



# Análisis de la interconexión entre rutas transcripcionales hormonales y del síndrome de huida de la sombra de *Arabidopsis*

Nicolás Cifuentes Esquivel

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Centre de Recerca en Agrigenòmica (CRAG)**  
Departamento de Genética Molecular.



**Universidad de Barcelona**  
Facultad de Biología  
Departamento de Biología Vegetal  
Bienni 2007-2008

# ANÁLISIS DE LA INTERCONEXIÓN ENTRE RUTAS TRANSCRIPCIONALES HORMONALES Y DEL SÍNDROME DE HUIDA DE LA SOMBRA DE ARABIDOPSIS

Memoria presentada por Nicolás Cifuentes Esquivel para optar al título de doctor de la Universidad de Barcelona

Este trabajo, realizado en el laboratorio de Genética Molecular del CRAG, ha estado financiado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile con la beca de doctorado en el extranjero por Gestión Propia 2008.

Firmado por

Director de tesis  
Dr. Jaime F. Martínez-García

Co-Director de Tesis  
Dr. Jordi Bou-Torrent

Tutor  
Dra. Carmen Bergareche Mantuliz

Autor  
Nicolás Cifuentes Esquivel

Barcelona, 2012



*A mis queridos padres*  
*A mis queridos hermanos*  
*A mi queridos abuelos*



## Agradecimientos

“.....Gracias a la vida que me ha dado tanto. Me ha dado la risa y me ha dado el llanto. Así yo distingo dicha de quebranto, los dos materiales que forman mi canto y el canto de ustedes que es el mismo canto, y el canto de todos, que es mi propio canto.....” Me acojo al cantico de Violeta para darle un reconocimiento a la vida por esta oportunidad que he tenido de venir desde tan lejos a perfeccionar mi carrera y a la para crecer como ser humano. Por toda la gente que he conocido y las experiencias que he vivido. Alegrías, penas, amor, decepciones, y así emociones varias que siempre te acompañan en la vida... Fue una decisión difícil hacer las maletas y dejar mi tierra con la familia y amigos, pero había que hacerlo y si bien hay momentos en que dude de esta decisión, el enriquecimiento personal que he logrado justifica tan magno sacrificio. He vivido experiencias que recordaré siempre, tanto buenas como malas, he conocido a gente increíble que esperas que siempre sigan en tu vida, que han compensado cosas que me he perdido de mi querido Chile.. Quizás podría haber vivido y disfrutado mas cosas aún, pero me siento realmente realizado por lo vivido.

En lo que respecta a los agradecimiento intentaré ser breve para no aburrir. Además los haré en forma global, ya que de otra forma esta parte de la tesis terminaría del mismo tamaño que la parte científica.

### A la parte Europea

Primero quiero dar las gracias Jaime por haberme abierto la puerta de su laboratorio. Sin conocerme previamente no tuvo problemas en darme una pipeta y una poyata, e instruirme para convertirme en un buen científico. Gracias por esta oportunidad y el conocimiento adquirido.

También agradecer a la gente del lab tanto los que están como los que pasaron, sobretodo por los buenos momentos vividos y que espero que sigan junto a la gente alegre que se queda. La alegría es el mejor reactivo en un laboratorio.

A la gente del CRAG gracias por todo. No profundizaré en nombres porque cada persona importante sabe lo que significa para mi, y a ellos les digo ¡Hasta Pronto! Las cenas, fiestas, casas rurales se pueden seguir disfrutando en otras partes del mundo donde nos volvamos a reunir, como Italia, Portugal, Francia, Argentina, Colombia, España y por que no Catalunya en un futuro.... No faltará un bautizo con orujo o algo parecido!!!

A los servicios del CRAG, microscopia, secuenciación, invernaderos, etc, por el soporte que también han permitido lograr esta tesis.

A nivel de financiación agradecer a CONIYT por la beca concedida que me permitió hacer estos estudios. También al CRAG por la ayuda complementaria de predoc, así como también al Gobierno Español por la concesión de proyectos que permitieron al laboratorio hacer nuestra investigación.

### *A la parte Chilena*

Primero agradecer a mis amigos chilenos que estaban tanto en Londres como en Lyon. Ellos fueron la familia cercana durante estos años... Casorios, nacimientos, navidades, años nuevos.... Amigos, Usachinos, familia.... Eramos 5 y ahora hay 2 nuevas integrantes... Gracias por todo...

A mis amigos en Chile... El apoyo a pesar de la lejanía ha sido único y preciso. La verdad es que los mensajes, los chat, los mail, puta que daban apoyo y también han mantenido estas amistades verdaderas a pesar de la distancia.

Bueno ahora la parte mas importante, la familia.... No puedo quejarme por la familia que tengo, y no me refiero solo a mis padre y hermanos sino que al conclave que nos juntamos siempre, primos, tios, abuelos.. Puta que era rico visitar Chile y verlos a todos como siempre, riéndonos, weando, comiendo y bebiendo a lo lindo... Quiero agradecer puntualmente antes de pasar al núcleo familiar, a mi abuela Inés y abuelo Carlos Cifuentes. Siempre me han dicho lo orgullosos que están de tenerme como nieto mayor, pero la verdad el orgullo es mío de tenerlos como abuelos. Doy gracias por que aún están conmigo, que en

estos 5 años lejos se mantienen con energía vital y siempre han estado ahí recibíendome y regaloneándome.. Nona y Tata en mi corazón por siempre.

A mis hermanos.. que son mi orgullo y mi felicidad. Gracias por estar siempre ahí, por los mágicos videos de cumple, los chat, los chistes y claro las visitas. Me he perdido cosas importantes que les han pasado pero las que viene y que serán mas importantes estaré ahí, se los prometo. Ale, colega, gracias por la ayudas hermanita, por las conversaciones, el animo y preocuparte de mi futuro profesional y personal. Max, la distancia nos unió mas y lo agradezco, sobretodo por las conversaciones y lo que vivimos cuando estuviste por estos lados. Aun queda carrete pendiente aquí, así que tenemos que volver los dos. A los dos los amo mucho y recuerden que tenemos un viaje pendiente.

A mis padres. Aquí tienen otro motivo para sentirte orgulloso de los 3 hijos que tienes. He llegado tan lejos para perfeccionarme y triunfar, gracias a todo lo que me han dado, cariño, sabiduría, alegrías y una familia que se basa en buenos principios, que lucha por lo que quiere, que si nos caemos nos levantamos una y otra vez.... Yo soy lo que uds han creado.... Gracias por haberme dado la vida...



## Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La luz: importante señal en el ciclo de vida vegetal.....	3
1.2. Desarrollo vegetal: Escotomorfogénesis y Fotomorfogénesis.....	4
1.3. Fotorreceptores: Captadores de la luz como señal.....	4
1.3.1. Criptocromos.....	5
1.3.2. Fototropinas y otras proteínas con dominio LOV.....	7
1.3.3. Fitocromos.....	9
1.4. Transducción de señal de los fotorreceptores.....	12
1.4.1. Componentes de la red de transducción de señales que regulan las fotorrespuestas.....	12
1.4.2. Señalización de los fitocromos.....	14
1.4.2.1. Componentes de la señalización de phyA.....	14
1.4.2.2. Componentes de la señalización de phyB.....	15
1.4.3. Respuestas fisiológicas reguladas por fitocromos.....	17
1.5. El síndrome de huida a la sombra: un mecanismo adaptativo a la competición por luz impuesto por la proximidad vegetal.....	19
1.5.1. Componentes moleculares del SAS.....	21
1.5.1.1. Papel de PIFs en la respuesta a SAS.....	23
1.5.1.2. Proteínas DELLAs.....	25
1.5.1.3. Factores ATHB y HAT.....	26
1.5.1.4. Genes PAR del tipo BHLH.....	28
1.5.1.5. PAR1: un gen PAR del tipo BHLH.....	29
1.5.1.6. POF: proteínas que interactúan con PAR1.....	31
1.5.2. Integración del SAS con otras vías de regulación del crecimiento.....	33
1.5.2.1. Conexión SAS-Hormonas.....	33
1.5.2.2. Conexión SAS-Reloj Circadiano.....	39
1.5.2.3. Conexión SAS-Temperatura.....	40
1.5.3. Aspectos espaciales y temporales de la señalización de SAS.....	41
2. OBJETIVOS.....	43
3. RESULTADOS.....	47
CAPITULO I.....	49
1. Análisis de la integración del SAS y las hormonas.....	51
2. Integración de la respuesta a SAS con el efecto de Giberelinas.....	51
3. Respuesta a GA en plántulas con niveles alterados de componentes del SAS.....	52
3.1. Respuesta a GA en plántulas con niveles alterados de PAR1 y PAR2.....	53
3.2. Respuesta a GA en plántulas con niveles alterados de BIMs y BEEs.....	55
3.3. Respuesta a GA en plántulas con niveles alterados de HFR1.....	56
4. Efecto de la sombra simulada en el alargamiento del hipocotilo mediado por hormonas.....	57
CAPITULO II.....	67
1. Análisis del mecanismo molecular de PAR1.....	69
CAPITULO III.....	79
1. Interactores de PAR1.....	81
1.1. Caracterización funcional de genes <i>POF</i> .....	81
1.2. Análisis de expresión de mutantes simples de genes <i>POF</i> .....	84
1.3. Respuesta de mutantes simples <i>POF</i> a sombra simulada.....	92
1.4. Identificación de dobles mutantes y análisis de su respuesta a sombra simulada.....	95

2. Estudio de los genes BEE y BIM. ....	98
2.1. Estudio de Interacción PAR1-BEE por Y2H. ....	98
2.2. Estudio de Interacción PAR1-BEE por complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC). ....	101
2.3. Estudio de interacción entre phyB y elementos POF (BEE y BIM). ....	105
2.4. Estudio de los factores BEE y BIM como módulos funcionales redundantes o módulos funcionales independientes reguladores del SAS. ....	106
CAPITULO IV. ....	113
1. Estudio de la unión de las proteínas BEE1, BEE2, BEE2 y BIM1 a DNA. ....	115
1.2. Ensayos de unión de dominios BHLH (dBHLH) a la caja G-box. ....	115
1.3. Mutagénesis de residuos en el dominio básico de BEE1 y BEE2. ....	120
1.4. Identificación de los sitios de de la unión de BEE1 a DNA. ....	123
1.4.1. Producción de proteína de fusión MBP-BEE1. ....	123
1.4.2. Análisis <i>in vitro</i> de especificidad de unión de BEE1 a diferentes motivos de DNA. ....	125
1.5. Comparación de los sitios de unión de BEE1 y BEE2 al DNA. ....	126
1.6. Ensayos de unión de dBHLH de BEE1 y BEE2 a la G-box y G-box+. ....	128
1.7. Ensayos de unión de dBHLH de BEE2 y BIM1 a la G-box en presencia de PAR1 y PAR1 <sub>L66</sub> . ....	130
4. DISCUSION. ....	133
4.1. La sensibilidad y niveles de hormonas en plántulas cambian tras la percepción de la proximidad vegetal. ....	135
4.2. PAR1 actúa como Cofactor Transcripcional. ....	138
4.3. Identificación de nuevos componentes del SAS que interaccionan con PAR. ....	139
4.4. BEEs y BIMs como componentes de la red del SAS. ....	145
5. CONCLUSIONES. ....	151
6. MATERIALES Y METODOS. ....	155
6.1. Material Biológico. ....	157
6.1.1. Material Bacteriológico. ....	157
6.1.1.1. Cepas bacterianas. ....	157
6.1.1.2. Medios de cultivos. ....	157
6.1.1.3. Condiciones de cultivos de bacterias. ....	158
6.1.1.4. Obtención de células competentes para choque térmico. ....	158
6.1.1.5. Obtención de células electrocompetentes. ....	159
6.1.2. Material de levadura. ....	160
6.1.2.1. Cepas de levaduras. ....	160
6.1.2.2. Medios de cultivos. ....	160
6.1.2.3. Condiciones de cultivos de levaduras. ....	160
6.1.3. Material Vegetal. ....	160
6.1.3.1. Líneas de ganancia y pérdida de función utilizadas. ....	161
6.1.3.2. Condiciones cultivo en invernadero y fitotrón. ....	162
6.1.3.3. Condiciones de cultivo en placa. ....	163
6.1.3.4. Medios de cultivos. ....	163
6.1.3.5. Plásmidos. ....	163
6.1.3.5.2. Constructos. ....	164
6.1.3.6. Oligonucleóticos. ....	166
6.2. Metodología. ....	167
6.2.1. Técnicas de biología molecular de los ácidos nucleicos. ....	167
6.2.1.1. Obtención de DNA plasmídico. ....	167
6.2.1.2. Clonaje de fragmentos de DNA en vectores. ....	168

6.2.1.4. Retrotranscripción.....	171
6.2.1.5. PCR Cuantitativo en tiempo real (qPCR).....	172
6.2.1.6. Clonaje de fragmentos de DNA.....	172
6.2.1.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	173
6.2.1.8. Secuenciación del DNA.....	173
6.2.1.9. Purificación de fragmentos de DNA.....	173
6.2.1.10. Precipitación de DNA.....	174
6.2.1.11. Obtención de RNA total de Arabidopsis.....	174
6.2.1.12. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	176
6.2.1.13. Análisis de RNA por <i>RNA-blot</i> .....	176
6.2.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PROTEÍNAS.....	180
6.2.2.1. Producción y purificación de proteínas.....	180
6.2.2.2. Cuantificación de proteínas.....	182
6.2.2.3. Separación electroforética de proteínas.....	182
6.2.2.4. Detección de proteínas por tinción de Coomassie.....	183
6.2.2.5. Detección proteica por Western Blot.....	184
6.2.3. Técnicas de biología molecular de interacciones.....	185
6.2.3.1. Y2H.....	185
6.2.3.2. BiFC.....	186
6.2.3.3. EMSA.....	188
6.2.4. Métodos de plantas.....	189
6.2.4.1. Esterilización y siembra de semillas.....	189
6.2.4.2. Obtención de dobles mutantes por cruzamiento.....	191
6.2.4.3. Tratamiento de plántas.....	192
6.2.4.4. Medida de fenotipos fisiológicos.....	193
6.2.4.5. Obtención de plantas transgénicas.....	193
6.2.4.6. Análisis molecular de las plantas mutantes.....	195
7. REFERENCIAS.....	197
8. ANEXO.....	213

## Abreviaturas y símbolos.

~	aproximado	<b>Hyg</b>	Higromicina
$\lambda$	longitud de onda	<b>HygR</b>	resistencia a higromicina
%	porcentaje	<b>IPTG</b>	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
<b>2,4-D</b>	ácido 2,4-dichlorofenoxiacético	<b>kDa</b>	kilodalton
<b>A</b>	adenina	<b>Km</b>	kanamicina
<b>AD</b>	dominio de activación	<b>KmR</b>	resistencia a kanamicina
<b>APB</b>	dominio de unión a phyB	<b>kV</b>	kilovolt
<b>Aux</b>	auxinas	<b>L</b>	leucina
<b>B</b>	luz azul	<b>LD</b>	día largo
<b>BC</b>	complejo Proteína/DNA	<b>long</b>	longitud
<b>BD</b>	dominio de unión a DNA	<b>M</b>	molar
<b>BEE</b>	Br-Enhanced Expression	<b>m</b>	metro
<b>BHLH</b>	basic helix-loop-helix	<b>mg</b>	miligramos
<b>BIM</b>	BES1-Interacting Myc-Like	<b>min</b>	minutos
<b>BRs</b>	brasinosteroides	<b>mL</b>	mililitros
<b>BL</b>	brasinolida	<b>mm</b>	milímetros
<b>bp</b>	pares de bases	<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>C</b>	citosina	<b>mV</b>	milivots
<b>CaMV</b>	virus del mosaico de la coliflor	<b>NASC</b>	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
<b>Cb</b>	carbenicilina	<b>ng</b>	nanogramos
<b>CbR</b>	resistencia a carbenicilina	<b>NPA</b>	ácido naftiltalamico
<b>cDNA</b>	DNA complementario	<b>Nt</b>	amino terminal
<b>CHX</b>	cicloheximida	<b>NLS</b>	señal de localización nuclear
<b>cm</b>	centrímetros	<b>O/N</b>	toda la noche
<b>cpm</b>	cuentas por minutos	<b>p</b>	promotor
<b>cry</b>	criptocromo	<b>PAR</b>	Phytochrome Rapidly Regulated
<b>Ct</b>	carboxil terminal	<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>d</b>	días	<b>Pfr</b>	forma activa de los fitocromos
<b>dBHLH</b>	dominio BHLH	<b>phot</b>	fototropinas
<b>D.O.</b>	densidad óptica	<b>phy</b>	fitocromos
<b>DEX</b>	dexametasona	<b>PIFs</b>	Phytochrome Interacting Factor
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>R</b>	luz roja
<b>dNTP</b>	desoxirribonucleicos	<b>R:FR</b>	razón entre luz roja y luz roja lejana
<b>E</b>	ácido glutámico	<b>Rc</b>	luz roja continua
<b>EBL</b>	epibrasinolida	<b>RFP</b>	proteína roja fluorescente
<b>EMSA</b>	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética	<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>EOD-FR</b>	luz roja lejana al final del día	<b>RNAi</b>	RNA interferente
<b>EOD-R</b>	luz roja al final del día	<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>FR</b>	luz roja lejano	<b>RT</b>	temperatura ambiental
<b>FRc</b>	luz roja lejana continua	<b>RT-PCR</b>	retrotranscripción por PCR
<b>FP</b>	sonda libre	<b>SAS</b>	síndrome de la huida de la sombra
<b>FT</b>	factor de transcripción	<b>SAUR</b>	Small- Auxin Up-RNA
<b>g</b>	fuerza centrífuga relativa (RCF)	<b>SD</b>	día corto
<b>G</b>	GFP	<b>seg</b>	segundos
<b>G</b>	glicina	<b>T</b>	tirosina
<b>g</b>	gramos	<b>t-DNA</b>	DNA transferencia
<b>GAs</b>	giberelinas	<b>Tm</b>	temperatura de melting
<b>GA3</b>	ácido giberélico	<b><math>\mu</math>L</b>	microlitros
<b>GFP</b>	proteína verde fluorescente	<b><math>\mu</math>m</b>	micromolar
<b>GG</b>	GUS-GFP	<b>V</b>	volts
<b>GR</b>	receptor de glucocorticoide	<b>v/v</b>	relación volúmen volúmen
<b>GUS</b>	$\beta$ -glucoronidasa	<b>W</b>	luz blanca
<b>h</b>	horas	<b>Wc</b>	luz blanca continua
<b>H, His</b>	histidina	<b>W+FR</b>	sombra simulada
<b>HD-ZIP</b>	Homeodomain Zip		

# **1. INTRODUCCIÓN.**

---



### ***1.1. La luz: importante señal en el ciclo de vida vegetal.***

Durante todo su ciclo de vida, las plantas pasan por diferentes estadios como son la germinación, la formación de la plántula, floración, generación de semillas y la senescencia. La regulación de todos estos estadios comprende la acción tanto de factores endógenos (genotipo), como el de factores externos o exógenos (ambientales). Ya que las plantas no son organismos móviles (son definidos como sésiles), necesitan percibir de manera continua las condiciones ambientales que las rodean para así ir modificando su crecimiento y desarrollo logrando así una óptima adaptación al ambiente. Esto resulta en una gran plasticidad en el desarrollo, que implica la integración de las señales provenientes del medio ambiente, permitiendo a las plantas sincronizar su crecimiento y reproducción con las variaciones diarias y transitorias, estacionales o permanentes, con el fin de competir con efectividad por los recursos esenciales con sus vecinos. Al respecto, se ha comentado que la plasticidad en el desarrollo es un proceso de supervivencia similar a lo que ocurre en los animales (Galstyan and Martinez-Garcia, 2010; Halliday and Fankhauser, 2003).

