación de semillas mediado por ABA, regulando la degradación de ABI5 (Zhao et al., 2016). También cumplen un rol en la reducción de los niveles de especies reactivas de oxígeno y protección del ADN contra el estrés oxidativo (Wang et al., 2019).

Con estos elementos decidimos en primer lugar estudiar profundamente a CIP7 debido a que los reportes muestran que esta proteína podría ser regulada por luz. Además, los p-valores para CIP7 en las comparaciones WT LB/ WT O y *phyAphyBcry1cry2* LB/ WT LB fueron menores que 0,01 (Tabla 1.1). Los avances con respecto a CIP7 se muestran en el capítulo 2 de esta tesis. Por otro lado, también consideramos interesante estudiar la proteína ISTL5, ya que poco se conoce acerca de la regulación por luz del tráfico endosomal. Dado el volumen de trabajo, con esta última línea hicimos algunos avances que planificamos a futuro continuar en colaboración con la Dra. Marisa Otegui de la Universidad de Winsconsin. Los mismos se muestran en el anexo I.

**A**

Proteína	Gen	Fosfopéptidos	WT LB/ WT O	<i>phyAphyBcry1cry2</i> LB/ WT LB
CRWN1	At1g67230	AESp <sup>851</sup> ETGTKEVEVTNVNSDGDQSDINSK	P	NP
		TpRSpVKDVVDDAK	NV	NV
		ALYGESINLYEPNDSTpENVDDSTK	NV	NV
		TCTTEQDGNESpDGKSDSVTGGAHQR	NV	NV
		RVTGEPALSpK	NV	NV
		AQEVAADSpLSpNLDVDGQSR	NV	NV
		RTDESpEAMSEVNK	NV	NV
		VASpEQQGEVVGQR	NV	NV

**B**



**Figura 1.8** **A.** Tabla que detalla los fosfopéptidos identificados para CRWN1. El fosfopéptido AESpETGTKEVEVTNVNSDGDQSDINSK presenta la S<sup>851</sup> que se fosforilaría en luz. **B.** Gráfico que muestra los valores de intensidades normalizados de la señal del MS para la isoforma fosforilada del fosfopéptido (n=3). Es mayoritariamente abundante en las muestras WT LB. P (fosforilado), NP (no fosforilado), NV (no varía).

En resumen, el diseño experimental nos permitió identificar proteínas que cambian su estado de fosforilación en respuesta a la luz; algunas mediadas por los principales fotorreceptores que participan en la fotomorfogénesis. Con el fin de dilucidar las implicancias de dicha regulación post-traducciona en procesos tales como desetiología, nos propusimos caracterizar en profundidad la proteína CIP7, ya que su interacción con COP1 sugiere un rol de CIP7 en eventos de señalización por luz.

### **1.3 Discusión.**

En este capítulo realizamos un estudio a gran escala de fosfoproteómica, enfocado en el proceso de desetiología de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. A través de técnicas de enriquecimiento en fosfopéptidos combinado con espectrometría de masas, identificamos un total de 1152 fosfoproteínas únicas y 3460 sitios de fosforilación. Del total de las fosfoproteínas identificadas, 37 cambiaron significativamente su estado de fosforilación en respuesta a un pulso de 20 min de luz blanca. Treinta y dos proteínas cambiaron su estado de fosforilación por luz de manera independiente de los fotorreceptores, mientras que 5 lo hicieron de manera dependiente. La identidad de algunas de las fosfoproteínas ya identificadas sugiere que nuestra estrategia fue exitosa en la obtención de candidatos tempranos de la señalización por luz. Sin embargo, también comprobamos que el diseño experimental es determinante del tipo de fosfoproteínas que pueden ser detectadas.

#### **1.3.1. El ensayo de fosfoproteómica a gran escala es robusto y permite el descubrimiento de nuevas proteínas señalizadoras.**

Las técnicas de fosfoproteómica constituyen una poderosa plataforma para conocer los perfiles de fosforilación que caracterizan procesos y vías de señalización. Dada la naturaleza dinámica y la baja estequiometría de las proteínas fosforiladas, los estudios sobre transducción de señales mediados por fosforilación revisten cierta dificultad (Li et al., 2015). Las metodologías a gran escala están ganando aceptación y popularidad en las líneas de investigación de biología molecular (Wilkes and Cutillas, 2017). Particularmente en biología de plantas, estas estrategias suelen emplearse como una aproximación exploratoria para identificar nuevos componentes de una vía de señalización. Por ejemplo, se han utilizado para revelar proteínas que sean sustrato de las “MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES” (MAPK) MPK3, MPK4 y MPK6 (Rayapuram et al., 2018) o “CASEIN KINASE II” (CKII) de cloroplastos (Reiland et al., 2009). También, para identificar proteínas de membrana que respondan a elicitores de patógenos (Benschop et al., 2007) o conocer el alcance que tiene la fosforilación de tirosinas en la regulación de procesos celulares (Sugiyama et al., 2008). Entre otros

casos, se identificaron sitios de fosforilación conservados entre distintas especies de plantas (Nakagami et al., 2010) y se compararon fosfoproteomas inducidos por nitrato vs. amonio (Engelsberger and Schulze, 2012).

Muchos de los componentes que participan en el proceso de fotomorfogénesis que hoy conocemos, se identificaron por medio de análisis de transcriptoma y estrategias de genética reversa y directa. En general, los ensayos de fosfoproteómica han sido utilizados para estudiar *in vivo* sitios de fosforilación de proteínas sobre-expresadas, como el caso de cry2, phot1 y PIF3 descritos previamente. En este trabajo, asumiendo que la fosforilación diferencial es un mecanismo fundamental en la transducción de señales lumínicas, hipotetizamos que aquellas proteínas que se des/fosforilan en respuesta a un pulso de luz son componentes de la fototransducción de señales. En este contexto, la duración del estímulo lumínico puede tener efectos dramáticos en el perfil de fosfoproteínas detectadas. Por ejemplo, Ning y colaboradores (Ning et al., 2016) realizaron ensayos en maíz con tratamientos de 6 o 12 h de luz. Durante esta ventana temporal, pueden perderse los efectos tempranos del tratamiento y favorecerse la detección de efectos indirectos. Entre ellos, los cambios transcripcionales afectan drásticamente el perfil proteómico. Los análisis de perfiles de expresión en *Arabidopsis* indicaron que al cabo de 1 h de exposición a la luz se induce la expresión principalmente de factores de transcripción (Casal and Yanovsky, 2005), pero la mayoría de los genes empiezan a responder a la señal lumínica al cabo de 3 h, alcanzando su máxima respuesta a las 12 h (Tepperman et al., 2001). En este momento el proceso de desetiación se encuentra completamente consolidado. Los 20 min utilizados en nuestro ensayo fueron suficientes para dar lugar a los eventos de fosforilación/defosforilación pero no para producir cambios en la transcripción. Varias fosfoproteínas para las cuales identificamos más de un fosfopéptido, mostraron cambios significativos de fosforilación solo para alguno/s de ellos, mientras que los restantes no variaron (Tabla 1.1). Este hecho apoya la idea de que la abundancia de la proteína era constante e independiente de su expresión con respecto a la luz.

Un primer interrogante, fue si la técnica había sido eficiente en la detección de fosfopéptidos. El tamaño del *set* de datos que obtuvimos en este trabajo es

comparable con los obtenidos mediante estrategias similares en otros trabajos (Engelsberger and Schulze, 2012; Sugiyama et al., 2008). Esto permite suponer que el tipo de tejido y tratamiento no comprometieron la detección. También, hemos registrado numerosos fosfopéptidos que se han identificado en otros trabajos utilizando la misma estrategia. Además de los ya conocidos cry2 y phot1, los fosfopéptidos MPVSASpSEDEEEVER de ISTL5 y DNDSpEPELLR de CIP7 fueron también encontrados por Sugiyama y colaboradores (2008), a partir de células de Arabidopsis en cultivo. Aunque en nuestro estudio estos fosfopéptidos no variaron con el tratamiento. Interesantemente, los cuatro fosfopéptidos que identificamos para CIP7 fueron hallados en tallos y hojas de la roseta de Arabidopsis (Reiland et al., 2009). Esto sugiere que la estrategia es reproducible. Es importante destacar que el fosfopéptido QVDALPAVASpVDDFK de CIP7 que se desfosforila por luz en nuestros resultados, también fue detectado por Reiland y colaboradores (2009), pero no presentó variación en sus condiciones de estudio. Esto apoya la especificidad de nuestros análisis.

Si bien identificamos 41 fosfopéptidos que cambiaron diferencialmente por la luz, el estado de fosforilación de sólo 5 fosfoproteínas estuvo mediado por alguno de los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y/o cry2 (Tabla 1.1). Este resultado es francamente sorprendente, ya que esperábamos encontrar un número más elevado de proteínas que responden a la luz. Sin embargo, nuestros mismos resultados parecen estar explicando este comportamiento. Algunas de las proteínas que ya han sido caracterizadas de respuesta a la luz, no lograron ser detectadas; tal es el caso de PIF3 (Ni et al., 2017). Es posible que la abundancia de éstas proteínas esté por debajo del límite de detección del método. En este caso, los experimentos deberían ser repetidos aumentando la masa de muestra analizada. Por ejemplo, para estudiar el perfil de fosforilación de PIF3 *in vivo*, Ni y colaboradores purificaron la proteína de fusión YFP-PIF3-N507 (versión de alta expresión) a partir de plantas sobre-expresantes, por la incapacidad de obtener suficiente masa de PIF3 endógena. Adicionalmente, la fosforilación de PIF3 conduce a su degradación, lo que hace aún más difícil su detección.

### 1.3.2 Predicción de quinasas responsables de la fosforilación por luz.

El bajo número de fosfoproteínas que encontramos y responden a la luz podrían sugerir que éstas son las proteínas efectoras más tempranas de la cascada, y por lo tanto, blancos directos de la señal lumínica. Estos efectores luego podrían desencadenar una amplificación de la señal.

El hecho de que sean pocas las fosfoproteínas que responden a la luz en nuestros resultados, nos dificultó la predicción de qué procesos celulares y posibles quinasas estarían involucrados en la fototransducción temprana. Por un lado, el análisis de términos GO no logró definir procesos celulares enriquecidos entre estas 37 fosfoproteínas (datos no mostrados). Y por el otro, no fue posible encontrar un motivo de fosforilación común para todas ellas, lo que sugiere que son diversas las quinasas actuantes. Para intentar superar estos obstáculos, buscamos bibliografía para cada una de estas proteínas y así poder identificar en qué procesos participan (Tabla 1.3). Además, realizamos una predicción *in silico* de qué quinasas podrían estar involucradas en su fosforilación. Utilizamos el sitio predictor NetPhos ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/); (Blom et al., 2004) para identificar qué quinasas tienen la capacidad de fosforilar los residuos encontrados en nuestro ensayo con un *score* mayor a 0.5 (correspondiente a predicciones de alta confianza para 17 quinasas diferentes).

El análisis bibliográfico reveló que 5 de las 37 proteínas tienen algún tipo de interacción con el metabolismo de los ARN, 8 proteínas interactúan o participan en la dinámica de microtúbulos y 9 tienen alguna relación con el tráfico vesicular o las vesículas (Tabla 1.3). Como mencionamos antes, no pudimos determinar si estas frecuencias son significativamente diferentes a las observadas en el genoma de *Arabidopsis*. Sin embargo, una interpretación *naïf* de estos resultados podría ser que al momento de la percepción de la luz, las células adaptan inmediatamente el perfil de ARN mensajeros que se están produciendo, rearregla su citoesqueleto para detener la expansión celular y cambia la composición de receptores, transportadores y otras proteínas en la membrana plasmática para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Para validar esta hipótesis, es necesario seleccionar varios candidatos de cada grupo de proteínas y verificar su comportamiento en respuesta a la luz.

Con respecto a la predicción de las quinasas que podrían estar fosforilando los fosfopéptidos identificados, encontramos que 83% eran predichos como sitios de fosforilación de alta confianza, independientemente de la quinasa asignada a ese sitio (Tabla 1.4). En principio, esto indica que el algoritmo detecta fosfositos satisfactoriamente. El 17% de los fosfositos no detectados podrían ser fosforilados por una o más quinasas no incluidas en el algoritmo. Cuando se analizan las predicciones teniendo en cuenta la identidad de las quinasas, el *top 5* corresponden a “CASEIN KINASE I” (CKI), “PROTEIN KINASE A” (PKA), “CASEIN KINASE II” (CKII), “CELL DIVISION CYCLE PROTEIN 2” (CDC2, correspondiente a la “CYCLIN-DEPENDENT KINASE A;1” - CDKA;1- en Arabidopsis) y “RIBOSOMAL S6 KINASE” (RSK) (Tabla 1.4). De éstas, PKA como tal no existe en plantas, por lo que otras quinasas desconocidas podrían estar fosforilando estos péptidos. Interesantemente, se ha mostrado que CKI fosforila a cry2 en Arabidopsis. En presencia de luz azul, se induce la fosforilación de cry2 mediada por CKI que resulta en la degradación del fotorreceptor. A su vez, cry2 regula la expresión de CKI (Tan et al., 2013). También existen evidencias que CKII participa en la regulación de proteínas reguladas por luz. Un ejemplo clásico es la degradación de PIF1 cuando ésta se fosforila por CKII en respuesta a la luz (Bu et al., 2011). Otro ejemplo de un sustrato de CKII involucrado en la fototransducción corresponde a HFR1. HFR1 participa en la fotomorfogénesis en respuesta al sombreado (Park et al., 2008). En condiciones de luz, CKII fosforila a HFR1 en su dominio N-terminal estabilizándola, mientras que en oscuridad HFR1 permanece desfosforilada y se degrada. Por último, poco se conoce de las funciones de CDKA;1 o RSKs en la percepción de la luz. Sólo existen algunos reportes que sugieren que las quinasas río arriba de RSK, las MAPK, podrían tener conexiones con la percepción de la luz (Sethi et al., 2014; Lee, 2015). En conclusión, todas estas observaciones sugieren que más de una quinasa podría estar participando en la fosforilación inducida por luz. Además, podrían sugerir que CKI y CKII pertenecen a una cascada conservada de fototransducción. En este contexto, sería interesante comprobar si en *backgrounds* mutantes para las CKIs o CKIIs de Arabidopsis se encuentran los mismos péptidos fosforilados en respuesta a la luz que encontramos en nuestro estudio.

Proteína	Gen	Fosfopéptido	Función celular	Referencia (DOI)	Predicción de NetPhos3
PROTEIN KINASE SUPERFAMILY PROTEIN	At3g53930	SHSpPPVEFIK	ND		no específico
PROTEIN KINASE SUPERFAMILY PROTEIN	At3g01490	SpLSDGEDVNNTR	Posiblemente autofagia (localización en vesículas)	Qi et al., 2020	no específico, PKA, CKI, CKII
PROBABLE S/T PROTEIN KINASE IREH1	At3g17850	HKDSLAAAE <sup>Sp</sup> PDGMK	Regulación de los microtúbulos	Yue et al., 2019	no específico, CKI, CDC2, GSK3
OUTER ARM DYNEIN LIGHT CHAIN 1 (AIR9)	At2g34680	EDNATIANES <sup>Sp</sup> RSPESVSAVSVSNR	Interactúa con microtúbulos	Buschmann et al., 2006	no específico, PKC, p38MAPK,
60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P- 1	At1g01100	KKDEPAEES <sup>Sp</sup> DGDLGFLFD	ND		no específico, CKI, CKII
60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P- 3	At5g57290	KKEE <sup>Sp</sup> EEEEEGDFGFLFG	Chaperona de proteínas y ARN.	Kang et al., 2016	no específico, CKI, CKII
P-LOOP CONTAINING NUCLEOSIDE TRIPHOSPHATE HYDROLASES SUPERFAMILY PROTEIN (DAA1)	At1g64110	SS <sup>Sp</sup> W <sup>Sp</sup> SFDEK	ATPasa que responde a estrés abiótico.	Ali et al., 2013	no específico, RSK, CDC2, PKA
DISEASE RESISTANCE PROTEIN (TIR class)	At1g61100	M <sup>Sp</sup> FDDSLTSQGS DK	ND		no específico
EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4A-2 (EIF 4A-2)	At1g54270	AG <sup>Sp</sup> AP <sup>Sp</sup> EGTQFDTR	Factor de iniciación de la traducción.		CDC2
CYSTEINE PROTEINASES SUPERFAMILY PROTEIN (ASP1) (ULP2B)	At1g09730	FTN <sup>Sp</sup> SPCNS <sup>Sp</sup> PVLQR	Proteasa SUIMO.	Liu et al., 2017	CDK5, p38MAPK, GSK3
EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4A-2 (EIF 4A-1)	At3g13920	AG <sup>Sp</sup> PAPEGTQFDAR	Factor de iniciación de la traducción. Se fosforila por CDKA.	Bush et al., 2016	CDC2
PHOTOTROPIN 1	At3g45780	R <sup>Sp</sup> M <sup>Sp</sup> EN <sup>Sp</sup> V <sup>Sp</sup> PSGR	Fototransducción	Kinoshita et al., 2001	no específico, PKA, PKG, RSK
		ME <sup>Sp</sup> TEK <sup>Sp</sup> TK <sup>Sp</sup> PS <sup>Sp</sup> R			no específico, PKG, PKC
		K <sup>Sp</sup> SL <sup>Sp</sup> SL <sup>Sp</sup> FMGIK			no específico, PKA, PKG, RSK
		G <sup>Sp</sup> L <sup>Sp</sup> EV <sup>Sp</sup> FN <sup>Sp</sup> STQLTR			no específico, DNAPK, PKA
		M <sup>Sp</sup> EN <sup>Sp</sup> V <sup>Sp</sup> PSGR			no específico, PKC
Uncharacterized Protein	At2g30930	E <sup>Sp</sup> pVTSTAESVTASLT <sup>Sp</sup> pDAEK	ND		no específico, CDC2
40S RIBOSOMAL PROTEIN S2-3 (RPS2C)	At2g41840	AL <sup>Sp</sup> TS <sup>Sp</sup> PK <sup>Sp</sup> PD <sup>Sp</sup> VVEDQA	ND		no específico
SH3 DOMAIN CONTAINING PROTEIN	At2g07360	E <sup>Sp</sup> pFEN <sup>Sp</sup> VAGSSR	Participa en endocitosis. Vesículas.	Gadayne et al., 2014	no específico
PROTEIN WVD2-LIKE 1 (WDL1)	At3g04630	IAAEET <sup>Sp</sup> DEEFVK	Regula el crecimiento de organos quizás afectando microtúbulos.	Yuen et al., 2003	no específico, CKII

\*Sigue a continuación



Proteína	Gen	Fosfopéptido	Función celular	Referencia (DOI)	Predicción de NetPhos3
PARAMYOSIN	At1g24560	ANGADEAVLSPDVESEDEPAPVVLK	Participa en el tráfico endosomal.	Ito et al., 2018	no específico, CKI, CKII
RNA BINDING (RRM/RBD/RNP MOTIFS) FAMILY PROTEIN	At1g07810	SpPLGAGSYGVNR	ND		no específico, CDK5, CDC2, p38MAPK, GSK3
FAM10 FAMILY PROTEIN	At4g22670	DANAALINPDPSPAK	Posiblemente co-chaperona con HSP70/90.	Webb et al., 2001	no específico
IQD2	At5g03040	DLSPPTADAVNVTADVPVSSAPGVVR	Interactúa con microtúbulos.	Bürstenbinder et al., 2017	no específico, PKB, CDK5, RSK, GSK3
KINESIN-LIKE PROTEIN	At3g16060	SNSpDDNLNALLQEEEDLVNAHR	ND		no específico, PKA, CKI, CDC2
CRYPTOCHROME 2	At1g04400	NLEGIQDSSDOIITPSLKG	Fototransducción	Guo et al., 1998	no específico
SNARE-INTERACTING PROTEIN KEULE	At1g12360	GSpDDGVSSDSVLR	Involucrada en el tráfico vesicular. Quizas con alguna conexión con microtúbulos.	Wu et al., 2013; Steiner et al., 2015	no específico, PKA
SPlicing FACTOR SF3a60 HOMOLOG (ATO)	At5g06160	EGEEANTELESPPDEDEDGLYNPLK	Quizas involucrada en splicing, uniendo ARN.	Moll et al., 2008	no específico, CKII
PROTEIN IQ-DOMAIN 32	At1g19870	QQQSPFSVDEK	Interactúa con microtúbulos.	Bürstenbinder et al., 2017	no específico
TRANSLOCASE OF CHLOROPLAST 120 (TOC120)	At3g16620	ESEVLSSVSPTEsPR	Translocador de proteínas al cloroplasto. Involucrado en el transporte de FAD5 al cloroplasto.	Bauer et al., 2000; Afithile et al., 2015	no específico, CDC2
RGG REPEATS NUCLEAR RNA BINDING PROTEIN C	At5g47210	EAAAPAIGDTAQFPSPLG	ND		PKA
PROTEIN MODIFIER OF SNC1 11 (MOS11)	At5g02770	EETpDSNGIGTAGVDSGDIspPVDDIQK	Participa en la translocación de ARN al citoplasma.	Germain et., 2010	no específico, CDK5
PROTEIN WVD2-LIKE 4 (WDL4)	At2g35880	RSpSpVGSASGFSFR	Una proteína ortóloga en Marchantia participa en el crecimiento normal de los rizoides. Asociada a vesículas y citoesqueleto.	Honkanen et al., 2016	no específico, PKA, PKG, RSK, PKB
NUCLEOLAR PROTEIN GAR2-LIKE PROTEIN (MHK10.4)	At2g42320	GYTSpDEELELDSPITSVDK	ND		no específico, CKII
HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR B-2b	At4g11660	TTSpCTpTAPELVEENER	Factor de transcripción involucrado en stress.	Kumar et al., 2009	no específico, RSK, CaM-II
POSITIVE REGULATOR OF SKD1 (PROS)	At4g24370	SSSpDYLDPLHSR	Trafico endosomal. Vesículas.	Reyes et al., 2014	no específico, PKA
PROTEIN CROWDED NUCLEI 1 (CRWN1)	At1g67230	AESpETpGTEKEVETNNSDGDQSDINSK	Regulador de la morfología nuclear.	Sakamoto y Takagi, 2013;	no específico, CKI, CKI
INCREASED SODIUM TOLERANCE PROTEIN 1-LIKE 5	At2g19710	LFDpDpTSPASVHEPDPHAK	Trafico endosomal. Vesículas (datos propios)	Goto et al., 2014	CDC2
TRANSCRIPTIONAL REGULATOR ATRX-LIKE PROTEIN	At3g27350	NDSHEENTHIALSQSIspFGK	ND	Buono et al., 2016	PKC, CKI
COP1 INTERACTING PROTEIN 7 (CIP7)	At4g27430	QVDALPAVAspVDFDK	Microtúbulos (datos propios).	Yamamoto et al., 1998	no específico, PKC
SWAP70	At2g30880	RNSLDIPVSpPEPNVPR	Rop/Rac GEF que participa en defensa.	Yamaguchi y Kawasaki, 2012	no específico, CDK5, GSK3

**Tabla 1.3** Función celular asignada por bibliografía y predicción de quinasa actuante por NetPhos3, para cada fosfoproteína fosforilada diferencialmente por luz. Referencias: (Qi et al., 2020; Yue et al., 2019; Buschmann et al., 2006; Kang et al., 2016; Ali et al., 2013; Liu et al., 2017a; Bush et al., 2016; Kinoshita et al., 2001; Gadeyne et al., 2014; Yuen et al., 2003; Ito et al., 2018; Webb et al., 2001;

Bürstenbinder et al., 2017; Guo et al., 1998; Wu et al., 2013; Steiner et al., 2016; Moll et al., 2008; Bürstenbinder et al., 2017; Bauer et al., 2000; Afithile et al., 2015; Germain et al., 2010; Honkanen et al., 2016; Kumar et al., 2009; Reyes et al., 2014; Sakamoto and Takagi, 2013; Goto et al., 2014; Buono et al., 2016; Yamamoto et al., 1998; Yamaguchi and Kawasaki, 2012).

Quinasa	No. de Fosfopéptidos	%
No específico	34	83
CKI	11	27
PKA*	10	24
CKII	9	22
CDC2	9	22
RSK	6	15
PKC*	5	12
CDK5	5	12
GSK3	5	12
p38MAPK	3	7
PKB*	2	5
DNAPK	1	2
CaM-II	1	2

**Tabla 1.4** Porcentaje de fosfopéptidos cuyos sitios de fosforilación variable en luz, son blancos predichos de las quinastas consideradas por NetPhos3.

### 1.3.3 Fosfoproteínas que varían por genotipo y no por luz.

En nuestros experimentos encontramos 39 fosfoproteínas que no fueron afectadas por el tratamiento de luz, pero presentaron diferencias significativas entre el genotipo WT y *phyAphyBcry1cry2* (Tabla 1.2). Esto puede deberse a diferencias en el proteoma de las plántulas WT y *phyAphyBcry1cry2*, tal como se observó cuando estas plantas son crecidas en oscuridad (Fox et al., 2015). En ese caso, las diferencias mayoritarias correspondían a proteínas de reserva de la semilla y se produjeron, probablemente, por el efecto del phyB sobre la germinación de las semillas en oscuridad (Mazzella et al., 2005). Según Mazzella y colaboradores, semillas WT germinadas en oscuridad generaron plántulas etioladas que expresaron mayores niveles de genes de proteínas de reserva en comparación con aquellas plántulas que germinaron tras recibir un pulso de luz roja. Esta hipótesis se sustenta con la identidad

de algunas de las proteínas de la Tabla 1.2. Tomando esto en consideración, es posible que las diferencias que registramos entre WT LB y *phyAphyBcry1cry2* LB independiente del tratamiento de luz, puedan ser consecuencia del ambiente lumínico que percibieron en estadios previos del desarrollo.

#### **1.3.4 Fosfoproteínas reguladas por luz y fotorreceptores.**

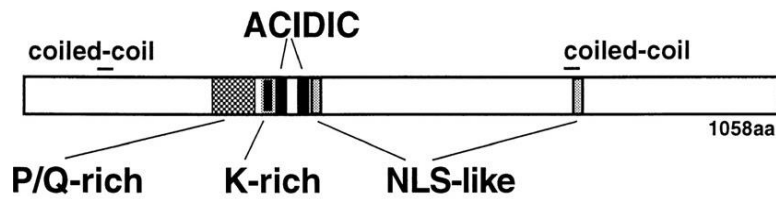
Nuestro interés se centra en identificar nuevos componentes que participen en la transducción de señales lumínicas para su posterior caracterización. Los fotorreceptores *phyA*, *phyB*, *cry1* y *cry2* cumplen un rol preponderante en la desetiología; y las cascadas de señalización que gatillan involucran cambios en el estado de fosforilación de las proteínas que intervienen (ver sección 5.1 de la introducción). Entonces, las 3 fosfoproteínas (*CIP7*, *ISTL5* y *At3g27350*) que se desfosforilarían y las 2 que se fosforilarían (*CRWN1* y *SWAP70*) por luz y fotorreceptores; son potenciales candidatos. Como se expuso en resultados, seleccionamos para su posterior estudio a *CIP7* por su factible participación en respuestas fotomorfogénicas (Yamamoto et al., 1998), y a *ISTL5* por la novedad que representa la regulación del tráfico vesicular por luz.

Las isoformas fosforiladas tanto de *CIP7* como *ISTL5* se encontraron sobrerrepresentadas en ausencia de los fotorreceptores en estudio (muestras *phyAphyBcry1cry2* LB), al igual que en oscuridad cuando se encuentran inactivos (muestras WT O). Es decir, que la S<sup>915</sup> de *CIP7* y la S<sup>598</sup> de *ISTL5* sufren desfosforilación inducida por luz como parte de alguna vía de señalización mediada por *phyA*, *phyB*, *cry1* y/o *cry2*. Si bien no deberían existir cambios a nivel transcripcional de ambos genes, es importante realizar ensayos de RT-qPCR para cuantificar los transcritos *CIP7* e *ISTL5* en WT O, WT LB, *phyAphyBcry1cry2* LB y *phyAphyBcry1cry2* O. Este experimento también permitiría descartar cualquier contribución del genotipo en la abundancia de las proteínas *CIP7* e *ISTL5*.

## CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN Y FUNCIÓN DE CIP7 (*COP1-INTERACTING FACTOR 7*)

### 2.1 Introducción.

A la fecha existe un único reporte que describe a CIP7 (Yamamoto *et. al.* 1998). En el laboratorio del Dr. Xing Wang Deng (Universidad de Yale, EE.UU.), se realizó una búsqueda de nuevos interactores del represor de la fotomorfogénesis COP1. La selección se llevó a cabo entre proteínas de Arabidopsis recombinantes, producidas en *E.coli* a partir de una biblioteca de ADN copia en fagos  $\lambda$ gt11. Aquellas proteínas que interactuaron *in vitro* con COP1 recombinante marcada radiactivamente, fueron seleccionadas para su posterior caracterización (Matsui *et al.*, 1995) y se las designó como CIP (“COP1-INTERACTING-PROTEIN). En primer lugar se identificó a CIP1, una proteína capaz de interactuar con el dominio *coil-coiled* de COP1. Se la reportó asociada a citoesqueleto en protoplastos de hipocótilos y cotiledones, no así en los de raíz (Matsui *et al.*, 1995). También se identificaron a CIP4, un coactivador de la transcripción nuclear que promueve la fotomorfogénesis (Yamamoto *et al.*, 2001) y CIP8, una proteína con motivo *RING finger* que interacciona con la E2 ubiquitina ligasa de Arabidopsis “UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 8” (AtUBC8), con posible participación en la degradación de HY5 vía proteasoma (Hardtke *et al.*, 2002). Entre ellas, identificaron a CIP7, que como su nombre lo indica, es una proteína capaz de interactuar con COP1 (Yamamoto *et al.*, 1998). Se determinó que la región COIL de COP1 era esencial para la interacción COP1-CIP7. Como se observa en la figura 2.1, en la secuencia de CIP7 se reconocieron diversos motivos frecuentes en factores de transcripción, entre ellos una región rica en lisinas y dos putativas señales de localización nuclear (*NLS-like*). A su vez, definieron dos dominios estructurales en CIP7: el N-terminal que comprende los aminoácidos 1 a 386: y el C-terminal entre los aminoácidos 387 y 1058. Éste último fue el que se recuperó inicialmente en el ensayo de interacción con COP1.



**Figura 2.1 Estructura de la proteína CIP7 descrita por Yamamoto et al 1998.** Esquema que representa la localización relativa de los motivos reconocidos en la proteína CIP7 que contiene 1058 aminoácidos totales. **NLS-like**: putativa señal de localización nuclear. **K-rich**: región rica en lisinas. **ACIDIC**: *clusters* de aminoácidos ácidos. **P/Q-rich**: regiones ricas en prolinas y glutaminas. **Coiled-coil**: dominio putativo de dimerización o interacción proteína-proteína. aa: aminoácido

Para analizar la localización subcelular, obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis* con la construcción *p35S::GFP-CIP7* (construcción híbrida de ADN genómico y ADN copia) y observaron señal en el núcleo de células de hipocótilo y raíz por microscopía de epifluorescencia, tanto en luz como en oscuridad (Yamamoto et al., 1998). A partir de estos datos los autores concluyeron que la proteína era de localización constitutivamente nuclear. A través de un ensayo heterólogo de regulación transcripcional, mostraron que CIP7 tendría la capacidad de regular la transcripción al menos *in vitro*, y presentaría un dominio activador de la transcripción. Todos estos resultados serían consistentes con que CIP7 es un factor de transcripción (Yamamoto et al., 1998).

Para analizar la regulación de la expresión de CIP7 por luz, realizaron ensayos de *Northern blot* donde observaron que los niveles de ARN mensajero fueron 20 veces mayores en plántulas crecidas en luz comparadas con plántulas etioladas. Además, como los niveles del transcripto eran mayores en el mutante *cop1-6* etiolado respecto al WT, se concluyó que la expresión de CIP7 se encontraría regulada positivamente por luz y negativamente por COP1 (Yamamoto et al., 1998).

La posible función de CIP7 la estudiaron por genética reversa. Para ello, buscaron fenotipos en plantas de *Arabidopsis* transgénicas antisentido para CIP7 donde el nivel de expresión de su ARN mensajero se redujo con respecto a plantas WT. Plántulas

crecidas en luz entre 11 y 13 días, mostraron una disminución en la acumulación de antocianinas y clorofila, sugiriendo que CIP7 sería un regulador positivo durante la desetiación. En consecuencia, analizaron por *Northern Blot* la expresión de genes de respuesta a luz asociados con la síntesis de antocianinas, tal como la enzima “CHALCONE SYNTHASE” (CHS); y los correspondientes a proteínas que participan en el desarrollo de cloroplastos, como “FERREDOXIN” (FED) y “LIGHT HARVESTING COMPLEX” (LHCB). Concluyeron que la expresión de dichos genes se veía reducida por la supresión parcial de la expresión de *CIP7*. En concreto, CIP7 sería un regulador positivo de la expresión de genes de respuesta a la luz (Yamamoto et al., 1998).

Según nuestros resultados, la serina 915 (S<sup>915</sup>) de CIP7 se desfosforilaría en respuesta a un pulso de luz blanca y en presencia de al menos uno de los siguientes fotorreceptores fotoactivados: phyA, phyB, cry1 y/o cry2 (Tabla 1.1). Este cambio en el estado de fosforilación solo se observó para un único péptido de los 4 identificados para CIP7 (Fig 1.5). Los cambios en la fosforilación de CIP7 dependiente de los principales fotorreceptores (capítulo I), sumado a que CIP7 participaría en la vía de transducción de COP1 (Yamamoto et al., 1998), sugiere que CIP7 podría participar en eventos tempranos de la fotomorfogénesis como es la desetiación.

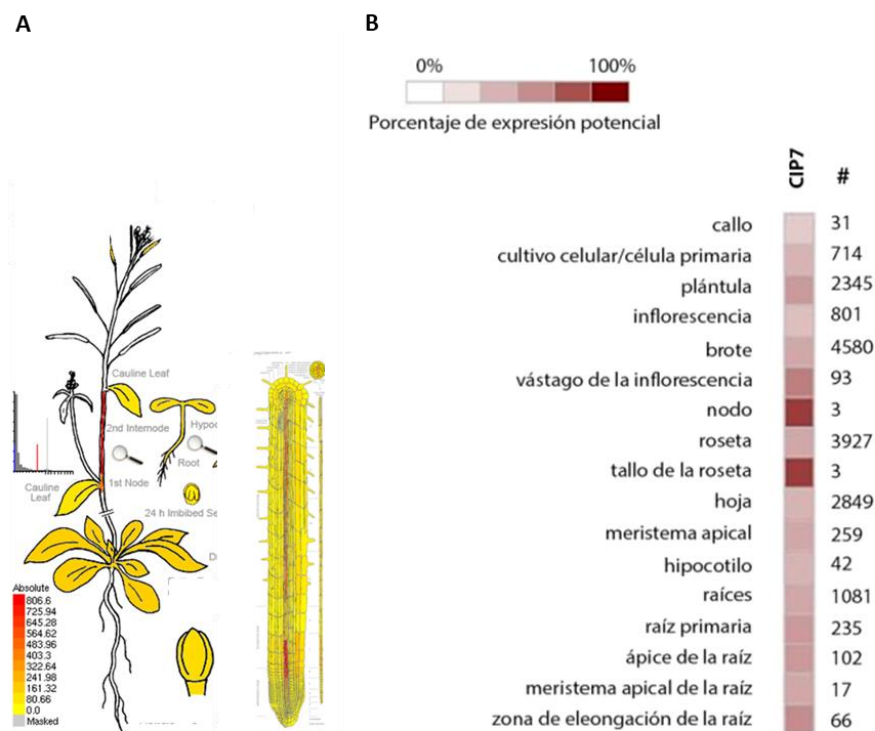
En conjunto, nuestros resultados y los de Yamamoto y colaboradores sugieren que CIP7 podría ser un potencial componente temprano de la transducción de señales lumínicas. Dada la escasa información disponible, decidimos corroborar los resultados publicados y completar la caracterización de *CIP7*. En nuestro caso, utilizamos reporteros transcripcionales para estudiar el patrón de expresión de *CIP7*, reporteros traduccionales (usando la versión genómica de *CIP7*) para estudiar su localización subcelular y líneas mutantes de *CIP7* (por T-ADN y CRISPR/Cas9) para identificar su función por genética reversa. En las secciones siguientes presentamos resultados que indican que la expresión de CIP7 está regulada por la luz, se expresa en tejidos de activo crecimiento y expansión, y se asociaría a estructuras involucradas en la expansión celular. En resumen, nuestros resultados apoyan la noción que CIP7 participa en el crecimiento de las plántulas etioladas.

## 2.2 Resultados

### 2.2.1 Estudio del patrón de expresión de CIP7.

#### 2.2.1.1 CIP7 se expresa en oscuridad en cotiledones, hipocotilos y raíces.

El trabajo de Yamamoto y colaboradores, no especifica en qué tejidos se expresa CIP7. Por lo que, en una primera instancia, decidimos analizar datos de microarreglos y RNA-seq *in silico*. Este análisis mostró que CIP7 se expresa en diferentes tejidos de Arabidopsis, pero predominantemente en tallos y zona de elongación de raíz (Fig. 2.2).



**Figura 2.2** Estudio *in silico* del patrón de expresión de CIP7 en diferentes tejidos según datos de microarreglos y RNA-seq. **A.** Diagramas extraídos de Klepikova Arabidopsis Atlas de eFP Browser en bar.utoronto.ca, construídos a partir del transcriptoma de los estadios de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (Klepikova et al., 2016). La coloración roja indica mayor número de lecturas. **B.** Heatmap creado con GENEVESTIGATOR a partir del *dataset* AT\_AFFY\_ATH10. Colores más oscuros indican mayor porcentaje de expresión potencial.

Con el objetivo de confirmar el patrón de expresión y analizar la posible regulación transcripcional de CIP7 *in vivo*, clonamos el promotor de CIP7 río arriba del gen de la beta glucuronidasa (GUS) para obtener líneas reporteras transcripcionales. El

promotor se definió como un fragmento de ADN de 2500 kb que incluye el 5'UTR río arriba del codón de iniciación de *CIP7*. Esta zona concentra 24 sitios putativos de pegado de factores de transcripción de acuerdo a la herramienta de predicción AGRIS (Arabidopsis.med.ohio-state.edu). Para ello se generaron plantas de *Arabidopsis* transgénicas estables que expresan la construcción *pCIP7::GUS* y se seleccionaron dos líneas independientes para realizar las tinciones histológicas. Como ambas líneas mostraron el mismo patrón de expresión, en esta sección se muestran los resultados de solo una de ellas. La actividad del promotor de *CIP7* se evidenció mediante el ensayo enzimático de GUS. En este ensayo, aquellas células donde el promotor está activo producen GUS, que en presencia del reactivo soluble X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico) genera un pigmento azul insoluble. En la figura 2.3 se muestra el patrón de expresión dado por la actividad del promotor de *CIP7* en plántulas cultivadas en las mismas condiciones que en el experimento de fosfoproteómica (5 d de oscuridad con o sin exposición al pulso de luz blanca de 20 min, inmediatamente antes de su cosecha). El promotor de *CIP7* activó la expresión de *GUS* en cotiledones, región apical de hipocótilo y zona de elongación de raíz en oscuridad (Figura 2.3). En principio, no se evidenciaron diferencias entre los tratamientos, sugiriendo que en ese corto período de 20 min no hubo modificación significativa de la actividad transcripcional.



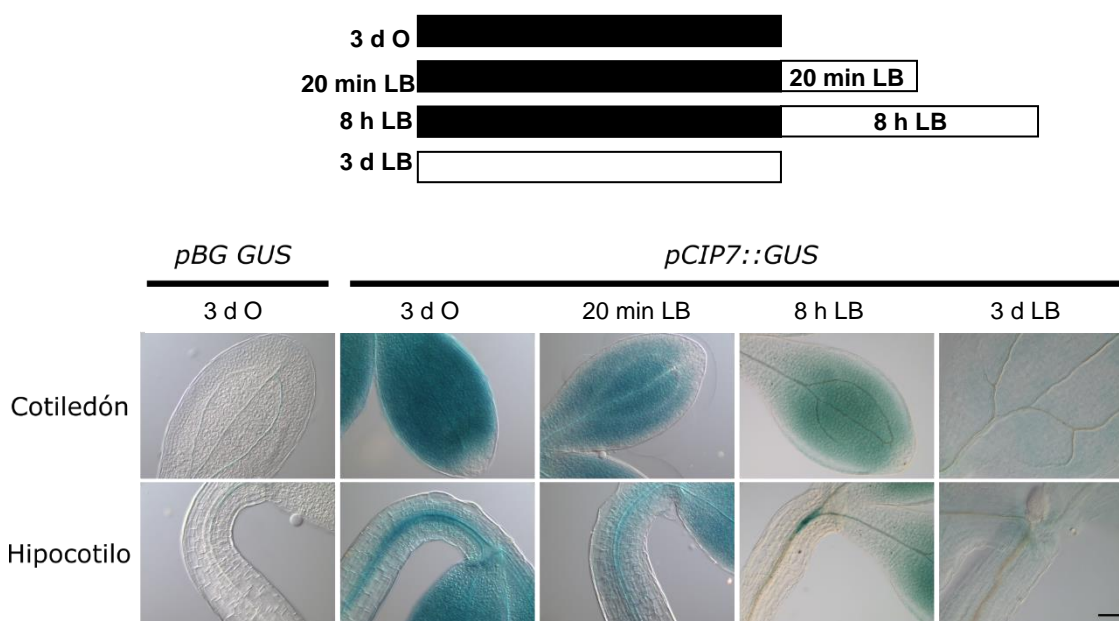
**Figura 2.3** El reportero *pCIP7::GUS* se expresa en oscuridad. Plántulas que portan el transgén *pCIP7::GUS* crecieron durante 5 d en completa oscuridad (5 d O) o 5 d O e inmediatamente expuestas a 20 min de luz blanca a  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (5 d O + 20min LB). *pBG::GUS*: plántulas de *Arabidopsis* transgénicas estables que portan el gen *GUS* sin promotor. *pCIP7::GUS*: línea representativa de dos



líneas independientes de plántulas de *Arabidopsis* transgénicas estables que expresan *pCIP7::GUS*. Barra = 100  $\mu$ m.

### 2.2.1.2 La expresión de CIP7 decrece gradualmente con la exposición a la luz.

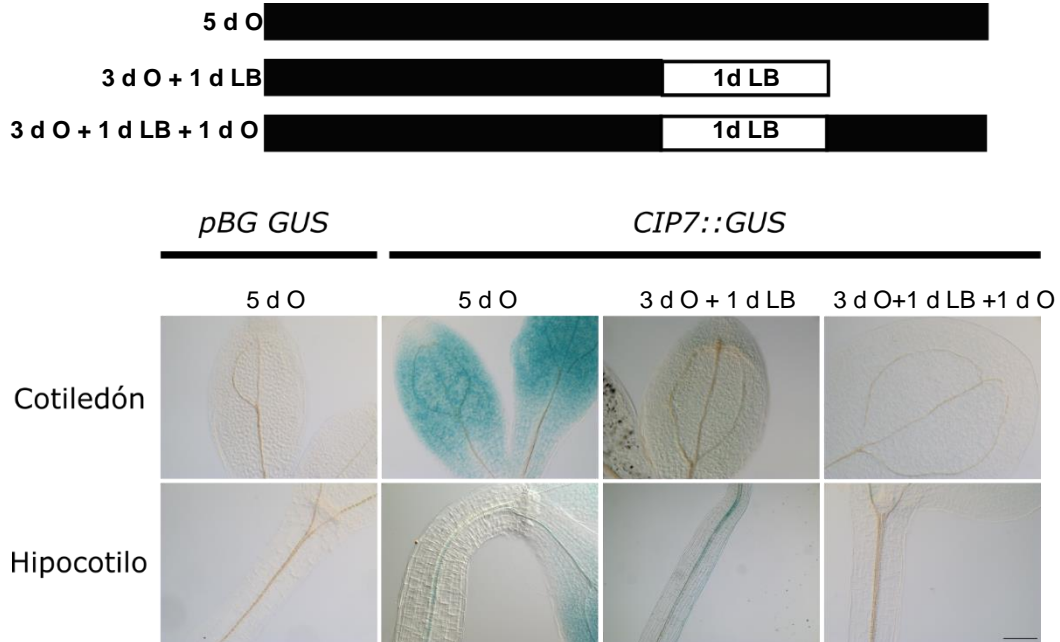
Para estudiar los efectos de la luz en la regulación transcripcional de *CIP7*, se evaluó la evolución de la actividad del promotor de *CIP7* en plántulas transgénicas *pCIP7::GUS* cultivadas 3 d en oscuridad con pulsos de luz blanca de variable duración (según se detalla en los esquemas de la figura 2.4). Cabe destacar que se realizaron todos los controles pertinentes con el propósito de respetar el tiempo total empleado; por ejemplo: 3 d O + 20 min O y 3 d O + 8 h O (ver Fig. 2.4). Los datos no fueron mostrados en la figura 2.4 por simplicidad. No observamos efectos del tiempo en oscuridad en estos tratamientos. Como muestra la figura 2.4, la actividad del promotor de *CIP7* alcanzó su máximo en oscuridad, decreciendo a medida que aumentaba la exposición de las plántulas a la luz. Estos resultados sugieren que la luz regularía negativamente la expresión de *CIP7*, una respuesta contraria a la descrita por Yamamoto et al. 1998.



**Figura 2.4** La expresión de *pCIP7::GUS* decrece gradualmente con la luz. Expresión del reportero GUS bajo el control del promotor de *CIP7* en cotiledones y región apical del hipocótilo de plántulas de 3 d sometidas a los distintos tratamientos detallados en el esquema superior. Tratamientos de luz blanca a

$100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . **pBG GUS**, plántulas de *Arabidopsis* transgénicas estables control que portan el gen *GUS* sin promotor. No presentan señal en ninguna de las condiciones evaluadas. **pCIP7::GUS**, línea independiente de plántulas de *Arabidopsis* transgénicas estables que expresan pCIP7::GUS. Barra =  $100\mu\text{m}$ .

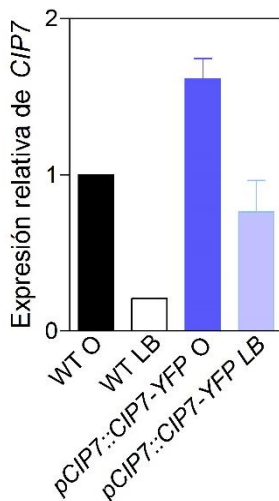
Luego, realizamos un ensayo preliminar con el fin de determinar si la expresión de CIP7 se puede recuperar una vez que fue depletada por la luz. Se crecieron plántulas durante 5 d en oscuridad, o 3 d en oscuridad seguida de 1 d de luz blanca, o 3 d en oscuridad seguida de 1 d de luz blanca y luego 1 d de oscuridad (Fig 2.5). Se utilizaron plántulas de 3 d de manera de no exceder con los distintos tratamientos los 5 d de edad. Nuevamente, también se realizó el control de 4 d O que no se muestra en la figura 2.5 por simplicidad ya que no se observaron efectos significativos del tiempo. Las plantas tratadas con luz no recuperaron la expresión del reportero GUS luego de un periodo de 1 d de oscuridad (Fig. 2.5).



**Figura 2.5** La expresión de *pCIP7::GUS* no se recupera de luego de tratamientos d luz. Expresión del reportero GUS bajo el control del promotor de *CIP7* en cotiledones y región apical del hipocótilo de plántulas de 5d de O sometidas a los distintos tratamientos detallados en el esquema superior. Tratamientos de luz blanca a  $100\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . **pBG GUS**, plántulas de *Arabidopsis* transgénicas estables control que portan el gen *GUS* sin promotor. No presentan señal en ninguna de las condiciones

evaluadas. *pCIP7::GUS*, línea independiente de plántulas de Arabidopsis transgénicas estables que expresan *pCIP7::GUS*. Barra = 100µm.

Nuestros resultados mostraron que el promotor de *CIP7* está activo en oscuridad, contrario a los resultados publicados que muestran expresión de *CIP7* en luz (Yamamoto et al., 1998). Para analizar si la expresión de *CIP7* coincide con nuestras observaciones, realizamos ensayos de RT-qPCR para cuantificar los niveles del transcripto de *CIP7*. Plántulas WT que crecieron 5 d en luz presentaron aproximadamente un 20% del nivel de transcriptos *CIP7* comparado con plántulas WT crecidas 5 d en oscuridad (Fig 2.6 A). Es decir que la luz regularía negativamente la expresión de *CIP7*. Consistentemente, se detectaron niveles más bajos (un 50%) del transcripto de *CIP7* en plantas cultivadas en luz que expresan *CIP7* fusionado a YFP bajo su promotor endógeno (*pCIP7::CIP7-YFP*) con respecto a las equivalentes en oscuridad (Fig. 2.6 B). Estos resultados constituyen otra evidencia más del efecto negativo que ejerce la luz sobre la expresión de *CIP7*.



**Figura 2.6 La luz regula negativamente la expresión de *CIP7*.** Análisis de expresión de *CIP7* por RT-qPCR en plántulas WT o *pCIP7::CIP7-YFP* que crecieron 5 d en oscuridad o 5 d en luz LB. La expresión de *CIP7* fue cuantificada con oligonucleotidos específicos para *CIP7* y luego relativizada al gen de expresión constitutiva EF-1 $\alpha$ . Los datos se muestran relativizados al WT.

A diferencia de lo reportado anteriormente (Yamamoto et al., 1998), todos estos resultados sugieren que *CIP7* se expresaría predominantemente en cotiledones y

región apical del hipocótilo en oscuridad. Además, exposiciones mayores a 20 min de luz regularían negativamente la expresión de *CIP7*.

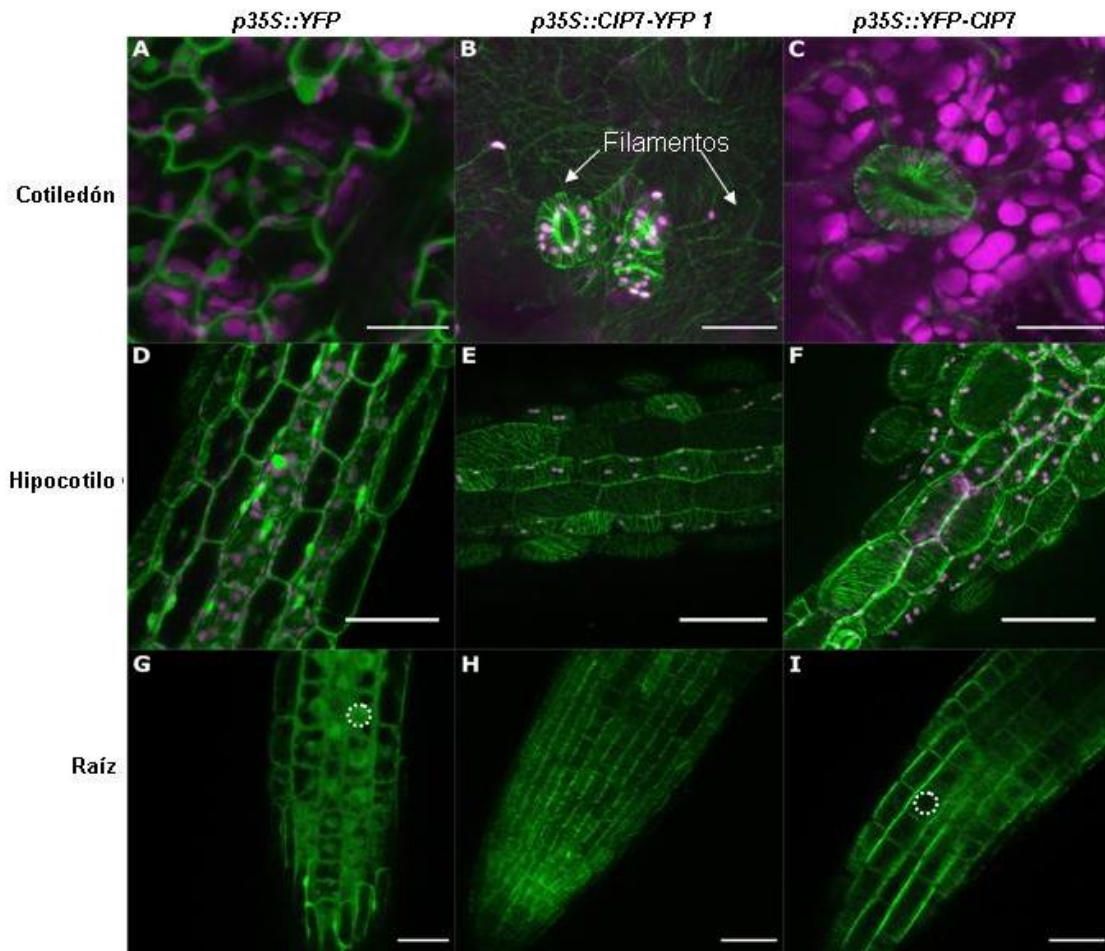
## 2.2.2 Estudio de la localización subcelular de *CIP7*.

### 2.2.2.1 *CIP7* se localiza en estructuras del citoesqueleto.

Con el objetivo de estudiar la localización subcelular de *CIP7* y su dependencia de la luz, generamos plantas de *Arabidopsis* transgénicas que sobre-expresan *CIP7* como proteína de fusión a YFP bajo el control del promotor constitutivo 35S. Dado que la fusión a YFP podría afectar la funcionalidad de *CIP7*, realizamos dos construcciones alternativas tanto en el extremo C-terminal (*p35S::CIP7-YFP*) como en el N-terminal (*p35S::YFP-CIP7*). De la línea *p35S::CIP7-YFP* obtuvimos dos líneas independientes: *p35S::CIP7-YFP 1* y *p35S::CIP7-YFP 2*; mientras que solo obtuvimos una única línea de la *p35S::YFP-CIP7*. Por otro lado, también utilizamos las líneas que portan la construcción bajo control de su propio promotor *pCIP7::CIP7-YFP*, previamente mencionadas. Como controles, se transformaron plantas con los vectores vacíos y la construcción *p35S::YFP* como se especifica en la secciones 5 y 6 de materiales y métodos (Fig. M.2).

En primer lugar estudiamos la localización subcelular de *CIP7* por microscopía confocal en plántulas cultivadas durante 3 d en luz de las líneas sobre-expresantes *p35S::YFP*, *p35S::CIP7-YFP 1* y *p35S::YFP-CIP7*. Cabe destacar, que comenzamos los análisis con plantas crecidas en luz porque la actividad del promotor 35S debería ser independiente de la luz, a diferencia del promotor endógeno de *CIP7*. Los estudios los realizamos con las dos líneas independientes *p35S::CIP7-YFP 1* y *2* y obtuvimos resultados similares. Para simplificar, en las fotos solo se muestran los resultados de una línea representativa. Como era esperable, la señal del control *p35S::YFP* (donde YFP se encuentra en su forma monomérica de 27 kDa) se detectó simultáneamente en el núcleo y citosol (Fig. 2.7.A, D y G). Sin embargo, la señal de YFP cuando está fusionada a *CIP7*, se encontró en estructuras filamentosas consistentes con estructuras del citoesqueleto semejantes a microtúbulos (Fig. 2.6.B, C, E, F, H e I). Cabe señalar que la posición de YFP en la proteína de fusión, ya sea N-terminal como C-terminal, no estaría interfiriendo con la localización de *CIP7* ya que en ambos casos la señal fue

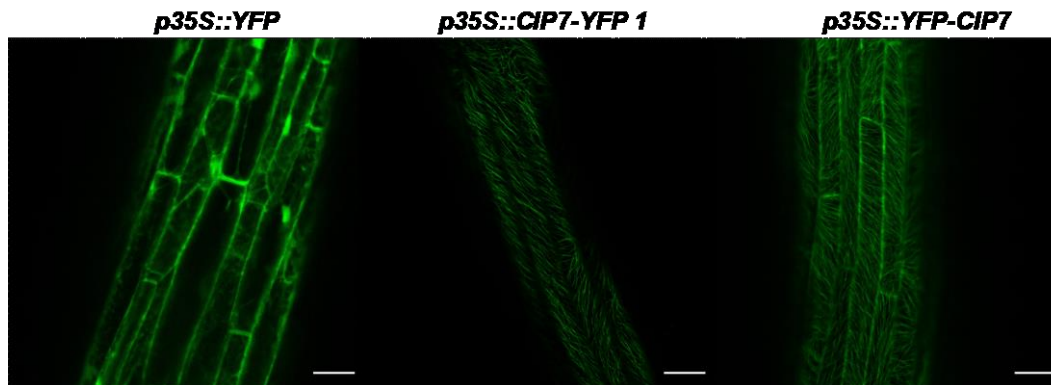
asociada a las mismas estructuras del citoesqueleto (Fig. 2.7). En las plántulas que crecieron 5 d en oscuridad se observó la misma señal filiforme (Fig. 2.8).



**Figura 2.7** En luz, CIP7 se localiza en estructuras filamentosas del citoesqueleto. Se visualizan células epidérmicas de cotiledones (A, B y C), de hipocótilo (D, E y F) y de raíz (G, H e I) de plántulas cultivadas 3 d en luz. Señal de YFP en verde y cloroplastos en magenta. Barra = 50µm para A, B, D, E y F. Barra= 20µm para C. Barra= 30µm para G, H y I. Las flechas indican filamentos de citoesqueleto (indicadas n B). Los círculos de línea punteada muestran núcleos con (G) y sin señal (I) de YFP.

En Yamamoto et al., 1998, se mostró que fusiones de CIP7 a GFP se localizaban en núcleos tanto en luz como en oscuridad. Sin embargo, nuestros resultados contradicen esas observaciones. Hipotetizamos que las discrepancias en los resultados podrían estar reflejando diferencias en las construcciones utilizadas. Mientras que Yamamoto y

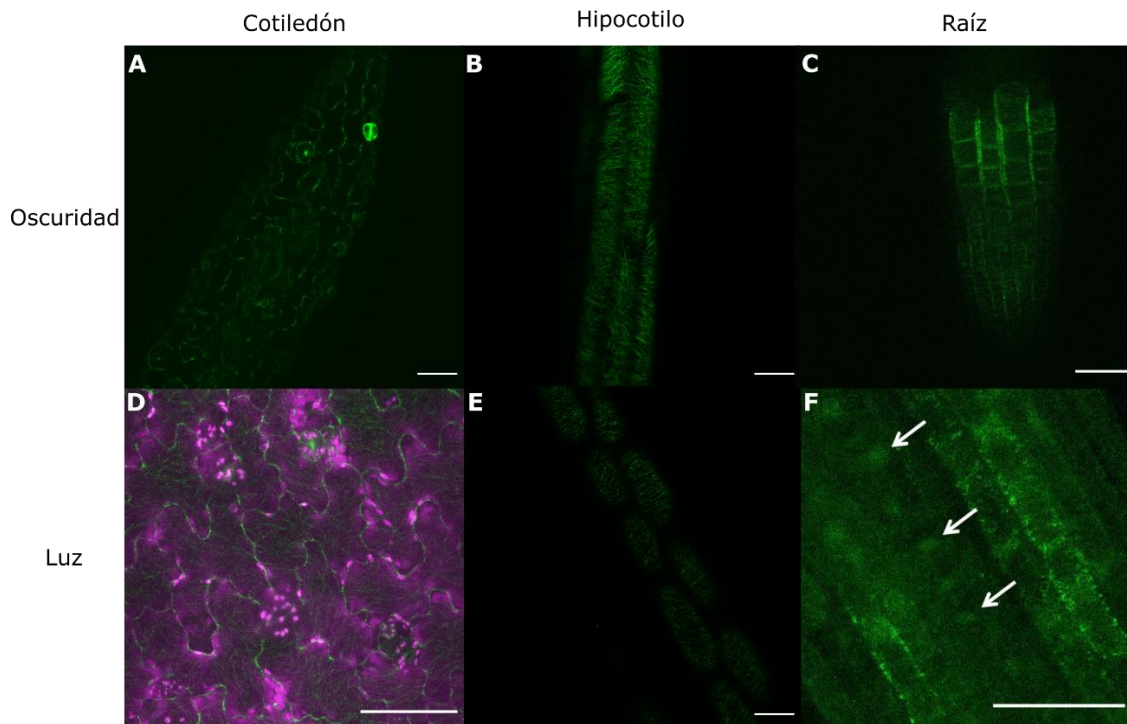
colaboradores utilizaron una construcción quimérica de ADN genómico y ADN copia, nosotros logramos clonar la versión genómica completa de CIP7 (3920 bp).



**Figura. 2.8** En oscuridad, CIP7 se localiza en estructuras filamentosas del citoesqueleto. Imágenes tomadas con el microscopio confocal que muestran hypocotilos de plántulas crecidas 5 d O. Señal de YFP en verde. Barra= 25µm

Con el fin de evaluar construcciones alternativas, procedimos a analizar las plántulas *pCIP7::CIP7-YFP* tanto en luz como en oscuridad. Esta construcción, es útil para descartar posibles efectos de localización ectópica inducida por la sobre-expresión causada por el promotor 35S. La señal filiforme de *pCIP7::CIP7-YFP* en plántulas de 5 d de oscuridad se detectó en cotiledones (Fig. 2.9.A), hypocótilo (Fig. 2.9.B) y raíz (Fig. 2.9.C). A pesar de que el transcripto de *CIP7* se expresa mayoritariamente en oscuridad (ver figura 2.6), también detectamos señal de *pCIP7::CIP7-YFP* en plántulas de 3 d de luz (Figura 2.9.D, E y F). Esto sugiere que, a pesar del efecto negativo de la luz en la transcripción de *CIP7*, existiría también un nivel de regulación post-transcripcional. En contraste con las líneas sobre-expresantes (35Sp) que no exhibieron localización nuclear de CIP7, en líneas *pCIP7::CIP7-YFP* fue posible detectar señal de CIP7-YFP en estructuras semejantes a núcleos principalmente en raíces en luz (Fig 2.9 F); localización esperada según los reportes de Yamamoto et al., 1998.