Entre los factores ambientales que afectan al desarrollo vegetal (temperatura, agua, humedad, gravedad, nutrientes, etc.) la luz es uno de los más importantes y críticos, ya que las plantas la utilizan como fuente de energía en la fotosíntesis y como señal informativa del entorno para modular su desarrollo. Para ello, las plantas superiores han desarrollado mecanismos sofisticados para detectar calidad de la luz, la dirección, la cantidad, la periodicidad, y responder a los cambios de señales de luz ambiente con el fin de maximizar la tasa de fotosíntesis, como en el fototropismo, y / o el tiempo apropiado para las transiciones del desarrollo (germinación de semillas e inducción de la floración) (Jiao et al., 2007; Lorrain et al., 2008).

## **1.2. Desarrollo vegetal: Escotomorfogénesis y Fotomorfogénesis.**

Tras la germinación de la semilla la plántula emergente presenta dos patrones de crecimiento dependiendo de la disponibilidad de luz: escotomorfogénesis (o etiolación) y la fotomorfogénesis (o desetiolación). El primero de estos patrones se da cuando las plantas crecen en situaciones de oscuridad, donde se reconocen hipocotilos alargados, cloroplastos sin diferenciarse y cotiledones sin expandir protegidos por un gancho apical, llamados en su conjunto fenotipo etiolado (Josse et al., 2008). Por el contrario, la fotomorfogénesis ocurre en presencia de luz, patrón que se caracteriza por la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la expansión de los cotiledones y maduración de los pigmentos fotosintéticos; en estas condiciones se dice que la plántula se desarrolla como desetiolada (Josse et al., 2008). La percepción de la señal lumínica induce un rápido cambio entre los dos programas, pasando de la escotomorfogénesis a la fotomorfogénesis.

Otras características de la luz (longitud de onda, intensidad, dirección, duración) indican a las plantas información de importancia para su desarrollo, como la proximidad vegetal o época de año. Todas estas características lumínicas son captadas por fotorreceptores de la planta, cuya señal se traduce luego a nivel celular modulando la diferenciación y control del crecimiento. Como consecuencia, la luz modula una variedad de procesos fotomorfogénicos en la planta como la germinación, de desetiolación de plántulas, la respuesta a la huida a la sombra e inducción de la floración (Galstyan and Martinez-Garcia, 2010).

## **1.3. Fotorreceptores: Captadores de la luz como señal.**

Como se mencionó anteriormente, las plantas perciben las diferentes características de la luz (es decir, la información que contiene) gracias a los fotorreceptores. En sistemas vegetales se conocen al menos cuatro familias de fotorreceptores relativamente bien caracterizadas: los **criptocromos**, que junto con las **fototropinas** absorben luz azul (B, del inglés Blue; 390–500 nm) y UV-

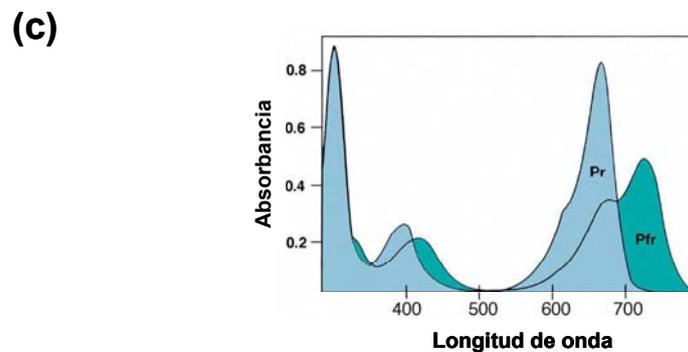
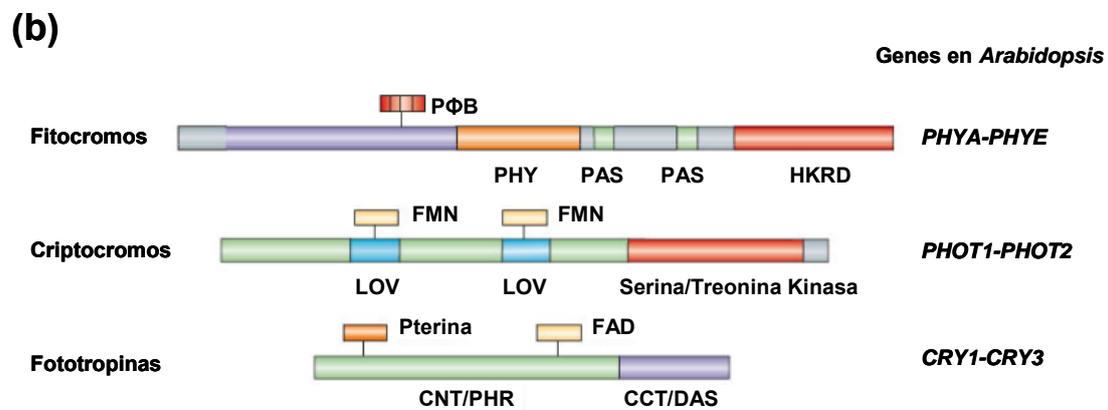
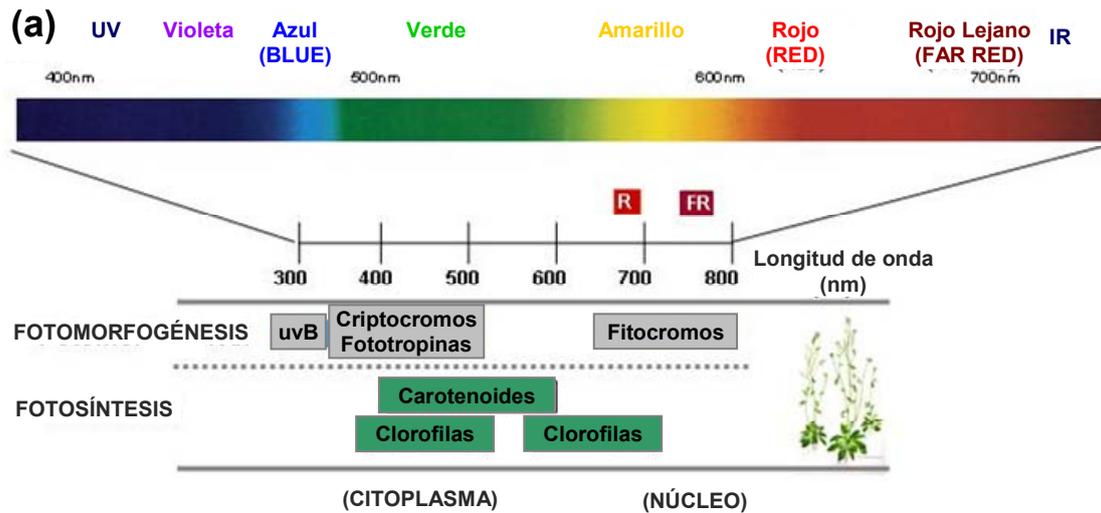
A (320–390 nm), los **fitocromos** que absorben principalmente luz roja (R, del inglés Red; 660 nm) y roja lejana (FR, del inglés Far Red; 730 nm) y recientemente un conjunto de fotorreceptores de luz azul llamados Zeitlupes (Kevei et al., 2007). También se ha identificado molecularmente un receptor de UV-B (Rizzini et al., 2011). Estos fotorreceptores regulan de manera conjunta la fotomorfogénesis, por medio de complejas redes transcripcionales reguladoras a partir de la percepción de la cantidad y calidad de luz (**Figura 1a**).

En general, los fotorreceptores son cromoproteínas compuesta de una apoproteína unida a una variedad de cromóforos (Rockwell et al., 2006). La característica del espectro de absorción este determinado por el carácter químico del cromóforo y de la apoproteína. El conjunto formado por la apoproteína y el cromóforo forman la holoproteína (Rockwell et al., 2006).

Al percibir y absorber la luz, diferentes aspectos de la actividad de estos receptores se ve afectada, tales como sus propiedades físico-químicas y/o la estabilidad de la parte proteica, lo que nivel funcional puede alterar su localización celular, su capacidad de interacción con otras proteínas y/o el efecto sobre la expresión de genes concretos (Bae and Choi, 2008).

### **1.3.1. Criptocromos.**

Los criptocromos (crys) son receptores lumínicos que absorben la luz UV-A (~ 320-400 nm) y B (~ 400-500 nm). A nivel funcional están implicados en respuestas reguladas por luz B, como la desetiología, floración dependiente del fotoperiodo y el reajuste del reloj circadiano. A nivel génico los crys se codifican por los genes *CRY1*, *CRY2* y *CRY3*. A nivel estructural los crys contienen dos dominios. El dominio N-terminal PHR (del inglés PHOTOLYASE-HOMOLOGOUS REGION), al cual se unen no covalentemente dos cromóforos, el FAD (del inglés FLAVIN ADENINE DINUCLEOTIDE) y una pterina o deazaflavina (bases nitrogenadas derivados de la pteridina), que proporciona la capacidad de detección de luz. El otro dominio es el C-terminal DAS (del inglés DQXVP-ACIDIC-STAES), ausente en cry3. Este dominio tiene la capacidad de transducir las señales percibidas por dominio PHR y es importante para el tráfico nuclear/citosol y para las interacciones proteína-proteína (**Figura 1b**).



**Figura 1. Espectro de la radiación lumínica con los principales fotorreceptores vegetales. (a)** Representación del espectro de luz y de los fotorreceptores que captan las diferentes longitudes de onda que lo componen, así como el proceso en el que están implicados (fotomorfogénesis y fotosíntesis). **(b)** Esquema de las estructuras de los fotorreceptores en *Arabidopsis*. Esquema adaptado de Jiao et al., 2007). **(c)** Espectro de absorción de las dos isoformas de los fitocromos: la Pr presenta un máximo de absorción a 660 nm mientras que el de la Pfr es a 770 nm. Esquema adaptado de Jiao et al., 2007).

Fisiológicamente el criptocromo cry1 está implicado en la respuesta de desetiación a altas intensidad de luz B, mientras que cry2 a bajas intensidades de luz (**Figura 2**). Sobre cry3 es poco lo que sabe en cuanto a su función.

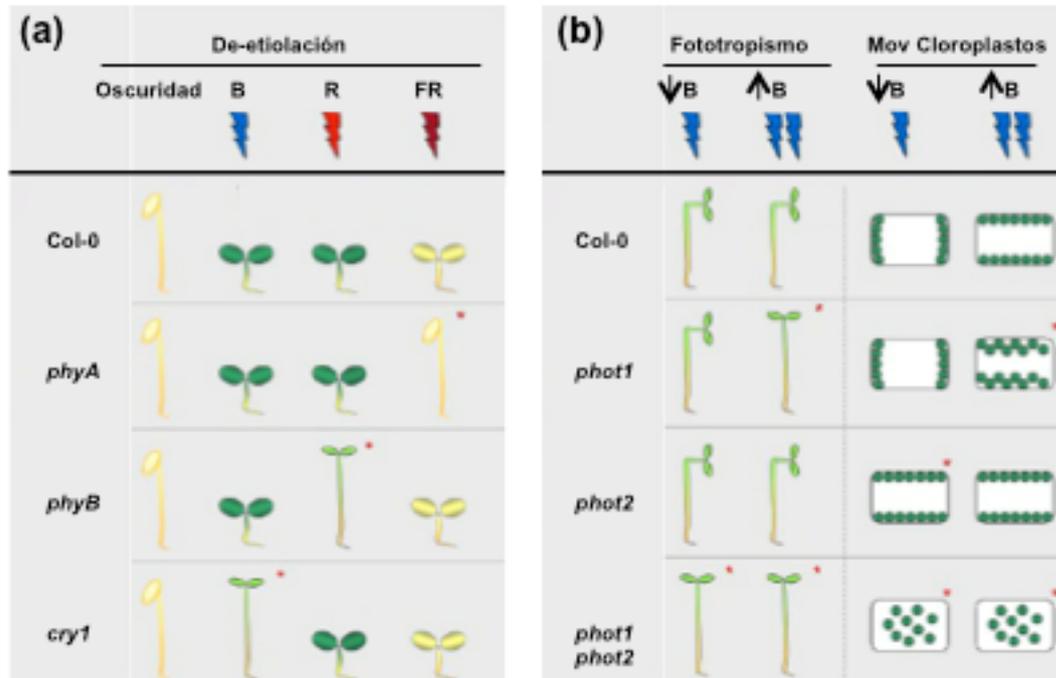
Sobre la estabilidad lumínica de los criptocromos, esta varía al igual como se enseñará mas adelante para los fitocromos. Cry1 es fotoestable (como phyB-phyE), mientras que cry2 es fotolábil (como phyA). Además de la estabilidad, la condición lumínica es partícipe de la localización de estos receptores. Cry2 esta constitutivamente localizado en el núcleo, mientras que cry1 es nuclear en oscuridad, ubicándose en el citoplasma en luz. Cry3, que carece del dominio C-terminal, posee un péptido señal que lo ubica en cloroplastos y las mitocondrias (Li and Yang, 2007; Lin and Shalitin, 2003; Yanovsky and Kay, 2003).

La secuencia de aminoácidos del dominio PHR comparte similitudes (en la secuencia proteica con las fotoliasas, una clase de enzimas inducidas por luz UV-A/B que reparan el DNA dañado por UV-B. Esto sugirió que quizás los crys pueden unirse a la cromatina, actividad que sólo se ha demostrado para cry3, pero no se ha demostrado si poseen capacidad reparadora como las fotoliasas (Chen et al., 2004; Galstyan and Martinez-Garcia, 2010; Kleine et al., 2003).

En relación a los receptores de luz UV-B, lo que se sabe es que existen los receptores UVBR8 que como se comentará más adelante están implicados en respuesta fotomorfogénica (Rizzini et al., 2011).

### **1.3.2. Fototropinas y otras proteínas con dominio LOV.**

Las fototropinas (phot) son fotorreceptores identificados como reguladores específicos de respuesta a luz B, como fototropismo, rápida inhibición de la elongación del hipocotilo, apertura estomática y movimientos cloroplastídicos (Boccalandro et al., 2007; Kang et al., 2008). En Arabidopsis estos receptores se codifican por los genes *PHOT1* y *PHOT2*, que trabajan a la par para regular las respuestas antes mencionadas. Estructuralmente estos fotorreceptores poseen en el dominio N-terminal que dos subdominios LOV (del



**Figura 2. Esquema de los fenotipos de diferentes mutantes de fotorreceptores. (a)** Fenotipo de plántulas Col-0, *phyA*, *phyB* y *cry1* crecidos en oscuridad y luz monocromática (B, R y FR). **(b)** Respuesta fototrópica hacia luz B (alta y baja intensidad) y migración de cloroplasto en células del mesófilo de hojas de plántulas Col-0, *phot1*, *phot2* y *phot1 phot2*. Los asteriscos indican diferencias de fenotipo comparando el control Col-0 y los mutantes. Adaptado de Galst'yan and Martínez-García, 2010).

inglés LIGHT, OXIGEN, VOLTAGE) y un dominio C-terminal con similitud a Ser/Thr quinasa. En los subdominios LOV se une de manera no covalente el cromóforo mononucleótido flavina (FMN) y pueden sufrir autofosforilación dependiente de luz B (**Figura 1b**). Las photos son proteínas asociadas a membrana. A nivel fisiológico phot1 regula respuestas a baja intensidad de luz B, en cambio phot2 lo hace a altas intensidades (**Figura 2**). En lo que respecta a phot1, luego de su activación lumínica, se libera al citoplasma. La expresión de *PHOT2* se induce por la luz, mientras que los niveles proteicos de phot1 disminuyen en condiciones de larga exposición a la luz. Estas características explicarían la diferencia de actividad entre ambas photos bajo diferentes intensidad de luz (Briggs and Christie, 2002; Tokutomi et al., 2008).