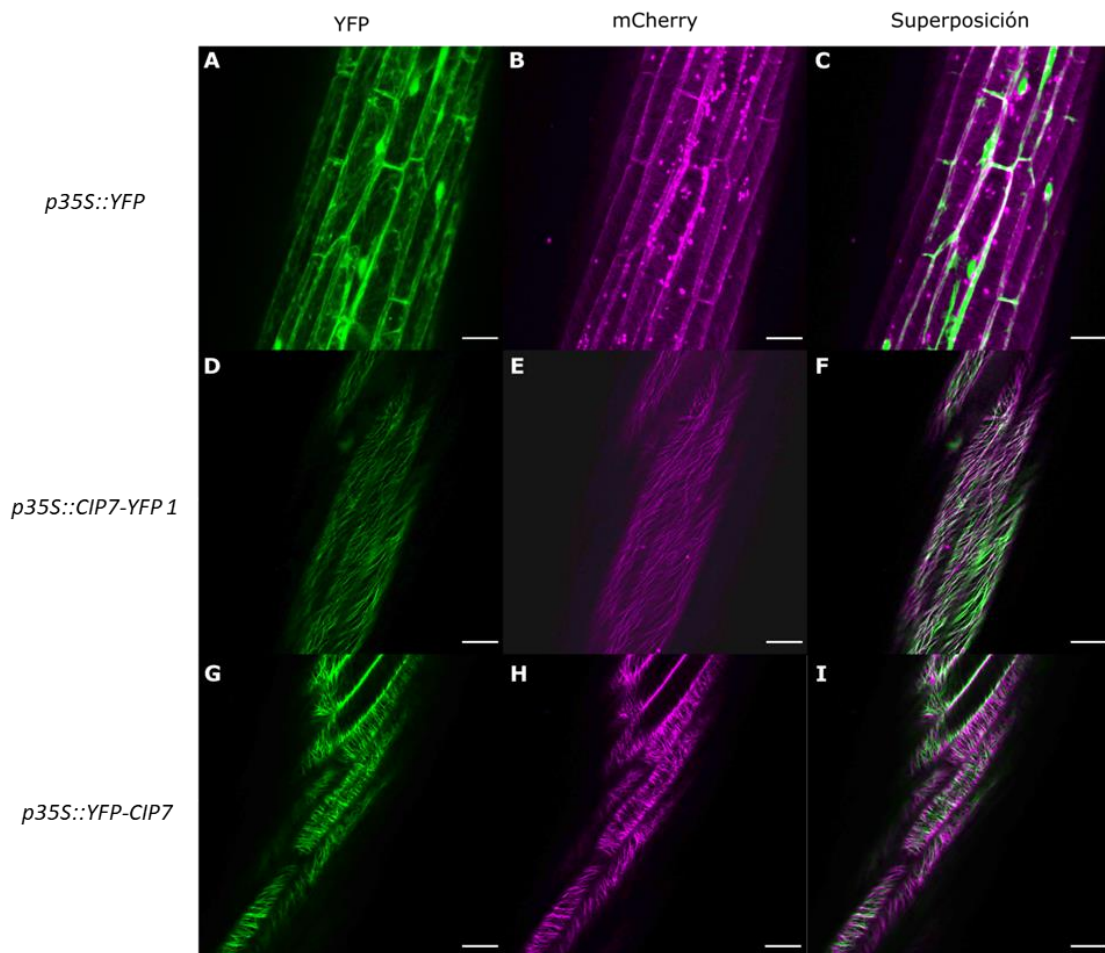


**Figura 2.9** Localización sub-celular de CIP7 en líneas *pCIP7::CIP7-YFP 1*, en oscuridad y luz. Se observaron cotiledones (A y D), hipocótilo (B y E) y raíz (C y F) de plántulas 3 d O y 3 d LB, respectivamente. Las flechas blancas señalan estructuras similares a núcleos. Barra = 50µm para D. Barra= 25µm para A, B y E. Barra= 30µm para C y Barra= 20µm para F.

### 2.2.2.2 CIP7 colocaliza con marcadores de microtúbulos.

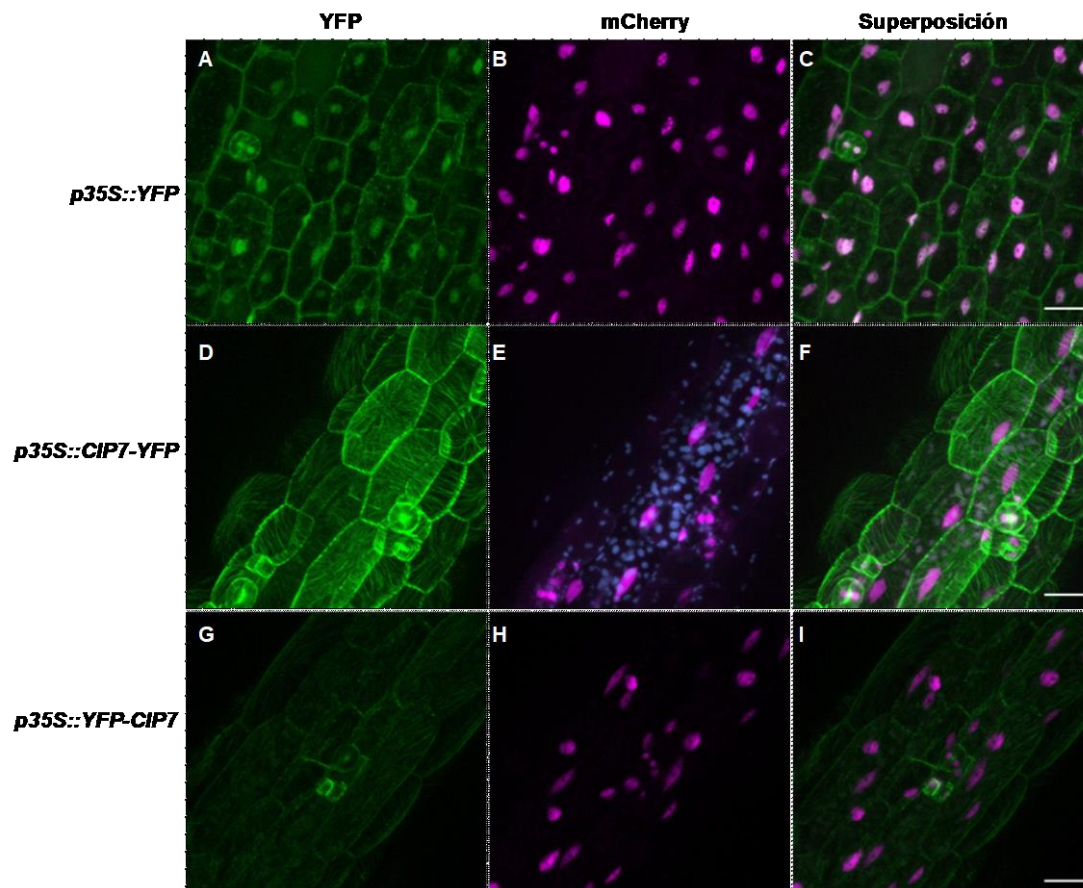
Con el objetivo de determinar en qué tipo de estructura del citoesqueleto se localiza CIP7, realizamos ensayos de co-localización con marcadores de microtúbulos (*pUBQ10::MBD-mCherry*) y núcleo (*pUBQ10::NLS-mCherry*) (Ivanov and Harrison, 2014). Para esto se cruzaron plantas portadoras del transgén *pUBQ10::MBD-mCherry* o *pUBQ10::NLS-mCherry* con plantas portadoras del transgén *p35S::CIP7-YFP* o *p35S::YFP-CIP7*. De esta manera logramos co-expresar en Arabidopsis la proteína CIP7 fusionada a YFP, junto con el marcador nuclear o el de microtúbulos simultáneamente (ver sección 9 de materiales y métodos). Usando microscopía confocal observamos que en hipocotilos de plantas cultivadas durante 5 d en oscuridad, las señales provenientes del control *p35S::YFP* en el canal verde, no se superpusieron con el marcador de microtúbulos en el canal rojo (Fig. 2.10.A-C). Sin embargo, tanto las señales originadas por las construcciones CIP7-YFP o YFP-CIP7 en el canal verde, se superpusieron con la señal de MBD-mCherry del canal magenta, confirmando que CIP7

se localiza en microtúbulos (Fig. 2.10.D-I). Esta señal se detectó específicamente en microtúbulos corticales de células epidérmicas. Al repetir los ensayos con plántulas crecidas 3 d en luz, se observó esta misma localización en los hypocotilos (datos no mostrados). En condiciones de luz no encontramos co-localización con marcadores nucleares; la señal de CIP7-YFP y YFP-CIP7 se registró nuevamente en microtúbulos (Fig. 2.11) excluyéndose del núcleo contrariamente a lo que ocurre ocasionalmente en las líneas *pCIP7::CIP7-YFP* (Fig. 2.8).



**Figura. 2.10** Tanto CIP7-YFP como YFP-CIP7 co-localizan con MBD-mCherry en microtúbulos corticales. **Plantulas crecidas 5 d en oscuridad** A -C. En plántulas control, la localización de YFP nuclear y citosólica, difiere de la del marcador de microtúbulos. **D - I.** En sobre-expresantes CIP7-YFP (D-F) y YFP-CIP7 (G-I), existe superposición de ambas señales. Imágenes tomadas en hypocótilos de plántulas 5 d O. En **verde**, se visualiza la señal de YFP, CIP7-YFP y YFP-CIP7. En **magenta**, la señal de MBD-mCherry. En **blanco**, la superposición de ambas señales. **MBD**, *Microtubule-Binding-Domain*. Barra= 25  $\mu$ m.



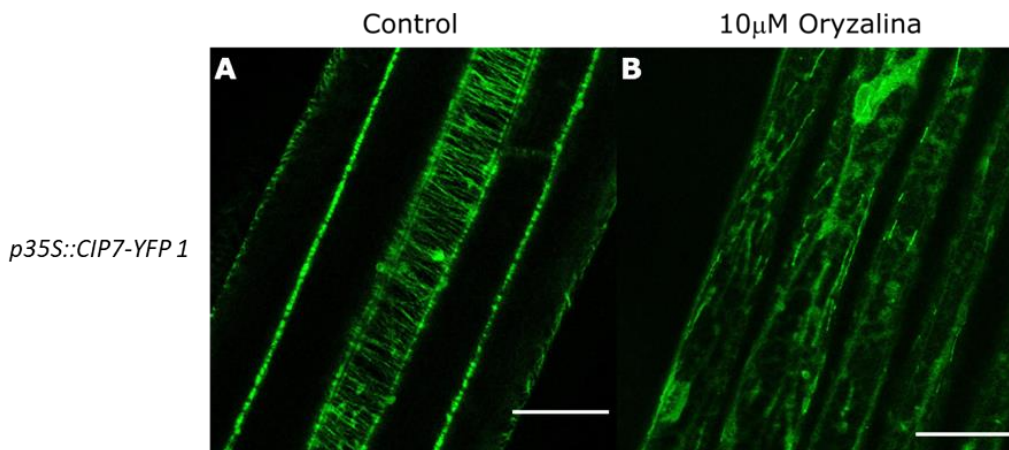


**Figura. 2.11** CIP7 no co-localiza con el marcador nuclear en las líneas sobre-expresantes. En plántulas control, la señal de YFP nuclear se superpone con la de NLS-mCherry (A-C). En plántulas sobre-expresantes, tanto la señal de CIP7-YFP (D-F) como la de YFP-CIP7 (G-I) se observa en microtúbulos. Imágenes tomadas en hipocótilos de plántulas 3 d LB. En **verde**, se visualiza la señal de YFP, CIP7-YFP y YFP-CIP7. En **magenta**, la señal de NLS-mCherry. En **blanco**, la superposición de ambas señales. **NLS**, *Nuclear-Localization-Signal*. Barra= 25  $\mu$ m.

### 2.2.2.3 Tratamientos con oryzalina desagregan la unión de CIP7 a los microtúbulos.

Con el objetivo de verificar la localización en microtúbulos, tratamos a las plántulas con oryzalina, una dinitroanilina que se une a tubulina favoreciendo la despolimerización de microtúbulos e inhibiendo su polimerización (Morejohn et al., 1987). Si CIP7 interactúa con los microtúbulos, la perturbación de los mismos por oryzalina también afectaría la unión de CIP7. Al cabo de 30 min de incubación con

oryzalina, se observaron microtúbulos parcialmente despolimerizados y la concomitante deslocalización de la señal CIP7-YFP hacia citoplasma y núcleo (Fig. 2.12), apoyando la evidencia que CIP7 se asocia a microtúbulos. Estos mismos resultados se obtuvieron con plántulas YFP-CIP7 (datos no mostrados).



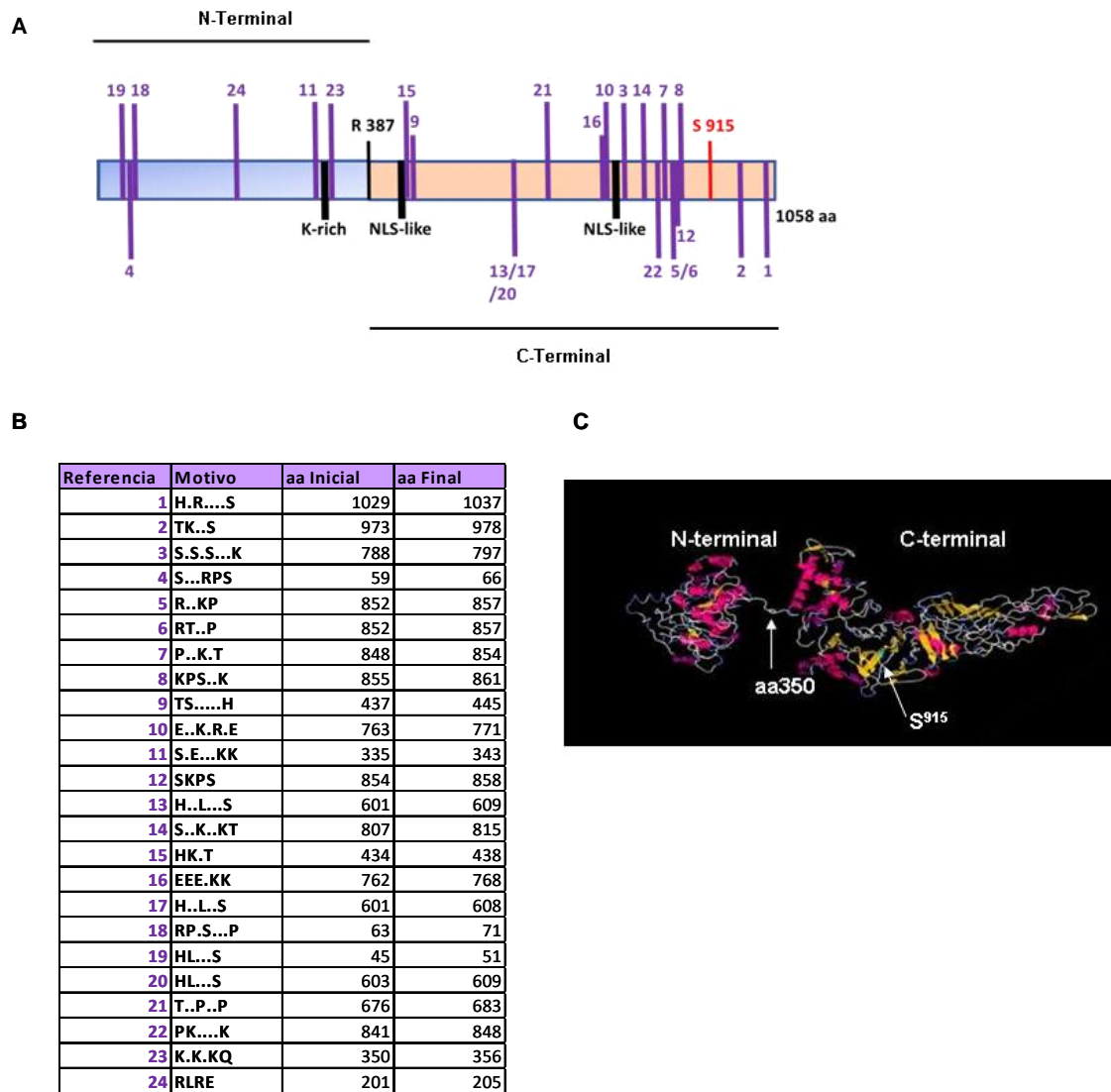
**Figura. 2.12** Señal de YFP en plántulas *p35S::CIP7-YFP* tratadas con el disruptor de microtúbulos *oryzalina*. Se incubaron plántulas sobre-expresantes *p35S::CIP7-YFP* de 5 d O con 10 μM de oryzalina durante 30 minutos y se tomaron imágenes de los hypocótilos antes (A) y después del tratamiento (B). Barra= 30 μm.

Todos los resultados anteriormente expuestos muestran que CIP7 localiza en microtúbulos corticales en nuestras condiciones experimentales. A diferencia de los reportes previos (Yamamoto et al., 1998), solo observamos ocasionalmente localización nuclear de CIP7 en células de la raíz de plantas *pCIP7::CIP7-YFP* que crecieron en luz.

#### **2.2.2.4 CIP7 presenta 24 motivos putativos de unión a microtúbulos distribuidos en dos dominios estructurales.**

Dada la novedosa y contundente localización que exhibió CIP7, estudiamos *in silico* la presencia de motivos de unión a microtúbulos en su secuencia primaria. Para ello,

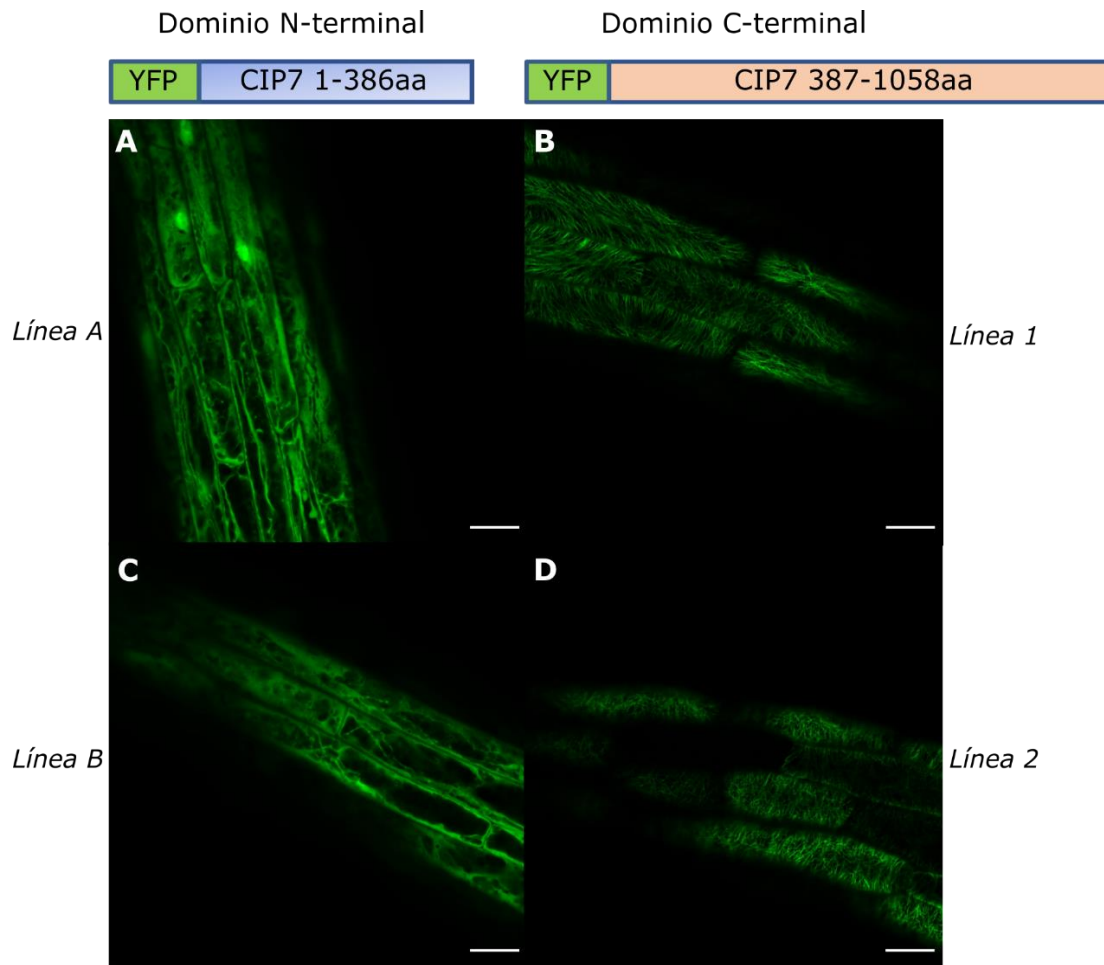
realizamos una búsqueda bioinformática utilizando la herramienta *MAPanalyzer* (Zhou et al., 2015), [systbio.cau.edu.cn/mappred/index.php](http://systbio.cau.edu.cn/mappred/index.php). Este sitio es un predictor de proteínas de asociación a microtúbulos (MAPs) basado en los motivos representativos de MAPs reportadas, con las que se construyó una gran base de datos curada por bibliografía y con actualización periódica. La figura 2.13.A-B muestra los motivos de unión a microtúbulos encontrados en la secuencia primaria de CIP7 con una especificidad mayor o igual al 95%. Con el propósito de estudiar si los dominios definidos por Yamamoto y colaboradores pudieran tener una correlación con su estructura tridimensional, y posiblemente su función, realizamos una predicción *in silico* de las probables estructuras terciarias a partir de la secuencia primaria de CIP7 utilizando la plataforma I-TASSER (Yang et al., 2015; Roy et al., 2010; Zhang, 2008). Brevemente, I-TASSER es una plataforma integral creada para la predicción de la estructura y función de proteínas basada en el paradigma secuencia-estructura-función (Roy et al., 2010). La figura 2.13.C muestra el modelo predicho con mayor confianza, en el que se evidencian dos dominios conectados por una secuencia de aminoácidos rica en lisinas: un dominio N-terminal pequeño de 350 aa y otro C-terminal del doble de tamaño. Esta estructura predicha se asemeja en gran medida a los dominios anteriormente descritos, ya que el dominio N-terminal fue definido por los primeros 386 aa (Fig. 2.12.A). Esta predicción sumada al hecho de que 18 de los 24 motivos de unión a microtúbulos se encontraran en el dominio C-terminal de CIP7, nos condujo a evaluar la contribución de cada dominio a la localización subcelular.



**Figura 2.13** CIP7 posee 24 putativos motivos de unión a microtúbulos característicos de MAPs conocidas y dos dominios estructurales característicos. **A.** Esquema que ilustra la disposición espacial de los 24 motivos de unión a microtúbulos en la proteína CIP7 según MAPanalyzer, numerados consecutivamente en violeta. **K-rich**, región rica en lisinas. **NLS-like**, putativas señales de localización nuclear. **R387**, arginina 387 marca el comienzo del dominio C-terminal de CIP7 descrito por Yamamoto et.al., 1998 que posee 1058 aminoácidos en total. **S915**, sitio que cambia su estado de fosforilación reportado en el capítulo 1. **B.** Tabla que especifica la secuencia de cada uno de los motivos de unión a microtúbulos encontrados y su localización exacta en la secuencia primaria de CIP7. **C.** Modelo de la estructura terciaria de CIP7 predicho por I-TASSER. aa: Aminoácido.

### **2.2.2.5 El dominio C-Terminal de CIP7 es necesario para la unión a microtúbulos.**

Con el objetivo de analizar la localización subcelular de cada dominio por separado, generamos plantas transgénicas estables de Arabidopsis que sobre-expresan cada dominio fusionado a YFP. Las construcciones se realizaron en base a los dominios descritos por Yamamoto y colaboradores (1998), es decir, los primeros 386 aminoácidos para el dominio N-terminal (*p35S::YFP-CIP7<sub>1-386aa</sub>*, dos líneas independientes 1 y 2) y el fragmento comprendido por los aminoácidos 387 a 1058 para el dominio C-terminal (*p35S::YFP-CIP7<sub>387-1058aa</sub>*, dos líneas independientes A y B). Las plantas transgénicas *p35S::YFP-CIP7<sub>387-1058aa</sub>* mostraron señal de YFP en microtúbulos mientras que aquellas plántulas que sobre-expresan solo el dominio N-terminal *p35S::YFP-CIP7<sub>1-386aa</sub>* presentaron señal en núcleo y citoplasma a semejanza del control *p35S::YFP* (Fig. 2.14). Estos resultados muestran que el dominio C-terminal es necesario para la correcta localización de CIP7 en microtúbulos. Aún queda pendiente determinar cuál/cuáles de los 18 motivos de unión a microtúbulos del extremo C-Terminal participarían en dicha asociación; pero el caudal de trabajo que representa excede esta tesis.



**Figura 2.14** El dominio C-terminal es necesario para la asociación a microtúbulos. Imágenes tomadas al microscopio confocal de hypocotilos de plántulas crecidas 3 d en oscuridad, provenientes de dos líneas independientes para el dominio N-terminal p35S::YFP\_CIP7<sub>1-386aa</sub> (A y C) y el dominio C-terminal p35S::YFP\_CIP7<sub>387-1058aa</sub> (B y D). Ambas construcciones se expresan bajo control de promotor 35S y la proteína fluorescente se posiciona en el amino-terminal, como se aprecian en los esquemas superiores. El dominio N-terminal comprende los primeros 386aa y el C-terminal los restantes 671aa. Verde: Señal de YFP. Barra= 25  $\mu$ m.

## 2.2.3 Estudio de la función biológica de CIP7.

### 2.2.3.1 CIP7 promueve el crecimiento del hypocótilo en oscuridad.

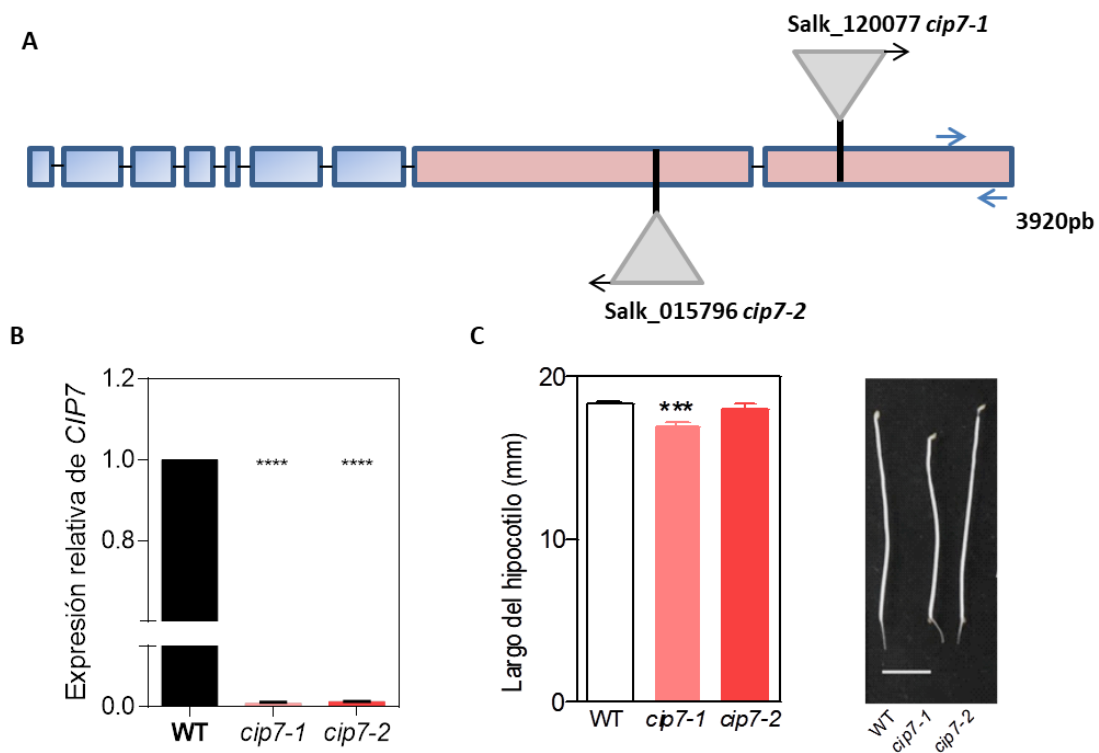
Con el objetivo de investigar la función de CIP7 mediante ensayos de genética reversa, estudiamos el comportamiento de diferentes líneas mutantes. En primer lugar, recurrimos al ABRC y obtuvimos dos líneas independientes mutantes homocigotas *cip7* por inserción de T-ADN, una en el último exón, *cip7-1* (Salk\_120077) y otra en el anteúltimo exón, *cip7-2* (Salk\_015796) (Fig. 2.15.A). Las líneas fueron

genotipificadas para confirmar la homocigosis de los alelos mutantes que portan, y secuenciadas para conocer inequívocamente el lugar exacto de inserción de los T-ADN (sección 4.1 de materiales y métodos). Particularmente, la línea *cip7-1* se introgressó dos veces con el genotipo WT para descartar la presencia de otro T-ADN espurio. Para corroborar que las líneas no expresaban el ARN mensajero endógeno, cuantificamos los niveles de transcripto *CIP7* en plántulas crecidas 5 d en oscuridad para ambos alelos por RT-qPCR. Mutantes *cip7-1* o *cip7-2* no exhibieron niveles de transcripto detectable comparadas con plántulas del genotipo WT (Figura 2.15.B).

Dado que *CIP7* se expresa en hipocotilo, es regulado por luz y colocaliza con microtúbulos; hipotetizamos que su función podría estar relacionada a la elongación del hipocotilo. Como se explicó previamente en la sección 6 de la introducción, la elongación del hipocótilo en oscuridad es una respuesta típica de escotomorfogénesis, y reportes anteriores sugieren que los microtúbulos estarían modulando esta respuesta (Li et al., 2011; Lloyd, 2011; Le et al., 2005; Dixit and Cyr, 2004). En consecuencia, estudiamos el fenotipo de largo de hipocótilo en plántulas etioladas de 5 d en los mutantes para *CIP7*. Las plántulas mutantes *cip7-1* presentaron un hipocótilo significativamente más corto que las plántulas WT ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el largo del hipocótilo entre plántulas WT y *cip7-2* ( $p < 0.8$ ) (Fig. 2.15.C). Estos resultados contradictorios entre ambas mutantes imposibilitan concluir cuál/es es/son la/s función/es de *CIP7*. En particular, es difícil explicar por qué la mutación *cip7-1*, que produce una menor delección en la secuencia de *CIP7*, genere un fenotipo que no se evidencia en *cip7-2* (Fig. 2.15.A). Varias hipótesis podrían explicar este comportamiento dispar: 1) la línea *cip7-2*, que no fue introgressada con el genotipo WT, posee una segunda inserción de un T-ADN que anula el fenotipo de arresto en el crecimiento del hipocotilo; 2) la línea *cip7-2* produce un transcripto que no puede ser amplificado por los *primers* de qPCR, pero que aún genera una proteína *CIP7* funcional; y 3) las líneas mutantes por inserción de T-ADN presentan defectos genéticos como delecciones, inversiones, translocaciones u otros rearrreglos cromosómicos que generan fenotipos extraños e inconsistentes, tal como se reporta en la literatura (Valentine et al., 2012; Xue et al., 2012; Arteaga-vazquez and Chandler, 2011). Para diferenciar entre estas posibilidades, se puede introgressar la línea *cip7-2*; diseñar nuevos oligonucleótidos río arriba de las inserciones de T-ADN

para verificar la presencia de transcripto o, alternativamente, cuantificar la expresión de *CIP7* por *Northern blot* y analizar posibles defectos de segregación de los alelos mutantes causados por los rearrreglos cromosómicos. Algunas de estas hipótesis fueron evaluadas en el Anexo II. Sin embargo, para evitar problemas posiblemente asociados a los T-ADN, decidimos generar nuestras propias mutantes de *CIP7*.

Para obtener mutantes alternativas que nos permitan evaluar la función de *CIP7*, decidimos generar nuevas mutantes por la estrategia de CRISPR Cas9 (Miao et al., 2013). Las construcciones se realizaron siguiendo la estrategia de Referencia.



**Figura 2.15** *cip7-1* presenta hipocótilos más cortos que WT en oscuridad. **A.** Esquemas de las líneas mutantes por inserción de T-ADN en el último exón *cip7-1* (Salk\_120077, triángulo gris invertido) y anteúltimo exón *cip7-2* (Salk\_015796, triángulo gris). El gen de *CIP7* posee 3920pb. Las flechas negras indican orientación de los T-ADN. Los exones en azul codifican para el dominio N-terminal de *CIP7* y los naranjas para el C-terminal. **B.** Abundancia del transcripto *CIP7* en plántulas WT, *cip7-1* y *cip7-2* que crecieron 5 d en oscuridad. La expresión de *CIP7* se expresa relativa al gen de expresión constitutiva EF-1 $\alpha$  y normalizada a los niveles cuantificados para WT. Las flechas en azul del esquema en A, indican el lugar donde hibridan los oligonucleótidos iniciadores usados para la RT-qPCR. **C.** Largo de hipocótilos de

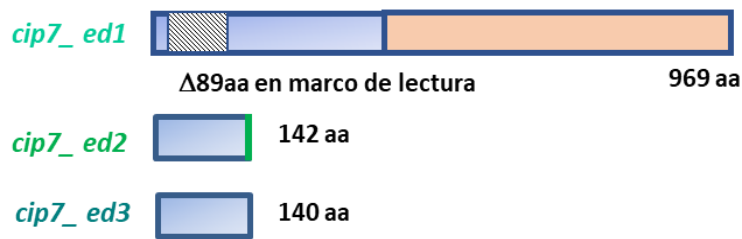


plántulas WT, *cip7-1* y *cip7-2* crecidas durante 5 d en oscuridad. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de al menos 19 repeticiones (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 1 factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Significancia \*\*\* corresponde a p-valor < 0.001. A la derecha, foto de plántulas representativas de los genotipos analizados. Barra: 5mm.

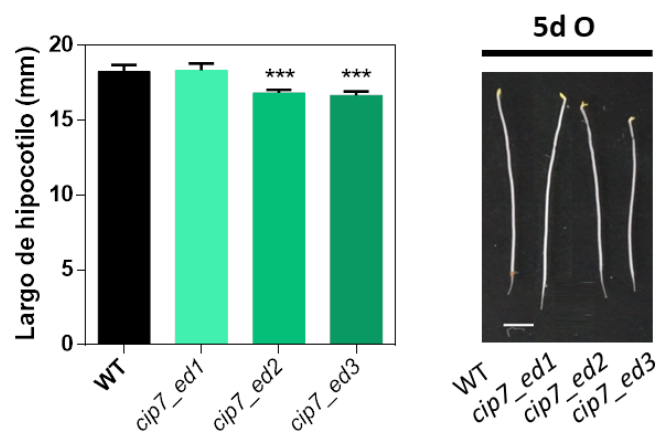
Se generaron 3 líneas mutantes homocigotas para *cip7*: *cip7\_ed1* presenta una delección de 89 aminoácidos en el dominio N-terminal que mantiene el marco de lectura de CIP7; *cip7\_ed2* presenta la inserción de una T que modifica el marco de lectura, provocando un codón de terminación prematuro y la consecuente generación de una proteína de 142 aminoácidos; y, *cip7\_ed3* posee una delección de 5 bases que también genera un codón de terminación prematuro, pero produciendo una proteína de 140 aminoácidos (Fig. 2.16.A). Debido a la aparición de codones de terminación prematuros en *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3*, estas líneas constituyen verdaderos *knock-out* (Fig. 2.16.A).

Con las nuevas mutantes de CIP7, analizamos su capacidad de elongar el hipocótilo en oscuridad. Ambas líneas *knock-out*, *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3*, presentaron hipocótilos significativamente más cortos que el WT. En cambio, *cip7\_ed1* fue indistinguible de las WT luego de 5 d en oscuridad (Fig. 2.15.B). Estos resultados sugieren que CIP7 cumple un rol en promover la elongación del hipocótilo en oscuridad, ya que los hipocótilos son más cortos que en el WT en ausencia de CIP7. Por otro lado, la carencia de fenotipo para las mutantes *cip7\_ed1*, indicaría que la delección de parte del dominio N-terminal de CIP7 no afectaría el normal funcionamiento de esta proteína en el alargamiento del hipocotilo en oscuridad. Por consiguiente, nuestros datos sugieren que el dominio C-terminal podría ser necesario para promover la elongación del hipocotilo. Dado que el dominio C-terminal también permite que CIP7 se asocie a microtúbulos (figura 2.14), es posible que CIP7 requiera la interacción con microtúbulos para promover la elongación de los hipocotilos en oscuridad.

**A**



**B**

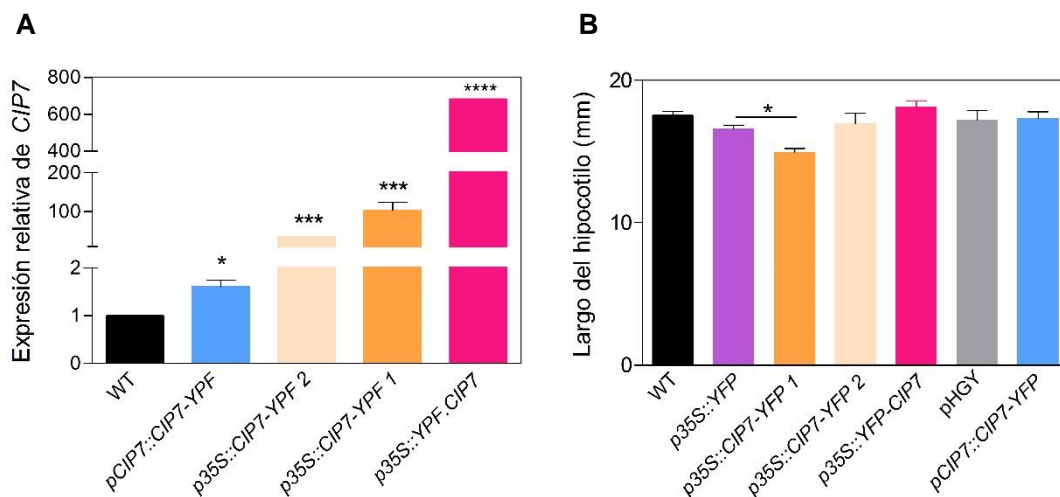


**Figura 2.16** Mutantes *Knock-out* *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* presentan hipocótilos significativamente más cortos que el WT en 5 d O. **A.** Esquemas de las líneas mutantes por edición generadas por CRISPR-Cas9. *cip7\_ed1* presenta una deleción en marco de 89aa (rectángulo rayado) en el dominio N-terminal dando lugar a una proteína de 969aa. *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* generaron versiones truncadas de CIP7 de 142aa y 140aa, respectivamente. Rectángulo azul: N-terminal, rectángulo rosa: C-Terminal **B.** Largo de hipocótilos de plántulas WT, *cip7\_ed1*, *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* que crecieron durante 5 d en oscuridad. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de al menos 13 réplicas independientes (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 1 factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Significancia \*\*\* corresponde a p-valor < 0.001. A la derecha fotos de plántulas representativas de los fenotipos mostrados en B. Barra: 5mm.

Nuestras observaciones muestran que la ausencia de CIP7 resulta en hipocótilos más cortos. Decidimos analizar entonces cuál sería el efecto de la sobreexpresión de CIP7. Sería esperable que el fenotipo de las plantas sobre-expresantes sea opuesto al de las plantas mutantes *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3*, y presenten hipocótilos más altos que sus controles en oscuridad. Pero también, se debe contemplar la posibilidad de que un

exceso de CIP7 perturbe la organización y dinámica de microtúbulos tal que resulte en hipocótilos aún más cortos o sin fenotipo aberrante. Para llevar adelante este objetivo, utilizamos las líneas *p35S::CIP7-YFP*, *p35S::YFP-CIP7* y *pCIP7::CIP7-YFP* (sección 2.2.2) que fueron generadas para el estudio de la localización subcelular de CIP7. Primero, cuantificamos el nivel de expresión de *CIP7* en estas líneas para poder correlacionar su abundancia con la severidad del fenotipo o magnitud de la respuesta.

La línea *p35S::YFP-CIP7* presentó la mayor expresión, mostrando niveles de transcripción alrededor de 700 veces mayor que el del genotipo WT (Fig. 2.17.A). Entre aquellas líneas sobre-expresantes con YFP fusionada a CIP7 en su extremo C-terminal, la línea *p35S::CIP7-YFP 1* fue la más fuerte (nivel de expresión aproximadamente 100 veces mayor que en WT). Por otro lado, la línea que expresa el transgén CIP7 bajo su propio promotor *pCIP7::CIP7-YFP* presentó un 50% más de expresión que el WT (Fig. 2.17.A).



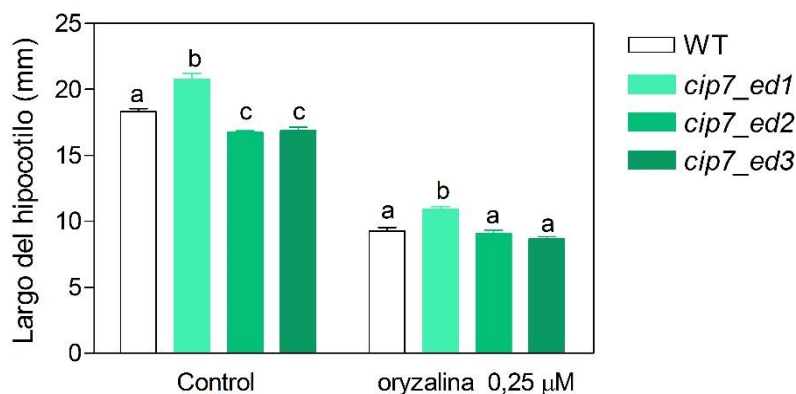
**Figura 2.17** La sobre-expresión de *CIP7* podría resultar en hipocótilos más cortos. **A.** Cuantificación del transcripción *CIP7* en plántulas cultivadas por 5 d en oscuridad, de los genotipos WT, sobre-expresantes con promotor constitutivo (*p35S::CIP7-YFP 1* y *2* y *p35S::YFP-CIP7*) y endógeno (*pCIP7::CIP7-YFP*). Expresión de *CIP7* relativa al gen de expresión constitutiva *EF-1 $\alpha$*  y normalizada a los niveles cuantificados para WT. Para el análisis estadístico se comparó a cada sobre-expresante con el WT por T-Test, \* corresponde a p-valor < 0.05, \*\*\* corresponde a p-valor < 0.01, y \*\*\*\* corresponde a p-valor < 0.0001 **B.** Largo de hipocótilos de plántulas que crecieron durante 5 d en oscuridad, correspondientes a WT, sobre-expresantes, y respectivos controles (*p35S::YFP* y *pHGY*). Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de al menos 11 réplicas independientes (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Análisis estadístico por ANOVA de 1 factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey, \* corresponde a p-valor < 0.05.

La sobre-expresante *p35S::CIP7-YFP 1* fue la única línea que presentó un hipocótilo más corto que su respectivo control *p35S::YFP* e incluso que el genotipo WT (Fig. 2.17.B). Tampoco se notaron diferencias en el largo del hipocotilo entre la línea con promotor endógeno *pCIP7::CIP7-YFP* y su respectivo control (Fig. 2.17.B). Estos resultados no son concluyentes debido a la disparidad de respuesta entre las distintas líneas analizadas. No hemos logrado establecer una relación entre el nivel de sobre-expresión con severidad de fenotipo, pero el comportamiento mostrado por *p35S::CIP7-YFP 1* sugiere que la sobre-expresión de *CIP7* también podría tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hipocotilos, lo mismo que se observó con la falta de *CIP7* (Fig.2.16). Estos fenotipos podrían explicarse ya que se necesita un balance óptimo en las proteínas que se unen a los microtúbulos y tanto la falta como el exceso de estas proteínas podría generar un desbalance en la dinámica de polimerización generando el mismo fenotipo (Buschmann and Lloyd, 2008; Sedbrook and Kaloriti, 2008; Kaloriti et al., 2007). Estudios incluyendo mayor número de líneas con expresión comparable serían necesarios para avalar esta hipótesis.

En concreto, nuestros resultados sugieren que *CIP7* promueve el crecimiento del hipocótilo en oscuridad, siendo su dominio N-terminal prescindible para cumplir su función.

### **2.2.3.2. CIP7 participaría en la estabilidad de los microtúbulos.**

Dado que *CIP7* sería una proteína que se une a microtúbulos y promueve el alargamiento del hipocotilo en oscuridad, decidimos estudiar la respuesta de los distintos mutantes frente a la despolimerización de los microtúbulos. Para esto crecimos plantas WT y las mutantes generadas por CRISPR-CAS9 durante 5 d en oscuridad en ausencia o presencia de 0,25  $\mu$ M de oryzalina (Fig. 2.18). Se utilizó esta concentración ya que ha sido empleada en otros trabajos para ensayos similares (Chen et al., 2016).



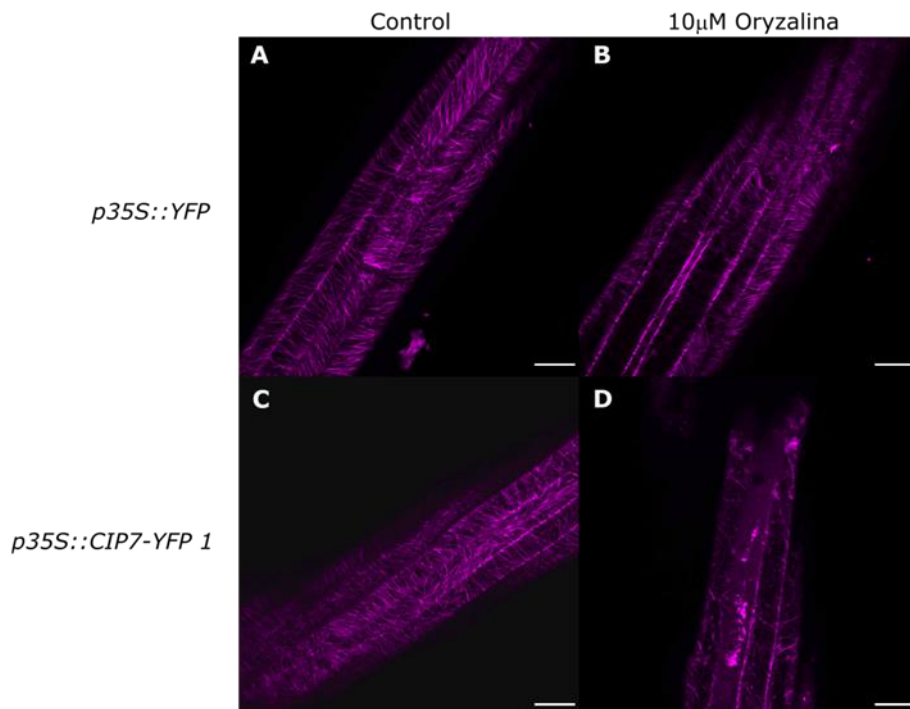
**Figura 2.18** El largo del hipocotilo en los mutantes CRISPR-CAS9 sería hiposensible a oryzalina.

Plántulas WT o mutantes *cip7\_ed1*, *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* fueron cultivados durante 5 d en oscuridad en medio MS suplementado con 0,25μM de oryzalina o etanol para la situación control. Los datos representan la media ± el error estándar de al menos 3 réplicas independientes (cada repetición es la medición de al menos 10 plántulas). Para cada tratamiento se analizaron los datos por ANOVA de 1 factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Letras distintas representan diferencias significativas en el tratamiento.

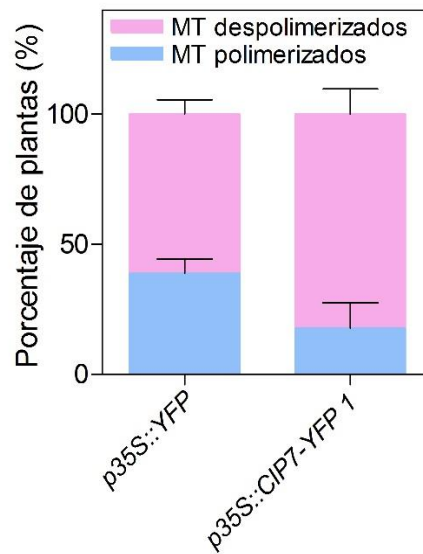
Como observamos antes, los hipocotilos de las líneas mutantes *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* crecidos en ausencia de oryzalina durante 5 d en oscuridad fueron significativamente más cortos que el genotipo WT (Fig. 2.18). En cambio, las mutantes no fueron diferentes al WT en tratamientos con oryzalina. Es decir que la respuesta a la despolimerización de microtúbulos mediada por oryzalina aparenta ser menor en las mutantes (diferencia del largo del hipocotilo entre control y 0,25 μM de oryzalina, media ± error estándar (mm), WT: 9,1 ± 0,5; *cip7\_ed1*: 9,9 ± 0,6; *cip7\_ed2*: 7,7± 0,3; *cip7\_ed3*: 8,1± 0,4). Estos resultados sugieren que CIP7 participaría en la estabilidad de los microtúbulos necesaria para el alargamiento del hipocotilo.

Con el objetivo de establecer las bases del mecanismo por el cual CIP7 se asocia a microtúbulos y promueve el crecimiento del hipocótilo en oscuridad, realizamos ensayos con oryzalina utilizando las plántulas sobre-expresantes *p35S::CIP7-YFP 1* y control *p35::YFP* cruzadas con la planta transgénica que porta el marcador de microtúbulos *pUBQ10::MBD-mCherry*. Plantas crecidas durante 5d en oscuridad fueron incubadas con 10μM de oryzalina durante 30 min y se tomaron imágenes en microscopio confocal de los hipocótilos antes y después de la incubación con la droga.

A



B



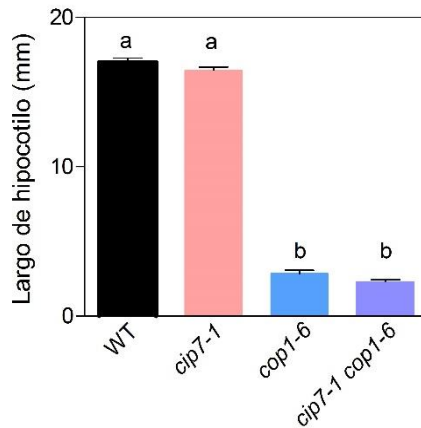
**Figura 2.19** La sobre-expresión de CIP7 favorecería la desestabilización de los microtúbulos. **A.** Imágenes representativas de hipocótilos de plántulas crecidas 5 d en oscuridad sobre-expresantes *p35S::CIP7-YFP 1* (A y B) y control *p35S::YFP* (C y D), incubadas con oryzalina 10µM durante 30 min o sin tratar. **Magenta**, señal proveniente del marcador de microtúbulos MBD-mCherry. Barra= 25µm. **B.** Estimación del porcentaje de plantas tratadas con oryzalina (ver sección 10 de materiales y métodos) que presentaron microtúbulos (MT) total o parcialmente despolimerizados (rosa) y aquellas en las cuales los microtúbulos se visualizaron con el mismo grado de polimerización que las plantas del mismo

genotipo no tratadas (celeste). Los datos fueron analizados por la prueba de  $\chi^2$  (valor de  $\chi^2$ : 9,9;  $p < 0.001$ ).

Comparar la señal del marcador de microtúbulos en los distintos *backgrounds* genéticos, nos permitiría inferir si CIP7 estabiliza o desestabiliza los microtúbulos en función del grado de despolimerización que presenten los mismos luego del tratamiento. Se registró un número significativamente mayor de plántulas *p35S::CIP7-YFP 1* que presentaron microtúbulos parcial o totalmente despolimerizados, en comparación con el control *p35S::YFP* (Fig. 2.19) es decir que la sobre-expresión de CIP7 aumentaría la susceptibilidad de los microtúbulos al efecto de la oryzalina. Por un lado, de la figura 2.18 se infiere que la ausencia de CIP7 provocaría que los microtúbulos sean menos susceptibles a la despolimerización (ergo, más estables). Por otro lado, el exceso de CIP7 aumentaría la inestabilidad de los microtúbulos frente al tratamiento con este agente (Fig. 2.19). En conjunto, estos resultados sugieren un posible rol de CIP7 en la desestabilización de los microtúbulos, efecto relevante para mantener la dinámica esencial de estas estructuras. Sin embargo, los efectos de la desestabilización no se reflejaron en el largo del hipocótilo de la mayoría de las líneas sobre-expresantes (Fig. 2.17). Esto podría explicarse por la existencia de otro factor que debiera ser necesario para permitir que CIP7 tenga la capacidad de desestabilizar a los microtúbulos; o bien, mecanismos de compensación que contrarresten los efectos de desestabilización.

#### **2.2.4 CIP7 es una proteína de asociación a microtúbulos que estaría regulada por luz vía proteasoma.**

Visto que CIP7 interacciona con COP1 (Yamamoto et al., 1998), se evaluó si ambos son intermediarios de una misma vía de señalización que conduce a la regulación del crecimiento del hipocótilo. Para ello se generó la doble mutante *cop1-6 cip7-1* como se detalla en la sección 1 de materiales y métodos.



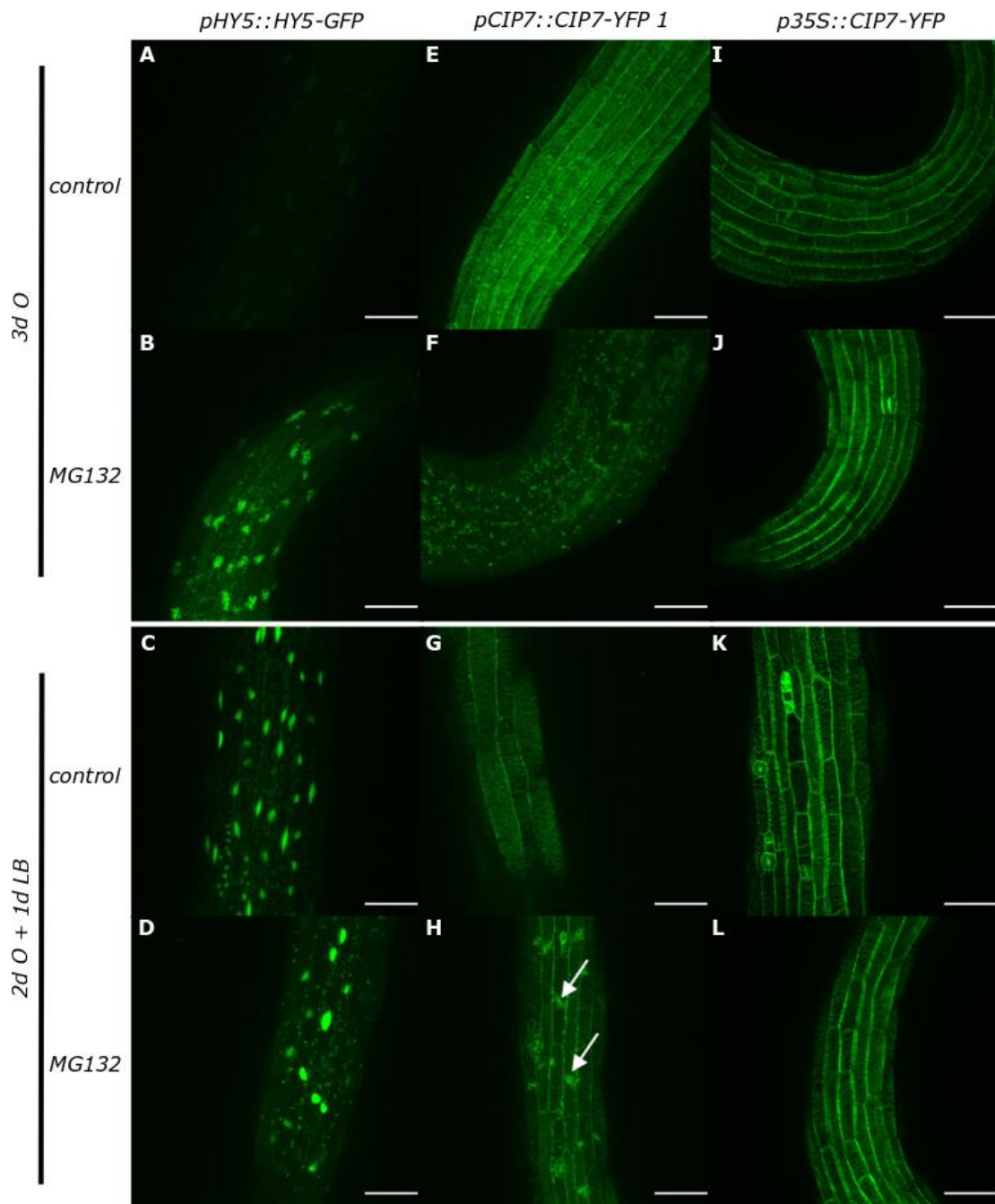
**Figura 2.20 CIP7 participaría río abajo de COP1 en la vía de señalización.** Longitud de hipocótilos de plántulas WT; simples mutantes *cip7-1* y *cop1-6*; y doble mutante *cop1-6 cip7-1* crecidas durante 5 d en oscuridad. Los datos representan la media  $\pm$  error estándar de al menos 3 réplicas independientes.

La mutante homocigota *cop1-6* presenta un fenotipo desetioloado en oscuridad, es decir, que su desarrollo se asemeja a una plántula crecida en luz con hipocótilo corto. La doble mutante *cip7-1 cop1-6* no presentó diferencias significativas con respecto al simple mutante *cop1-6* en cuanto al largo del hipocotilo (Fig. 2.20). Existen dos alternativas para explicar este resultado. En la primera, COP1 intervendría río arriba de CIP7 y su fenotipo sería el dominante. En la segunda alternativa, ambas proteínas no participarían en la misma vía que gobierna la elongación del hipocotilo, pero la mutación *cop1-6* sería dominante sobre *cip7-1*. Dado que ambas proteínas interaccionan físicamente (Yamamoto et al., 1998), es más probable que la primera alternativa sea correcta y ambas proteínas sean parte de la misma cascada de regulación del crecimiento del hipocotilo, en la que CIP7 participaría río abajo de COP1.

Como se mencionó previamente en la sección 5.1 de la introducción, COP1 es una E3 ligasa que promueve la degradación de reguladores positivos de la fotomorfogénesis vía proteasoma 26S, como el factor de transcripción HY5 (Osterlund et al., 2000). Dado que CIP7 fue reportada como una proteína de interacción con COP1, y nuestros resultados sugieren que presenta una regulación por luz (Tabla 1.1, Fig. 2.4 y 2.6), decidimos estudiar el rol de COP1 sobre el mecanismo de acción de CIP7. Como primera aproximación, para estudiar si CIP7 está sujeta a regulación por proteasoma llevamos a cabo ensayos de microscopía confocal en los que las plántulas



se incubaron con MG132, un inhibidor de proteasoma. Como control positivo del funcionamiento del MG132, hicimos uso de un reportero traduccional de HY5 que refleja el comportamiento de esta proteína frente a la luz (Osterlund et al., 2000). La línea reportera *pHY5::HY5-GFP* fue obtenida del laboratorio del Dr. Jorge Casal (IFEVA, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, y FIL Fundación Instituto Leloir, Argentina). Como era de esperar, la línea *pHY5::HY5-GFP* no presentó señal de GFP en oscuridad (Fig. 2.21.A) ya que este factor de transcripción es degradado vía proteasoma en esas condiciones. Cuando las plántulas crecieron 2 d en oscuridad y 1 d en luz blanca, la señal de la proteína HY5-GFP se localizó específicamente en los núcleos (Fig. 2.21.C), consistentemente con el hecho de que la luz reprime la degradación de HY5. En oscuridad, al bloquear la actividad del proteasoma incubando las plántulas con MG132, se recuperó la señal nuclear característica de HY5-GFP (Fig. 2.21.B) a niveles cualitativamente comparables a los observados en plantas que crecieron 2 d en oscuridad y recibieron 1 d de luz (Fig. 2.21.C). Cuando analizamos el efecto de MG132 sobre CIP7, tanto las plántulas *pCIP7::CIP7-YFP* como *p35S::CIP7-YFP 1* que crecieron en oscuridad 2 d y posteriormente recibieron 1 d de luz, presentaron señal de CIP7-YFP en microtúbulos (Fig. 2.21.G y K, respectivamente). Sin embargo, ambas líneas exhibieron un comportamiento distinto al inhibir el funcionamiento del proteasoma. Sorprendentemente, el tratamiento con MG132 en luz permitió detectar la señal nuclear de CIP7-YFP en las plántulas *pCIP7::CIP7-YFP*, en tanto no se percibieron cambios con las plántulas *p35S::CIP7-YFP 1* (Fig. 2.21.H). Estos resultados fueron confirmados usando dos líneas independientes de *pCIP7::CIP7-YFP* (datos no mostrados).



**Figura 2.21** CIP7 se particionaría entre microtúbulos y núcleo en las líneas *pCIP7::CIP7-YFP* cuando se bloquea la actividad del proteasoma en luz. Imágenes de hypocótilos tomadas en microscopio confocal de las líneas *pHY5::HY5-GFP* (A – D), *pCIP7::CIP7-YFP* (E – H) y *p35S::CIP7-YFP* (I – L) que crecieron 3 d en oscuridad (3d O) o 2 d en oscuridad y 1 d en luz (2 d O + 1 d LB). El tratamiento con 100 $\mu$ M de MG132 se realizó el tercer día incubando las plántulas en MS líquido durante 24 h ya sea en luz como en oscuridad y utilizando 100 $\mu$ M de DMSO para la condición control. Barra= 25 $\mu$ M. Las flechas blancas indican la relocalización de CIP7-YFP en núcleos (H).

Estos resultados, aún preliminares, sugieren que CIP7 se encuentra mayoritariamente asociada a microtúbulos, pero además tendría la capacidad de translocarse al núcleo (tal como lo describiera Yamamoto et al., 1998). Dicha localización nuclear sería inestable porque se estaría degradando en luz vía proteasoma.

En este capítulo hemos expuesto los experimentos realizados con el objetivo de dilucidar la regulación transcripcional, localización, función, modo de acción y regulación de la estabilidad de CIP7. Todos estos aspectos confluyen en un mecanismo de señalización descrito en un modelo hipotético que se discutirá en la siguiente sección.

## 2.3 Discusión.

En el presente estudio, los ensayos con el reportero GUS revelaron que *CIP7* se expresa en oscuridad en cotiledones, región apical de hipocótilo y zona de elongación de raíz de plántulas etioladas de 3 a 5 días (Fig. 2.3). Asimismo, la actividad de su promotor endógeno decrece con la exposición a la luz (Fig. 2.4), en concordancia, con la disminución en los niveles de transcripto *CIP7* cuantificados por qPCR en plántulas cultivadas en luz respecto a las de oscuridad (Fig. 2.5). Los ensayos de localización mediante estudios de microscopía confocal demostraron que CIP7-YFP se encuentra asociada a microtúbulos corticales (Fig. 2.7), siendo su dominio C-terminal el responsable de dicha unión (Fig. 2.14). Los ensayos fisiológicos con plántulas mutantes nulas *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* mostraron hipocótilos significativamente más cortos que el WT al cabo de 5 d de oscuridad (Fig. 2.16). Todos estos resultados son consistentes con que CIP7 es un promotor de la elongación del hipocótilo en oscuridad a través de la regulación de la dinámica de microtúbulos (Fig. 2.19). Finalmente, resultados preliminares muestran que CIP7 estaría sujeto a una regulación post-traducciona (Fig. 2.21).

### 2.3.1 *CIP7* exhibe un patrón de expresión en plántulas etioladas característico de reguladores positivos del crecimiento.