Se han identificados otras proteínas con dominios LOV adyacentes a motivos F-box y repeticiones Kelch. Una de estas proteínas son las ZTL (del inglés ZEITLUPES) (**Figura 1b**). Genéticamente se ha mostrado que tendrían una función controlando el reloj circadiano así como de la floración. Debido a la

falta de evidencia funcional, estructuralmente se han clasificados como una nueva clase de fotorreceptores.

### 1.3.3. Fitocromos.

Los fitocromos (phys) son cromoproteínas diméricas solubles de una masa molecular de aproximadamente 250 kDa. Cada subunidad está compuesta por una cadena polipeptídica denominada apoproteína, a la que se une covalentemente un cromóforo (pigmento). Todos los phys tienen el mismo cromóforo pero se diferencian en la apoproteína.

Cada subunidad del dímero puede dividirse en un dominio N-terminal y en un dominio C-terminal (**Figura 1b**). El dominio N-terminal se une covalentemente al cromóforo, el que le confiere la capacidad de absorber los dos tipos de luz, por lo que posee la capacidad fotosensorial. Con respecto al cromóforo, este corresponde a un tetrapirrol lineal conocido como fitocromobilina. Puede encontrarse en una configuración *cis* o *trans* dependiendo del estado del fitocromo. El C-terminal posee dos dominios PAS y dos dominios HKRD (del inglés HIS KINASE RELATED DOMAIN) y le otorga la capacidad de dimerizar y migrar al núcleo. Se considera que este último dominio proporciona la capacidad reguladora a los fitocromos.

Estudios fisiológicos, bioquímicos e inmunológicos realizados principalmente en plántulas etioladas (crecidas en oscuridad) demostraron la existencia de dos tipos principales de fitocromos: el tipo I, que predomina en las plántulas etioladas y se degrada por la luz (fotolábil) y el tipo II, que predomina en plantas crecidas en luz y es fotoestable. Posteriormente, estudios genéticos y moleculares demostraron que la apoproteína de los fitocromos estaba codificada por una familia de genes divergentes. En *Arabidopsis thaliana* la familia consta de 5 genes (*PHYA* a *PHYE*), que codifican las apoproteínas respectivas (*PHYA* a *PHYE*), que al unirse a los cromóforos forman las holoproteínas fotoactivas (*phyA* a *phyE*). El *phyA*, muy abundante en plántulas etioladas y que prácticamente desaparece cuando la planta se expone a luz R o blanca, es de tipo I (fotolábil). En cambio, los otros se consideran de tipo II,

pese a que los phyB y phyC no son completamente fotoestables (Sharrock and Clack, 2004).

Los fitocromos existen en 2 formas fotointerconvertibles, la Pr, y la Pfr. Los fitocromos se sintetizan en la forma inactiva Pr, que tiene un máximo de absorción en luz R y se localiza en el citoplasma. Tras la percepción y absorción de luz, la forma Pr se convierte en la forma biológicamente activa Pfr, que presenta un máximo de absorción en luz FR y se transloca al núcleo para ejercer su función. A su vez, la forma Pfr puede absorber luz y convertirse en la forma Pr (Nagy and Schafer, 2002) (**Figura 1b**). Ambas formas, tienen espectros de absorción parcialmente solapados (**Figura 1c**), por lo que también pueden absorber luz UV, B e infrarroja cercana (800 nm). Como consecuencia de este solapamiento se establece un equilibrio dinámico entre las dos formas denominado fotoequilibrio ( $\Phi = [Pfr]/[P_{total}]$ , siendo  $P_{total} = Pfr + Pr$ ). Es por esto que en una planta crecida en luz coexisten Pr y Pfr en un equilibrio que refleja las proporciones relativas de R y FR de su ambiente lumínico.

Las respuestas reguladas por los fitocromos se han clasificado de acuerdo a la cantidad de energía de radiación requerida para obtener la respuesta:

- i) Respuestas de alta irradiancia de luz (HIR, del inglés HIGH IRRADIANCE RESPONSE): necesitan iluminación intermitente prolongada o de alta frecuencia.
- ii) Respuestas de baja fluencia de luz (LFR, del inglés LOW FLUENCE RESPONSE): son las respuestas reversibles R/FR.
- iii) Respuestas de muy baja fluencia de luz (VLFR, del inglés VERY LOW FLUENCE RESPONSE): sensibles a una amplia longitud de ondas (300 hasta 780 nm).

Los fitocromos son responsables de varias respuestas fisiológicas en respuesta a luz R y FR, incluyendo germinación, desetiolación, floración y respuesta a sombra. Como se observa en la **Figura 2**, phyA sería responsable de respuestas en luz FR, y phyB de las de luz R.

La identificación de mutantes nulos en Arabidopsis, deficiente en cada uno de los cinco miembros de la familia de fitocromos, ha permitido dilucidar el rol que podrían tener cada uno de ellos en diferentes procesos fisiológicos (Franklin and Quail, 2010) (**Tabla 1**).

Función	Fitocromos
Promoción de la germinación de la semilla.	phyA, phyB, phyE
Regulación de la desetiación de la plántula.	phyA, phyB, phyC, phyD, phyE
Regulación de la randomización del hipocotilo.	phyA, phyB
Regulación de la curvatura gravitrópica de la raíz.	phyB
Supresión del crecimiento del pelo radicular.	phyB
Regulación de la arquitectura foliar.	phyA, phyB, phyC, phyD, phyE
Supresión de la elongación internodal.	phyA, phyB, phyE
Supresión de la huída a la sombra.	phyB, phyD, phyE
Antagonismo de la huída a la sombra.	phyA
Regulación del índice estomático.	phyB
Incorporación del reloj circadiano.	phyA, phyB, phyD, phyE
Percepción del fotoperíodo.	phyA, phyC
Represión de la floración	phyB, phyC, phyD, phyE

Tabla 1. Resumen de las funciones de los fitocromos, a partir de los análisis hechos en mutantes de *Arabidopsis*. Adaptado de Franklin KA y Quail PH, 2010).

En contraste con otros fitocromos, phyA media exclusivamente las respuesta a VLFR, las cuales son generadas con una reducida cantidad de luz (Shinomura et al., 1996), y respuesta a alta irradiancia de FR (FR-HIR, del inglés FR HIGH IRRADIANCE RESPONSE), la cual es observada bajo continua luz FR (Nagatani et al., 1993; Parks and Quail, 1993; Whitelam et al., 1993). PhyB que es el responsable de mediar las respuestas a respuesta a alta irradiancia de R (R-HIR, del inglés R HIGH IRRADIANCE RESPONSE) y de clásica respuesta reversible R:FR de baja fluencia durante fotomorfogénesis (Mancinelli, 1994; Shinomura et al., 1996). Además que la ausencia de todos ellos refuerza el rol importante que tienen con la señal de la fotomorfogénesis y su relación con el proceso que controla el desarrollo vegetal (Strasser et al., 2010).

## **1.4. Transducción de señal de los fotorreceptores.**

Podemos definir como transducción de señales, al conjunto de procesos que ocurren desde la percepción de una señal biológica o física hasta la aparición de un cambio en el desarrollo o crecimiento, pasando por cambios en la expresión génica (Quail, 2002b). La luz modula la acción de los fotorreceptores induciendo cambios en la su localización y/o abundancia provocando que, como es el caso de phy (y cry) se movilicen al núcleo para regular la expresión génica de dianas directas implicadas en la activación de la red de transducción de señales que regulan las fotorrespuestas.

### **1.4.1. Componentes de la red de transducción de señales que regulan las fotorrespuestas.**

Mediante el uso de cribados genéticos basándose en el proceso de desetiación, es decir plántulas caracterizadas por la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la expansión de los cotiledones, entre otros, se han podido identificar dos clases principales de mutantes que sugieren cómo se organiza esta ruta de transducción:

**(i) Mutantes que se desetiolen en oscuridad.** Los mutantes identificados en este grupo han sido *cop* (del inglés *constitutive photomorphogenic*), *det* (del inglés *de-etiolated*), *fus* (del latín *fusca*, referido al color púrpura oscuro, visualizado como carácter en las semillas de este mutante), y se caracterizan por tener un fenotipo de desetiación en completa oscuridad como si creciesen en luz. Debido a la pleiotropía que presentan en mayor o menor grado los mutantes recesivos *cop/det/fus*, se ha postulado su función como reguladores negativos río debajo de la ruta en donde convergen crys y phys,. Además su rol sería de reguladores negativos de la fotomorfogénesis (Liu et al., 2011; Ma et al., 2003; Schwechheimer and Deng, 2000).

**(ii) Mutantes con desarrollo normal en oscuridad, pero con respuestas alteradas a diferentes longitudes de onda.** Dicha clasificación fue hecha de acuerdo a la longitud de onda a la cual son incapaces de percibir estos

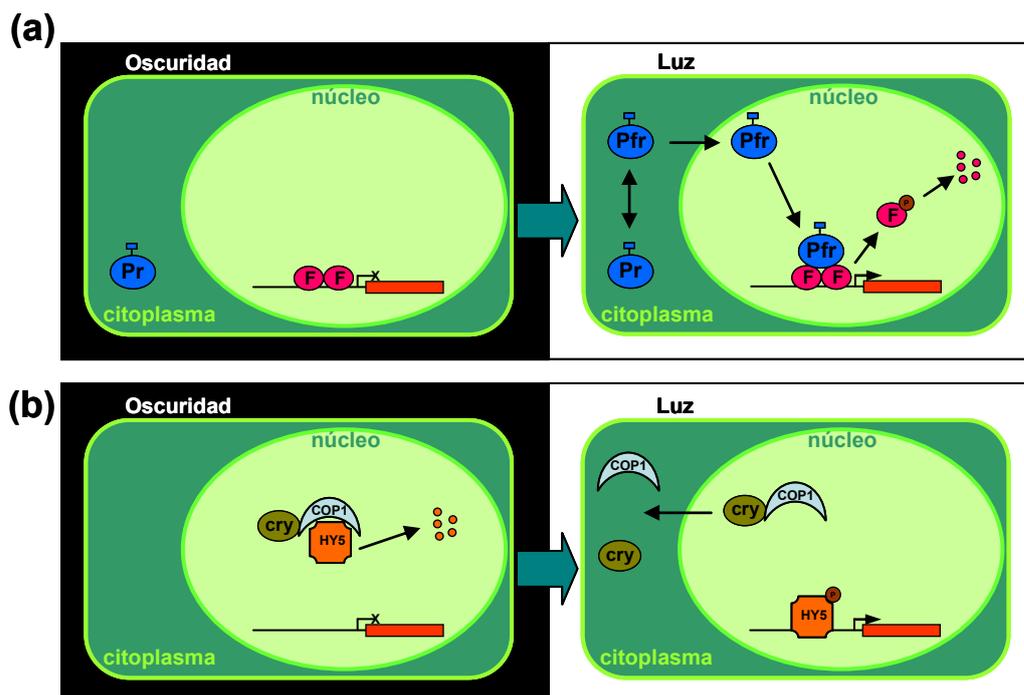
mutante. Se caracterizan por tener un fenotipo normal en oscuridad pero presentan respuestas alteradas a diferentes longitudes de onda. El mutante más caracterizado de este grupo es *hy5* (del inglés *long hypocotyl 5*). En esta clase se encuentra un primer grupo de componentes específicos de la señalización del phyA o del phyB, o de *phys vs crys*. El mutante *hy5* (del inglés *long hypocotyl 5*), que presenta hiposensibilidad a luz B, R y FR. *HY5* codifica un factor de transcripción de tipo bZIP, cuya acción se reprime por la degradación mediada por COP1. Como componente involucrado en las respuestas a luz B, R y FR, se cree que *HY5* actúa río abajo de la convergencia entre señales de los múltiples fotorreceptores y otras señales de desarrollo, junto con COP/DET/FUS (Quail, 2002b).

En relación a componentes de la vía de señalización de criptocromos, se ha identificado un regulador positivo de esta vía, *PP7* (del inglés *PROTEIN PHOSPHATASE 7*). Además se han identificados algunos reguladores negativos, como *HFR1* (del inglés *LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1*), *SUB1* (del inglés *SHORT UNDER BLUE LIGHT 1*) *HYH* (del inglés *HY5 HOMOLOG*) y *HY5*, comentado anteriormente. Estos factores también han sido identificados como componentes de la señalización de phyA (Duek and Fankhauser, 2003; Galstyan and Martinez-Garcia, 2010; Li and Yang, 2007; Schwechheimer and Deng, 2000). Un ejemplo de señalización de cry, es la que propone que *cry1* regula la estabilidad de *HY5* dependiente de luz y la formación de un complejo de regulación con COP1, dependiente de luz (**Figura 3b**).

En lo que respecta a la caracterización de la señalización medida por phot1, la información es escasa identificándose sólo dos componentes que interactúan con phot1 a nivel de membrana plasmática: *NPH3* (del inglés *NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3*) y *RPT2* (del inglés *ROOT PHOTOTROPISM 2*). Las interacciones formadas entre phot1 con *NPH3* y *RPT2* han sido implicadas en la regulación de la inhibición de la hipocotilo dependiente de phot y de la apertura estomática, respectivamente (Pedmale and Liscum, 2007). Si bien *NPH3* y *RPT2* forman complejos con phot1 con una finalidad funcional, se ha descrito que sólo *NPH3* es esencial para todas las respuestas fototrópicas dependientes de phot1 (Kang et al., 2008; Pedmale and Liscum, 2007).

Las respuestas a UV-B median las respuestas fotomorfogénicas como son la inhibición de la elongación del hipocotilo y una regulación transcripcional

de la expresión génica. La señalización fotomorfogénica es captada por un receptor de UV-B llamado UVR8 (Rizzini et al., 2011). UVR8 y COP1 son requeridos para la inducción en la expresión de *HY5*, el cual tiene un papel central en la regulación de genes involucrados en las respuestas fotomorfogénicas a UV-B (Favory et al., 2009; Jenkins, 2009). Otro componente específico involucrado en la transducción de señal UV-B es ULI3 (del inglés UV-B LIGHT 3) (Suesslin and Frohnmeyer, 2003).



**Figura 3. Modelo simplificado que resume los diferentes mecanismos de la acción de fotoreceptores.** Mecanismo que involucra la señalización por fitocromos (a) y por criptocromos (b). (a) Se ejemplifica la activación de los fitocromos dependiente de la luz y como se ve involucrado en la interacción con factores de transcripción (F) y la regulación génica. (b) Se ejemplifica la regulación de la transcripción dependiente de luz por parte del complejo cry1/COP1/HY5. Adaptado de Galstyan and Martínez-García, 2010).

## 1.4.2. Señalización de los fitocromos.

### 1.4.2.1. Componentes de la señalización de phyA.

Los mutantes que se desetiolan en luz FR anómalamente (es decir, son hipo o hipersensibles) se consideran como mutantes de la señalización de phyA, ya que es el único fotoreceptor que controla esta respuesta a esta longitud de onda (**Figura 4**) a nivel de establecimiento de las plántulas. De esta forma se han identificado FHY1 (del inglés FAR-RED ELONGATED

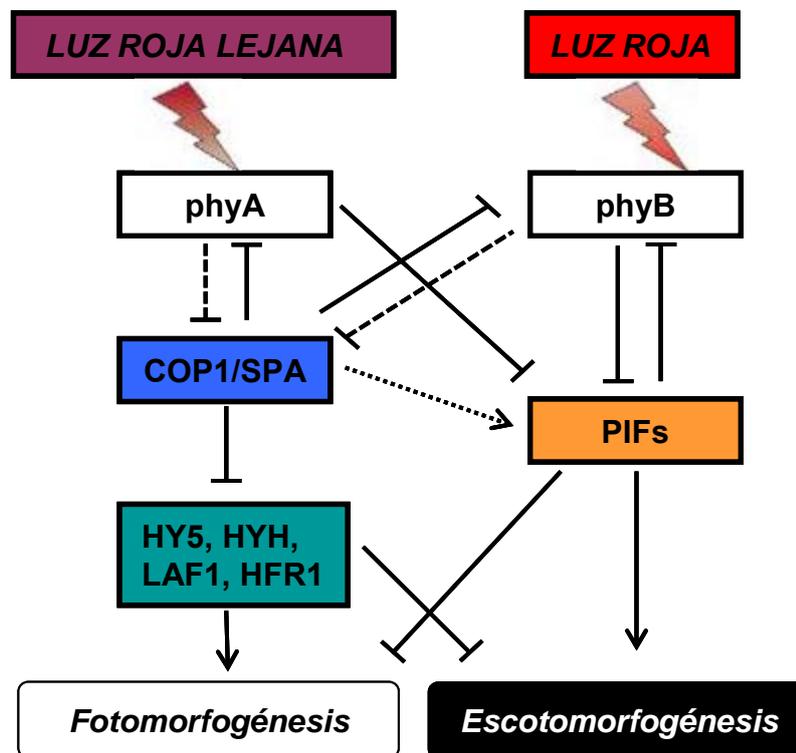
HYPOCOTYL 1), su parólogo FHL (del inglés FHY1-LIKE), FHY3 y FAR1 (del inglés FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1). El análisis funcional de mutantes de estos genes, ha mostrado un rol de FHY1 y FHL en la localización nuclear de la forma activa de phyA (PfrA). La captación de luz por parte de phyA, permite que pase a su forma activa la cual es capaz de interactuar con FHL y FHY en el citoplasma. La señal nuclear que presentan estos factores permite la entrada del complejo al núcleo. Además los factores FHY3 y FAR1 permiten la acumulación de PfrA a nivel nuclear, controlando la expresión de *FHY1* y *FHL* (Hiltbrunner et al., 2006). Recientemente se ha visto que la fosforilación de FHY1 es el mecanismo clave que define la dinámica de señalización de phyA en condiciones de luz R y FR en Arabidopsis (Chen et al., 2012).