Los estudios con el reportero transcripcional *pCIP7::GUS* mostraron que el patrón de expresión de *CIP7* no es ubicuo, sugiriendo que CIP7 presentaría cierta especificidad temporal y espacial. Mientras que en plantas adultas se expresaría principalmente en zonas de elongación de tallos y raíces (Fig. 2.2); en plántulas etioladas cultivadas en oscuridad entre 3 y 5 días, el promotor endógeno tiene actividad en cotiledones, región apical del hipocótilo y zona de elongación de raíz (Fig. 2.3 y 2.4). Inmediatamente posterior a la germinación en oscuridad, los hipocótilos crecen predominantemente por expansión de sus células basales, en sentido acrópeto; siendo la tasa de división celular muy baja (Boron and Vissenberg, 2014; Gendreau et al., 1997). Al cabo de 3 a 4 días post-germinación, las 5 células más basales del hipocótilo cesan su crecimiento, momento en que comienzan a expandirse las células ubicadas en

la región apical (Gendreau et al., 1997). En estas condiciones, se ha observado que los reguladores positivos y negativos de elongación celular en hipocótilos de plántulas etioladas presentan dos patrones de expresión posicionales opuestos (Li et al., 2011). En tanto las proteínas que juegan un rol positivo en el crecimiento del hipocótilo se expresan preponderantemente en su región apical; los reguladores negativos lo hacen en las células basales que arrestan su expansión (Li et al., 2011). Por ejemplo, la proteína “MICROTUBULE-DESTABILIZING PROTEIN 25” (MDP25) inhibe la elongación celular del hipocótilo cuando se incrementan los niveles citosólicos de  $Ca^{2+}$ , evento que provoca su disociación de la membrana plasmática resultando finalmente en la desestabilización de los microtúbulos corticales (Li et al., 2011). Líneas transgénicas para reporteros transcripcionales (GUS) del promotor endógeno de *MDP25* en *Arabidopsis*, exhiben un máximo de expresión en la región basal de hipocótilos en plántulas etioladas de 3, 4 y 5 días (Li et al., 2011). La proteína “MICROTUBULE-DESTABILIZING PROTEIN 40” (MDP40) es una proteína que desestabiliza microtúbulos y, que en contraposición a MDP25, cumple un rol positivo en la elongación celular de hipocótilos en oscuridad regulada por brassinoesteroides (Wang et al., 2012a). Ensayos de actividad GUS con líneas transgénicas para reporteros transcripcionales del promotor *MDP40* y RT-qPCR revelaron mayor expresión de *MDP40* en la región apical de hipocótilos en plántulas etioladas de 3 a 5 días, región considerada de mayor velocidad de crecimiento al cabo de 4 d de oscuridad (Wang et al., 2012a). En este contexto, el patrón de expresión de *CIP7* y el fenotipo de su mutante coinciden con el comportamiento de MDP40. Esto enmarca a ambas proteínas como reguladores positivos del crecimiento del hipocótilo en oscuridad cuya máxima expresión se encuentra en la región apical.

### **2.3.2 *CIP7* se expresa en oscuridad y se reprime por la luz.**

Como se mencionó previamente en la sección 6 de la introducción, las plantas que crecen en oscuridad elongan su hipocótilo de manera de alcanzar un ambiente lumínico favorable. La percepción de luz es señal de arresto del crecimiento y los recursos se destinan a otras respuestas adaptativas (Ha et al., 2017). En relación a esto, *CIP7* presentó su máximo de expresión en oscuridad y decreció con la exposición

prolongada a la luz (Fig. 2.4), condición que coincide con la disminución de la tasa de crecimiento del hipocótilo.

Nuestros resultados difieren de lo publicado por Yamamoto y colaboradores (Yamamoto et al., 1998) ya que ellos propusieron que *CIP7* aumentaría su expresión en luz, mientras que nosotros observamos que la luz inhibe la expresión de *CIP7*. Los ensayos con reporteros transcripcionales y la cuantificación de transcripto por RT-qPCR, mostraron que la luz regularía negativamente la expresión de *CIP7* (Fig 2.4 y 2.5). El hecho de obtener los mismos resultados desde dos abordajes distintos le confiere solidez a nuestros datos. Es importante resaltar que *CIP7* es un gen de baja expresión. En los ensayos de RT-qPCR, los valores medidos de transcripto *CIP7* relativo al gen *EF-1 $\alpha$* , se encontraron en un orden centesimal en las condiciones de mayor expresión de *CIP7* (es decir, en las muestras de plántulas WT que crecieron 5 d en oscuridad). En este contexto, es posible que las diferencias en cuanto a la regulación transcripcional de *CIP7* por luz, se expliquen por sesgos experimentales dado las técnicas disponibles en el momento que el grupo del Dr. Xing Wang Deng llevó adelante este experimento.

### **2.3.3 *CIP7* es una proteína de asociación a microtúbulos.**

Una característica fundamental de las proteínas MAP es su capacidad de interactuar con los microtúbulos del citoesqueleto celular, a través de dominios específicos de unión a microtúbulos (Krtková et al., 2016). En consecuencia, su función es dependiente de la actividad que cumplen cuando están unidas a dichas estructuras (Buschmann and Lloyd, 2008). Nuestros resultados demuestran que *CIP7* se localiza en microtúbulos corticales de células epidérmicas en cotiledones, hipocótilo y raíz; tanto en luz como en oscuridad (Fig. 2.7, 2.8 y 2.9). Esto se basa en que la proteína *CIP7*-YFP co-localiza con el marcador de microtúbulos (Fig. 2.10) y la disrupción de los microtúbulos con la droga oryzalina perturba la localización de *CIP7*-YFP (Fig. 2.12). A su vez, logramos determinar que el dominio C-terminal de *CIP7*, que posee 18 motivos putativos de unión característicos de MAPs (Fig. 2.13), es necesario para su asociación a microtúbulos (Fig. 2.14). Sin embargo, la información con la que contamos no nos

permite confirmar cuáles de esos 18 motivos son necesarios para la interacción, si existe alguna jerarquía entre ellos o si actúan de forma independiente o cooperativa. En el futuro, sería interesante generar nuevas líneas transgénicas para diseccionar la proteína CIP7 tal que se pueda determinar su secuencia mínima de unión a microtúbulos.

Nuestros resultados de localización de CIP7 difieren de los previamente publicados. Como se expuso en la introducción de este capítulo, Yamamoto y colaboradores reportaron que CIP7 se localizaba constitutivamente en el núcleo de células de hipocótilo y raíz (Yamamoto et al., 1998). Todas nuestras construcciones de CIP7 fusionada a YFP se localizaron en microtúbulos (Fig. 2.7-10). En sólo dos excepciones logramos detectar señal de CIP7 en estructuras semejantes a núcleos, además de la señal de microtúbulos: en las raíces de plantas *pCIP7::CIP7-YFP* crecidas 3 días en luz (Fig. 2.9.F) y en hipocotilos tratados con MG132 de estas mismas plantas crecidas en luz (Fig. 2.21). Dado que los microtúbulos intervienen en diversos procesos celulares, entre ellos la división celular, crecimiento, organización intracelular y tráfico de organelas (Bodakuntla et al., 2019), no es extraño visualizar una intrincada red de microtúbulos rodeando el núcleo, preferentemente en células próximas a entrar en división como ocurre con frecuencia en raíces. De hecho, se ha descrito que en el estadio tardío G2 de células vegetales, ocurre la iniciación de nuevos microtúbulos, proceso denominado nucleación, en forma perinuclear. Esto es esencial para la formación de todas las estructuras de microtúbulos involucradas en la división celular (Masoud et al., 2013). En algunos casos, se requieren técnicas de microscopía confocal de alta resolución para poder resolver estas estructuras. En el trabajo de Yamamoto y colaboradores usaron un microscopio de epifluorescencia *Axiophot Zeiss* (Jena, Alemania), posiblemente porque no estaba disponible esta tecnología en ese momento. No obstante, como observamos que *pCIP7::CIP7-YFP* en luz podría localizar en núcleo de células de la raíz (Fig. 2.9), actualmente estamos obteniendo líneas transgénicas que co-expresan *pCIP7::CIP7-YFP* y el marcador nuclear *pUBQ10::NLS-mCherry*, para profundizar nuestros estudios.

### **2.3.4 La promoción del crecimiento en oscuridad regulada por CIP7 involucra la interacción con microtúbulos.**

Como previamente se describió en la sección 6 de la introducción, los microtúbulos corticales regulan el crecimiento celular orientando las fibras de celulosa para construir la pared celular (Buschmann and Lloyd, 2008). En células de hipocótilos en expansión, la red paralela de microtúbulos se orienta transversal al eje de crecimiento. Cuando las células dejan de crecer, los microtúbulos se reorganizan de forma oblicua/longitudinal al eje de crecimiento (Lloyd, 2011). En este sentido, los microtúbulos son estructuras dinámicas y el balance entre proteínas MAPs regulatorias, que los estabilizan y desestabilizan, es determinante para su correcta reorganización (Sedbrook and Kaloriti, 2008). Se ha descrito que la reorientación de los microtúbulos corticales de transversales a oblicuos/longitudinales, responde a la luz (Sambade et al., 2012; Le et al., 2005; Ueda and Matsuyama, 2000). Esto es consistente con el rol inhibitorio que ejerce la luz sobre el crecimiento del hipocótilo.

El fenotipo de hipocótilo corto observado en los mutantes *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* entran en contradicción con las mediciones de largo de hipocótilos expuestas en Yamamoto et al., 1998. En ese trabajo, no se observaron diferencias significativas entre plántulas WT y líneas antisentido para *CIP7* crecidas 5 días en oscuridad. Cabe destacar que sólo obtuvieron 2 líneas antisentido, pero solo una de ellas con menor expresión de *CIP7* que las plantas WT (Yamamoto et al., 1998). Quizás el uso de las plantas antisentido no haya sido suficiente para encontrar un fenotipo asociado a la ausencia de *CIP7*. Incluso, existen evidencias en la bibliografía que muestran que a veces la estrategia de silenciamiento por expresión de antisentido puede generar resultados equivocados, tal como fue el caso de la caracterización de los PIFs (Kim et al., 2003; Ni et al., 1998). Claramente nuestros resultados con dos líneas *knockout* con codones de terminación prematuros generados por CRISPR–Cas9 apoyan fuertemente que *CIP7* es un promotor de la elongación.

En esta tesis logramos determinar que el dominio C-terminal, responsable de la asociación a microtúbulos, es necesario para que *CIP7* cumpla su función promotora del crecimiento. Esto se deduce al observar que la línea *cip7\_ed1*, con el dominio C-terminal intacto pero una delección significativa en el dominio N-terminal, no presenta



fenotipo de hipocótilo corto en oscuridad, mientras que las mutantes nulas *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* si lo hacen (Fig. 2.16).

Existen numerosos reportes de proteínas MAPs involucradas en el crecimiento del hipocótilo a través de la reorientación de los microtúbulos. Una de ellas es la proteína desestabilizante de microtúbulos MDP40 (mencionada antes). La reducción en la expresión de MDP40 resulta en hipocótilos cortos en plantas etioladas, por lo que MDP40 favorece el crecimiento de hipocótilos en oscuridad (Wang et al., 2012a). Asimismo, la doble mutante en *Arabidopsis* para las proteínas estabilizadoras de microtúbulos MAP65-1 y MAP65-2, *map65-1 map65-2*, presenta hipocótilos más cortos (Lucas et al., 2011; Li et al., 2009a; Mao et al., 2005; Smertenko et al., 2004). Por otro lado, MDP25 que desestabiliza microtúbulos, cumple un rol inhibitorio en la elongación de hipocótilos, y la sobre-expresión genera fenotipo de hipocótilo corto (Li et al., 2011). Este caso se asemeja al de la proteína “MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 18” (MAP18), también desestabilizadora, cuya sobre-expresión resulta en la desorganización de la red de microtúbulos corticales y consecuente inhibición de la expansión celular (Wang et al., 2007). Por último, un caso diferente es el de la proteína “WAVE-DAMPENED 2-LIKE 3” (WDL3), que pertenece a la familia de proteínas regulatorias WDV2/WDL (Perrin et al., 2007; Yuen et al., 2003). WDL3 estabiliza microtúbulos favoreciendo la orientación longitudinal de los mismos, hecho que inhibe la elongación celular del hipocótilo en luz (Liu et al., 2013). En concreto, tanto la desestabilización como la sobre-estabilización de los microtúbulos afecta el correcto reordenamiento de los mismos en detrimento del crecimiento. Este mismo fenómeno se ha descrito en levaduras. Por ejemplo, la sobre-expresión de  $\beta$ -tubulina en *Saccharomyces cerevisiae* aumenta la frecuencia de pérdida de cromosomas durante la división celular, fenotipo que conduce a la letalidad. Tanto la sobre-expresión como la deficiencia de  $\beta$ -tubulina producen el mismo fenotipo (Burke et al., 1989). No obstante, la regulación de la dinámica de microtúbulos por estabilización y desestabilización, es un proceso biofísico altamente dependiente de la concentración de MAPs (Bodakuntla et al., 2019); entonces cualquier sobre-expresión no fisiológica de estas proteínas podría conducir a una serie de artificios que generan resultados no concluyentes. Esto podría explicar el comportamiento observado con la sobre-

expresante *p35S::CIP7-YFP 1* que presenta un hipocótilo corto (Fig. 2.17), comparable a las mutantes nulas *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* (Fig. 2.16).

En un futuro esperamos evaluar si el efecto de CIP7 sobre la promoción del crecimiento del hipocotilo se basa en la regulación del tamaño, división celular o ambas. Para esto evaluaremos el tamaño y número de células en las distintas líneas con las que contamos: mutantes, sobre-expresantes y respectivos controles, cultivando las plántulas 5 d en oscuridad. Para ello, se harán tinciones con yoduro de propidio y se tomarán imágenes al microscopio para luego hacer las correspondientes cuantificaciones. Será fundamental también, realizar ensayos de complementación de las mutantes nulas *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3*, con la construcción *pCIP7::CIP7-YFP*, para proceder al rescate del fenotipo.

### **2.3.5 ¿Es CIP7 una MAP convencional o multifuncional?**

Las MAPs convencionales están típicamente conservadas en eucariotas. Según su modo de acción, se las puede clasificar en 5 grupos (Bodakuntla et al., 2019): I) Proteínas motoras como las kinesinas; II) Proteínas que cortan y despolimerizan microtúbulos como katatina; III) MAPs nucleadoras, que inician la formación de nuevos microtúbulos como la “GAMMA-TUBULIN-CONTAINING COMPLEX” (GCP2); IV) las que se asocian al extremo + de los microtúbulos (donde predomina la polimerización) y promueven su crecimiento, como las proteínas del tipo “CYTOPLASMIC LINKER-ASSOCIATED PROTEINS” (CLASP) y “END BINDING 1” (EB1); y V) MAPs estructurales, en general estabilizadoras de microtúbulos, que constituyen el grupo más heterogéneo, como MAP65 (revisado en Hashimoto, 2015; Sedbrook and Kaloriti, 2008).

Además de las MAPs convencionales, existen muchas otras proteínas de asociación a microtúbulos cuya función principal no se relaciona directamente con la regulación de éstos y su interacción ocurre en condiciones fisiológicas específicas (Krtková et al., 2016). Estas son las denominadas MAPs multifuncionales que emplean la red de microtúbulos como soporte para integrar vías de señalización y hacer más eficientes procesos celulares. Algunas son enzimas como “GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE” (GAPDH); otras chaperonas como las “HEAT SHOCK

PROTEINS” 70 y 90 (HSP70 y HSP90); también proteínas asociadas a membrana plasmática entre las cuales se encuentran la “PHOSPHOLIPASE D” (PLD), MDP25 y MAP18; o proteínas que interactúan con actina como las forminas; y por último, se encontraron proteínas pertenecientes a la maquinaria de transcripción y traducción como EF-1 $\alpha$ . Existen algunos reportes de factores de transcripción que interactúan con los microtúbulos. El trabajo de Ziegelbauer y colaboradores (2001) describe el caso del factor de transcripción “MYC-INTERACTING ZINC FINGER PROTEIN 1” (MIZ-1) de animales que promueve la expresión del gen *LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR* (LDLR) que codifica para un regulador importante del metabolismo del colesterol. En una selección de drogas que indujeron la transcripción del gen *LDLR*, hallaron una sulfonamida (T113242 o T1) que provocaba la despolimerización de microtúbulos. Como el factor de transcripción MIZ-1 tiene la capacidad de asociarse tanto a microtúbulos como a sitios específicos del promotor de *LDLR*, enfocaron sus estudios en dilucidar el mecanismo a través del cual MIZ-1 promueve la transcripción de *LDLR* mediado por T1. Originalmente, MIZ-1 se encuentra secuestrado en el citoplasma al estar unido a microtúbulos. Luego del tratamiento con T1, los microtúbulos se despolimerizan liberando a MIZ-1, que es importado al núcleo donde induce la expresión de *LDLR*. En base a esto, proponen que la actividad de MIZ-1 es regulada por su asociación a microtúbulos y, en consecuencia, es capaz de activar la expresión génica en respuesta a cambios en el citoesqueleto (Ziegelbauer et al., 2001). En plantas se ha reportado que la integridad de los microtúbulos es necesaria para la translocación del factor de transcripción “SHORT ROOT” (SHR) desde la estela hacia las células vecinas que darán origen a la endodermis en las raíces. La despolimerización de microtúbulos por acción química (tratamientos con oryzalina) o genética (empleo de mutantes incapaces de mantener la integridad de los microtúbulos a altas temperaturas), resulta en una drástica reducción del transporte de SHR (Wu and Gallagher, 2013). Esto constituye otra evidencia de la compleja regulación (poco explorada) que existe entre la localización de factores de transcripción (que modula su actividad) y la dinámica de microtúbulos.

Una de las primeras aproximaciones para empezar a dilucidar la función de una MAP, suele ser evaluar la respuesta de los microtúbulos frente a una condición de estrés tal como el tratamiento con una droga que favorece su despolimerización (Liu et

al., 2013; Nakajima et al., 2004). Nuestros resultados sugieren que CIP7 podría ejercer un rol en la desestabilización de los microtúbulos ya que los mutantes nulos *cip7\_ed2* y *cip7\_ed3* tienen una respuesta menor que el WT frente al tratamiento con oryzalina (Fig. 2.18). En concordancia, la sobre-expresante *p35S::CIP7-YFP* presenta un mayor grado de despolimerización de microtúbulos que su respectivo control, frente al tratamiento con oryzalina (Fig. 2.19). No obstante, se requieren más estudios para dilucidar qué función cumple CIP7 en la regulación de la dinámica de los microtúbulos. Sería interesante evaluar la capacidad que tienen los microtúbulos en plantas mutantes o sobre-expresantes para reorientarse de transversales (condición de expansión celular) a oblicuos/longitudinales (arresto del crecimiento) en respuesta a la luz. Para ello se deberían llevar a cabo ensayos de microscopía confocal en los que se detecte la señal del marcador de microtúbulos (MBD-mCherry) en los distintos *backgrounds* genéticos de plántulas crecidas en oscuridad y sometidas a diferentes tratamientos de luz: WT; mutantes *cip7\_ed1*, *ed2* y *ed3*; y sobre-expresantes con promotor constitutivo y promotor endógeno (con sus respectivos controles). En este momento nos encontramos generando las plantas *cip7\_ed1*, *ed2* y *ed3* que portan este marcador.

En contraposición a la contundente localización en microtúbulos que revelaron nuestros resultados, CIP7 ha sido previamente descrita como una proteína de localización nuclear. Sin embargo, también hemos observado localización nuclear de CIP7 en condiciones específicas. De hecho, estos estudios previos caracterizaron a CIP7 como una proteína capaz de promover la transcripción de genes de respuesta a luz (Yamamoto et al., 1998). Con el fin de dilucidar si fehacientemente CIP7 presenta un rol activador de la transcripción de genes de respuesta a luz, sería conveniente realizar cuantificaciones de los transcriptos de los mismos genes analizados por Yamamoto y colaboradores (*CHS*, *FedA*, *LHCH*) sobre las líneas mutantes *cip7\_ed2*, *cip7\_ed3*; y sobre-expresantes en luz y oscuridad.

Los datos que tenemos hasta el momento sugieren que CIP7 es una MAP del tipo convencional. Sin embargo, hasta no verificar su localización nuclear y su capacidad de ser un activador de la transcripción en nuestras condiciones, no podemos descartar que pueda ser una MAP multifuncional.

### 2.3.5 Regulación post-traducciona de CIP7 mediada por proteasoma 26S.

Poco se conoce sobre la modulación de las concentraciones de MAPs en una célula. La afinidad de las mismas por los microtúbulos se ve influenciada por varios factores. Existen MAPs capaces de reconocer configuraciones específicas de microtúbulos, ya sea arreglos paralelos o antiparalelos (Bodakuntla et al., 2019). Otras, cuya localización depende del código de isotipos de tubulina y patrón de modificaciones post-traduccionales que exponen los microtúbulos (Janke, 2014). Finalmente, las MAPs también presentan regulación por modificaciones post-traduccionales dependiendo del contexto celular. Entre ellas, la fosforilación afecta su afinidad por los microtúbulos, localización subcelular, estabilidad y función (Ramkumar et al., 2018). Por ejemplo, la MAP65 de *Nicotiana tabacum* es fosforilada por las quinasas NRK1/NTF6 pertenecientes a la cascada de MAPK de tabaco; suceso que modula su actividad sobre la formación de haces de microtúbulos (Sasabe et al., 2006; Hussey et al., 2002).

El hecho que CIP7 interactúe físicamente con COP1 (Yamamoto et al., 1998) y que el doble mutante *cip7-1 cop1-6* es semejante al simple mutante *cop1-6* (Fig. 2.20) sugieren, en principio, que COP1 actúa río arriba de CIP7. Es factible que esta interacción sea parte del mecanismo que conduce a la regulación de CIP7. Existen numerosos ejemplos de proteínas que intervienen en la transducción de señales lumínicas que son degradadas vía proteasoma 26S a través de la acción de COP1 (Jang et al., 2010, 2005; Duek et al., 2004; Soo Seo et al., 2003; Osterlund et al., 2000). En los casos detallados en la sección 5.3.1 de la introducción, como HY5 y PIFs, sus interacciones con COP1 son dependientes de sus estados de fosforilación. Nuestros resultados evidencian una posible desfosforilación de CIP7 en la S<sup>915</sup> inducida por luz (Capítulo 1).

A nivel celular, evaluamos el efecto del proteasoma 26S en la regulación post-traducciona de CIP7. El bloqueo del proteasoma por MG132 en luz, evidenció que CIP7 es capaz de localizarse en núcleo, en concordancia con lo descripto en Yamamoto et al.

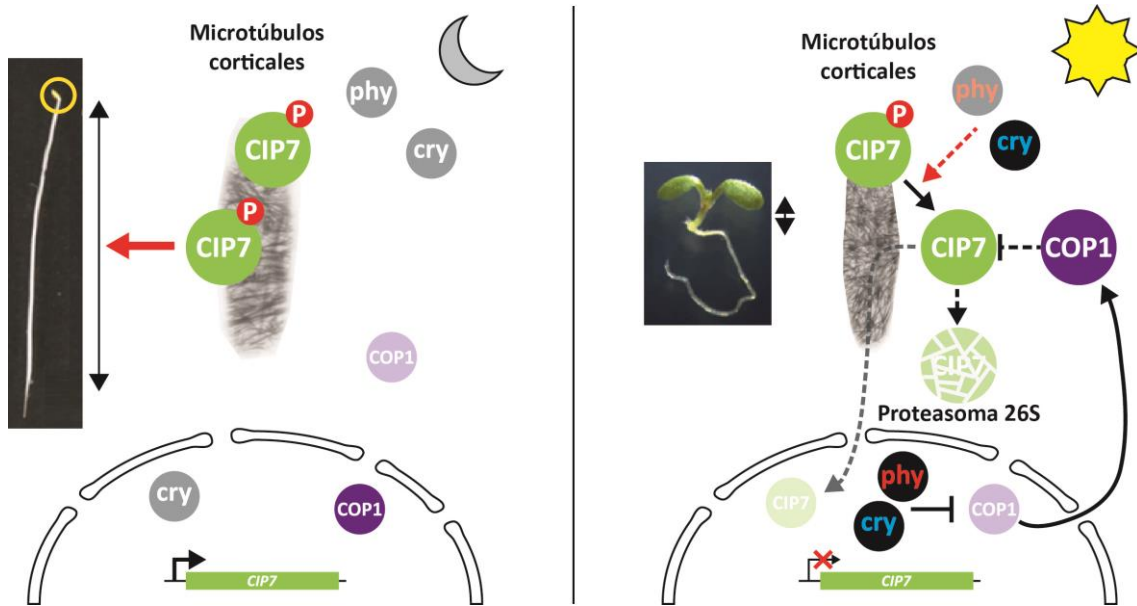
(1998), además de asociarse a microtúbulos (Fig. 2.21). Estos datos sugieren que en la luz ocurriría una eventual migración de CIP7 desde microtúbulos a núcleo. Al desprenderse de los microtúbulos, CIP7 sería susceptible a la degradación mediada por la acción del proteasoma. Es necesario llevar a cabo estudios más exhaustivos para discernir fehacientemente la dinámica de CIP7 en relación a la actividad del proteasoma tanto en la luz como en oscuridad, sobre todo debido a algunas inconsistencias que observamos entre las líneas que expresan CIP7 bajo el control de su propio promotor o el promotor 35S (sección 2.2.6 de resultados). También sería enriquecedor analizar la localización de CIP7 tanto en luz como en oscuridad en líneas *pCIP7::CIP7-YFP cop1-6* y *p35S::CIP7-YFP cop1-6*, con el fin de conocer inequívocamente si es COP1 el que media la regulación post-traduccional de CIP7 por proteasoma. Estas líneas ya están en proceso de ser obtenidas. Las hipótesis que subyacen a esta aseveración se encuentran respaldadas por el caso de la proteína de asociación a microtúbulos WDL3. WDL3 es una MAP que inhibe la expansión celular del hipocótilo en luz por estabilización de microtúbulos, favoreciendo la orientación longitudinal de los mismos (condición de arresto del crecimiento). En oscuridad es degradada por el proteasoma 26S, mientras que en luz se estabiliza ejerciendo efectos supresores de la expansión celular. Así WDL3 coordina los efectos antagónicos de la oscuridad y la luz sobre el crecimiento del hipocótilo en lo que respecta a la acción de WDL3 (Liu et al., 2013). Más tarde, se demostró que COP1 interacciona con WDL3 en los microtúbulos corticales de plántulas desarrolladas en oscuridad. Dicha interacción es mediada por el dominio WD40 de COP1, que reconoce fosforilaciones en WDL3 (Lian et al., 2017). Ensayos de ubiquitinación *in vitro*, revelaron que WDL3 es blanco de ubiquitinación de COP1 (Lian et al., 2017). Incluso, la proteína WDL3 se acumula en la mutante *cop1* en oscuridad. En tanto, la sobre-expresión de WDL3 exagera el fenotipo de *cop1*; la mutación *wdl3* ejerce el efecto opuesto, genera hipocótilos levemente más largos en la mutante *cop1*. Este trabajo provee evidencia de que la fracción citosólica de COP1 en oscuridad sería capaz de mediar la degradación de la proteína de asociación a microtúbulos WDL3, promoviendo la elongación del hipocótilo en esas condiciones (Lian et al., 2017).

Cabe mencionar que en la búsqueda de interactores de COP1 realizada por el laboratorio del Dr. Deng, encontraron otras proteínas además de CIP7. CIP1 ("COP1-

INTERACTING PROTEIN 1”) resultó ser una proteína que se asocia a estructuras del citoesqueleto (Matsui et al., 1995). Este constituye otro ejemplo de la relación existente entre COP1 y proteínas del citoesqueleto celular.

### 2.3.7 Modelo hipotético.

En base a los resultados y análisis que hemos realizado en el marco bibliográfico expuesto, proponemos el **modelo hipotético** que se observa en la figura 2.22. En oscuridad, CIP7 se encuentra asociada a microtúbulos ejerciendo una actividad de desestabilización que favorece la dinámica normal de estas estructuras del citoesqueleto, promoviendo la elongación del hipocótilo. La luz reprime la expresión de CIP7, induce la desfosforilación de la Ser<sup>915</sup> y desagregaría CIP7 de los microtúbulos. La defosforilación por luz está mediada por los fotorreceptores, aunque con los datos al momento no podemos conocer si es una acción inmediata de los fotorreceptores en el citoplasma o luego de que migraron al núcleo. Como consecuencia, aumentaría CIP7 libre en el citosol, al mismo tiempo que COP1 se transloca del núcleo al citoplasma (Pacín et al., 2013). Allí, COP1 podría interactuar e inducir la degradación de CIP7 vía proteasoma 26S impidiendo o disminuyendo su eventual migración al núcleo. El efecto de la luz sobre la desfosforilación de CIP7 tendría influencia sobre la pérdida de afinidad de CIP7 por los microtúbulos y/o el reconocimiento de CIP7 por COP1. En este momento estamos generando fosfomutantes que imitan versiones constitutivamente fosforiladas (CIP7<sup>Ser915Asp</sup>) o sin fosforilar (CIP7<sup>Ser915Ala</sup>) para estudiar el rol de la fosforilación en este modelo.



**Figura 2.22** Modelo hipotético. Se excluyó el cry2 de este modelo ya que no es un fotorreceptor relevante en el proceso de elongación del hipocótilo.



## **ANEXO I**

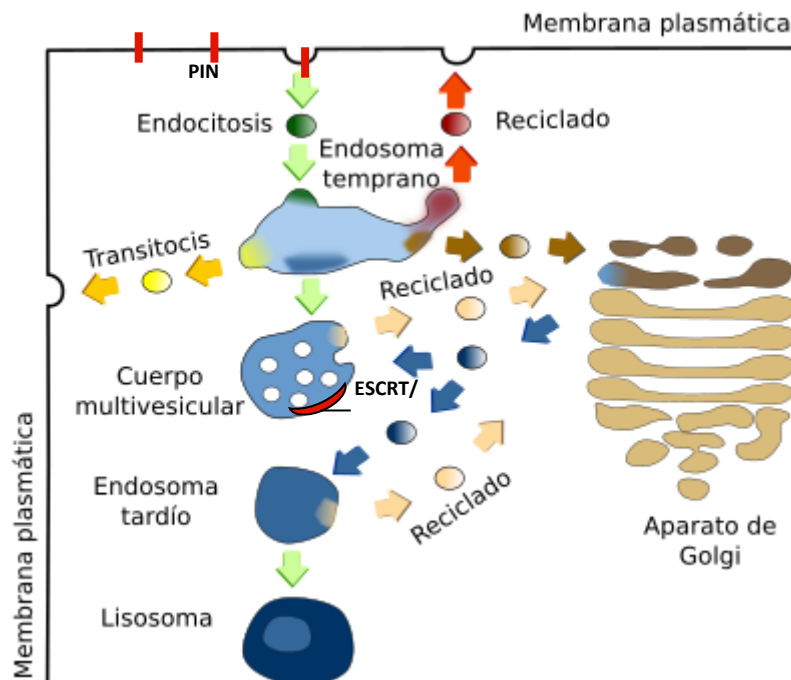
### **ISTL5, UNA PROTEÍNA INVOLUCRADA EN EL TRÁFICO VESICULAR CUYA DESFOSFORILACIÓN INDUCIDA POR LUZ DEPENDE DE LOS FOTORRECEPTORES**

#### **A1.1. Introducción.**

Por su estilo de vida sésil, las plantas han tenido que ser capaces de adaptar rápidamente sus respuestas a las señales del ambiente. En este sentido, hay datos que indican que la composición de proteínas en membrana es altamente dinámica y está constantemente reciclándose según las necesidades de las plantas (Otegui y Spitzer, 2008). Estas proteínas incluyen receptores que median la transducción de señales ambientales y del desarrollo así como también transportadores de iones y hormonas. A través de la regulación de la densidad y la composición de las proteínas de membrana por secreción y endocitosis, las plantas son capaces de adaptarse a un nuevo ambiente; sin embargo mucho del conocimiento de la función de las proteínas y compartimentos de la vía endocítica es aún rudimentario (Robinson et al., 2008). Asimismo, poco se conoce sobre la regulación del tráfico de vesículas regulado por la luz. Un caso estudiado muestra que los fotorreceptores regulan los procesos del desarrollo y crecimiento al menos en parte a través de la regulación de la fitohormona auxina. La localización subcelular de los transportadores de auxinas “PIN FORMED” (PIN), involucrados en el transporte polar de esta hormona, están regulados por el sistema de secreción de endomembranas (Vanneste and Friml, 2009; Tanaka et al., 2006 Fig. A1.1) y por la luz (Adamowski and Friml, 2015; Ding et al., 2011), aunque se desconoce cuáles son las formas por las cuales las señales lumínicas afectan al tráfico vesicular.

En el capítulo 1 mostramos que un fosfopéptido de ISTL5 se desfosforila en respuesta a un pulso de luz de 20 min en forma dependiente de los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y/o cry2 (capítulo 1, sección 1.2.4). ISTL5 se ha descrito como un posible regulador de SKD1, una proteína involucrada en el transporte endosomal de los cuerpos vesiculares. Como explicaremos posteriormente, esta función de ISTL5 podría establecer una conexión directa entre la percepción de la luz y la regulación de la expansión y crecimiento celular.