Otros factores que se han mostrado como parte de la señalización de phyA es LAF1 (del inglés LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1) que codifica una proteína MYB, y HFR1 (ya mencionado anteriormente) que codifica una BHLH atípica (del inglés BASIC-HELIX-LOOP-HELIX) la cual está relacionada filogenéticamente con otra proteína BHLH, PIF3 (del inglés PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3) (Bae and Choi, 2008; Boccalandro et al., 2007). Finalmente se ha especulado que el factor SPA1 (del inglés SUPPRESSOR OF PHYA 1) también sería parte de esta vía de señalización. Se ha propuesto que el complejo formado entre COP1/SPA1 podría interactuar directamente con phyA para regular su abundancia y localización subcelular, actuando como un represor de señalización del phyA (Saijo et al., 2008).

#### **1.4.2.2. Componentes de la señalización de phyB.**

Para poder identificar componentes de la señalización de este fitocromo se han encontrado mutantes con la desetiolación en luz R alterada, ya que phyB es el fitocromo principal que controla este proceso en esta longitud de onda (**Figura 4**). No obstante, la aproximación que ha resultado más exitosa ha sido la combinación de experimentos de genética reversa y ensayos de interacción por el sistema de doble híbrido (Y2H, del inglés YEAST TWO HYBRID), que han permitido identificar nuevos componentes de la señalización. Mediante esta

estrategia se han identificado factores de transcripción como los PIFs y PILs (de inglés PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR-LIKE).



**Figura 4. Modelo de vías de señalización de phyA y phyB.** Se muestra que phyA es el principal fotorreceptor de la respuesta a FR mientras que phyB lo es para R. Ambos receptores están involucrados en los procesos morfológicos de a plantas activando o reprimiendo directa o indirectamente otros factores de sus vías reguladora. Adaptado de Li et al, 2011 Arabidopsis book).

Uno de los PIFs más estudiados es PIF3. Como se comentó previamente es un factor de transcripción del tipo BHLH que se une preferentemente a las formas activas de phyA (PfrA) y phyB (PfrB) (Ni et al., 1998). Se ha visto que *in vitro* PfrB puede interactuar con PIF3 para unirse a DNA, lo cual sugiere que hay una regulación directa de la expresión génica vía fitocromos en respuesta a luz R y FR (Martinez-Garcia et al., 2000a) (**Figura 3a**). Si bien no hay suficientes datos que avalen este mecanismo, ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP, del inglés CHROMATIN IMMUNOPRECIPITATION) han identificado algunos genes que son dianas directas de PIF3 (Shin et al., 2007). Además, también se ha visto que tras la percepción de luz los PIFs rápidamente se induce la fosforilación de los PIFs lo cual provoca la interacción y subsecuente degradación vía proteosoma 26S (Al-

Sady, et al. 2006, Lorrain, et al. 2008, Nozue, et al. 2007, Oh, et al. 2006, Park, et al. 2004, Shen, et al. 2005).

A nivel de mecanismo de transducción de señales, se ha visto que los phys pueden fosforilarse. La fosforilación y desfosforilación de los phys puede tener un rol importante en la regulación de la respuesta de crecimiento, modulando la localización subcelular de los fotorreceptores, su estabilidad y/o su afinidad por otros componentes de la cadena de la transducción de la señal. La actividad kinasa de los phys fue sugerida después de la identificación e varios sustratos como PKS1 (del inglés PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE\_1 (Fankhauser et al., 1999), Aux/IAA (Colon-Carmona et al., 2000) y crys (Ahmad and Cashmore, 1996). En ese contexto, se ha sugerido que la fosforilación de fitocromos podría afectar la interacción proteína-proteína entre fitocromo y sus putativos componentes de la señalización (Kim et al., 2004).

### **1.4.3. Respuestas fisiológicas reguladas por fitocromos.**

Los fitocromos pueden participar en conjunto o independientemente en la regulación de diferentes procesos a lo largo del ciclo de vida vegetal asociados a luz. Puntualmente mediante mutantes deficientes en uno o más de estos fotorreceptores se ha podido ver su implicancia en procesos como la germinación, desetiación, fototropismo, floración, y el síndrome de huida a la sombra (**Tabla 1**).

- **Germinación:** La participación de los fitocromos en este proceso radica en que la germinación es un proceso dependiente de la luz, mediado principalmente por phyA y phyB. En situaciones donde tenemos condiciones lumínicas como VLFR o HIR, la germinación esta inducida por phyA. Por otra parte en condiciones de LFR la germinación esta controlada por phyB. También se ha implicado en este proceso al phyE (Botto et al., 1996; Jiao et al., 2007).

- **Desetiación:** El análisis de mutantes de fitocromos crecidos en diferentes condiciones de luz, ha permitido caracterizar la función de cada uno de ellos.

Por ejemplos mutantes de *phyA* no muestran fenotipos alterados al crecerlos en luz blanca (W, del inglés WHITE LIGHT) o R, mientras que al crecerlos en luz FR presentan un fenotipo escotomorfogénico, confirmando que *phyA* es responsable de percibir y mediar varias respuestas a la luz FR (Matsushita et al., 2003; Parks and Quail, 1993; Whitelam et al., 1993) (Figura 12.A). Por otro lado *phyB* es el fotorreceptor predominante en regular las respuestas de desetiación en W y R (**Figura 2.a**). Mutantes de *phyC* muestran una pérdida parcial de sensibilidad a la luz R, con hipocotilo más largos y cotiledones más pequeños que lo normal, indicando su función en la regulación de la desetiación en R (Franklin et al., 2003; Monte et al., 2003). Esta función se debería a la formación de heterodimeros con *phyB* (Clack et al., 2009). En luz B los fitocromos co-actúan con fotorreceptores de luz B/UV-B para regular la desetiación de las plántulas (Franklin and Quail, 2010).

- **Fototropismo:** Si bien en *Arabidopsis* esta respuesta esta controlada principalmente por fototropinas, también ha sido descrita la contribución de los fitocromos en la regulación de este proceso (Jiao et al., 2007).

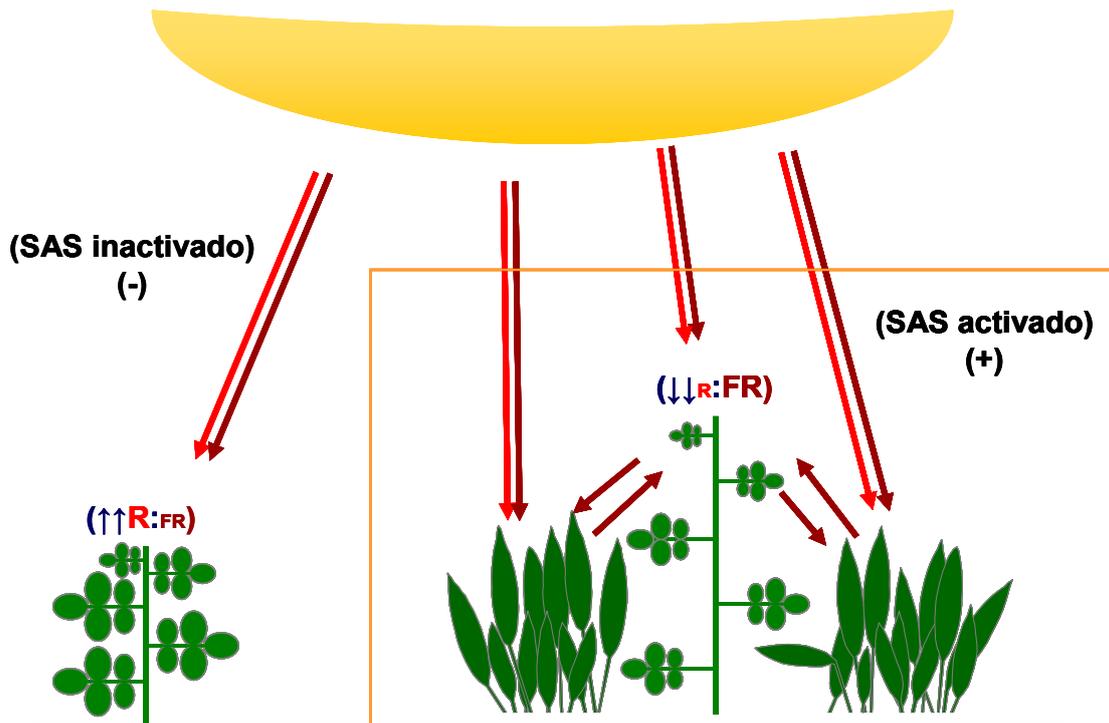
- **Floración:** En *Arabidopsis* este proceso se ve acelerado en fotoperíodos de día largo (>14h de luz), lo que ha llevado a definir a esta planta como de día largo. El análisis de mutantes de *phyA* (como de *cry2*) en el tiempo de floración, han mostrado el rol de este fitocromo en la percepción del fotoperiodo (Reed et al., 1994). Además esto se reafirma con lo observado en la floración tardía en mutante de *phyA* crecidos en fotoperiodo de día largo (Neff and Chory, 1998).

Los fitocromos *phyB*, *phyD* y *phyE* actúan de manera redundante reprimiendo la floración en condiciones de una elevada razón R:FR, a través de la represión de la expresión del integrador floral FT (del inglés FLOWERIN TIME) (Halliday and Fankhauser, 2003). Mutantes *phyC* crecidos en día corto muestran una ligera aceleración en la floración, sugiriendo un papel de este fitocromo en la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis* (Monte et al., 2003).

### **1.5. El síndrome de huida a la sombra: un mecanismo adaptativo a la competición por luz impuesto por la proximidad vegetal.**

Cuando una planta crece en baja densidad vegetal la luz solar que recibe presenta una razón R:FR alta. La proximidad de vegetación refleja específicamente luz FR. Esto provoca el enriquecimiento selectivo en esta longitud de onda de la luz percibida por la planta, con la consiguiente reducción de la proporción R:FR (**Figura 5**). La luz de baja razón R:FR es percibida por los fitocromos e interpretada como una señal de la proximidad vegetal, y pone en marcha una serie de respuestas conocidas conjuntamente como el síndrome de huida de la sombra (SAS, del inglés SHADE AVOIDANCE SYNDROME). Las respuestas del SAS se caracterizan por un mayor crecimiento longitudinal, un cambio en la expansión foliar (normalmente una menor expansión de la lámina foliar y mayor alargamiento de los pecíolos), una menor ramificación (por el reforzamiento de la dominancia apical) y, por último, una reducción del tiempo de floración. En condiciones naturales, este fenómeno permite a las plantas anticiparse al sombreado vegetal y/o finalmente asegurar la producción de semillas (**Figura 6**). En condiciones de alta densidad propias de los monocultivos, la puesta en marcha del SAS puede ser perjudicial para la agricultura debido al redireccionamiento de los recursos de la planta focalizados en el crecimiento longitudinal (p.ej., tallos), en un esfuerzo de la planta por optimizar la captación de la luz, a expensas de los órganos de interés agronómico (como las hojas, semillas u otros órganos de reserva), de manera que se reduciría la productividad agrícola (Quail, 2002a; Smith and Whitelam, 1997).

Para estudiar los efectos de la proximidad vegetal, en el laboratorio se incrementa la cantidad de la luz FR (730nm) manteniendo constante la cantidad de radiación fotosintéticamente activa (RFA=400-700 nm). Esto se consigue utilizando tubos de luz blanca (W) fluorescente, que aportan RFA constante (luz blanca de razón R:FR alta), y enriqueciéndola con luz FR emitida por una fuente casi monocromática (tipo LED), simulando así las condiciones de proximidad vegetal (luz blanca de razón R:FR baja) (Smith, 1982b). Estas condiciones las denominaremos como **sombra simulada**.

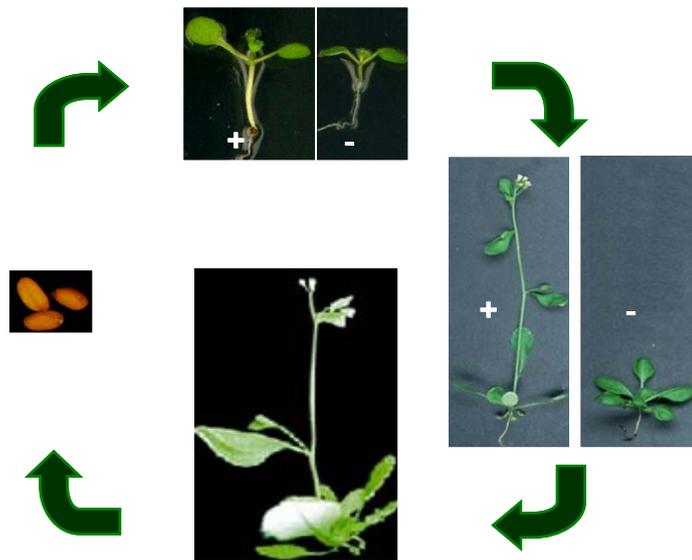


**Figura 5. El síndrome de la huida de la sombra (SAS).** Esquema que representa las condiciones naturales que alteran la razón R:FR para desencadenar el SAS. La planta de la izquierda recibe luz con una alta razón R:FR y en estas condiciones el SAS está inactivado. La planta de la derecha recibe la misma luz que la planta anterior pero además enriquecida en luz FR reflejada de las plantas vecinas dando una razón final de R:FR baja, condición para la activación de SAS.

Los cambios en la razón R:FR son percibidos rápidamente por los fitocromos, afectando directamente el equilibrio entre sus formas inactivas (Pr) y activas (Pfr). Si bien el principal fitocromo involucrado en el SAS es phyB, análisis fisiológicos y moleculares han mostrado la participación de manera redundante de los otros fitocromos con phyB en algunos aspectos de esta respuesta, como el tiempo de floración (phyD, phyE), elongación del peciolo (phyD, phyE) y elongación de los entrenudos entre las hojas de la roseta (phyE). Además phyA y phyB tienen un efecto antagonista: mientras que phyA inhibe fuertemente la respuesta a SAS en condiciones de baja razón R:FR, phyB inhibe la respuesta en condiciones de alta razón R:FR (Bae and Choi, 2008; Smith and Whitelam, 1997).

### 1.5.1. Componentes moleculares del SAS.

En condiciones de oscuridad phyA y phyB se encuentran en el citoplasma en su forma inactiva (PrA y PrB), hasta el momento de su activación por luz (PfrA y PfrB), en que se traslocan al núcleo (Quail, 2002a). En el caso de phyB se requiere su activación y traslocación para la señalización que desencadenará (Huq et al., 2003). Como se dijo anteriormente, en el núcleo PfrB se une a PIF3 formando un complejo que se une a DNA específicamente a un motivo G-box, ubicado en promotores de genes que regulan directamente en respuesta a los cambios de luz (Martinez-Garcia et al., 2000a). Para reforzar esta posibilidad, se ha visto que PIF3 se une a promotores de genes regulados por luz como CHS, implicados en la biosíntesis de antocianinas, aunque dicha unión parece ser independiente de la condición lumínica (Shin et al., 2007), lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales por lo cuales los fitocromos regulan cambios en la expresión génica regulado por luz medida por PIF3 (Al-Sady et al., 2008).

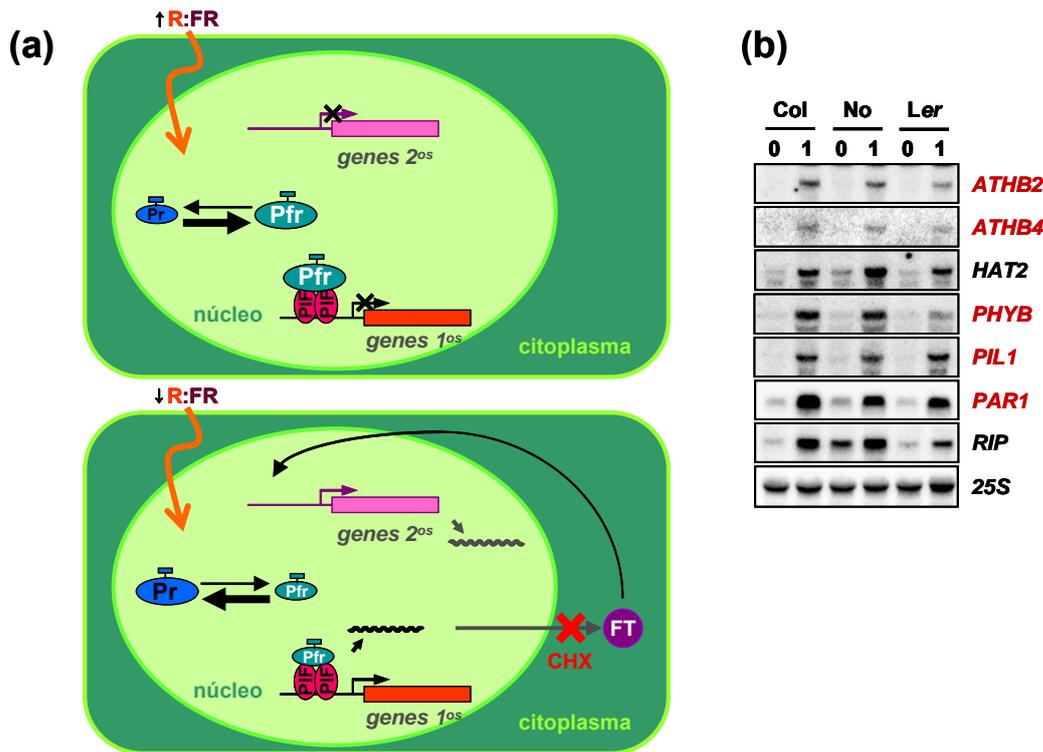


**Figura 6. Alteraciones morfológicas producidas por el SAS durante el ciclo de vida *Arabidopsis*.** Cuando la planta crece en condiciones de sombra (+), hay un cambio en el patrón de crecimiento y desarrollo como es la represión de la germinación, alargamiento del hipocotilo y pecíolos, rápida floración y formación de frutos, entre otros.

La percepción de las plantas vecinas por los fitocromos provoca cambios rápidos y reversibles en la expresión de los genes denominados *PAR* (del inglés *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED*) (Carabelli et al., 2007; Devlin et al., 2003; Roig-Villanova et al., 2007; Roig-Villanova et al., 2006; Salter et al., 2003; Sessa et al., 2005) (**Figura 7a**). Estos cambios inician una red transcripcional que es probablemente dinámica y está afectada por factores endógenos (estadio de desarrollo, niveles hormonales) y exógenos (temperatura, irradiancia, reloj circadiano), que explicarían la complejidad en la respuesta del SAS. La rapidez de los cambios en la expresión génica inducida por la sombra simulada es consistente con la hipótesis de que los fitocromos transmiten la señal rápidamente a los promotores de los genes fotorregulados en otros procesos como la desetiología (Martinez-Garcia et al., 2000a; Quail, 2002a)

Entre los genes *PAR* analizados, algunos codifican proteínas que pertenecen a factores de transcripción de la subfamilia II de las HD-Zip, como son *ATHB2/HAT4* (a partir de ahora *ATHB2*), *ATHB4*, *HAT1*, *HAT2* y *HAT3*. Otro grupo integrante de estos genes *PAR* son *HFR1*, *PIL1*, *PIL2*, *PAR1* y *PAR2*, que codifican para factores pertenecientes a la familia BHLH, mencionada anteriormente.

Los genes *PAR* se han propuesto como componentes clave para la implementación de las respuestas morfogénicas, metabólicas y fisiológicas del SAS. Experimentos que combinaban la aplicación de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis proteica, con el tratamiento de sombra simulada, mostraron que algunos de estos genes *PAR*, como *PAR1*, *ATHB2*, *ATHB4* y *PIL1*, son dianas directas de la acción de los fitocromos (Roig-Villanova et al., 2006) (**Figura 7b**). Por lo tanto, estos factores *PAR* serían el punto de entrada de la señal de sombra percibida por los fitocromos para modular la red transcripcional implicada en la adaptación de la planta a la competencia por la luz (Martinez-Garcia et al., 2010). En el laboratorio nos hemos centrado en el estudio de *PAR1* y *ATHB4* en la regulación de las respuestas del SAS, en el control de la expresión génica y de su interacción con el desarrollo vegetal regulado por hormonas.



**Figura 7. Cambios transcripcionales rápidos inducidos por los fitocromos tras la percepción de la proximidad vegetal.** (a) Esquema de una célula vegetal crecida en alta (arriba) o baja razón de R:FR (abajo), indicativa de la proximidad vegetal y su efecto en la expresión génica. (b) Efecto de la sombra simulada sobre la expresión de los genes *PAR*. Plántulas de 3 ecotipos de *Arabidopsis* (Col-0, No-0, Ler) de 7 días crecidas en luz blanca continua (W) se trataron con luz W+FR (sombra simulada). Se extrajo RNA de plántulas inmediatamente antes (0) o 1 h (1) de iniciar el tratamiento con sombra simulada para estudiar el efecto en la expresión de los genes indicados. Los niveles de rRNA 25S se muestran como control de carga. En rojo se señalan los que se consideran como genes primarios (1<sup>os</sup>) de la acción de fitocromos por tratamientos con CHX. FT, factor de transcripción.

### 1.5.1.1. Papel de PIFs en la respuesta a SAS.

Como se ha comentado anteriormente los PIFs son factores de transcripción que se unen a la forma activa de phyB a nivel nuclear, resultando en un complejo regulador de la expresión de ciertos genes. Se ha visto que este complejo se fosforila rápidamente, luego de lo cual vendrían un proceso de ubiquitinación y degradación (Leivar and Quail, 2011). Es importante mencionar que la interacción entre phys y PIFs se ve alterada en condiciones de baja razón R:FR induciendo el SAS, ya que el fotoequilibrio de las formas Pr y Pfr de los phys se desplaza hacia la forma inactiva.

Mediante experimentos genéticos y moleculares se ha determinado el rol de algunos PIF en el SAS. Es el caso de PIF4 y PIF5, factores que se

acumulan en oscuridad, se degradan en luz R o W, y luego se vuelven a acumular en condiciones de baja razón R:FR (Lorrain et al., 2008). Se ha visto que en experimentos de sombra simulada (luz W+FR), los mutantes *pif4* y *pif5* presentan una respuesta reducida a esta condición, lo cual diría que estos factores son reguladores positivos del SAS. Esto se ha validado con experimentos hechos en líneas sobreexpresoras de estos genes que presentan un fenotipo parcial de SAS. Estos datos dan a entender que el SAS, en parte, se inicia como consecuencia de la disminución de la degradación de PIF4 y PIF5 mediada por phyB, idea validada al ver que la respuesta constitutiva de phyB se ve revertida en fondos genéticos carentes de los PIF mencionados (Lorrain et al., 2008). Recientemente ambos PIFs se han implicado en un modelo del desarrollo del carpelo marginal, basado en una vía dependiente de luz donde PIF4 y PIF5 regulan genes marcadores de sombra, los que luego regulan el desarrollo del carpelo marginal (Reymond et al., 2012). PIF7, que interacciona con phyB, también se ha asociado al SAS. Así, los hipocotilos mutantes de *pif7* se alargan menos que los silvestres en respuesta a sombra simulada (Li et al., 2012).

Recientemente, mediante experimentos ChIP se ha mostrado que phyB inhibe la actividad regulatoria de PIF3 liberándolo de su unión a DNA de sus genes blancos (Park et al., 2012). PIF3 también se ha mostrado que tendría un rol en la regulación en respuesta a condiciones de sombra simulada (Leivar et al., 2012b).

Además, la expresión de varios genes *PAR* en respuesta a sombra simulada está atenuada en plántulas mutantes para estos 3 PIFs (Hornitschek et al., 2012; Leivar et al., 2012a; Li et al., 2012).

Como se ha visto, estos factores presentan un rol importante en respuesta a sombra simulada, involucrando una rápida regulación en la expresión génica en condiciones de sombra de genes *PAR*, relacionados con hormonas, crecimiento y desarrollo, entre otros (Leivar et al., 2012b).

### 1.5.1.2. Proteínas DELLAs.

Las DELLAs son un grupo de proteínas definidas como reguladoras negativas del crecimiento originalmente identificados como componentes de la señalización de giberelinas (GAs). Su nombre deriva de que todos sus integrantes poseen los residuos aminoacídicos DELLA (Achard and Genschik, 2009; Bolle, 2004). Son componentes de la señalización de giberelinas (GAs), siendo regulada su degradación por la presencia de GAs (Achard and Genschik, 2009; Bolle, 2004). En *Arabidopsis*, las proteínas DELLA están codificadas por cinco genes: *GAI* (*GA INSENSITIVE*), *RGA* (*REPRESSOR OF GA1*), *RGL1* (*RGA-LIKE 1*), *RGL2* y *RGL3*.

La unión de las GAs activas a sus receptores (GID1a, GID1b y GID1c en *Arabidopsis*) provoca la activación de los últimos, lo que permite que la formación de un complejo con las DELLAs y SCF E3 ubiquitina-ligasa, que provoca la ubiquitinación y posterior degradación DELLA, tal como se mencionó al principio, (Achard and Genschik, 2009; Bolle, 2004). Además de esta regulación mediada por GAs, la estabilidad de las DELLAS también está afectada a nivel hormonal (auxina y etileno) y por luz, entre otros (Achard and Genschik, 2009; Bolle, 2004; Swain and Singh, 2005), dando a entender que estas proteínas podrían ser integradores moleculares de diferentes vías de señalización que regulan el crecimiento. Una posible explicación para esto sería al impedir la unión de PIF3 y PIF4 al DNA, los cuales están implicados en la regulación del desarrollo (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008)

Las proteínas DELLA son parte de la familia de las proteínas GRAS, al igual que SCARECROW, y poseen características similares a factores de transcripción (Bolle, 2004). Las proteínas DELLA son de localización nuclear y reprimen la expresión de genes involucrados con GAs (Sun and Gubler, 2004).

Se ha mostrado que las DELLAs están implicadas en cambios transcripcionales tempranos durante la desetiología. Esta participación en la regulación génica por parte de GAI parece ser en parte a través de los PIFs y de HY5. Además datos muestran la participación de DELLAs en la regulación de vía de las GAs, en la mediación de la interacción de las vías de auxinas y etileno, y también su incidencia en redes transcripcionales como las moduladas durante el SAS (Gallego-Bartolome et al., 2011).

Mediante análisis genéticos de las DELLAS se ha podido ver su participación en la regulación del SAS (Djakovic-Petrovic et al., 2007a). El mutante de ganancia de función *gai-D* (en el que se expresa una forma truncada de la proteína GAI que es estable), insensible a GA, muestra una respuesta reducida a baja razón R:FR, lo que indica que la inducción de la degradación DELLA por esta señal lumínica es necesario para la respuesta de crecimiento. Sin embargo el cuádruple mutante *gai/rga/rgl1/rgl2* muestra hipocotilos parcialmente alargados en experimentos de sombra con el adición de paclobutrazol (PAC, un inhibidor de la biosíntesis de GAs), concluyendo que las DELLAs no son las únicas responsables de las respuestas SAS, dando a entender que hay otros reguladores de la SAS independientes de las DELLAs (Djakovic-Petrovic et al., 2007a). Análisis transcripcionales han mostrado que *HAT3*, un componente de la red reguladora del SAS y clasificado como un gen *PAR*, es un gen diana directa de DELLAs (Gallego-Bartolome et al., 2011), dando otro soporte a que las DELLAs podrían estar implicadas en el SAS.

La existencia de otros reguladores del SAS es consistente con el concepto antes mencionado de que las respuestas del SAS son reguladas por redes transcripcionales complejas. Con esto se esperarían otros encontrar más componentes que modulan la expresión de cientos de genes (Jiao et al., 2007; Martinez-Garcia et al., 2010).

### **1.5.1.3. Factores ATHB y HAT.**

Los factores ATHB y HAT son proteínas pertenecientes a la familia de los factores de transcripción HD-ZIP. Esta familia se caracteriza estructuralmente por contener un dominio de unión a DNA (HD, del inglés HOMEDDOMAIN), y un dominio Cremallera de Leucina (ZIP, del inglés LEUCINE ZIPPER). Los factores HD-ZIP se han clasificado en cuatro familias de acuerdo a un conjunto de características como son especificidad de unión a DNA, estructura génica, motivos comunes y funciones fisiológicas. Algunos de los componentes de esta familia participan en la regulación del desarrollo vegetal y hormonales (Ariel et al., 2007). En el caso concreto de varios de los factores pertenecientes a la familia II (Ariel et al., 2007; Ciarbelli et al., 2008),

como *ATHB2*, *ATHB4*, *HAT1*, *HAT2* y *HAT3*, se han caracterizado como genes *PAR* (Martinez-Garcia et al., 2010).

Los dos primeros genes reportados como probablemente involucrados en la respuestas del SAS fueron *ATHB2* y *ATHB4*, ya que se vio que su expresión se inducía rápidamente en condiciones de sombra (Carabelli et al., 1996). Mediante estudios genéticos en plantas transgénicas de sobreexpresión o en antisentido se concluyó que *ATHB2* es un regulador positivo de la respuesta a SAS. Por ejemplo en plantas sobreexpresoras de *ATHB2* se observan hipocotilos alargados, opuesto a lo que pasa con líneas antisentido de *ATHB2* (Schena et al., 1993; Sessa et al., 2005; Steindler et al., 1999). No obstante mutantes de pérdida de función *athb2* no muestran ningún fenotipo (Sorin et al., 2009). En cualquier caso, este rol de regulador positivo también se ha visto para *HAT1* y *HAT2*. En el caso de *ATHB4* así como también para *HAT3* se ha postulado que son reguladores complejos del SAS ya que tienen facetas de reguladores negativos como de reguladores positivos (Sorin et al., 2009).

A nivel molecular se ha visto que factores como *ATHB2*, *ATHB4*, y *HAT1* regulan negativamente la expresión de varios de los genes de esta familia (Ciarbelli et al., 2008; Ohgishi et al., 2001; Sawa et al., 2002; Sorin et al., 2009), lo que sugiere la existencia de un bucle regulador de la expresión de componentes de la misma familia. Dado que la expresión de algunos de estos genes está regulada rápidamente por sombra simulada (que a su vez modulan la expresión del resto de la subfamilia), la percepción de la proximidad vegetal por parte de los fitocromos podría afectar la expresión de toda la subfamilia, contribuyendo a la complejidad mencionada anteriormente de la función de estos factores de transcripción para el control de las respuestas SAS (Martinez-Garcia et al., 2010).

Como se dijo al principio la familia HD-ZIP está implicada en diferentes tipos de acciones y respuestas. Asimismo se ha visto que factores HD-ZIP II son elementos integradores de las respuestas del SAS y hormonal. Además se ha visto que *ATHB4* y *HAT3* también están implicados en el establecimiento de la polaridad de las hojas, hecho que también ha sido caracterizado para integrantes de la familia HD-ZIP III. Finalmente se ha visto una regulación de la

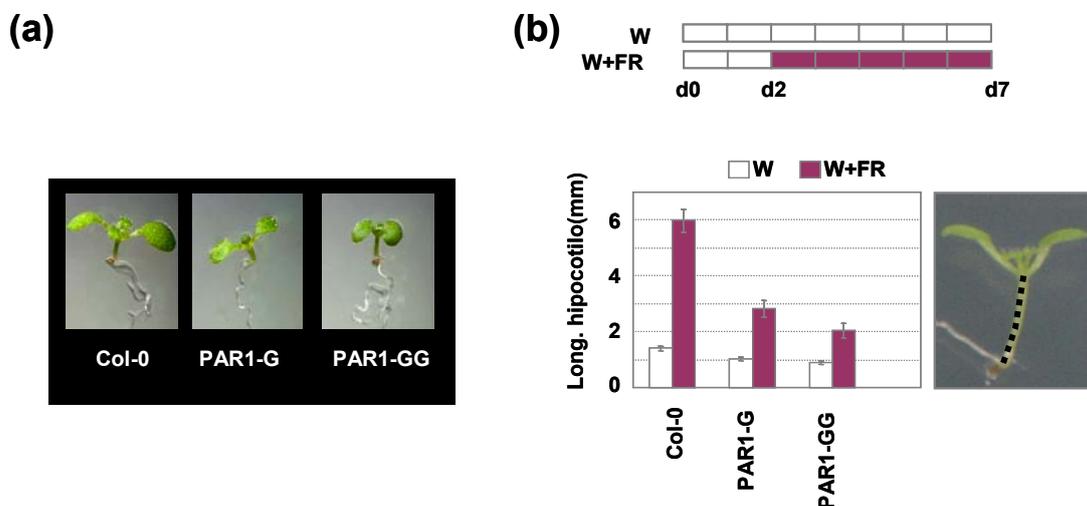
expresión de las HD-ZIP II por parte de las HD-ZIP III (Bou-Torrent et al., 2012; Brandt et al., 2012).

#### **1.5.1.4. Genes PAR del tipo BHLH.**

Dos de los primeros genes del tipo BHLH descritos como *PAR* (es decir, rápidamente regulado por la percepción de la proximidad vegetal) y luego caracterizados como el regulador negativo del SAS, fueron *PIL1* y *HFR1*. Experimentos fisiológicos en mutantes *pil1*, permitieron primero ver su implicancia en el SAS (Salter et al., 2003) y luego especificarla como regulador negativo (Roig-Villanova et al., 2006). El homólogo de éste gen, *PIL2* (o *PIF6*), también presenta una inducción en condiciones de percepción de proximidad, pero su función en la regulación de SAS no ha sido establecida (Salter et al., 2003). *HFR1* fue definido como un regulador negativo del SAS basándose en experimentos fisiológicos con los mutantes *hfr1-4* y *hfr1-5*, que presentan una mayor elongación de hipocotilo en condiciones de SAS (Sessa et al., 2005). Estructuralmente *HFR1* se parece a los PIF, aunque carece del dominio básico de unión a DNA y del de interacción con phyA o phyB; no obstante el heterodímero de *HFR1* con PIF3 puede unir la forma activa de fitocromo. De hecho se ha visto que esta heterodimerización podría modular la vía de señalización de phyA durante la desetiolación de plántulas (Fairchild et al., 2000). Recientemente se ha visto que *HFR1* inhibe la respuesta a SAS por la formación de heterodímeros con PIF4 y PIF5, impidiendo que estos PIFs regulen la expresión de genes implicados en la respuesta a SAS (Hornitschek et al., 2009). Análisis de la estructura-función de *HFR1* en plantas transgénicas han apoyado estas observaciones, de forma que *HFR1* actuaría como un cofactor de la transcripción, es decir, un factor de transcripción que no necesita unir directamente DNA para regular directamente la expresión génica (Galstyan et al., 2011).

### 1.5.1.5. PAR1: un gen PAR del tipo BHLH.

PAR1 es una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción BHLH. La sobreexpresión de *PAR1* y su homólogo *PAR2* resulta en plántulas con fenotipo enano y de coloración verde oscura, cuya respuesta a tratamiento de sombra se ve reducida en comparación a la de los controles (Col-0) (**Figura 8**). Plántulas con niveles reducidos de PAR1 y PAR2 (*PAR1*-RNAi y *par2-1*) presentan una respuesta a sombra potenciada. Conjuntamente estos datos muestran a estos factores como reguladores negativos del SAS (Roig-Villanova et al., 2007).