Los endosomas son compartimentos dentro del citoplasma que funcionan como transporte de material dentro de las células (Otegui y Spitzer, 2008, Fig. A1.1). La mayoría de los componentes estructurales de la membrana plasmática, la pared celular primaria y las proteínas apoplásticas llegan a destino a través del sistema de secreción de endomembranas. Por otro lado, las proteínas de membrana son continuamente internalizadas por endocitosis y relocalizadas en los endosomas (Fig.A1.1). El complejo endosomal requerido para el transporte o ESCRT une y acumula proteínas ubiquitinadas que son luego empaquetadas en vesículas dando lugar a los cuerpos multivesiculares (Fig.A1.1). Existe un flujo recíproco de vesículas entre los endosomas y la membrana plasmática por un lado; y entre los endosomas y el aparato de Golgi, por el otro. De esta manera se recicla membrana mientras que el resto de las moléculas sigue su procesamiento hacia los lisosomas. Los cuerpos multivesiculares son orgánulos esféricos con una membrana que encierra a múltiples vesículas internas. Estos cuerpos multivesiculares, son la antesala de la degradación de las moléculas endocitadas, la cual se realiza finalmente en los lisosomas por acción de hidrolasas ácidas (Fig.A1.1).



**Figura A1.1.** Esquema simplificado de las rutas de comunicación endosomal. A modo de ejemplo, se muestra la internalización del transportador PIN. Adaptado de Megías Pacheco et al. 2017.

La acción de las bombas de protones localizadas en las membranas de estos endosomas acidifican progresivamente el pH interno favoreciendo la acción de las hidrolasas ácidas. Proteínas como la SKD1 (también conocida como VPS4) proporciona la energía necesaria para la disociación de ESCRT de los cuerpos multivesiculares liberando el complejo para iniciar un nuevo ciclo de reciclado (revisado en Buono et al., 2016). Existen evidencias que sugieren que SKD1 participaría en la regulación del crecimiento celular. El silenciamiento de un regulador positivo de SKD1 conduce al crecimiento anormal de las células y órganos de Arabidopsis (Reyes et al., 2014). En levaduras, IST1 es un regulador negativo de SKD1 (Dimaano et al., 2008). Arabidopsis contiene 12 genes que codifican para proteínas del tipo ISTL (*IST-Like*), por contener un dominio similar a IST1 de levaduras (Buono et al., 2016). En Arabidopsis, se ha mostrado que ISTL1 actúa como un regulador negativo de SKD1, y se ha propuesto que otros ISTLs también lo serían (ISTL2 a ISTL6; Buono et al., 2016). En particular, se ha mostrado que ISTL5 interacciona con SKD1 en plantas (Buono et al., 2016). Sin embargo, más allá de estos resultados se desconoce la función específica de ISTL5 en plantas. Nuestros resultados muestran que la S<sup>528</sup> de ISTL5 se encuentra diferencialmente fosforilada por luz (Capítulo 1 Fig. 1.6), por lo que hipotetizamos que la defosforilación de ISTL5 inducida por luz a través de los fotorreceptores tendría implicancias en el transporte vesicular involucrado en el crecimiento celular. Para iniciar la caracterización de ISTL5 y estudiar su posible asociación a la transducción de señales lumínicas, generamos líneas transgénicas sobre-expresantes de ISTL5 fusionada a YFP (*p35S::ISTL5-YFP*) y obtuvimos dos líneas mutantes por T-ADN de *ISTL5* (Salk\_130226 y Salk\_107893, ambas homocigotas). Además, hemos establecido una estrecha colaboración con el laboratorio de la Dra. Marisa Otegui (Universidad de Wisconsin-Madison, EEUU), especialista en tráfico vesicular en plantas y responsable del primer reporte de la actividad de las proteínas de la familia de las ISTL en plantas (Buono et al., 2016).

## **A1.2 Resultados.**

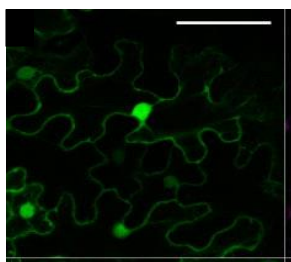
### **A1. 2.1 ISTL5 se expresaría en los ápices meristemáticos de tallos y raíces, y en polen.**

Según los datos de expresión de *eFP browser*, los mayores niveles de expresión de *ISTL5* se detectaron en el ápice meristemático de raíces, la zona subapical del ápice meristemático de los vástagos (donde se expresa el factor de transcripción “WUSCHEL”) y en granos de polen maduro. Para confirmar los datos públicos de microarreglos/*RNAseq*, hemos construido reporteros transcripcionales para *ISTL5*. Para ello, el promotor de *ISTL5* se clonó río arriba del gen de la beta-glucuronidasa (*GUS*). La construcción *pISTL5::GUS* tiene su respectivo control que corresponde al plásmido vacío *pBG GUS*. Ambas construcciones fueron transformadas en *Arabidopsis thaliana* por la técnica de *floral dip* (sección 6.1 de materiales y métodos). Ya estamos obteniendo plantas sobreexpresantes homocigotas.

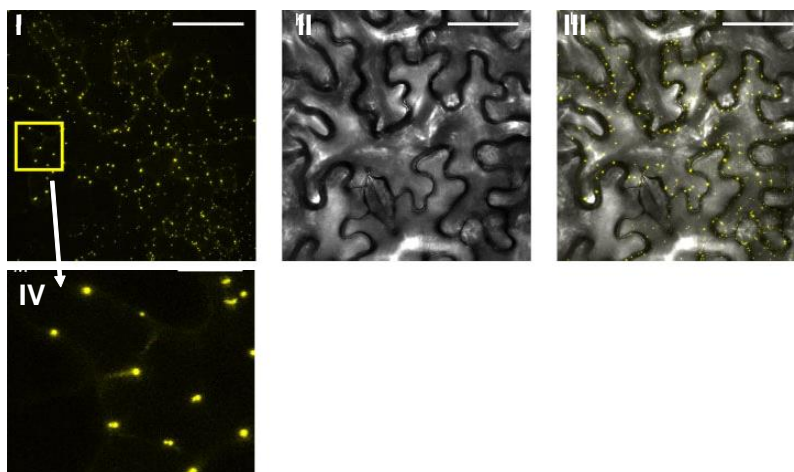
### **A1.2.2 ISTL5-YFP se localiza en vesículas pequeñas cuando se expresa heterológamente en células de *Nicotiana benthamiana*.**

Para determinar si la localización de *ISTL5* se da en vesículas asociadas a los cuerpos multivesiculares, clonamos al ADN copia para *ISTL5* (gentilmente donado por la Dra. Marisa Otegui) bajo el control del promotor constitutivo 35S y con etiquetas YFP en sus extremos carboxilo-terminal y amino-terminal (*p35S::ISTL5-YFP*, *p35S::YFP-ISTL5*).

**A** *N. Benthamiana*-p35S::YFP



**B** *N. Benthamiana*-p35S::ISTL5-YFP



**Figura A1.2.** Localización subcelular de *35S:ISTL5:YFP* en plantas de expresión transitoria en *N. Benthamiana*. **A)** Control *p35S::YFP*, **B)** *p35S::ISTL5-YFP*. I, fluorescencia correspondiente a la emisión de YFP. II, luz transmitida. III, superposición de I y II. IV representa una ampliación del sector encuadrado en I. Las imágenes fueron tomadas en microscopio confocal. Las barras representan 50  $\mu\text{m}$ .

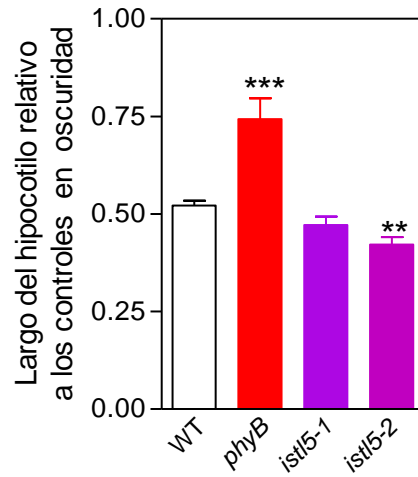
Con las construcciones obtenidas, transformamos plantas de *Arabidopsis* por la técnica de *floral dip* y estamos obteniendo plantas sobreexpresantes homocigotas para las construcciones. Como una alternativa que nos permitiera determinar la posible localización subcelular de ISTL5 en células vegetales, utilizamos las mismas construcciones en ensayos de agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana*. Los ensayos de agroinfiltración transitoria revelaron que ISTL5 se encuentra en estructuras similares a vesículas (Fig A.1.2).

Si bien estos experimentos son preliminares, los resultados parecerían indicar que ISTL5 se localiza en vesículas, tal como era de esperar. Sin embargo, es necesario repetir estos ensayos de localización en las líneas sobre-expresantes de *Arabidopsis* y en presencia de marcadores moleculares fluorescentes para organelas subcelulares

Primeramente probaremos con FM4-64 para ver si son algún tipo de endosomas. Si co-localizan con FM4-64, co-tranformaremos con marcadores del compartimento prevacuolar como Rab5, ARA6, ARA7 o RHA1; o con marcadores del *Trans Golgi Network* (TGN), tales como VHAa (Lee et al., 2004). Si no co-localiza con estos marcadores se evaluarán otros posibles marcadores de la literatura. Se incluirán en estos ensayos, líneas donde la expresión de ISTL5 fusionada a YFP se dirige por su propio promotor. Hemos clonado un fragmento genómico conteniendo promotor-región 5' no codificante-gen de ISTL5, incluyendo intrones, pero sin codón de finalización ni región 3' no codificante (*PromotorISTL5::ISTL5-YFP*). Estos clones nos permitieron crear proteínas de fusión en el extremo carboxilo-terminal con etiquetas de proteína fluorescente amarilla (YFP). Transformamos plantas de *Arabidopsis* con pHGY-*PromotorISTL5::ISTL5-YFP* o pHGY, y estamos obteniendo plantas sobreexpresantes homocigotas. Los ensayos de colocalización se realizarán en el laboratorio de la Dra. Marisa Otegui.

### **A1.2.3 ISTL5 actuaría como un regulador negativo de la señalización por luz roja.**

Por otro lado, para conocer si ISTL5 pudiera tener una función durante la fotomorfogenesis, analizamos el comportamiento de los mutantes *ist15* por inserción de T-ADN en cuanto a la inhibición de la elongación del hipocotilo bajo luz roja o azul. Contamos con dos líneas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de *ISTL5* por inserción de T-ADN en exones (Salk\_130226 y Salk\_107893 obtenidas del instituto ABRC de Ohio) homocigotas que hemos ya introgresado con el genotipo salvaje. Los primeros experimentos mostraron que una de las mutantes tuvo una mayor capacidad de inhibición de la elongación del hipocotilo (Fig. A1.3), mientras que no se observaron diferencias significativas bajo luz azul para ninguna mutante (datos no mostrados). En luz roja, el fenotipo lo observamos a bajos flujos ( $3 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ), pero se pierde tanto a flujos altos ( $50 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ) como a flujos muy bajos ( $0,025 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ) (datos no mostrados). Tenemos pensado estudiar otros fenotipos asociados a la desetiación bajo luz roja.



**Figura A1.3.** Plantas mutantes *ist15-2* presentan el hipocotilo mas corto en luz roja. Plántulas crecidas durante 3 d en luz roja continua ( $3 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-2}$ ). Los datos representan la medias  $\pm$  error estándar de 6 repeticiones (cada repetición se compuso del promedio de 10 plántulas). \*\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

### **A1.3 Conclusión.**

ISTL5 es una proteína que se localizaría en estructuras vesiculares con un posible rol en el tráfico vesicular. Nuestros resultados sugieren que ISTL5 sería un regulador negativo de la desetiología inducida por luz roja. Sin embargo, dado que sólo una de las mutantes mostró diferencias significativas con respecto al WT, es necesario obtener otras mutantes alternativas que nos permitan confirmar el fenotipo. Para ello, obtendremos varias líneas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de *ISTL5* generadas por CRISPR-Cas9, que están siendo generadas por el laboratorio de la Dra. Marisa Otegui. En un futuro esperamos estudiar también el rol de la fosforilación en la regulación de la función por luz.



## ANEXO II

### LAS PLANTAS HETEROCIGOTAS DE LAS MUTANTES POR T-ADN DE *CIP7* PRESENTAN HIPOCOTILOS ALTOS EN OSCURIDAD

#### All. 1 Introducción.

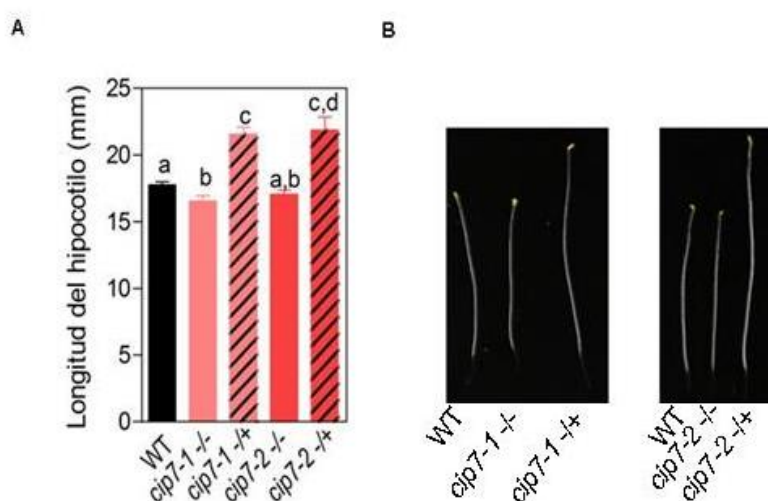
Como mencionamos en el capítulo 2, los fenotipos de las líneas mutantes por T-ADN *cip7-1* y *cip7-2* fueron contradictorios: las mutantes de *cip7-1*, y no las de *cip7-2*, presentaron hipocotilos más cortos que los de las WT, aún cuando la inserción del T-ADN en *cip7-2* ocurre río arriba de la mutante *cip7-1*. Sin embargo, un efecto mucho más confuso, pero interesante, lo observamos en las filiales de las cruzas entre WT y las mutantes de T-ADN (F1s) mientras realizábamos las retrocruzas necesarias para limpiar los *background* genéticos de las mutantes.

Para facilitar el análisis de los experimentos que se mencionan más abajo, detallaremos la nomenclatura que se utilizará. Típicamente, las líneas heterocigotas mutantes se escriben como  $-/+$ , donde  $-$  significa que porta un alelo mutado y  $+$  significa que lleva un alelo salvaje. En este anexo, nosotros nos referiremos al heterocigota  $-/+$  para indicar con  $-$  que porta el transgen T-ADN (alelo mutado) y con  $+$  que no porta una copia de transgen de T-ADN (alelo salvaje). Las F1s, todas heterocigotas para los T-ADNs (*cip7-/+*), fueron significativamente más altas que ambas líneas parentales (*cip7-/-* o *cip7+/+*) (ver abajo). Primeramente pensamos que éste podría ser un fenotipo probablemente relacionado a alguna regulación epigenética asociada al locus de *CIP7* o la función de la proteína CIP7. Realizamos ensayos genéticos para intentar determinar el mecanismo detrás de este fenotipo. Luego de más de un año ininterrumpido de experimentos, los resultados parecen indicar que el fenotipo observado es un artefacto que podría producirse por efectos del T-ADN y no por la interrupción del gen de *CIP7*. A pesar de ello, creemos que es conveniente mostrar estos resultados ya que podrían explicar comportamientos extraños de otras líneas mutantes de T-ADN usadas por la comunidad científica.

## AII.2 Resultados.

### AII.2.1 La presencia simultánea de un alelo salvaje y otro mutante por T-ADN de *CIP7* exagera la longitud del hipocótilo.

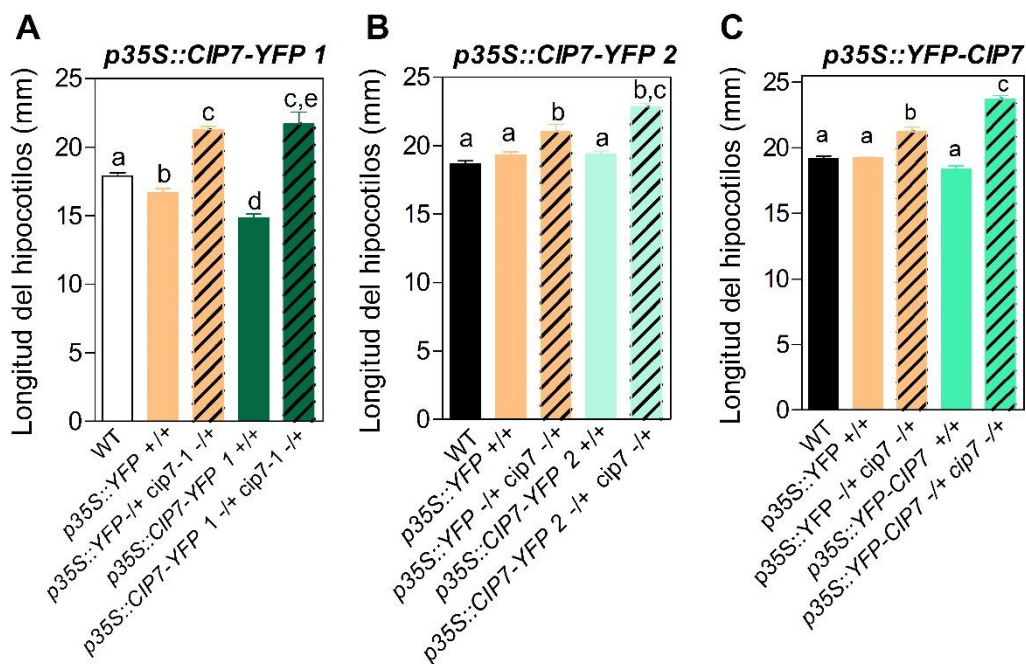
Con el propósito de investigar el efecto de la heterocigosis en los mutantes, cruzamos *cip7-1* y *cip7-2* contra WT, y crecimos las F1s simultáneamente con sus parentales por 5 d en oscuridad. Tal como mostramos en la figura 2.15 del capítulo 2, observamos que los hipocótilos de la mutante *cip7-1* fueron ligeramente más cortos que en las plantas WT, mientras que la mutante *cip7-2* se comportó como el WT (Fig. All.1). Sin embargo, cuando el alelo *cip7* se encontraba en heterocigosis (*cip7-1*/+ o *cip7-2*/+), las plántulas mostraron hipocótilos significativamente más largos que cualquiera de los parentales (Figura All.1).



**Figura AII.1.** La presencia de un alelo salvaje *CIP7* y otro alelo mutante *cip7* por inserción de T-ADN genera hipocótilos largos. **A.** Longitud promedio de los hipocótilos al cabo de 5 d de oscuridad, de las líneas mutantes por inserción de T-ADN *cip7-1*<sup>-/-</sup> y *cip7-2*<sup>-/-</sup> y las heterocigotas producto de la cruce con el genotipo WT. Las mutantes *cip7-1* y *cip7-2* se representan con rojos lisos y sus respectivos heterocigotas con rojos rayados. n=10, cada repetición independiente es el promedio de 10 plántulas. Análisis estadístico por ANOVA de un factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Diferentes letras denotan diferencias significativas. **B.** Foto de plántulas representativas de los genotipos analizados en A.

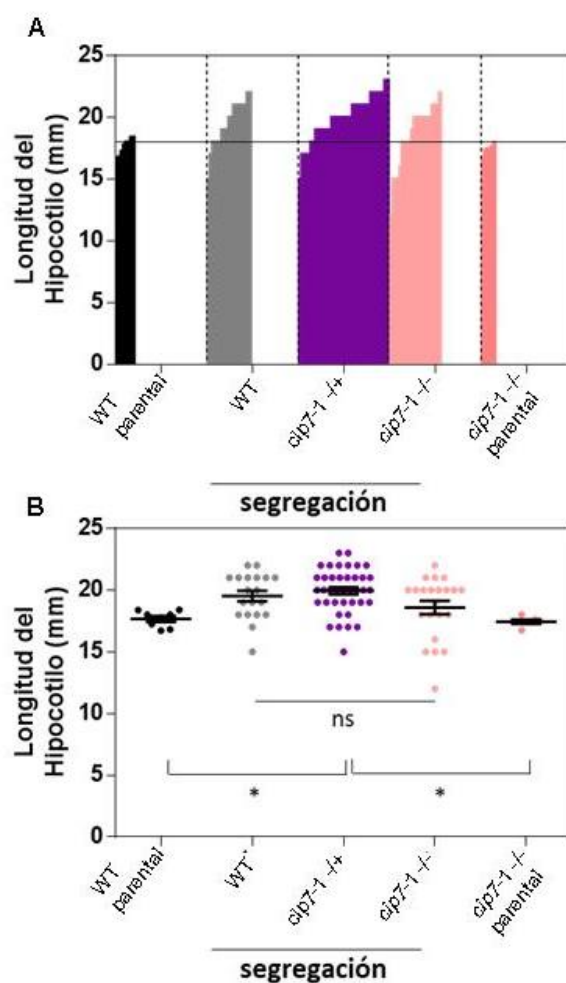
Como los hipocótilos largos aparecían en heterocigosis, pensamos que la causa de este fenotipo estaba relacionada a la dosis de *CIP7*. En esta hipótesis, una sola copia de

*CIP7* sería suficiente para promover la elongación del hipocotilo, mientras que la ausencia de *CIP7* salvaje inhibiría la elongación. Para poner a prueba esta hipótesis, cruzamos las líneas transgénicas sobre-expresantes de *CIP7* (Capítulo 2, *p35S::CIP7-YFP 1*, *p35S::CIP7-YFP 2* o *p35S::YFP-CIP7*) con la mutantes *cip7-1* y analizamos la longitud del hipocotilo en la descendencia heterocigota. En este anexo, llamaremos genéricamente *CIP7ox* a las líneas que sobre-expresan *CIP7* independientemente de su promotor. Como las líneas *CIP7ox* se encuentran en homocigosis (*CIP7ox*+/+) en el *background* WT (*CIP7*+/+), las F1s de la cruce de *CIP7ox* con la mutante *cip7-1* (*CIP7*-/-) tendrían un genotipo *CIP7ox*-/+ *CIP7*-/+. Como las F1s poseen dos copias de *CIP7*, una endógena y otra *CIP7ox*, las plántulas dejarían de ser altas como *CIP7*-/+. La línea sobre-expresante *35S::CIP7-YFP 1* presentó un hipocotilo más corto que su control, mientras que *35S::CIP7-YFP 2* y *35S::YFP-CIP7* no presentaron diferencias significativas respecto a sus respectivos controles (Fig 2.17.B, Fig. All.2). Sin embargo, todas las F1s producto de cruza contra *cip7-1* presentaron hipocotilos marcadamente más altos que sus correspondientes homocigotas (Fig. All.2). Es decir que la presencia de un alelo mutante por inserción de *cip7-1* sería suficiente para generar el fenotipo, independientemente de la cantidad de copias que presente del alelo salvaje o el transgén.



**Figura AII.2.** Longitud promedio de los hipocotilos al cabo de 5 días de oscuridad, de las líneas transgénicas homocigotas y heterocigotas producto de la cruce con mutantes *cip7-1*. Las sobre-expresantes *p35S::YFP* en naranja; las sobre-expresantes *p35S::CIP7-YFP 1 (A)*, *p35S::CIP7-YFP 2 (B)* y *p35S::YFP-CIP7 (C)* en la gama del verde liso y sus respectivos heterocigotas para *cip7-1 -/+* en la gama de verde rayado. Las sobre-expresantes *p35S::YFP* en naranja; las sobre-expresantes *p35S::CIP7-YFP 1 (A)*, *p35S::CIP7-YFP 2 (B)* y *p35S::YFP-CIP7 (C)* en la gama del verde liso y sus respectivos heterocigotas para *cip7-1 -/+* en la gama de verde rayado. n=8, cada repetición independiente es el promedio de 10 plántulas. Análisis estadístico por ANOVA de un factor y comparaciones múltiples por test de Tuckey. Diferentes letras denotan diferencias significativas

Dado que el fenotipo de hipocotilo alargado se correlacionaba con la presencia simultánea de al menos un alelo CIP7 (alelo WT) y el mutante por T-ADN, decidimos analizar la heredabilidad del fenotipo y medir el largo del hipocotilo de plantas F2s descendientes de las F1s originadas por la cruce entre *cip7-1 -/-* y el WT. Bajo nuestra hipótesis, todas las descendientes con genotipo WT y mutantes *cip7-1 -/-* homocigotas debieran ser más petisas que las heterocigotas *cip7-1 -/+*. Con el fin de correlacionar largo del hipocotilo con genotipo, a cada una de 169 plántulas de la F2 se le midió la longitud del hipocótilo y se determinó su genotipo por PCR según se detalla en la sección 7.1 de Materiales y Métodos (Fig. AII.3).



**Figura AII.3** Todos los descendientes de una población *cip7-1 +/-* heterocigota presentaron hipocotilos altos. **A.** Longitud de hipocótilos de 169 plántulas F2 categorizadas por genotipo, producto de la segregación de *cip7-1 +/-*. **B.** Promedios y errores estándar, de los valores individuales del largo de hipocotilo (que se muestran como puntos) en A. WT y *cip7-1 -/-* son el WT y el mutante homocigota de referencia que no fueron producto de la segregación.

Encontramos que el 70% de las plantas heterocigotas tenían hipocotilos más largos que el genotipo WT parental (Fig. AII. 3.A), sugiriendo que más de la mitad de las plántulas heterocigotas de la generación F2 exhiben el fenotipo característico de las plántulas F1 *cip7-1 +/-* (Fig. AII. 1). Sorpresivamente, el WT y mutante homocigota *cip7-1* producto de la segregación también fueron más altos que el WT de referencia (Fig. AII.3). Más aún, el homocigota *cip7-1* producto de la segregación fue más alto que el

homocigota *cip7-1* parental (Fig. All.3). Cabe destacar, que no se registraron problemas de segregación ya que las relaciones WT: heterocigotas: mutantes siguen las proporciones esperadas por las leyes de Mendel (1:2:1) (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que una vez que una planta recibe una copia del T-ADN de *cip7*, su hipocotilo y el de las plantas segregantes de las siguientes generaciones van a ser más largos que antes de la cruce, incluso si las plantas ya no contienen al T-ADN.

### **All.3 Conclusiones.**

En este anexo, mostramos los resultados que en una primera instancia, nos llevaron a interpretar un fenotipo erróneo probablemente no asociado a la ausencia de *CIP7*. Al comenzar, una posible hipótesis para explicar el fenotipo del heterocigota se basó en que una única copia WT de *CIP7* podría causar los hipocotilos altos. Estos resultados, en su momento, nos parecieron sólidos ya que era un fenotipo mucho más fuerte que el mutante simple y se observaba en dos alelos independientes. Sin embargo, dos hechos no resultaron consistentes con nuestra hipótesis. Primero, si la dosis (es decir, la presencia de un solo alelo mutante y uno salvaje) fuera la responsable del fenotipo alto, entonces las plantas *CIP7ox/+ CIP7-/+* (porta un alelo mutante y una copia extra salvaje) deberían haber sido bajas. Sin embargo, estas plantas fueron más altas (Fig. All. 2). Segundo, las plantas WT y *cip7-1*, producto de una segregación F2 de *CIP7-/+*, deberían haber sido más petisas que las heterocigotas. Pero esto tampoco se observó (Fig All.3). En conclusión, la adquisición de una copia de *CIP7* interrumpido por un T-ADN en algún momento generó este fenotipo, aún luego del que T-ADN segregó. Estas inconsistencias no son totalmente inexplicables, ya que existen varios reportes que muestran que líneas mutantes por inserción de T-ADN frecuentemente generan fenotipos extraños (Valentine et al., 2012; Xue et al., 2012; Arteaga-vazquez and Chandler, 2011). Por esta razón, y para independizarnos de cualquier artificio proveniente de líneas que llevan un T-ADN, decidimos generar las mutantes por CRISPR-CAS9 para buscar un fenotipo (ver capítulo 2). Hasta el momento, hemos demostrado que las mutantes *cip7* por CRISPR-Cas9 son más petisas que las WT, igual que *cip7-1*. Sin embargo, aún no hemos analizado el efecto de la heterocigosis en el largo de los hipocotilos de las mutantes por CRISPR-Cas9. Para dar por finalizada esta controversia, cruzaremos mutantes por CRISPR-Cas9 contra plantas WT o mutantes por T-ADN. Este experimento nos permitirá responder si el efecto de la heterocigosis se produce por plantas F1s que portan un solo alelo WT de *CIP7* y otro mutado; o, por un artificio del T-ADN. Además, hemos iniciado experimentos para evaluar si el efecto del T-ADN está ligado directamente a *CIP7* o es independiente de su posición en el genoma e intrínseco del T-ADN. Contamos con una batería de mutantes por T-ADN que están siendo cruzadas con plantas WT.

## DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis nos propusimos identificar proteínas involucradas en el inicio de la fototransducción de señales. Teniendo en cuenta que la fosforilación es una modificación post-traducciona que ocurre tempranamente durante la señalización por luz, buscamos aquellas proteínas cuya des/fosforilación cambie en respuesta a la luz en plantas de Arabidopsis. Para esto utilizamos las técnicas más novedosas y eficientes como el enriquecimiento en fosfopéptidos seguido de cromatografía líquida y espectrometría de masas en *tandem* (Capítulo 1). Particularmente nos enfocamos en el estudio de aquellas proteínas cuyo cambio en el estado de fosforilación fuera un efecto temprano y directo de la luz utilizando tratamientos cortos. Discriminamos entre aquellos cambios de manera independiente y dependiente de phyA, phyB, cry1 y/o cry2. Durante varios años, las evidencias sugerían que la luz, presumiblemente a través de los fotorreceptores, inducía cambios en la fosforilación de varios componentes en la cadena de transducción de señales (según lo expuesto en la sección 5.3.1). Pero no fue hasta 2017 cuando se identificó por primera vez a PPK, una quinasa de PIF3 que cataliza la fosforilación inducida por luz y mediada por phyB (Ni et al., 2017). Coterminamente, se mostró que el phyA de Avena también actuaría como quinasa fosforilando *in vivo* a PIF3 (Shin et al., 2016). Estos resultados sumados a los nuestros apoyan la idea que la fosforilación por fotorreceptores (directa e indirectamente) sería parte de los primeros pasos de la fototransducción de señales en plantas. En este contexto, nuestros resultados son relevantes ya que además aportan un conjunto de fosfoproteínas que cambiarían su estado de fosforilación por luz.

Numerosos estudios muestran que la luz (independientemente de los fotorreceptores), juega un rol importante en la fosforilación de proteínas del tilacoide y cloroplastos (Cutolo et al., 2019; Ingelsson and Vener, 2012; Reiland et al., 2009; Sugiyama et al., 2008). Tres estudios independientes de fosfoproteomas a gran escala en Arabidopsis han producido diferentes resultados, pero la intersección de ellos convergió en una lista de 200 fosfoproteínas cuya característica común es la localización en el cloroplasto (Baginsky and Grisse, 2009). Este resultado no es particularmente sorprendente, ya que el muestreo se realizó en plantas adultas y



fotosintéticamente activas. Sin embargo, otras proteínas cuya función principal es modular el crecimiento y desarrollo en la transición de hábitos de vida, quedarían naturalmente excluidos de estos análisis. En nuestro caso, identificamos 37 proteínas diferencialmente fosforiladas por luz. Dado que 20 min de exposición a luz no son suficientes para que los etioplastos se transformen en cloroplastos (proceso que requiere 16 h) (Philippart et al., 2007) nuestros resultados revelan proteínas candidatas a estar involucradas en la transición a la luz. Estas fosfoproteínas serían independientes de la actividad de las quinasas de cloroplastos involucradas en la transición a la autotrofía (Ingelsson and Vener, 2012). Apoyando nuestra hipótesis, una única proteína (“TRANSLOCASE OF CHLOROPLAST 120” o TOC120) de la tabla 1.1 presenta localización en la membrana externa del cloroplasto.