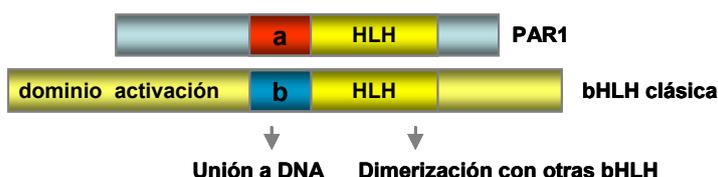


**Figura 8. Características de plantas con altos niveles de PAR1.** (a) Plantas sobreexpresoras de *PAR1-G* y *PAR1-GG* presentan un fenotipo de enanismo y una coloración verde oscura en comparación a Col-0. (b) Experimento de sombra simulada donde se aprecia que en las líneas con altos niveles de PAR1 la respuesta de elongación del hipocotilo es menos en comparación a Col-0.

El dominio BHLH (dBHLH) que define a este tipo de factor de transcripción presenta aproximadamente 60 residuos aminoacídicos divididos en el subdominio básico (15 a 20 residuos) y el dominio HLH (del inglés HELIX-LOOP-HELIX) compuesto de dos hélices alfa anfipáticas (*helix*) separadas por una región lazo (*loop*). El dominio básico está implicado en la unión a DNA, específicamente a motivos E-box (CANNTG) o G-box (CACGTG) en los promotores de los genes diana que regulan (Atchley and Fitch, 1997), mientras que el dominio HLH es necesario para la interacción proteína-proteína. El análisis de la estructura primaria de PAR1 ha mostrado que la región N-terminal junto al motivo HLH es ácida en vez de básica, lo que convierte a PAR1 en una BHLH atípica, y sugiere que PAR1 no uniría DNA (Heim et al.,

2003) (**Figura 9**). Este tipo de BHLH atípicas se han propuesto como reguladores negativos de BHLHs que unen DNA, por su capacidad de heterodimerizar con ellas e inhibir su actividad de unión al DNA (Toledo-Ortiz et al., 2003).

PAR1 actúa a nivel nuclear en el control del desarrollo vegetal. Esta localización se ha visto mediante fusiones traduccionales de PAR1-GFP y PAR1-GUS-GFP (Roig-Villanova et al., 2007). Se ha sugerido un mecanismo dual para explicar la localización nuclear: una mediada por una señal no consenso de localización nuclear (NLS) ubicada en la región N-terminal de la proteína, y la otra basada en la interacción con otras proteínas a través del dominio de dimerización (Galstyan et al., 2012). Esta dimerización, comprobada por el sistema del Y2H, se debe a su dominio HLH y depende del residuo Leucina 66, conservado en las BHLH de plantas dentro del dominio HLH (Carretero-Paulet et al., 2010; Galstyan et al., 2011).

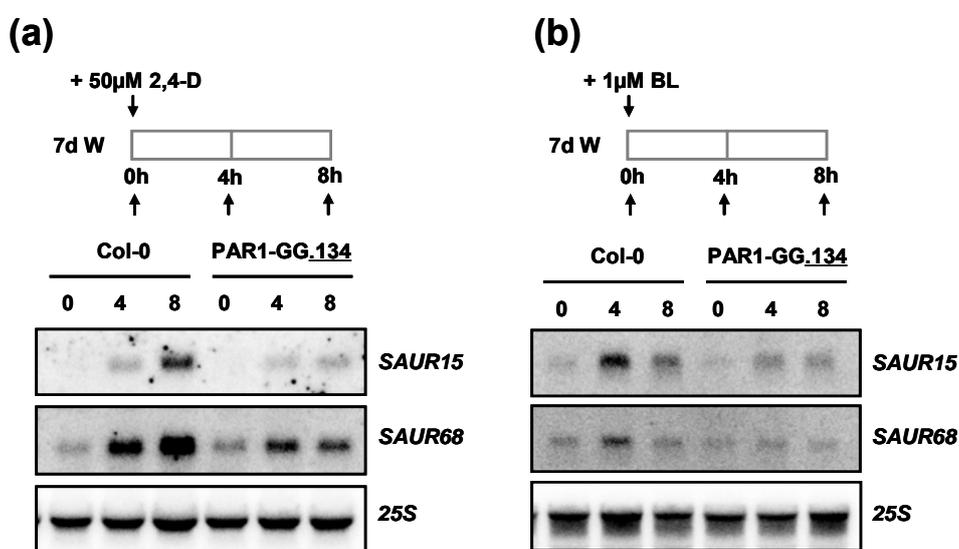


**Figura 9. Esquema de la estructura primaria de PAR1.** Comparación estructural de PAR1 y un factor de transcripción clásico de la familia BHLH.

Se ha visto que la localización nuclear de PAR1 es necesaria para su actividad biológica (Galstyan et al., 2011) lo cual ha sugerido su rol como un tipo de factor de transcripción. Experimentos con microarrays y moleculares usando plantas que sobreexpresan *PAR1* indican que cambios en los niveles de PAR1 impactan en la expresión de ciertos genes, algunos de ellos regulados por auxinas y brasinosteroides como son *SAUR15*, *SAUR68* y *P1R1* (del inglés *PAR1-RESPONSIVE 1*) (Roig-Villanova et al., 2007) (**Figura 10**). Estos resultados sugieren que la señalización por ambas hormonas y por luz confluyen a nivel de los promotores de estos genes y que PAR1 actuaría como integrador de las mismas (Roig-Villanova et al., 2007).

El conjunto de estos resultados nos ha llevado a postular que la regulación de la expresión génica por *PAR1* estaría mediada por su

heterodimerización con factores BHLH capaces de unir elementos reguladores en los promotores de sus genes diana (**Figura 21**). Recientemente se ha visto que PAR1 heterodimeriza con PIF4, inhibido la capacidad de este último de activar sus genes dianas (Hao et al., 2012). Por lo tanto PAR1 podría ser un cofactor transcripcional y funcionar de esa manera regulando negativamente el SAS. Así como se ha identificado a PIF4 como interactores de PAR1, sería clave la identificación de interactores de *PAR1* para entender los pasos que regula y, por lo tanto, su implicación en el SAS.



**Figura 10. Efecto de los altos niveles de PAR1 sobre la respuesta a 2,4-D y BL de la expresión de los genes SAUR15 y SAUR68.** (a) Análisis de northern-blot de la expresión de los dos genes SAUR en plantas silvestres (Col-0) y PAR1-GG tratadas con 2,4-D y cultivadas tal como se indica en el esquema superior. (b) Análisis de northern-blot de la expresión de los dos genes SAUR en plantas silvestres (Col-0) y PAR1-GG tratadas con BL y cultivadas tal como se indica en el esquema superior. En a y b como control de carga se muestra la hibridación con la sonda constitutiva 25S.

### 1.5.1.6. POF: proteínas que interactúan con PAR1.

En el laboratorio se ha llevado a cabo un cribado (screening) mediante el sistema de Y2H que resultó en la identificación de cerca de 70 genes que codifican proteínas que interactúan directamente con PAR1. De estos genes, denominados genéricamente como *POF* (*PARTERNS OF PAR1 FACTOR*), 28 codifican proteínas de la superfamilia BHLH. En el genoma de Arabidopsis se han identificado más de 135 genes que codifican BHLHs (Bailey et al., 2003; Carretero-Paulet et al., 2010; Heim et al., 2003; Toledo-Ortiz et al., 2003). La

comparación de la secuencia aminoacídica y el análisis de la distribución de los exones e intrones ha permitido agruparlas en 12 grupos o familias. Los genes agrupados comparten similar número de intrones con posiciones conservadas, tamaño para la proteína a codificar y posición del dominio BHLH dentro de la proteína (Heim et al., 2003)

De las BHLH encontradas en el cribado, la expresión de 9 de ellas también está rápidamente regulada por sombra simulada (Galstyan, 2011). Asimismo, de los 28 genes que codifican BHLH, 12 pertenecen a la familia XII (Heim et al., 2003) lo que sugiere una preferencia de reconocimiento de PAR1 por factores BHLH (**Figura 27**). El grupo XII está compuesto por un total de 16 miembros, de los que 12 se identificaron como factores POFs. Dentro de este grupo se han identificado los genes *BEE1/BHLH44* (del inglés *BR-ENHANCED EXPRESSION 1*), *BHLH58/BEE2* y *BHLH50/BEE3*, los cuales han sido descritos como reguladores positivos (y redundantes) en la respuesta temprana de señalización de BRs y su antagonista ABA (Friedrichsen et al., 2002). Se ha visto que la expresión tanto de los genes *BEEs* se induce por aplicación de BRs. La expresión de *BEE1* y *BEE2* también se induce rápidamente en condiciones de sombra simulada (Tao et al., 2008), lo cual sugiere su implicancia en el SAS. Además los hipocotilos del triple mutante *bee1;bee2;bee3* (que llamaremos *bee123*) (Friedrichsen et al., 2002) responden menos a sombra simulada que los del control Col-0, lo que ha llevado a proponer que los genes *BEEs* son reguladores positivos del SAS (Galstyan, 2011).

Otro grupo de BHLH clasificados como *POF* pero que no fueron identificados en el cribado mediante el Y2H son los genes *BIM1* (del inglés *BES1-INTERACTING MYC-LIKE 1*), *BIM2* y *BIM3*, involucrados en la señalización de BRs (Yin et al., 2005). La expresión de *BIM1* y *BIM2* se induce rápidamente por sombra (Carabelli et al., 2007). Además *BIM1* se une específica y directamente al promotor de *SAUR15*, activando su expresión (Yin et al., 2005), gen que se reprime directamente por la acción de PAR1 (Roig-Villanova et al., 2007). Experimentos de Y2H y de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC, del inglés *BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION*) en nuestro laboratorio han mostrado que *BIM1* interacciona con PAR1. Además el análisis de la respuesta a sombra

simulada hecha con el triple mutante *bim1;bim2;bim3* (a partir de ahora *bim123*) (Yin et al., 2005), han mostrado una respuesta a sombra reducida por parte de este mutante en comparación a Col-0 (Galstyan, 2011). Estos datos suponen que los genes *BIMs* también serían reguladores positivos del SAS.

Por tanto, la caracterización funcional otros factores POF y su papel durante el SAS es importante para entender la red transcripcional del SAS y también el papel de PAR1 en la regulación de este proceso.

### **1.5.2. Integración del SAS con otras vías de regulación del crecimiento.**

El responder a un estímulo lumínico ha llevado a que diferentes redes de señalización interacciones entres si con el fin de dar una respuesta al estímulo percibido. Así pues como hemos visto respuestas a sombra como la elongación del hipocotilo, son también respuesta clásicas descritas para fitohormonas como auxinas, GAs, etc. Las respuestas hormonales pueden o no actuar en la misma dirección para contribuir en la regulación de la respuesta fotomorfogénica. Además otros estímulos externos, como la temperatura, también puede participar en la regulación de este proceso, de forma que se presupone que todas estas redes de señalización tanto internas como externas se entrelazan para integrar la información requerida para que la planta se desarrolle. A continuación se comenta aspectos de conectividad entre el SAS y otros factores reguladores del crecimiento vegetal.

#### **1.5.2.1. Conexión SAS-Hormonas.**

Características como la elongación del hipocotilo o expansión de los cotiledones son procesos regulados por hormonas como auxinas, BRs y GAs. Estas características son también vistas en respuesta a experimentos de sombra simulada, por lo cual posiblemente existen conexiones entre hormonas y el SAS para dar estas respuestas en común. Esta posibles conexiones ya han sido establecidas ciertas interacciones entre las vías de señalización de estas hormonas y el SAS (Martinez-Garcia et al., 2010).

## - Auxinas.

Las auxinas regulan aspectos del crecimiento vegetal como elongación del hipocotilo y tallo, expansión de cotiledones y hojas, y la dominancia apical. La acción de esta hormona está influenciada por la luz, cuya percepción afecta los niveles, transporte y respuesta de la planta a las auxinas (Halliday and Fankhauser, 2003). Con respecto a la proximidad vegetal, la biosíntesis, transporte y respuesta está controlada por los fitocromos. Así se ha visto en líneas mutantes a nivel de síntesis, transporte o percepción de auxinas que hay una reducción del alargamiento del hipocotilo.

El gen *SAV3/TAA1* (del inglés *SHADE AVOIDANCE 3/TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1*) codifica una proteína implicada en la biosíntesis de auxinas e involucrada en al alza de la auxina activa, el ácido indolacético (IAA), en condiciones de baja razón de R:FR y de bajos niveles de PfrB. Experimentos en mutantes deficientes de este gen (*sav3*) han mostrado que esta proteína se requiere para una rápida alza de IAA y para la elongación del hipocotilo en respuesta a la proximidad vegetal (Tao et al., 2008). *PIN3* (del inglés *PIN-FORMED 3*) es un regulador del flujo de auxinas en *Arabidopsis*, que en condiciones de baja razón R:FR cambia su localización celular (a nivel de hipocotilo), resultando en un incremento en los niveles de auxinas y elongación de los hipocotilos, lo cual no ocurre en el mutante *pin3-3* (Keuskamp et al., 2010). Esto también ocurre con el gen *TIR1* (del inglés *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1*), un receptor de auxinas, cuyo mutante *tir1-1* responde menos a sombra. Plántulas mutantes en otro componente regulador de auxinas, *AUXIN RESISTANT 1* (*AXR1*, una enzima con actividad ubiquitina que controla la estabilidad de transportadores de auxina) también presenta respuestas a sombra reducidas (Pierik et al., 2009). Plántulas expuestas a ácido naftilftalámico (NPA, del inglés *N-1-NAPHTHYLPHTHALAMIC ACID*), un bloqueador de los transportadores de auxina, presentan una supresión de la respuesta a SAS (Sorin et al., 2009; Steindler et al., 1999). Por otra parte se ha visto que tratamientos de sombra intervienen en la producción de raíces laterales producidas por las auxinas derivadas del tallo (Bhalerao et al., 2002; Salisbury et al., 2007). Con estos experimentos se ha presumido que posiblemente en condiciones de sombra

existe una reducción del transporte de auxinas basipétalo a través del centro del hipocotilo a favor de las capas celulares en el mismo órgano. Debido a lo deficiente que son las capas laterales movilizándolo la hormona en cuestión desde su fuente, daría como resultado un incremento de la cantidad de auxinas en estas capas incrementando la elongación del hipocotilo y reduciendo la cantidad de auxinas alcanzadas por las raíces (Morelli and Ruberti, 2002). Los resultados obtenidos mostrarían una implicación de los phys en el transporte de auxinas durante la respuesta a SAS. Cuando se han tratado líneas DR5:GUS (gen artificial reportero de los niveles o actividad de las auxinas) con tratamientos de sombra simulada se ha visto que han un cambio en el patrón expresión de GUS, lo que se entiende como los niveles de auxina libre (Sabatini et al., 1999; Tao et al., 2008). Aunque es cuestionable el uso de esta línea marcadora como indicadora de los niveles de auxina libre, su uso permite visualizar si el estímulo de la proximidad de vegetación altera la respuesta a auxina en diferentes órganos y/o dentro de células individuales. Así, estas líneas presentan actividad GUS en el tercio inferior de hipocotilos y cotiledones, y reducido en raíces, lo que indicaría que después de la percepción de proximidad vegetal, los phys también controlan la respuesta local a auxinas (Roig-Villanova et al., 2007; Sabatini et al., 1999; Tao et al., 2008).

Estudios genéticos y moleculares de PIF4, PIF5 y PIF7 han mostrado que estos factores están implicados en la interacción de auxinas y SAS, ya que estos reguladores de la respuesta a sombra regulan la expresión de genes implicados en la biosíntesis de auxina (como el gen *YUCCA8*, entre otros), además de ver que en el mutante *pif4pif5* esta afectada la acumulación de auxinas en situaciones de sombra (Hornitschek et al., 2012). En los mutantes *pif7-1* y *pif7-2* los niveles de auxinas libre no cambian en comparación a líneas control, además de tener reprimidos genes de la biosíntesis de auxinas (Li et al., 2012).

Otra perspectiva de ver la relación SAS-auxinas, ha sido estudiando factores ya descritos que están involucrados en la regulación SAS y su implicancia con auxinas. Así, plantas que sobreexpresan *ATHB2* o *HAT2* poseen fenotipos relacionados con auxinas como hipocotilos largos, cotiledones epinásticos (típicos en plantas que producen mucha cantidad de auxinas) o reducción de la producción de raíces laterales (Schena et al., 1993;

Steindler et al., 1999) (Sawa et al., 2002). Cuando ATHB4 se sobreexpresa también presenta cotiledones epinásticos, sobre todo en condiciones de sombra, carácter que se ve abolido en presencia de NPA. Además plantas con alta actividad de ATHB4 mostraron una reducción de la respuesta a 2,4D (auxina sintética), sugiriendo un papel de este factor en la modulación de la respuesta de los hipocotilos a auxinas (Sorin et al., 2009). Puesto que estos genes codifican HD-ZIP II, estos resultados sugieren que la expresión de los genes HD-ZIP II inducida por sombra podrían integrar la señal de proximidad vegetal captada por los phys con algunos aspectos de la capacidad de respuesta a auxina y modular la respuesta a SAS (Martinez-Garcia et al., 2010).

#### - **Brasinoesteroides.**

Los BRs son moléculas esteroidales que regulan procesos de crecimiento y desarrollo como el desarrollo vascular, senescencia, elongación celular y la fotomorfogénesis (Li and Chory, 1999; Yang et al., 2011). Los primeros resultados que implicaron a los BRs con el desarrollo fotomorfogénico fueron los obtenidos en mutantes de los genes que codifican enzimas de biosíntesis de esta hormona, como son *DET2*, *CPD* y *DWF* (Li and Chory, 1999). Los mutantes de estos genes presentaban un fenotipo desetioloado en oscuridad. En relación a la respuesta a sombra, se ha visto que los BRs se requieren para responder a este estímulo implicándose en la elongación de hipocotilo o expansión de los cotiledones. Así, el mutante *dwarf1-101* no elonga el hipocotilo en respuesta a sombra vegetal y la elongación del mutante *det2-1* está reducida cuando crece en sombra simulada (Luccioni et al., 2002; Martinez-Garcia et al., 2010). Otra conexión entre BRs y SAS es basada en el efecto que tiene BAS1 sobre el mutante phyB-9, suprimiendo su fenotipo constitutivo de sombra (Neff et al., 1999). El conjunto de estos resultados apoyan la importancia de los BRs en la respuesta al SAS.

Así como se comento del rol de los factores HD-ZIP en la conexión de sombra y auxina, se ha visto que en plantas con alta actividad de ATHB4 los hipocotilos se alargan sustancialmente más que los controles tras la aplicación de epibrasinólido (EBL), un BR comercial que estimula la elongación del hipocotilo. El mutante *athb4/hat3* presenta una longitud del hipocotilo similar a

las de las plantas silvestres en luz W (razón R:FR elevada), pero responde menos a luz W de razón R:FR baja y a la aplicación de BRs (Sorin et al., 2009). Estos resultados sugerirían que la sombra simulada incrementaría la sensibilidad a BRs, además que ATHB4 y HAT3 tendrían funciones de reguladores positivos de la elongación de hipocotilo inducido por BRs. Esto también mostraría que diferentes reguladores de las respuestas del SAS, como ATHB4 y HAT3, participarían de la integración entre BRs y SAS, involucrando a los fitocromos en la modulación del SAS por control de la respuesta a y/o niveles de BRs (Sorin et al., 2009).

#### - Etileno.

El etileno es una fitohormona implicada en diferentes respuestas de crecimiento, incluyendo la germinación, crecimiento de plántulas, desarrollo de hojas, raíces y flores, maduración de frutas, senescencia y abscisión de las hojas. Su implicación en la fotomorfogénesis se pudo apreciar en un principio cuando se vio en *Sorghum bicolor* que la producción de etileno seguía un ritmo circadiano; además la amplitud del ciclo circadiano aumentaba en el mutante *phyB-1* que presenta un fenotipo constitutivo de SAS, proporcionando datos que relacionarían ritmo, fitocromo y hormonas (Finlayson et al., 1999). A nivel de su relación con el SAS, el etileno se ha involucrado en la elongación del tallo y pecíolo en tabaco inducido por sombra (Pierik et al., 2004). Recientemente se vio que esta respuesta se produce a través de la vía de auxinas ya que mutantes de señalización de auxinas pierden capacidad de responder a etileno pero mutantes de etileno sí que responden a auxinas (Pierik et al., 2009). Se ha demostrado que el etileno regula la estabilidad de las proteínas DELLA (Achard and Genschik, 2009), previamente implicadas en la regulación de la elongación de hipocotilo y pecíolo en condiciones de sombra simulada, proponiendo a esta hormona como integradora molecular de diferentes vías de señalización. Recientemente se ha mostrado que la elongación del hipocotilo inducida por sombra puede ser medida por etileno de manera independiente de GAs (Martinez-Garcia et al., 2010; Pierik et al., 2009).

## - Giberelinas.

Las GAs son otra clase de fitohormonas implicadas en promover el crecimiento, regulando un amplio espectro de procesos de desarrollo y crecimiento, tales como la germinación, expansión foliar, inducción de la floración y desarrollo de semillas y flor (Sun and Gubler, 2004; Yamaguchi, 2008). Estudios en diferentes especies indican que la inducción de la elongación del hipocotilo o tallo en respuesta a sombra simulada o tratamiento con FR al final del día (EOD-FR, del inglés END-OF-DAY-FR) altera el metabolismo y los niveles de GAs activas (Devlin et al., 2003; Garcia-Martinez et al., 1987; Martinez-Garcia et al., 2000b; Pierik et al., 2004). En el mutante *phyB* el crecimiento del hipocotilo por razón R:FR baja (Djakovic-Petrovic et al., 2007b) se ve afectado por la adición de paclobutrazol (PAC, un inhibidor de la biosíntesis de GAs), así como también en fondos genéticos de mutantes deficientes en síntesis de GAs activas.

Diferentes factores podrían tener un rol integrador entre el SAS y GAs. Así, hipocotilos de plántulas de sobreexpresión de *PAR1* no responden (no se alargan) en respuesta a diferentes concentraciones de GA3, resultado que muestra que estas plantas son insensibles a esta hormona (resultados no publicados). Esta función de *PAR1* con relación a la respuesta a GAs podría involucrar también a los factores *PRE1* y *PIF4*, con los que se ha mostrado que *PAR1* interacciona (Hao et al., 2012).

Como se comentó en una sección anterior, las DELLAS son componentes de la regulación de GAs. Su implicación en la respuesta de elongación inducida por sombra ha sido determinada en varias ocasiones. Se ha visto que la respuesta de elongación en respuesta a sombra simulada está mediada por la degradación de las DELLA, posiblemente, pero no medido, por el aumento de las GAs. Pero si bien esta degradación es necesaria, no es suficiente para inducir la respuesta a sombra. El cuádruple mutante *gai;rga;rgl1;rgl2* (*della4*) no presenta un fenotipo constitutivo de sombra y responde a sombra con una inducción de la elongación similar a la del control Ler (Djakovic-Petrovic et al., 2007b; Pierik et al., 2007). Esto también daría a especular la posibilidad de que *RGL3* tenga un papel en la respuesta a sombra, o que hay una redundancia total de los cinco integrantes de las DELLA. Por otro lado, en base a la capacidad de las DELLA de interaccionar con *PIF3* y

PIF4 (que también participan en la regulación del SAS), impidiendo que se unan a al DNA para regular la expresión de genes, cabe especular sobre el papel de las DELLA en la respuesta a sombra (Feng et al., 2008). Toda esta información sugiere que los mecanismos de implicancia de las GAs en la respuesta a sombra son múltiples, tal como pasa con otras hormonas. En este trabajo se dará más información sobre esta interacción, además de una posible regulación de las GAs en condiciones de sombra mediada por auxinas.

### **1.5.2.2. Conexión SAS-Reloj Circadiano.**

El reloj circadiano es un complejo regulador de la fisiología vegetal, que controla cambios diarios de la expresión génica, crecimiento, actividad fotosintética y floración estacional. Los ritmos circadianos sincronizan procesos de señalización internos con estímulos externos, permitiendo a los organismos llevar a cabo procesos metabólicos en diferentes momentos y coordinar las respuestas de determinadas fases para que se lleven a cabo en el momento más óptimo, lo cual da una ventaja adaptativa en comparación a las actividades realizadas al azar (Harmer, 2009; Mas, 2008). El reloj circadiano es puesto a punto con los ciclos de día/noche gracias a las señales lumínicas traducidas por *phys* y *crys*, mostrando que por lo tanto hay una conexión entre componentes del reloj y fotorreceptores. Este proceso se conoce como fotoaclimatación (*photoentrainment*) y se logra ajustando los ritmos del oscilador al ciclo solar de 24 h (Fankhauser and Staiger, 2002). A nivel de relación con la respuesta a sombra, se ha visto que la expresión de los genes *PIL1* y *PIL2* inducida por sombra se controla por el reloj circadiano, con mínimos incrementos al inicio del día (Salter et al., 2003). Estos resultados indicarían que componentes implicados en el SAS están conectados con el reloj, y por lo tanto que el SAS podría estar regulado por el reloj. Tratamientos transitorios de sombra simulada (2 h) pueden desencadenar la elongación del hipocotilo dentro de las siguientes 24 h luego que plántulas fueron crecidas en luz W (alta razón R:FR). Estos experimentos mostraron que la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra está regulada por el reloj, con un incremento máximo en el anochecer subjetivo. Además la elongación del hipocotilo fue inhibida, en vez

de inducirse, después del tratamiento de sombra transitorio aplicado en el amanecer (Salter et al., 2003). En luz W (alta razón R:FR), el patrón de elongación del hipocotilo crecido en fotoperiodos neutros también es rítmico, mostrando una represión del crecimiento diario al amanecer y un intervalo de crecimiento rápido al anochecer (Dowson-Day and Millar, 1999). Se ha visto que los valles de inducción por sombra de *PIL1* y *PIL2* coinciden con los picos de elongación de hipocotilo, sugiriendo un rol negativo de estos genes en la regulación de esta respuesta. Otros componentes del SAS que han sido propuestos como elementos importantes para explicar el crecimiento rítmico son PIF4 y PIF5. Se sabe que a nivel de mRNA estos se empiezan a acumular durante el final de la noche bajando al final del día, por el contrario a nivel proteico estos se comienzan a degradar al inicio del día por causa de la luz, comenzando a acumularse tras el inicio de la noche (Nozue et al., 2007). Además se ha visto que también esta participación de PIF4 y PIF5 en el ritmo del alargamiento implica la modulación de vías relacionadas con auxinas (Nozue et al., 2011). Todo esto indicaría una regulación a través del reloj, que también incluye a los fitocromos. En condiciones de baja razón de R:FR hay una estabilidad de PIF4 y PIF5, lo que podría implicar a estos factores con *PIL1* y *PIL2* en las respuestas transitorias de elongación del hipocotilo inducido por sombra y controlado por el reloj (Lorrain et al., 2008; Martinez-Garcia et al., 2010).

### **1.5.2.3. Conexión SAS-Temperatura.**

Existen datos que indican la interacción entre la luz y la temperatura en la regulación de respuestas del SAS a nivel floración (Halliday et al., 2003) o de germinación (Smith, 1982a). En condiciones de alta temperatura (29°C) se ha visto que hay cambios dramáticos en la planta como la inducción de la elongación del hipocotilo, floración temprana e hiponastia foliar. En *Arabidopsis*, esta mayor elongación del hipocotilo en altas temperaturas se ha asociado a un incremento en la producción de auxinas (Gray et al., 1998; Koini et al., 2009). Análisis genéticos en mutantes de auxinas han mostrado reducción de la elongación del hipocotilo a altas temperatura, como es el caso

de del mutante *sav3* (Tao et al., 2008). PIF4 y PIF5 podrían tener un papel, ya que en los simples mutantes deficientes en estos factores se vio que la respuesta del hipocotilo a alta temperatura está anulada (*pif4*) o atenuada (*pif5*); esto sugería que PIF4 y en menor medida PIF5 podrían regular la acumulación de auxinas en respuesta a altas temperaturas (Franklin et al., 2011; Nozue et al., 2011; Stavang et al., 2009). Recientemente se ha demostrado que PIF4 regula la biosíntesis de auxinas a altas temperaturas (Franklin et al., 2011) y específicamente media la activación de la expresión de *YUCA8* integrando así las vías de auxinas y temperatura con la elongación del hipocotilo (Sun et al., 2012). Estas observaciones sugieren que altas temperaturas y condiciones de sombra comparten mecanismos de control de la elongación de hipocotilo.

Otro componente que podría relacionar el SAS y temperatura es PAR1, ya que líneas de sobreexpresión de *PAR1*, descrito anteriormente como un regulador negativo del SAS, no responden a altas temperaturas (29°C), definiéndose como menos sensible al igual que pasa con el mutante *pifq* (Hao et al., 2012).

En relación a bajas temperaturas, análisis transcriptómicos de *Arabidopsis* crecidas a 16°C y 22°C mostraron que la expresión de decenas de genes estaba afectada diferencialmente por sombra simulada, entre los que se encontraban los *CBF* (del inglés *CRT/DRE BINDING FACTOR*), *COR* (del inglés *COLD REGULATED*) (Franklin and Whitelam, 2007). En plantas adultas, plantas tratadas con sombra simulada a 16°C hay un incremento en la expresión de los genes *COR* es suficiente para permitir la tolerancia a congelación en *Arabidopsis*.

Los hipocotilos de plántulas crecidas a 16°C responden menos a sombra simulada, si bien no hay mutantes descritos que específicamente respondan de manera alterada sólo en esta temperatura.

### **1.5.3. Aspectos espaciales y temporales de la señalización de SAS.**

La identificación de componentes relacionados con el SAS se ha realizado en su mayoría a partir del análisis de toda la plántula. Sin embargo

los modelos que describen la acción e interacciones de los fitocromos están realizados a nivel celular o molecular. Aunque es un hecho que las redes regulatorias y transcripcionales están en el contexto multicelular de una planta (no hay un patrón de expresión similar en todas las células) éste ha sido un tópico que ha recibido poca atención. Recientemente una serie de trabajos han abordado este aspecto en el contexto de la fotomorfogénesis mediada por fitocromos (Bou-Torrent et al., 2008; Josse et al., 2008; Montgomery, 2008; Montgomery and Lagarias, 2002). A nivel de planta total, la señalización de respuesta a sombra involucra al menos 2 etapas, una intracelular y otra intercelular. La fase intracelular es un paso autónomo celular potenciada por los *phys* dentro de la célula que percibe la señal lumínica y principalmente se refiere a los cambios que ocurren inmediatamente por debajo de la acción de los fitocromos, como cambios rápidos en la expresión génica. El paso intercelular se refiere a los cambios en el crecimiento y desarrollo que ocurren en células o tejidos diferentes de los que percibieron la luz (Bou-Torrent et al., 2008). Esta doble señalización de fitocromo implica que los lugares de percepción de la luz y acción pueden estar físicamente separados de la planta, lo que enfatiza lo importante que es la comunicación a larga distancia para comprender cómo la planta crece y se desarrolla regulada por la luz durante el SAS (Martinez-Garcia et al., 2010). En este sentido, cabe recalcar que en lo que respecta a las hormonas, también se sabe la importancia del lugar de síntesis y acción. Un ejemplo clásico es la acción de las auxinas, la cual esta controlada en tres puntos: síntesis, transporte y efecto (Chandler et al., 2009).

## **2. OBJETIVOS.**

---



## **Objetivos.**

El objetivo general de esta tesis es identificar y caracterizar componentes implicados en la puesta en marcha del SAS tras la percepción de la proximidad vegetal en *Arabidopsis thaliana*. Para esto, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. **Análisis de la interconexión entre fitohormonas y sombra.** Estudiar la respuesta de diferentes factores que integran el SAS a giberelinas, y cómo componentes de la planta relacionados con la síntesis o sensibilidad a esta hormona se regulan durante el SAS.
2. **Análisis del mecanismo molecular de PAR1.** Estudiar la capacidad de unión a DNA de PAR1, propuesta a partir de sus características de BHLH atípica.
3. **Caracterización funcional de genes *POF* en la regulación de las respuestas del SAS.** Identificar factores que interaccionen con PAR1, y caracterizarlos molecular y fisiológicamente con la finalidad de encontrar nuevos componentes del SAS.
4. **Análisis del mecanismo molecular de acción de BEE y BIM, y como PAR1 interfiere en él.** Identificar y estudiar los motivos de unión a DNA de los factores BEEs y BIMs, y ensayar si PAR1 interfiere en dicha unión como posible cofactor transcripcional.



### **3. RESULTADOS.**

---



## **CAPITULO I.**

---

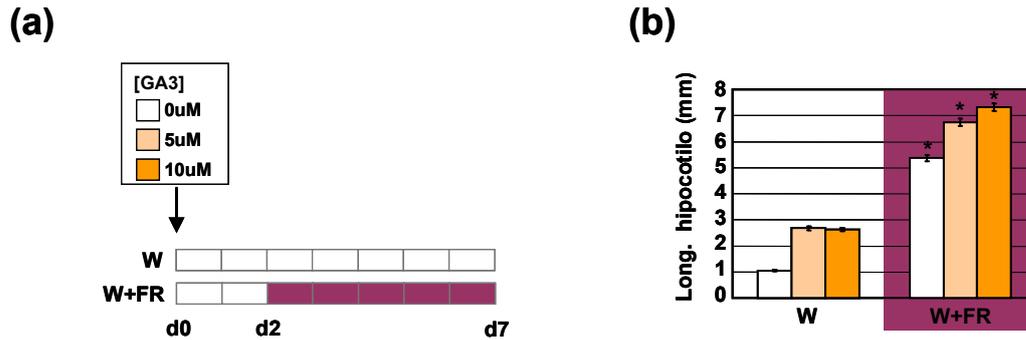


## **1. Análisis de la integración del SAS y las hormonas.**

Como se ha comentado en la introducción, una de las respuestas que caracteriza al síndrome de la huida de la sombra (SAS) en estadio de plántula es la elongación del hipocotilo. Este proceso también se regulado por las hormonas vegetales auxinas, giberelinas (GAs) y brasinosteroides (BRs). Las GAs, como se ha comentado en la introducción, ya han sido asociadas al SAS en situaciones como la inducción de genes de biosíntesis y respuesta de GAs en tratamiento de sombra simulada (W+FR) (Hisamatsu et al., 2005; Reed et al., 1996), como también de la inducción de genes relacionados con GAs (Devlin et al., 2003). Con esta información se quiso profundizar más sobre la existencia de una interacción entre SAS y GAs.