De aquellas 5 fosfoproteínas cuyo estado de fosforilación varió por luz y fotorreceptores, estudiamos más profundamente a CIP7 (Capítulo 2) y comenzamos también con los estudios de ISTL5 (Anexo I). CIP7 fue descrita originalmente como un factor de transcripción de localización nuclear, cuya expresión sería inducida por luz (Yamamoto et al., 1998). Interesantemente, nuestros resultados discreparon con los reportados. En comparación con Yamamoto y colaboradores, nosotros utilizamos estrategias simultáneas y alternativas, nuevas tecnologías, y estudios *in vivo* con construcciones usando el locus completo de CIP7. Por estas razones, creemos que nuestros resultados son suficientemente sólidos para afirmar que CIP7 es una proteína de asociación a microtúbulos y que se expresa principalmente en oscuridad. No descartamos que CIP7 pueda localizarse en el núcleo (Fig. 2.21) y tenga alguna función allí. En un futuro, validaremos si la fosforilación en la Ser<sup>915</sup> en respuesta a la luz está asociada a las funciones de CIP7. Más allá de las diferencias técnicas entre el trabajo de Yamamoto y colaboradores, y el presentado en esta tesis, no descartamos que los diferentes comportamientos de CIP7 sean factibles. Es decir, que CIP7 actúe como una MAP multifuncional en respuesta a la luz.

La detección de 24 sitios putativos de interacción a microtúbulos en CIP7, sumado a la importancia de la regulación de la dinámica de los microtúbulos en el crecimiento de los hipocotilos, nos llevó a analizar cuál era la representación de posibles MAPs en nuestro ensayo. Según la herramienta bioinformática *MAPanalyzer*, de los 27.417

genes de *Arabidopsis* que contempla, el 5% (1495) pertenecen a proteínas MAPs con una especificidad mayor al 95%. En nuestro ensayo, de las 1152 fosfoproteínas totales identificamos que un 13% (149) corresponden a MAPs. Este porcentaje es significativamente mayor que el esperado según la prueba estadística de Chi-cuadrado, lo que demuestra una sobrerrepresentación de MAPs (Tabla D.1). Es conocido que uno de los mecanismos de regulación de las MAPs es la fosforilación reversible (Vavrdová et al., 2019). Esto implica que proteínas quinasas y fosfatasa son reguladores maestros de la organización y dinámica de microtúbulos (Vavrdová et al., 2019). Nuestros resultados muestran que existe un enriquecimiento en MAPs en la población de proteínas fosforiladas en plántulas crecidas por 5 d en oscuridad (con o sin tratamiento de luz). Esto sugiere que los microtúbulos y su regulación tendrían roles fundamentales en estadios tempranos del crecimiento de las plantas.

La dinámica de microtúbulos está gobernada por las MAPs y también por luz (Sambade et al., 2012; Le et al., 2005; Ueda and Matsuyama, 2000). Se ha reportado que la reorganización de microtúbulos en respuesta a la luz azul ocurre en el orden de 15 min aproximadamente (Lindeboom et al., 2019). Esto sugiere que los 20 min de luz utilizados en nuestros experimentos serían suficientes para que los microtúbulos se encuentren en su configuración definitiva. Por lo tanto, una hipótesis plausible sería que la luz influya sobre la fosforilación de MAPs. En ese contexto, analizamos si existe alguna diferencia en la proporción de fosfoproteínas presentes en las muestras WT O y WT LB comparadas con la proporción existente en el genoma (5%). De las 712 fosfoproteínas detectadas en el tratamiento WT O, 94 (el 13 %) corresponden a MAPs, mientras que en el tratamiento WT LB de las 869 fosfoproteínas identificadas, 146 (el 17 %) corresponden a MAPs (Tabla D.1, comparación A y B). Es esperable que los porcentajes de proteínas en ambos grupos sea comparable (13% vs. 17%), ya que muchas de las proteínas estaban presentes en ambos grupos (luz u oscuridad). Ambos porcentajes son significativamente mayores al esperado (5 %) según la prueba estadística de Chi-cuadrado (Tabla D.1). Sorpresivamente, de las 37 fosfoproteínas que cambiaron significativamente su estado de fosforilación en respuesta a la luz, el 27 % (10) corresponden a MAPs con una especificidad mayor al 95% (Tabla D.1). De estas 10 fosfoproteínas predichas por el MAPanalyzer, 8 ya han sido confirmadas como proteínas asociadas a microtúbulos experimentalmente (por referencias, Tabla 1.3).

Este 27% se encuentra sobrerrepresentado respecto de las MAPs codificadas en el genoma (comparación A y E, Tabla D.1) y en nuestra muestra en general (comparación B y E, Tabla D.1), sugiriendo que uno de los primeros procesos modificados por luz es la fosforilación de MAPs y la regulación de la dinámica de los microtúbulos.

	TOTAL	CON motivos MAP	SIN motivos MAP	Porcentaje de fosfoproteínas del tipo MAP	$\chi^2$ /p valor
A) Referencia del Genoma	27.417	1495	25922	5%	-
B) Todas las fosfoproteínas del experimento	1152	149	1003	13%	114/0,00001 (A y B)
C) Fosfoproteínas en WT O	712	94	618	13%	88/0,00001 (A y C)
D) Fosfoproteínas en WT LB	869	146	723	17%	219/0,00001 (A y D)
E) Fosfoproteínas que cambian diferencialmente por la luz	37	10	27	27%	24/0,00001 (A y E) 8/0,001 (B y E)

**Tabla D.1.** La tabla muestra la distribución de proteínas del tipo MAP en el genoma y en los tratamientos de nuestro experimento. Se muestra en las columnas el total de proteínas identificadas, aquellas con o sin motivos MAPs y el porcentaje de aquellas que predicen ser MAPs sobre el total. La última columna informa el valor del  $\chi^2$  con su p-valor. Entre paréntesis se indica entre que tratamientos se realizaron las comparaciones. Una proteína se consideró MAP si fue detectada como tal con una confianza del 95% por el sitio bioinformático *MAPanalyzer*.

Hay varias clases de quinasas implicadas en la fosforilación de MAPs, entre ellas, “CYCLIN-DEPENDENT KINASES” (CDKs), “AURORA KINASES” (AURs), “NIMA-RELATED KINASES” (NEKs) y MAPKs (Vavrdová et al., 2019). Las primeras tres participan en la progresión del ciclo celular, interviniendo en la reorganización del citoesqueleto y estructuras de microtúbulos durante la división mitótica (Briño-Enríquez et al., 2017; Costa, 2017; Schecher et al., 2017). Por otro lado, las MAPKs son ampliamente conocidas por fosforilar MAPs. En Arabidopsis, MPK4 y MPK6 fosforilan proteínas de la familia de MAP65 (Zhou et al., 2017; Smékalová et al., 2014), y MPK6 también fosforila a EB1<sub>C</sub>, la MAP ya mencionada que se asocia al extremo + de microtúbulos (Kohoutová et al., 2015). Las predicciones que realizamos sobre las 37 proteínas que responden a la luz sugieren que CDKs también participarían en este proceso, pero CKI y CKII serían las quinasas con roles preponderantes en la transducción de la señal lumínica.

La reversibilidad de las fosforilaciones requiere de la acción conjunta entre quinasas y fosfatasa. Se conocen tres familias de fosfatasa que regulan la dinámica de microtúbulos principalmente durante la citocinesis: “TYPE 1 PROTEIN PHOSPHATASE 1” (TOPPs, también denominadas PP1s), fosfatasa tipo 2A (PP2A) y proteínas fosfatasa metalodependientes (PP2C) (Samofalova et al., 2019). En especial, PP2A en plantas controla la organización y dinámica tanto de microtúbulos corticales como mitóticos (Yoon et al., 2018; Camilleri et al., 2002). Nuestros resultados sugieren que CIP7 sufre una desfosforilación inducida por luz en la S<sup>915</sup>, por lo que resulta factible la acción de alguna fosfatasa. Esto abre una nueva línea de investigación ya que poco se conoce sobre la regulación de fosfatasa por luz. Hasta el momento se ha identificado a “SERINE/THREONINE-PROTEIN PHOSPHATASE PP1 ISOZYME 4” (TOPP4) como la fosfatasa que desfosforila y estabiliza a PIF5 (Yue et al., 2016); y la fosfatasa 6 (PP6) con dominios catalíticos “PHYTOCHROME-ASSOCIATED SER/THR PROTEIN PHOSPHATASE” 1 Y 3 (FyPP1 y FyPP3) que regulan el estado de fosforilación de PIF3 y PIF4, y la estabilidad de PIF4 (Yu et al., 2019). Todas estas fosfatasa constituyen represores de la fotomorfogénesis, que contrarrestan la señalización de phyB en lo que respecta a la fosforilación de los PIFs y su consecuente degradación inducida por luz roja. El hecho de haber identificado eventos de desfosforilación también en la S<sup>598</sup> de ISTL5 en las muestras WT LB, apoya la idea que existen fosfatasa inducidas por luz y dependientes de los fotorreceptores.

Existen claras evidencias del efecto que ejerce la luz sobre la dinámica de microtúbulos, pero aún no se conocen con certeza las bases mecánicas. En esta tesis comenzamos a estudiar el mecanismo por el cual CIP7 podría afectar a los microtúbulos, y cuál es la participación de la luz en este mecanismo. Estos ensayos son muy preliminares y esperamos confirmar a la brevedad. Al menos dos de nuestros resultados sugieren que CIP7 participaría en la regulación de la estabilidad de los microtúbulos durante el crecimiento del hipocotilo en oscuridad. Primero, la respuesta frente a la despolimerización de microtúbulos por oryzalina aparenta ser menor en las mutantes *cip7* (Fig. 2.18). Segundo, un mayor número de plántulas *p35S::CIP7-YFP* presentaron microtúbulos parcial o totalmente despolimerizados (Fig. 2.19). Estos resultados necesitan ser validados con más experimentos.

Por otro lado, también de manera preliminar aportamos datos sobre la regulación post-traducciona l de CIP7 en luz. El bloqueo del proteasoma por MG132 en luz, sugieren que ocurriría una eventual migración de CIP7 desde microtúbulos a núcleo, que sería impedida por la acción del proteasoma. Claramente estos resultados deben ser estudiados de manera más exhaustiva.

Tres procesos celulares parecen estar sobrerrepresentados en las fosfoproteínas de respuesta temprana a la luz: regulación de la dinámica de microtúbulos, tráfico vesicular y regulación del metabolismo del ARN. En esta tesis nos enfocamos en el primer proceso estudiando a CIP7 (Capítulo 2) y esbozamos los primeros experimentos en el segundo proceso estudiando a ISTL5 (Anexo I). La regulación del metabolismo del ARN también está siendo abordada en el laboratorio por otro estudiante.

Como perspectivas, nos proponemos estudiar las implicancias del estado de fosforilación de CIP7 en el crecimiento del hipocótilo y su relación con la dinámica de microtúbulos. Para ello, comenzamos a generar las versiones fosfo-miméticas de CIP7, constitutivamente fosforilada (reemplazando la S<sup>915</sup> por D) y desfosforilada (sustituyendo S<sup>915</sup> por A). Encontrar el vínculo directo entre luz y microtúbulos continúa hoy siendo un gran desafío. Además, consideramos realizar ensayos de *Western Blot* para validar experimentalmente las desfosforilaciones inducidas por luz que sugieren nuestros análisis. Para ello, contamos con líneas de Arabidopsis sobre-expresantes *p35S::CIP7-YFP* y *p35S::ISTL5-YFP* (ver sección 1 de materiales y métodos)

y anticuerpo Anti-GFP con especificidad también para detectar YFP. Si una proteína se encuentra fosforilada se producen cambios en la movilidad electroforética de las mismas. Por ejemplo, datos preliminares para CIP7 muestran que la proteína de fusión CIP7-YFP de 147KDa presenta la movilidad electroforética de una proteína de aproximadamente 190KDa (datos no mostrados), posiblemente debido a múltiples fosforilaciones u otras modificaciones post-traduccionales. La comparación de la movilidad electroforética de CIP7-YFP proveniente de plántulas 5 d O y 5 d O + 20 min LB nos podría dar un indicio del cambio en su estado de fosforilación. Preveemos también reemplazar el pulso de luz blanca por pulsos de luz roja, rojo lejano y azul de manera de identificar los posibles fotorreceptores que estarían interviniendo. No obstante, la desfosforilación de un único sitio en una proteína con múltiples fosforilaciones, puede hacer dificultosa la percepción de cambios singulares en la movilidad electroforética. Por esa razón, como alternativa, estamos considerando llevar adelante una inmunoprecipitación de CIP7-YFP usando una columna de afinidad contra YFP (*GFP-Trap*) de extractos proteicos provenientes de plántulas 5 d O y 5 d O + 20 min LB. Obtenidos los inmunoprecipitados, determinaríamos la presencia de residuos fosforilados en CIP7 por espectrometría de masas, tal como se describe en la bibliografía (Liu et al., 2017b; Ni et al., 2013). Con esta estrategia lograríamos corroborar la desfosforilación de la S<sup>915</sup> de CIP7 inducida por luz. De igual manera, se debe proceder con ISTL5. Como se expone en el Anexo I, ensayos fisiológicos en busca de fenotipos relacionados a respuestas fotomorfogénicas proveen evidencia que ISTL5 participaría en vías de señalización gobernadas por phyB.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., and Harberd, N.P. (2007). The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 6484–6489.
- Adamowski, M. and Friml, J. (2015). PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. *Plant Cell* **27**: 20–32.
- Afithhile, M., Fry, M., and Workman, S. (2015). The TOC159 mutant of *Arabidopsis thaliana* accumulates altered levels of saturated and polyunsaturated fatty acids. *Plant Physiol. Biochem.* **87**: 61–72.
- Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schäfer, E., and Quail, P.H. (2006). Photoactivated Phytochrome Induces Rapid PIF3 Phosphorylation Prior to Proteasome-Mediated Degradation. *Mol. Cell* **23**: 439–446.
- Alabadí, D., Gallego-Bartolomé, J., Orlando, L., García-Cárcel, L., Rubio, V., Martínez, C., Frigerio, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Espinosa, A., Deng, X.W., and Blázquez, M.A. (2008). Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent *Arabidopsis* seedling de-etioliation in darkness. *Plant J.* **53**: 324–335.
- Alabadí, D., Gil, J., Blázquez, M.A., and García-Martínez, J.L. (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol.* **134**: 1050–1057.
- Ali, M.A., Plattner, S., Radakovic, Z., Wieczorek, K., Elashry, A., Grundler, F.M.W., Ammelburg, M., Siddique, S., and Bohlmann, H. (2013). An *Arabidopsis* ATPase gene involved in nematode-induced syncytium development and abiotic stress responses. *Plant J.* **74**: 852–866.
- Anderson, L. (1954). Hoyer 's Solution as a Rapid Permanent Mounting Medium for Bryophytes. *Am. Bryol. Lichenol. Soc.* **57**: 242–244.
- Arana, M. V., Sánchez-Lamas, M., Strasser, B., Ibarra, S.E., Cerdán, P.D., Botto, J.F., and Sánchez, R.A. (2014). Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in *Arabidopsis*. *Plant, Cell Environ.* **37**: 2014–2023.
- Arteaga-vazquez, M.A. and Chandler, V.L. (2011). Paramutation in maize: RNA mediated trans-generational gene silencing. *Curr Opin Genet Dev* **20**: 156–163.
- Baginsky, S. and Gruissem, W. (2009). The chloroplast kinase network: New insights from large-scale phosphoproteome profiling. *Mol. Plant* **2**: 1141–1153.
- Bai, M.Y., Shang, J.X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T.P., and Wang, Z.Y. (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **14**: 810–817.
- Bauer, D., Viczián, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K.C., Ádám, É., Fejes, E., Schäfer, E., and Nagy, F. (2004). Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple phytoresectors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1433–1445.
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D., and Kessler, F. (2000). The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* **403**: 203–207.
- Bayle, V., Arrighi, J.-F.F., Creff, A., Nespoulous, C., Vialaret, J., Rossignol, M., Gonzalez, E.,

- Paz-Ares, J., and Nussaume, L.** (2011). Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell* **23**: 1523–1535.
- Benschop, J.J., Mohammed, S., O’Flaherty, M., Heck, A.J.R., Slijper, M., and Menke, F.L.H.** (2007). Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in Arabidopsis. *Mol. Cell. Proteomics* **6**: 1198–1214.
- Bernardo-García, S., de Lucas, M., Martínez, C., Espinosa-Ruiz, A., Davière, J.M., and Prat, S.** (2014). BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth. *Genes Dev.* **28**: 1681–1694.
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S.** (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**: 1633–1649.
- Boccalandro, H.E., Rugnone, M.L., Moreno, J.E., Ploschuk, E.L., Serna, L., Yanovsky, M.J., and Casal, J.J.** (2009). Phytochrome B Enhances Photosynthesis at the Expense of Water-Use Efficiency in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **150**: 1083–1092.
- Bodakuntla, S., Jijumon, A.S., Villablanca, C., Gonzalez-Billault, C., and Janke, C.** (2019). Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **29**: 804–819.
- Boron, A.K. and Vissenberg, K.** (2014). The Arabidopsis thaliana hypocotyl, a model to identify and study control mechanisms of cellular expansion. *Plant Cell Rep.* **33**: 697–706.
- Briño-Enríquez, M.A., Moak, S.L., Holloway, J.K., and Cohen, P.E.** (2017). NIMA-related kinase 1 (NEK1) regulates meiosis I spindle assembly by altering the balance between  $\alpha$ -Adducin and Myosin X. *PLoS One* **12**: 1–18.
- Briggs, W.R.** (2014). Phototropism: Some history, some puzzles, and a look ahead. *Plant Physiol.* **164**: 13–23.
- Bu, Q., Zhu, L., Dennis, M.D., Yu, L., Lu, S.X., Person, M.D., Tobin, E.M., Browning, K.S., and Huq, E.** (2011). Phosphorylation by CK2 enhances the rapid light-induced degradation of PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 1 in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **286**: 12066–12074.
- Buono, R.A., Paez-Valencia, J., Miller, N.D., Goodman, K., Spitzer, C., Spalding, E.P., and Otegui, M.S.** (2016). Role of SKD1 regulators LIP5 and IST1-LIKE1 in endosomal sorting and plant development. *Plant Physiol.* **171**: 251–264.
- Burke, D., Gasdaska, P., and Hartwell, L.** (1989). Dominant effects of tubulin overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 1049–1059.
- Bürstenbinder, K., Möller, B., Plötner, R., Stamm, G., Hause, G., Mitra, D., and Abel, S.** (2017). The IQD family of calmodulin-binding proteins links calcium signaling to microtubules, membrane subdomains, and the nucleus. *Plant Physiol.* **173**: 1692–1708.
- Buschmann, H., Chan, J., Sanchez-Pulido, L., Andrade-Navarro, M.A., Doonan, J.H., and Lloyd, C.W.** (2006). Microtubule-Associated AIR9 Recognizes the Cortical Division Site at Preprophase and Cell-Plate Insertion. *Curr. Biol.* **16**: 1938–1943.
- Buschmann, H. and Lloyd, C.W.** (2008). Arabidopsis Mutants and the Network of Microtubule-Associated Functions. *Mol. Plant* **1**: 888–898.
- Bush, M.S., Pierrat, O., Nibau, C., Mikitova, V., Zheng, T., Corke, F.M.K., Vlachonasios, K., Mayberry, L.K., Browning, K.S., and Doonan, J.H.** (2016). EIF4A RNA helicase associates with cyclin-dependent protein kinase A in proliferating cells and is modulated by



phosphorylation. *Plant Physiol.* **172**: 128–140.

- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D.** (2002). The Arabidopsis TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**: 833–845.
- Casal, J.J. and Yanovsky, M.J.** (2005). Regulation of gene expression by light. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 501–511.
- Cerdán, P.D. and Chory, J.** (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* **423**: 881–885.
- Chen, D., Xu, G., Tang, W., Jing, Y., Ji, Q., Fei, Z., and Lin, R.** (2013). Antagonistic basic helix-loop-helix/bZIP transcription factors form transcriptional modules that integrate light and reactive oxygen species signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1657–1673.
- Chen, L., Peng, Y., Tian, J., Wang, X., Kong, Z., Mao, T., Yuan, M., and Li, Y.** (2016). TCS1, a Microtubule-Binding Protein, Interacts with KCBP/ZWICHEL to Regulate Trichome Cell Shape in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **12**: e1006266.
- Chen, M., Chory, J., and Fankhauser, C.** (2004). Light Signal Transduction in Higher Plants. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 87–117.
- Cheng, Y.L. and Tu, S.L.** (2018). Alternative splicing and cross-talk with light signaling. *Plant Cell Physiol.* **59**: 1104–1110.
- Christie, J., Reymond, P., Powell, G., Bernasconi, P., Raibekas, A., Liscum, E., and Briggs, W.** (1998). Arabidopsis NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science* (80- ). **282**: 1698–1701.
- Christie, J.M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O’Hara, A., Kelly, S.M., Hothorn, M., Smith, B.O., Hitomi, K., Jenkins, G.I., and Getzoff, E.D.** (2012). Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* (80- ). **335**: 1492–1496.
- Christie, J.M., Blackwood, L., Petersen, J., and Sullivan, S.** (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant Cell Physiol.* **56**: 401–413.
- Clouse, S.D.** (2011). Brassinosteroid signal transduction: From receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* **23**: 1219–1230.
- Costa, S.** (2017). Are division plane determination and cell-cycle progression coordinated? *New Phytol.* **213**: 16–21.
- Cutolo, E., Parvin, N., Ruge, H., Pirayesh, N., Roustan, V., Weckwerth, W., Teige, M., Grieco, M., Larosa, V., and Vothknecht, U.C.** (2019). The High Light Response in Arabidopsis Requires the Calcium Sensor Protein CAS, a Target of STN7- and STN8-Mediated Phosphorylation. *Front. Plant Sci.* **10**: 974.
- Demarsy, E., Schepens, I., Okajima, K., Hersch, M., Bergmann, S., Christie, J., Shimazaki, K.I., Tokutomi, S., and Fankhauser, C.** (2012). Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor. *EMBO J.* **31**: 3457–3467.
- Deng, Z., Osés-Prieto, J.A., Kutschera, U., Tseng, T.S., Hao, L., Burlingame, A.L., Wang, Z.Y., and Briggs, W.R.** (2014). Blue light-induced proteomic changes in etiolated Arabidopsis seedlings. *J. Proteome Res.* **13**: 2524–2533.
- Dimaano, C., Jones, C.B., Hanono, A., Curtiss, M., and Babst, M.** (2008). Ist1 regulates Vps4

localization and assembly. *Mol. Biol. Cell* **19**: 465–474.

- Ding, Z., GGalván-Ampudia, C.S., Demarsy, E., Łangowski, Ł., Kleine-Vehn, J., Fan, Y., Morita, M.T., Tasaka, M., Fankhauser, C., Offringa, R., and Friml, J.** (2011). Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **13**: 447–453.
- Dixit, R. and Cyr, R.** (2004). Encounters between Dynamic Cortical Microtubules Promote Ordering of the Cortical Array through Angle-Dependent Modifications of Microtubule Behavior. *Plant Cell* **16**: 3274–3284.
- Duek, P., Elmer, M., Van Oosten, V., and Fankhauser, C.** (2004). The Degradation of HFR1, a Putative bHLH Class Transcription Factor Involved in Light Signaling, Is Regulated by Phosphorylation and Requires COP1. *Curr. Biol.* **14**: 2296–2301.
- Duek, P.D. and Fankhauser, C.** (2005). bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci.* **10**: 4.
- Engelsberger, W.R. and Schulze, W.X.** (2012). Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* **69**: 978–995.
- Fankhauser, C. and Chory, J.** (1997). Light control of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 203–229.
- Fankhauser, C. and Christie, J.M.** (2015). Plant phototropic growth. *Curr. Biol.* **25**: 384–389.
- Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D., and Chory, J.** (1999). PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* (80-. ). **284**: 1539–1541.
- Feng, S. et al.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475–479.
- Folta, K.M., Pontin, M.A., Karlin-Neumann, G., Bottini, R., and Spalding, E.P.** (2003). Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. *Plant J.* **36**: 203–214.
- Fox, A.R., Barberini, M.L., Ploschuk, E.L., Muschietti, J.P., and Mazzella, M.A.** (2015). A proteome map of a quadruple photoreceptor mutant sustains its severe photosynthetic deficient phenotype. *J. Plant Physiol.* **185**: 13–23.
- Gadeyne, A. et al.** (2014). The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. *Cell* **156**: 691–704.
- Garfin, D.E.** (2003). Two-dimensional gel electrophoresis: An overview. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **22**: 263–272.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., and Hofte, H.** (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **11**: 295–305.
- Germain, H. et al.** (2010). MOS11: A new component in the mRNA export pathway. *PLoS Genet.* **6**: 1–9.
- Goto, C., Tamura, K., Fukao, Y., Shimada, T., and Hara-Nishimura, I.** (2014). The novel nuclear envelope protein KAKU4 modulates nuclear morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 2143–2155.
- Grimsrud, P.A., den Os, D., Wenger, C.D., Swaney, D.L., Schwartz, D., Sussman, M.R., Ané,**

- J.M., and Coon, J.J.** (2010). Large-scale Phosphoprotein analysis in *Medicago truncatula* roots provides insight into in vivo kinase activity in legumes. *Plant Physiol.* **152**: 19–28.
- Guo, H., Duong, H., Ma, N., and Lin, C.** (1999). The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J.* **19**: 279–287.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., and Lin, C.** (1998). Regulation of Flowering Time by Arabidopsis Photoreceptors. *Science* (80-. ). **279**: 1360–1363.
- Ha, J.H., Han, S.H., Lee, H.J., and Park, C.M.** (2017). Environmental Adaptation of the Heterotrophic-to-Autotrophic Transition: The Developmental Plasticity of Seedling Establishment. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **36**: 128–137.
- Hamamoto, K., Aki, T., Shigyo, M., Sato, S., Ishida, T., Yano, K., Yoneyama, T., and Yanagisawa, S.** (2012). Proteomic characterization of the greening process in rice seedlings using the MS spectral intensity-based label free method. *J. Proteome Res.* **11**: 331–347.
- Hardtke, C., Gohda, K., Osterlund, M., Oyama, T., Okada, K., and Deng, X.** (2000). HY5 stability and activity in Arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J.* **19**: 4997–5006.
- Hardtke, C.S., Okamoto, H., Stoop-Myer, C., and Deng, X.W.** (2002). Biochemical evidence for ubiquitin ligase activity of the Arabidopsis COP1 interacting protein 8 (CIP8). *Plant J.* **30**: 385–394.
- Hartmann, L., Drewe-Boß, P., Wießner, T., Wagner, G., Geue, S., Lee, H.C., Obermüller, D.M., Kahles, A., Behr, J., Sinz, F.H., Rättsch, G., and Wachter, A.** (2016). Alternative splicing substantially diversifies the transcriptome during early photomorphogenesis and correlates with the energy availability in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**: 2715–2734.
- Hashimoto, T.** (2015). Microtubules in Plants. *Arab. B.* **13**: e0179.
- He, J.X., Gendron, J.M., Yang, Y., Li, J., and Wang, Z.Y.** (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 10185–10190.
- Higuchi, Y. and Hisamatsu, T.** (2016). Light acts as a signal for regulation of growth and development. In *LED Lighting for Urban Agriculture*, pp. 57–75.
- Hoecker, U.** (2017). The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **37**: 63–69.
- Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J., and Deng, X.W.** (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev.* **16**: 1247–1259.
- Honkanen, S., Jones, V.A.S., Morieri, G., Champion, C., Hetherington, A.J., Kelly, S., Proust, H., Saint-Marcoux, D., Prescott, H., and Dolan, L.** (2016). The Mechanism Forming the Cell Surface of Tip-Growing Rooting Cells Is Conserved among Land Plants. *Curr. Biol.* **26**: 3238–3244.
- Huang, H., Alvarez, S., Bindbeutel, R., Shen, Z., Naldrett, M.J., Evans, B.S., Briggs, S.P., Hicks, L.M., Kay, S.A., and Nusinow, D.A.** (2016). Identification of Evening Complex Associated Proteins in Arabidopsis by Affinity Purification and Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*: 201–217.
- Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., and Smertenko, A.** (2002). The plant

cytoskeleton: Recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol. Biol.* **50**: 915–924.

- Ingelsson, B. and Vener, A. V.** (2012). Phosphoproteomics of *Arabidopsis* chloroplasts reveals involvement of the STN7 kinase in phosphorylation of nucleoid protein pTAC16. *FEBS Lett.* **586**: 1265–1271.
- Inoue, S. ichiro, Matsushita, T., Tomokiyo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kinoshita, T., and Shimazaki, K. ichiro** (2011). Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**: 117–128.
- Inoue, S.I., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Doi, M., and Shimazaki, K.I.** (2008). Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 5626–5631.
- Ito, E., Ebine, K., Choi, S.W., Ichinose, S., Uemura, T., Nakano, A., and Ueda, T.** (2018). Integration of two RAB5 groups during endosomal transport in plants. *Elife* **7**: 1–22.
- Ivanov, S. and Harrison, M.J.** (2014). A set of fluorescent protein-based markers expressed from constitutive and arbuscular mycorrhiza-inducible promoters to label organelles, membranes and cytoskeletal elements in *Medicago truncatula*. *Plant J.* **80**: 1151–1163.
- Jailais, Y. and Vert, G.** (2012). Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signalling are the three-way controls of plant sprouting. *Nat. Cell Biol.* **14**: 788–790.
- Jang, I.C., Henriques, R., Seo, H.S., Nagatani, A., and Chua, N.H.** (2010). *Arabidopsis* PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *Plant Cell* **22**: 2370–2383.
- Jang, I.C., Yang, J.Y., Seo, H.S., and Chua, N.H.** (2005). HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev.* **19**: 593–602.
- Janke, C.** (2014). The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, functions. *J. Cell Biol.* **206**: 461–472.
- Jiao, Y. et al.** (2003). A Genome-Wide Analysis of Blue-Light Regulation of *Arabidopsis* Transcription Factor Gene Expression during Seedling Development. *Plant Physiol.* **133**: 1480–1493.
- Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W.** (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 217–230.
- Kaloriti, D., Galva, C., Parupalli, C., Khalifa, N., Galvin, M., and Sedbrook, J.C.** (2007). Microtubule associated proteins in plants and the processes they manage. *J. Integr. Plant Biol.* **49**: 1164–1173.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., and Fankhauser, C.** (2010). Light-regulated plant growth and development. In *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 29–66.
- Kang, C.H., Lee, Y.M., Park, J.H., Nawkar, G.M., Oh, H.T., Kim, M.G., Lee, S.I., Kim, W.Y., Yun, D.J., and Lee, S.Y.** (2016). Ribosomal P3 protein AtP3B of *Arabidopsis* acts as both protein and RNA chaperone to increase tolerance of heat and cold stresses. *Plant Cell Environ.* **39**: 1631–1642.
- Kang, C.Y., Lian, H.L., Wang, F.F., Huang, J.R., and Yang, H.Q.** (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2624–2641.

- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E.A., Al-Sady, B., Lanzatella, C., and Quail, P.H.** (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* **16**: 3033–3044.
- Kim, D.S., Cho, D.S., Park, W.M., Na, H.J., and Nam, H.G.** (2006). Proteomic pattern-based analyses of light responses in *Arabidopsis thaliana* wild-type and photoreceptor mutants. *Proteomics* **6**: 3040–3049.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P.-S., and Choi, G.** (2003). The Plant Cell Functional Characterization of Phytochrome Interacting Factor 3 in Phytochrome-Mediated Light Signal Transduction. *Plant Cell* **15**: 2399–2407.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K.** (2001). *phot1* and *phot2* mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 0–4.
- Kircher, S., Wellmer, F., Nick, P., Rügner, A., Schäfer, E., and Harter, K.** (1999). Nuclear import of the parsley bZIP transcription factor CPRF2 is regulated by phytochrome photoreceptors. *J. Cell Biol.* **144**: 201–211.
- Kleffmann, T., Von Zychlinski, A., Russenberger, D., Hirsch-Hoffmann, M., Gehrig, P., Gruissem, W., and Baginsky, S.** (2007). Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. *Plant Physiol.* **143**: 912–923.
- Klepikova, A. V., Kasianov, A.S., Gerasimov, E.S., Logacheva, M.D., and Penin, A.A.** (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.* **88**: 1058–1070.
- Klose, C., Viczián, A., Kircher, S., Schäfer, E., and Nagy, F.** (2015). Molecular mechanisms for mediating light-dependent nucleo/cytoplasmic partitioning of phytochrome photoreceptors. *New Phytol.* **206**: 965–971.
- Kohoutová, L., Kourová, H., Nagy, S.K., Volc, J., Halada, P., Mészáros, T., Meskiene, I., Bögre, L., and Binarová, P.** (2015). The *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase 6 is associated with  $\gamma$ -tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *New Phytol.* **207**: 1061–1074.
- Krtková, J., Benáková, M., and Schwarzerová, K.** (2016). Multifunctional microtubule-associated proteins in plants. *Front. Plant Sci.* **7**: 1–13.
- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., and Demura, T.** (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev.* **19**: 1855–1860.
- Kumar, M., Busch, W., Birke, H., Kemmerling, B., Nürnberger, T., and Schöffl, F.** (2009). Heat shock factors HsfB1 and HsfB2b are involved in the regulation of Pdf1.2 expression and pathogen resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **2**: 152–165.
- Kuno, N. and Furuya, M.** (2000). Phytochrome regulation of nuclear gene expression in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**: 485–493.
- Lau, O.S. and Deng, X.W.** (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci.* **17**: 584–593.
- Le, J., Vandenbussche, F., De Cnodder, T., Van Der Straeten, D., and Verbelen, J.P.** (2005). Cell elongation and microtubule behavior in the *Arabidopsis* hypocotyl: Responses to ethylene and auxin. *J. Plant Growth Regul.* **24**: 166–178.
- Lee, G.J., Eun, J.S., Myong, H.L., and Hwang, I.** (2004). The *Arabidopsis* Rab5 homologs Rha1 and Ara7 localize to the prevacuolar compartment. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1211–1220.

- Lee, H.** (2015). Mitogen-activated protein kinase kinase 3 is required for regulation during dark-light transition. *Mol. Cells* **38**: 651–656.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I., and Xing, W.D.** (2007). Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* **19**: 731–749.
- Legris, M., Ince, Y.Ç., and Fankhauser, C.** (2019). Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nat. Commun.* **10**: 5219.
- Leivar, P. and Monte, E.** (2014). PIFs: Systems Integrators in Plant Development. *Plant Cell* **26**: 56–78.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C.M., Castillon, A., Huq, E., and Quail, P.H.** (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature photomorphogenesis during early seedling development in darkness. *Curr. Biol.* **18**: 1815–1823.
- Leivar, P. and Quail, P.H.** (2011). PIFs: Pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci.* **16**: 19–28.
- Leivar, P., Tepperman, J.M., Monte, E., Calderon, R.H., Liu, T.L., and Quail, P.H.** (2009). Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **21**: 3535–3553.
- Li, H., Zeng, X., Liu, Z.Q., Meng, Q.T., Yuan, M., and Mao, T.L.** (2009a). *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer. *Plant Mol. Biol.* **69**: 313–324.
- Li, J., Silva-Sanchez, C., Zhang, T., Chen, S., and Li, H.** (2015). Phosphoproteomics technologies and applications in plant biology research. *Front. Plant Sci.* **6**: 1–9.
- Li, J., Wang, X., Qin, T., Zhang, Y., Liu, X., Sun, J., Zhou, Y., Zhu, L., Zhang, Z., Yuan, M., and Mao, T.** (2011). MDP25, a novel calcium regulatory protein, mediates hypocotyl cell elongation by destabilizing cortical microtubules in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 4411–4427.
- Li, X., Yang, Y.J., Li, Y., Wang, J., Xiao, X.J., Guo, X.H., Tang, D.Y., and Liu, X.M.** (2009b). Protein identification and mRNA analysis of phytochrome-regulated genes in *Arabidopsis* under red light. *Sci. China, Ser. C Life Sci.* **52**: 371–380.
- Lian, N., Liu, X., Wang, X., Zhou, Y., Li, H., Li, J., and Mao, T.** (2017). COP1 mediates dark-specific degradation of microtubule-associated protein WDL3 in regulating *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 12321–12326.
- Lindeboom, J.J., Nakamura, M., Saltini, M., Hibbel, A., Walia, A., Ketelaar, T., Emons, A.M.C., Sedbrook, J.C., Kirik, V., Mulder, B.M., and Ehrhardt, D.W.** (2019). CLASP stabilization of plus ends created by severing promotes microtubule creation and reorientation. *J. Cell Biol.* **218**: 190–205.
- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., and Lin, C.** (2011). The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci.* **16**: 684–691.
- Liu, L., Jiang, Y., Zhang, X., Wang, X., Wang, Y., Han, Y., Coupland, G., Jin, J.B., Searle, I., Fu, Y.F., and Chen, F.** (2017a). Two SUMO proteases SUMO PROTEASE RELATED TO FERTILITY1 and 2 are required for fertility in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **175**: 1703–1719.
- Liu, Q. et al.** (2017b). Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 2. *Nat. Commun.* **8**: 1–12.

- Liu, X., Qin, T., Ma, Q., Sun, J., Liu, Z., Yuan, M., and Mao, T.** (2013). Light-regulated hypocotyl elongation involves proteasome-dependent degradation of the microtubule regulatory protein WDL3 in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1740–1755.
- Lloyd, C.** (2011). *Dynamic Microtubules and the Texture of Plant Cell Walls* 1st ed. (Elsevier Inc.).
- Lopez, L., Carbone, F., Bianco, L., Giuliano, G., Facella, P., and Perrotta, G.** (2012). Tomato plants overexpressing cryptochrome 2 reveal altered expression of energy and stress-related gene products in response to diurnal cues. *Plant, Cell Environ.* **35**: 994–1012.
- Lucas, J.R., Courtney, S., Hassfurder, M., Dhingra, S., Bryant, A., and Shaw, S.L.** (2011). Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated Arabidopsis hypocotyls. *Plant Cell* **23**: 1889–1903.
- De Lucas, M., Davière, J.M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480–484.
- Luo, X. et al.** (2010). Integration of light and brassinosteroid signaling pathways by a GATA transcription factor in Arabidopsis. *Dev. Cell* **19**: 872–883.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., and Deng, X.W.** (2001). Light Control of Arabidopsis Development Entails Coordinated Regulation of Genome Expression and Cellular Pathways. *Plant Cell* **13**: 2589–2607.
- Mao, T., Jin, L., Li, H., Liu, B., and Yuan, M.** (2005). Two microtubule-associated proteins of the Arabidopsis MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol.* **138**: 654–662.
- Masoud, K., Herzog, E., Chabouté, M.E., and Schmit, A.C.** (2013). Microtubule nucleation and establishment of the mitotic spindle in vascular plant cells. *Plant J.* **75**: 245–257.
- Matsui, M., Chatanika, D., Albrecht, G., Ning, W., and Deng, X.** (1995). Arabidopsis COP1 protein specifically interacts in vitro with a cytoskeleton-associated protein, CIP1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4239–4243.
- Mazzella, M.A., Arana, M.V., Staneloni, R.J., Perelman, S., Rodriguez Batiller, M.J., Muschietti, J., Cerdán, P.D., Chen, K., Sánchez, R. a, Zhu, T., Chory, J., and Casal, J.J.** (2005). Phytochrome control of the Arabidopsis transcriptome anticipates seedling exposure to light. *Plant Cell* **17**: 2507–2516.
- Mazzella, M.A., Casal, J.J., Muschietti, J.P., and Fox, A.R.** (2014). Hormonal networks involved in apical hook development in darkness and their response to light. *Front. Plant Sci.* **5**: 52.
- Meyer, L.J., Gao, J., Xu, D., and Thelen, J.J.** (2012). Phosphoproteomic analysis of seed maturation in arabidopsis, rapeseed, and soybean. *Plant Physiol.* **159**: 517–528.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H., and Qu, L.J.** (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res.* **23**: 1233–1236.
- Moll, C., Von Lyncker, L., Zimmermann, S., Kägi, C., Baumann, N., Twell, D., Grossniklaus, U., and Groß-Hardt, R.** (2008). CLO/GFA1 and ATO are novel regulators of gametic cell fate in plants. *Plant J.* **56**: 913–921.
- Monte, E., Al-Sady, B., Leivar, P., and Quail, P.H.** (2007). Out of the dark: How the PIFs are unmasking a dual temporal mechanism of phytochrome signalling. *J. Exp. Bot.* **58**: 3125–3133.

- Morejohn, L.C., Bureau, T.E., Molè-Bajer, J., Bajer, A.S., and Fosket, D.E.** (1987). Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta* **172**: 252–264.
- Nakagami, H., Sugiyama, N., Mochida, K., Daudi, A., Yoshida, Y., Toyoda, T., Tomita, M., Ishihama, Y., and Shirasu, K.** (2010). Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol.* **153**: 1161–1174.
- Nakajima, K., Furutani, I., Tachimoto, H., Matsubara, H., and Hashimoto, T.** (2004). SPIRAL1 encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding arabidopsis cells. *Plant Cell* **16**: 1178–1190.
- Nguyen, T.H.N. et al.** (2012). Quantitative phosphoproteomic analysis of soybean root hairs inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Cell. Proteomics* **11**: 1140–1155.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**: 657–667.
- Ni, W., Xu, S.-L., González-Grandío, E., Chalkley, R.J., Huhmer, A.F.R., Burlingame, A.L., Wang, Z.-Y., and Quail, P.H.** (2017). PPKs mediate direct signal transfer from phytochrome photoreceptors to transcription factor PIF3. *Nat. Commun.* **8**: 15236.
- Ni, W., Xu, S.L., Chalkley, R.J., Pham, T.N.D., Guan, S., Maltby, D.A., Burlingame, A.L., Wang, Z.Y., and Quail, P.H.** (2013). Multisite light-induced phosphorylation of the transcription factor PIF3 is necessary for both its rapid degradation and concomitant negative feedback modulation of photoreceptor phyB levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 2679–2698.
- Ning, D.L., Liu, K.H., Liu, C.C., Liu, J.W., Qian, C.R., Yu, Y., Wang, Y.F., Wang, Y.C., and Wang, B.C.** (2016). Large-scale comparative phosphoprotein analysis of maize seedling leaves during greening. *Planta* **243**: 501–517.
- Oh, E., Zhu, J.Y., Bai, M.Y., Arenhart, R.A., Sun, Y., and Wang, Z.Y.** (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. *Elife* **2014**: 3031.
- Oh, E., Zhu, J.Y., and Wang, Z.Y.** (2012). Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat. Cell Biol.* **14**: 802–809.
- Osterlund, M.T., Ang, L.H., and Deng, X.W.** (1999). The role of COP1 in repression of *Arabidopsis* photomorphogenic development. *Trends Cell Biol.* **9**: 113–118.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Ning, W., and Deng, X.W.** (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**: 462–466.
- Otegui, M.S. and Spitzer, C.** (2008). Endosomal functions in plants. *Traffic* **9**: 1589–1598.
- Pacín, M., Legris, M., and Casal, J.J.** (2013). COP1 re-accumulates in the nucleus under shade. *Plant J.* **75**: 631–641.
- Pacín, M., Legris, M., and Casal, J.J.** (2014). Rapid decline in nuclear CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1 abundance anticipates the stabilization of its target ELONGATED HYPOCOTYL5 in the light. *Plant Physiol.* **164**: 1134–1138.
- Park, E., Kim, J., Lee, Y., Shin, J., Oh, E., Chung, W. II, Jang, R.L., and Choi, G.** (2004). Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant Cell Physiol.* **45**: 968–975.
- Park, H.J., Ding, L., Dai, M., Lin, R., and Wang, H.** (2008). Multisite phosphorylation of



- Arabidopsis HFR1 by casein kinase II and a plausible role in regulating its degradation rate. *J. Biol. Chem.* **283**: 23264–23273.
- Pedmale, U. V., Huang, S.S.C., Zander, M., Cole, B.J., Hetzel, J., Ljung, K., Reis, P.A.B., Sridevi, P., Nito, K., Nery, J.R., Ecker, J.R., and Chory, J.** (2016). Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell* **164**: 233–245.
- Perelman, S., Mazzella, M.A., Muschietti, J., Zhu, T., and Casal, J.J.** (2003). Finding Unexpected Patterns in Microarray Data. *Plant Physiol.* **133**: 1717–1725.
- Perrin, R.M., Wang, Y., Yuen, C.Y.L., Will, J., and Masson, P.H.** (2007). WVD2 is a novel microtubule-associated protein in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **49**: 961–971.
- Peschke, F. and Kretsch, T.** (2011). Genome-wide analysis of light-dependent transcript accumulation patterns during early stages of arabidopsis seedling deetiolation. *Plant Physiol.* **155**: 1353–1366.
- Petersen, J., Inoue, S. ichiro, Kelly, S.M., Sullivan, S., Kinoshita, T., and Christie, J.M.** (2017). Functional characterization of a constitutively active kinase variant of Arabidopsis phototropin 1. *J. Biol. Chem.* **292**: 13843–13852.
- Pham, V.N., Kathare, P.K., and Huq, E.** (2018). Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiol.* **176**: 1025–1038.
- Phee, B.K., Park, S., Cho, J.H., Jeon, J.S., Bhoo, S.H., and Hahn, T.R.** (2007). Comparative proteomic analysis of blue light signaling components in the arabidopsis cryptochrome 1 mutant. *Mol. Cells* **23**: 154–160.
- Philippar, K., Geis, T., Ilkavets, I., Oster, U., Schwenkert, S., Meurer, J., and Soll, J.** (2007). Chloroplast biogenesis: The use of mutants to study the etioplast-chloroplast transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 678–683.
- Podolec, R. and Ulm, R.** (2018). Photoreceptor-mediated regulation of the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase. *Curr. Opin. Plant Biol.* **45**: 18–25.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A., and Essen, L.O.** (2008). Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 21023–21027.
- Qi, H., Li, J., Xia, F.N., Chen, J.Y., Lei, X., Han, M.Q., Xie, L.J., Zhou, Q.M., and Xiao, S.** (2020). Arabidopsis SINAT Proteins Control Autophagy by Mediating Ubiquitylation and Degradation of ATG13. *Plant Cell* **32**: 263–284.
- Ramkumar, A., Jong, B.Y., and Ori-McKenney, K.M.** (2018). ReMAPping the microtubule landscape: How phosphorylation dictates the activities of microtubule-associated proteins. *Dev. Dyn.* **247**: 138–155.
- Rayapuram, N., Bigeard, J., Alhoraibi, H., Bonhomme, L., Hesse, A.M., Vinh, J., Hirt, H., and Pflieger, D.** (2018). Quantitative phosphoproteomic analysis reveals shared and specific targets of Arabidopsis mitogen-activated protein kinases (MAPKs) MPK3, MPK4, and MPK6. *Mol. Cell. Proteomics* **17**: 61–80.
- Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., Gruissem, W., and Baginsky, S.** (2009). Large-scale arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiol.* **150**: 889–903.
- Reyes, F.C., Buono, R.A., Roschztardt, H., Di Rubbo, S., Yeun, L.H., Russinova, E., and Otegui, M.S.** (2014). A novel endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) component in Arabidopsis thaliana controls cell expansion and development. *J. Biol.*

Chem. **289**: 4980–4988.

- Rizzini, L., Favory, J., Cloix, C., Faggionato, D., Hara, A.O., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., and Ulm, R.** (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* (80-. ). **332**: 103–106.
- Robinson, D.G., Jiang, L., and Schumacher, K.** (2008). The endosomal system of plants: Charting new and familiar territories. *Plant Physiol.* **147**: 1482–1492.
- Rockwell, N.C., Su, Y.-S., and Lagarias, J.C.** (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 837–858.
- Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y.** (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**: 725–738.
- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U., and Deng, X.W.** (2003). The COP1–SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev.* **17**: 2642–2647.
- Sakamoto, Y. and Takagi, S.** (2013). LITTLE NUCLEI 1 and 4 regulate nuclear morphology in arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **54**: 622–633.
- Sambade, A., Pratap, A., Buschmann, H., Morris, R.J., and Lloyd, C.** (2012). The Influence of Light on Microtubule Dynamics and Alignment in the Arabidopsis Hypocotyl. *Plant Cell* **24**: 192–201.
- Samofalova, D.O., Karpov, P.A., Raevsky, A. V., and Blume, Y.B.** (2019). Protein phosphatases potentially associated with regulation of microtubules, their spatial structure reconstruction and analysis. *Cell Biol. Int.* **43**: 1081–1090.
- Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T.J., Hidaka, M., and Machida, Y.** (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev.* **20**: 1004–1014.
- Schecher, S., Walter, B., Falkenstein, M., Macher-Goeppinger, S., Stenzel, P., Krümpelmann, K., Hadaschik, B., Perner, S., Kristiansen, G., Duensing, S., Roth, W., and Tagscherer, K.E.** (2017). Cyclin K dependent regulation of Aurora B affects apoptosis and proliferation by induction of mitotic catastrophe in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **141**: 1643–1653.
- Schneider-Poetsch, H.A.W.** (1992). Signal transduction by phytochrome: phytochromes have a module related to the transmitter modules of bacterial sensor proteins. *Photochem. Photobiol.* **56**: 839–846.
- Schwartz, D. and Gygi, S.P.** (2005). An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1391–1398.
- Sedbrook, J.C. and Kaloriti, D.** (2008). Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. *Trends Plant Sci.* **13**: 303–310.
- Selby, C.P. and Sancar, A.** (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 17696–17700.
- Sethi, V., Raghuram, B., Sinha, A.K., and Chattopadhyay, S.** (2014). A mitogen-activated protein kinase cascade module, MKK3-MPK6 and MYC2, is involved in blue light-mediated seedling development in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 3343–3357.

- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C., and Lin, C.** (2002). Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* **417**: 763–767.
- Shalitin, D., Yu, X., Maymon, M., Mockler, T., and Lin, C.** (2003). Blue Light-Dependent in Vivo and in Vitro Phosphorylation of Arabidopsis Cryptochrome 1. *Plant Cell* **15**: 2421–2429.
- Sharrock, R.A.** (2008). The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biol.* **9**: 230.
- Shen, Z. et al.** (2009). Label-free quantitative proteomics analysis of etiolated maize seedling leaves during greening. *Mol. Cell. Proteomics* **8**: 2443–2460.
- Shi, H., Lyu, M., Luo, Y., Liu, S., Li, Y., He, H., Wei, N., Deng, X.W., and Zhong, S.** (2018). Genome-wide regulation of light-controlled seedling morphogenesis by three families of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: 6482–6487.
- Shih, C.J., Chen, H.W., Hsieh, H.Y., Lai, Y.H., Chiu, F.Y., Chen, Y.R., and Tu, S.L.** (2019). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein h1 coordinates with phytochrome and the U1 snRNP complex to regulate alternative splicing in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **31**: 2510–2524.
- Shikata, H., Hanada, K., Ushijima, T., Nakashima, M., Suzuki, Y., and Matsushita, T.** (2014). Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 18781–18786.
- Shikata, H., Shibata, M., Ushijima, T., Nakashima, M., Kong, S.G., Matsuoka, K., Lin, C., and Matsushita, T.** (2012). The RS domain of Arabidopsis splicing factor RRC1 is required for phytochrome B signal transduction. *Plant J.* **70**: 727–738.
- Shin, A.Y., Han, Y.J., Baek, A., Ahn, T., Kim, S.Y., Nguyen, T.S., Son, M., Lee, K.W., Shen, Y., Song, P.S., and Kim, J. II** (2016). Evidence that phytochrome functions as a protein kinase in plant light signalling. *Nat. Commun.* **7**.
- Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I.S., Bae, G., Lee, C.H., Lee, D., and Choi, G.** (2009). Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 7660–7665.
- Smékalová, V. et al.** (2014). Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytol.* **203**: 1175–1193.
- Smertenko, A.P., Chang, H.Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M.T., and Hussey, P.J.** (2004). The arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: Molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* **16**: 2035–2047.
- Song, C., Mroginski, M.A., Lang, C., Kopycki, J., Gärtner, W., Matysik, J., and Hughes, J.** (2018). 3D structures of plant phytochrome a as Pr and Pfr from solid-state NMR: Implications for molecular function. *Front. Plant Sci.* **9**: 1–15.
- Soo Seo, H., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L., and Chua, N.H.** (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **423**: 995–999.
- Steiner, A., Müller, L., Rybak, K., Vodermaier, V., Facher, E., Thellmann, M., Ravikumar, R., Wanner, G., Hauser, M.T., and Assaad, F.F.** (2016). The Membrane-Associated Sec1/Munc18 KEULE is Required for Phragmoplast Microtubule Reorganization during Cytokinesis in Arabidopsis. *Mol. Plant* **9**: 528–540.

- Sugiyama, N., Nakagami, H., Mochida, K., Daudi, A., Tomita, M., Shirasu, K., and Ishihama, Y.** (2008). Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. *Mol. Syst. Biol.* **4**.
- Sullivan, J.A. and Deng, X.W.** (2003). From seed to seed: The role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Dev. Biol.* **260**: 289–297.
- Sullivan, S., Thomson, C.E., Lamont, D.J., Jones, M.A., and Christie, J.M.** (2008). In Vivo Phosphorylation Site Mapping and Functional Characterization of Arabidopsis Phototropin 1. *Mol. Plant* **1**: 178–194.
- Takemiya, A. and Shimazaki, K. ichiro** (2016). Arabidopsis phot1 and phot2 phosphorylate BLUS1 kinase with different efficiencies in stomatal opening. *J. Plant Res.* **129**: 167–174.
- Takemiya, A., Sugiyama, N., Fujimoto, H., Tsutsumi, T., Yamauchi, S., Hiyama, A., Tada, Y., Christie, J.M., and Shimazaki, K.I.** (2013). Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat. Commun.* **4**: 1–8.
- Tan, S.T., Dai, C., Liu, H.T., and Xue, H.W.** (2013). Arabidopsis Casein kinase1 proteins CK1.3 and CK1.4 phosphorylate cryptochrome2 to regulate blue light signaling. *Plant Cell* **25**: 2618–2632.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P.B., and Friml, J.** (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: A means to coordinate plant development. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 2738–2754.
- Tepperman, J.M., Hudson, M.E., Khanna, R., Zhu, T., Chang, S.H., Wang, X., and Quail, P.H.** (2004). Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *Plant J.* **38**: 725–739.
- Tepperman, J.M., Zhu, T., Chang, H.-S., Wang, X., and Quail, P.H.** (2001). Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 9437–9442.
- Terzaghi, W.B. and Cashmore, A.R.** (1995). Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 445–474.
- Ueda, K. and Matsuyama, T.** (2000). Rearrangement of cortical microtubules from transverse to oblique or longitudinal in living cells of transgenic Arabidopsis thaliana. *Protoplasma* **213**: 28–38.
- Valentine, M.E., Wolyniak, M.J., and Rutter, M.T.** (2012). Extensive Phenotypic Variation among Allelic T-DNA Inserts in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **7**: e44981.
- Vanneste, S. and Friml, J.** (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* **136**: 1005–1016.
- Vavrdová, T., Samaj, J., and Komis, G.** (2019). Phosphorylation of plant microtubule-associated proteins during cell division. *Front. Plant Sci.* **10**: 11.
- Wang, C., Li, J., and Yuan, M.** (2007). Salt tolerance requires cortical microtubule reorganization in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **48**: 1534–1547.
- Wang, H., Dittmer, T.A., and Richards, E.J.** (2013). Arabidopsis CROWDED NUCLEI (CRWN) proteins are required for nuclear size control and heterochromatin organization. *BMC Plant Biol.* **13**: 200–214.
- Wang, H., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y., and Xing Wang Deng** (2001). Direct interaction of

- Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* (80-. ). **294**: 154–158.
- Wang, Q., Liu, S., Lu, C., La, Y., Dai, J., Ma, H., Zhou, S., Tan, F., Wang, X., Wu, Y., Kong, W., and La, H.** (2019). Roles of CRWN-family proteins in protecting genomic DNA against oxidative damage. *J. Plant Physiol.* **233**: 20–30.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., and Cresti, M.** (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* **27**: 2782–2786.
- Wang, X., Zhang, J., Yuan, M., Ehrhardt, D.W., Wang, Z., and Mao, T.** (2012a). Arabidopsis MICROTUBULE DESTABILIZING PROTEIN40 Is involved in brassinosteroid regulation of hypocotyl elongation. *Plant Cell* **24**: 4012–4025.
- Wang, Z.-Y., Bai, M.-Y., Oh, E., and Zhu, J.-Y.** (2012b). Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. *Annu. Rev. Genet.* **46**: 701–724.
- Webb, M.A., Cavaletto, J.M., Klanrit, P., and Thompson, G.A.** (2001). Orthologs in Arabidopsis thaliana of the Hsp70 interacting protein Hip. *Cell Stress Chaperones* **6**: 247–255.
- Welch, B.L.** (1947). The generalisation of student's problems when several different population variances are involved. *Biometrika* **34**: 28–35.
- Whitelam, G.C. and Halliday, K.J.** (2007). *Light and Plant Development*.
- Wilkes, E. and Cutillas, P.** (2017). Label-free phosphoproteomic approach for kinase signaling analysis.
- Wu, G. and Spalding, E.P.** (2007). Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 18813–18818.
- Wu, J., Tan, X., Wu, C., Cao, K., Li, Y., and Bao, Y.** (2013). Regulation of cytokinesis by exocyst subunit SEC6 and KEULE in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant* **6**: 1863–1876.
- Wu, S. and Gallagher, K.L.** (2013). Intact microtubules are required for the intercellular movement of the SHORT-ROOT transcription factor. *Plant J.* **74**: 148–159.
- Xin, R., Zhu, L., Salomé, P.A., Mancini, E., Marshall, C.M., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J., Weigel, D., and Huq, E.** (2017). SPF45-related splicing factor for phytochrome signaling promotes photomorphogenesis by regulating pre-mRNA splicing in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 7018–7027.
- Xue, W., Ruprecht, C., Street, N., Hematy, K., Chang, C., Frommer, W.B., Persson, S., and Niittylä, T.** (2012). Paramutation-Like Interaction of T-DNA Loci in Arabidopsis. *PLoS One* **7**: 1–7.
- Yamaguchi, K. and Kawasaki, T.** (2012). Function of Arabidopsis SWAP70 GEF in immune response. *Plant Signal. Behav.* **7**: 465–468.
- Yamamoto, Y.Y., Deng, X.-W., and Matsui, M.** (2001). CIP4, a New COP1 Target, Is a Nucleus-Localized Positive Regulator of Arabidopsis Photomorphogenesis.
- Yamamoto, Y.Y., Matsui, M., Ang, L.H., and Deng, X.W.** (1998). Role of a COP1 interactive protein in mediating light-regulated gene expression in arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 1083–94.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y.** (2015). performed research and

created and tested the I-TASSER Suite package. *Nat Methods* **12**: 7–8.

- Yang, P., Li, X., Wang, X., Chen, H., Chen, F., and Shen, S.** (2007). Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. *Proteomics* **7**: 3358–3368.
- Yang, Y.J., Zuo, Z.C., Zhao, X.Y., Li, X., Klejnot, J., Li, Y., Chen, P., Liang, S.P., Yu, X.H., Liu, X.M., and Lin, C.T.** (2008). Blue-light-independent activity of Arabidopsis cryptochromes in the regulation of steady-state levels of protein and mRNA expression. *Mol. Plant* **1**: 167–177.
- Yanovsky, M.J., Izaguirre, M., Wagmaister, J.A., Gatz, C., Jackson, S.D., Thomas, B., and Casal, J.J.** (2000). Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato. *Plant J.* **23**: 223–232.
- Yeh, K.-C. and Lagarias, J.C.** (1998). Eukaryotic phytochromes: Light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 13976–13981.
- Yoon, Y.N., Choe, M.H., Jung, K.Y., Hwang, S.G., Oh, J.S., and Kim, J.S.** (2018). MASTL inhibition promotes mitotic catastrophe through PP2A activation to inhibit cancer growth and radioresistance in breast cancer cells. *BMC Cancer* **18**.
- Yu, X., Dong, J., Deng, Z., Jiang, Y., Wu, C., Qin, X., Terzaghi, W., Chen, H., Dai, M., and Deng, X.W.** (2019). Arabidopsis PP6 phosphatases dephosphorylate PIF proteins to repress photomorphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**: 20218–20225.
- Yue, J., Qin, Q., Meng, S., Jing, H., Gou, X., Li, J., and Hou, S.** (2016). TOPP4 regulates the stability of PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 5 during photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **170**: 1381–1397.
- Yue, X., Guo, Z., Shi, T., Song, L., and Cheng, Y.** (2019). Arabidopsis AGC protein kinases IREH1 and IRE3 control root skewing. *J. Genet. Genomics* **46**: 259–267.
- Yuen, C.Y.L., Pearlman, R.S., Silo-Suh, L., Hilson, P., Carroll, K.L., and Masson, P.H.** (2003). WVD2 and WDL1 modulate helical organ growth and anisotropic cell expansion in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **131**: 493–506.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., and Chua, N.H.** (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nat. Protoc.* **1**: 641–646.
- Zhang, Y.** (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**: DOI: 10.1186/1471-2105-9-40.
- Zhang, Y., Mayba, O., Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J.M., Speed, T.P., and Quail, P.H.** (2013). A Quartet of PIF bHLH Factors Provides a Transcriptionally Centered Signaling Hub That Regulates Seedling Morphogenesis through Differential Expression-Patterning of Shared Target Genes in Arabidopsis. *PLoS Genet.* **9**: 11–13.
- Zhang, Z., Chen, J., Lin, S., Li, Z., Cheng, R., Fang, C., Chen, H., and Lin, W.** (2012). Proteomic and phosphoproteomic determination of ABA's effects on grain-filling of *Oryza sativa* L. inferior spikelets. *Plant Sci.* **185–186**: 259–273.
- Zhao, W., Guan, C., Feng, J., Liang, Y., Zhan, N., Zuo, J., and Ren, B.** (2016). The Arabidopsis CROWDED NUCLEI genes regulate seed germination by modulating degradation of ABI5 protein. *J. Integr. Plant Biol.* **58**: 669–678.
- Zhou, S., Chen, Q., Li, X., and Li, Y.** (2017). MAP65-1 is required for the depolymerization and reorganization of cortical microtubules in the response to salt stress in Arabidopsis. *Plant*

Sci. **264**: 112–121.

**Zhou, Y., Yang, S., Mao, T., and Zhang, Z.** (2015). MAPanalyzer: A novel online tool for analyzing microtubule-associated proteins. *Database* **2015**: 1–12.

**Ziegelbauer, J., Shan, B., Yager, D., Larabell, C., Hoffmann, B., and Tjian, R.** (2001). Transcription Factor MIZ-1 Is Regulated via Microtubule Association. *Mol. Cell* **8**: 339–349.

**Zuo, Z.C., Meng, Y.Y., Yu, X.H., Zhang, Z.L., Feng, D.S., Sun, S.F., Liu, B., and Lin, C.T.** (2012). A study of the blue-light-dependent phosphorylation, degradation, and photobody formation of Arabidopsis CRY2. *Mol. Plant* **5**: 726–733.