## **2. Integración de la respuesta a SAS con el efecto de Giberelinas.**

Como se comentó anteriormente las GA son hormonas implicadas en la elongación del hipocotilo. Esta respuesta también se ve en plántulas que crecen en condición de sombra. Si bien ambos estímulos generan la misma respuesta, sería importante ver si la aplicación de GA exógenas en condiciones de sombra, presenta una respuesta también de elongación de hipocotilo, es decir si la condición de sombra afecta la sensibilidad a responder a giberelinas. Para estudiar si el SAS afecta la sensibilidad de las plántulas a GA, se realizaron experimentos de sombra simulada en presencia de diferentes concentraciones de la giberelina activa GA3. Para esto, semillas Col-0 se sembraron en placas de medio 0.5x GM- suplementado con 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de GA3. Tras la estratificación, se realizó el experimento de sombra simulada, el que consiste en placas se transfieren a luz W durante 2 días, tras lo cual un grupo se mantiene en luz W y el otro se transfiere a una condición de luz W enriquecida en luz FR (W+FR) durante 5 días adicionales (hasta día 7), después de lo cual, para este el caso, se mide la elongación del hipocotilo (**Figura 11a**). Tal como se observa en la **Figura 11b**, en W la elongación del hipocotilo se inducía por la dosis de GA3 aplicadas. En condiciones de W+FR,



**Figura 11. Efecto de la sombra simulada en el alargamiento del hipocotilo en respuesta a la aplicación exógena de GA3.** (a) Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de las giberelinas y la sombra simulada en el fenotipo morfológico de las plántulas Col-0. (b) Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en (a), en placas GM-0,5x con 0, 5 y 10 μM de GA3. Se compara la respuesta de línea control Col-0. Valores son medias ± error estándar de 30 plántulas analizadas (tres réplicas); los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}P < 0.05$ ,  $^*P < 0.01$ ) relativa del control (Col-0) en las dos condicione.

en ausencia de GA3 el hipocotilo era más largo, tal como se había observado con anterioridad, y la aplicación de dosis crecientes de GA3 incrementaban su longitud. Para establecer si el tratamiento con sombra simulada alteraba significativamente la respuesta de los hipocotilos a la aplicación exógena de GA3, se aplicó el test estadístico de Two-way Anova (2WA) (**Tabla 2**), que mostró que la interacción entre la condición de sombra simulada y el tratamiento de giberelinas en términos de la elongación del hipocotilo era significativa ( $P < 0,0068$ ). Estos resultados indican que en condiciones de W+FR los hipocotilos de las plántulas responden al tratamiento exógeno de giberelinas, sugiriendo que la sombra simulada no afectaría la sensibilidad a giberelinas de los hipocotilos.

### **3. Respuesta a GA en plántulas con niveles alterados de componentes del SAS.**

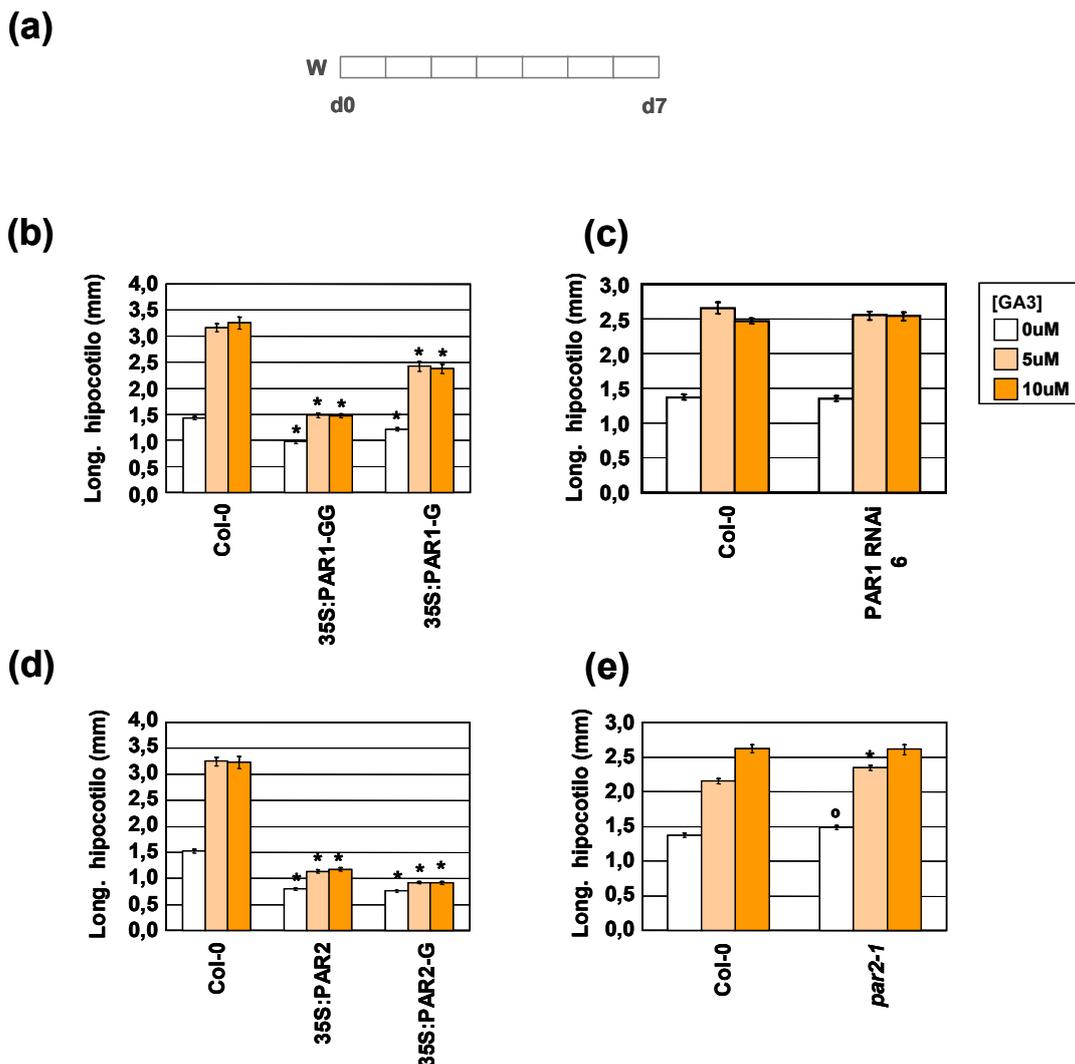
Ha sido planteada la existencia de una integración entre el SAS y rutas hormonales, la cual en parte esta dada por componentes en común que regulan ambas respuestas. Es así como específicamente podemos encontrar reguladores del SAS que modulan la respuesta a auxinas y brasinosteroides como es el caso de los factores PAR1, PAR2, BEE, BIM, ATHB4, HAT2, HAT3, PIF4, PIF5, entre otros. Ya que existe esta base del rol integrador de estos

factores entre el SAS y algunas hormonas se quiso ver la existencia de esto con las giberelinas, viendo el efecto en la elongación del hipocotilo en líneas con diferentes niveles de estos factores bajo tratamientos con la giberelina activa GA3.

### **3.1. Respuesta a GA en plántulas con niveles alterados de PAR1 y PAR2.**

Resultados previos del laboratorio habían mostrado que PAR1 y PAR2 modulan la respuesta de auxinas por la regulación de la expresión de los genes *SAUR15* y *SAUR68*, implicados con auxinas y BRs. Si bien no había datos moleculares que implicara a PAR1 y PAR2 con las giberelinas, el aspecto de las plantas transgénicas de sobreexpresión de *PAR1* y *PAR2* (enanismo y color verde oscuro) recordaba a plantas deficientes en niveles o señalización de GAs como el mutante *gai-1d* (Peng and Harberd, 1993, 1997) y *ga* (Davies, 2004), lo que sugería una posible conexión entre estos factores y las GAs. Es así como previamente en el laboratorio se analizó la respuesta a GA3, en relación al alargamiento de cotiledones y de hojas primarias viéndose una respuesta casi atenuada en comparación a Col-0, descartándose que la sobreexpresión de *PAR1* provocara el fenotipo enano por inhibición de la biosíntesis de GAs (Roig-Villanova, 2007)(Roig-Villanova tesis doctoral 2007). Nosotros quisimos analizar el efecto de la GA3 en la elongación del hipocotilo en líneas con altas y bajas concentraciones de PAR1 y PAR2 en 3 concentraciones de GA3, con el fin de para dar mas información con el resultado previo entregado.

Para esto se midió el hipocotilo de líneas sobreexpresoras de *PAR1* (35S:PAR1-GG y 35S:PAR1-G), de *PAR2* (35S:PAR2 y 35S:PAR2-G), mutantes de *PAR2* (*par2-1*), *PAR1*-RNAi, y Col-0 crecidas durante 7 días en placas con diferentes concentraciones crecientes de GA3, (0, 5 y 10  $\mu$ M) y se crecieron en W. Como se observa en la **Figura 12** en las plantas sobreexpresoras de *PAR1* (**b**) y *PAR2* (**d**) la elongación del hipocotilo en respuesta a GA3 esta casi anulada en comparación con Col-0 sobre todo las de líneas 35S:PAR2 y 35S:PAR2-G. Por otro lado las líneas que tenían menos



niveles de *PAR1* y *PAR2* respondieron en las 3 diferentes concentraciones de manera similar al control Col-0. El análisis estadísticos de Two-way Anova mostró una interacción entre los niveles alterados de *PAR1* y *PAR2* y el tratamiento de giberelinas en términos de la elongación del hipocotilo, salvo para lo analizado en las líneas PAR1-RNAi y *par2-1* (Tabla 2). Si bien previamente en el laboratorio se definió que PAR1 y PAR2 no son responsables el fenotipo enano por inhibición de la biosíntesis de GAs,

nuestros resultados de igual forma sugerirían que PAR1 y PAR2 estarían modulando la respuesta de giberelinas en lo que respecta a la elongación del hipocotilo. Tanto PAR1 como PAR2 serían reguladores negativos de la respuesta de giberelinas, pero posiblemente de carácter redundante.

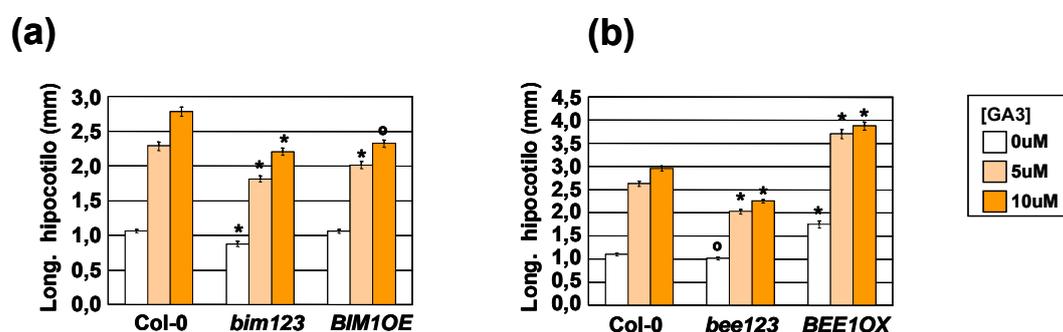
### **3.2. Respuesta a GA en plántulas con niveles alterados de BIMs y BEEs.**

Como se ha comentado en la introducción y veremos más adelante (**Capítulo 3**), otros factores involucrados en el SAS y en hormonas son los BEE y BIM, implicados en la ruta de brasinosteroides y mostrados como reguladores positivos del SAS (Galstyan, 2011). Con el fin de ver si también estos factores son integradores del SAS y giberelinas, se midieron hipocotilos de plántulas crecidas en condiciones similares a las del punto anterior de líneas sobreexpresoras de *BEE1*, *BEE1OX* (35S:*BEE1*) y *BIM1*, *BIM1OX* (35S:*BIM1*-flag) y los triples mutantes de pérdida de función *bee123* y *bim123*, (Friedrichsen et al., 2002).

Como se aprecia en la **Figura 13a**, los hipocotilos de las plántulas *BIM1OX* responden menos a giberelinas en comparación a Col-0. Este resultado fue similar al analizar las líneas *bim123*. El test estadístico de Two-way Anova mostró que la interacción los niveles de BIMs y el tratamiento de giberelinas en términos de la elongación del hipocotilo era significativa (**Tabla 2**). Estos resultados quizás nos dirían que los factores BIM tienen una implicancia en la regulación de la respuesta a giberelina, pero quizás no son parte de los reguladores principales.

Cuando se vio el efecto de giberelinas en la elongación del hipocotilo en plantas sobreexpresoras de *BEE1*, se vio que habían una mayor respuesta en comparación a Col-0. Por otro lado, esta respuesta era menor en el mutante *bee123* al compararla al control (**Figura 13b**). El test estadístico de Two-way Anova mostró que la interacción los niveles de BEE y el tratamiento de giberelinas en términos de la elongación del hipocotilo era significativa. Estos resultados sugerirían los factores BEE también modularían la respuesta de giberelinas en lo que respecta a la elongación del hipocotilo, y que actuarían

como reguladores positivos de esta respuesta como también lo hacen en el SAS.



**Figura 13. Alargamiento del hipocotilo de plántulas diferentes niveles de BIM y BEE en respuesta a la aplicación exógena de GA3.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en **Figura 12a** en placas GM-0,5x con 0, 5 y 10  $\mu$ M de GA3. **(a)** Se compara la respuesta de línea Col-0 con líneas sobreexpresoras de *BIM1* y la línea mutante *bim123*. **(b)** Comparación de la respuesta de línea Col-0 con líneas sobreexpresoras de *BEE1* y de la línea mutante *bee123*. Valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas (tres réplicas); los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.05$ , \* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

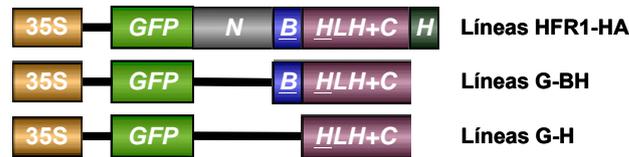
### 3.3. Respuesta a GA en plántulas con niveles alterados de HFR1.

Se analizó también la respuesta a GA del regulador negativo de sombra, HFR1. Para esto se utilizaron líneas que sobreexpresaban formas truncadas de HFR1 (G-BH y G-H) (**Figura 14a**) que en experimentos de sombra simulada no respondían (G-BH) o respondían poco (G-H) a W+FR (Galstyan et al., 2011), el mutante simple *hfr1-5*. Con estas líneas se realizó el mismo tipo de experimento que los descritos anteriormente en este apartado del capítulo. Como se ve en la **Figura 14b**, el análisis de la elongación de los hipocotilos en las líneas que sobreexpresaban las truncaciones de HFR1 mostró que este carácter responde menos que Col-0 a las diferentes concentraciones de GA3. El análisis estadísticos de Two-way Anova mostró una interacción entre los niveles altos de HFR1 (G-BH y G-H) y el tratamiento de giberelinas en términos de la elongación del hipocotilo.

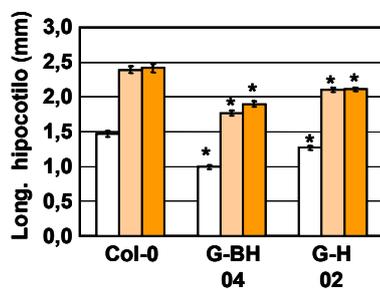
Con respecto al mutante *hfr1-4*, no mostró variación en la elongación del hipocotilo al compararlo con Col-0 en el tratamiento con GA3 (**Figura 14c**). Este resultado es similar a lo visto para PAR1, es decir altas concentraciones del factor vemos efecto en la respuesta a GA y bajas cantidades del factor no

hay diferencia con el control. Esto nos podría indicar que quizás HFR1 también tiene un rol de regulador negativo de la respuesta a giberelinas, pero que no es el responsable principal de esta regulación teniendo rol redundante, al igual que PAR1.

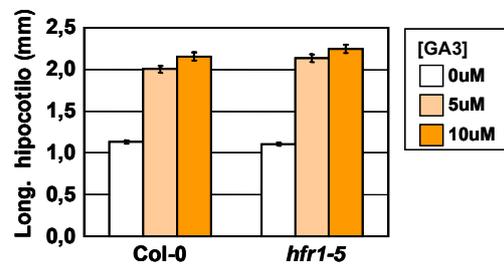
(a)



(b)



(c)

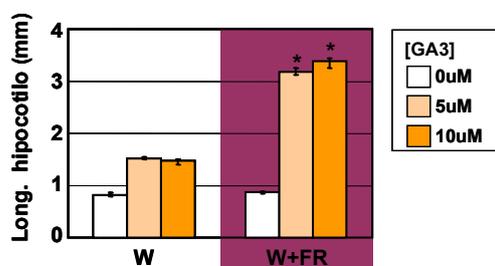


**Figura 14. Alargamiento del hipocotilo de plántulas diferentes niveles de HFR1 en respuesta a la aplicación exógena de GA3.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en **Figura 12a** en placas GM-0,5x con 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de GA3. **(a)** Esquema de las líneas sobreexpresoras de formas truncadas de HFR1. **(b y c)** Se compara la respuesta de línea Col-0 con líneas sobreexpresoras de truncaciones de HFR1 y la línea mutante *hfr1-5*, respectivamente. Valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas (dos réplicas); los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}\text{P} < 0.05$ ,  $^*\text{P} < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

#### 4. Efecto de la sombra simulada en el alargamiento del hipocotilo mediado por hormonas.

El hecho de que factores del SAS estén relacionados con la regulación de hormonas como auxinas, giberelinas, brasinosteroides, sugiere dos cosas. La primera, la cual ya ha sido sugerida en otros trabajos, nos dice que la elongación del hipocotilo en plantas crecidas en condiciones de sombra simulada depende de una respuesta hormonal. En el caso de las giberelinas, para profundizar más esta idea se realizó un experimento similar al de la **Figura 11**, pero además se incluyó en todas las placas el inhibidor de la síntesis de giberelinas pacobutrazol (PAC), con el fin de ver si realmente las

giberelinas son importantes para la respuesta a sombra simulada. Por lo que semillas del control Col-0 se sembraron sobre papel filtro en placas medio 0.5x GM-. Luego de la estratificación se les dio un pulso de 1 h de luz W, luego de lo cual se pasaron a placas con medio 0.5x GM- con 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de GA3 más 50  $\mu\text{M}$  de PAC (por duplicado), y se hizo el experimento de sombra comentado anteriormente. Como se ve en la **Figura 15**, vemos que en ausencia de GA3, la elongación del hipocotilo en W+FR esta atenuada y es similar a lo que ocurre en W. En las gráficas con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de GA3 vemos que existe una recuperación de la elongación del hipocotilo en W+FR comparándolo con W. Estos datos enseñaron que las giberelinas son necesarias para la respuesta a sombra.



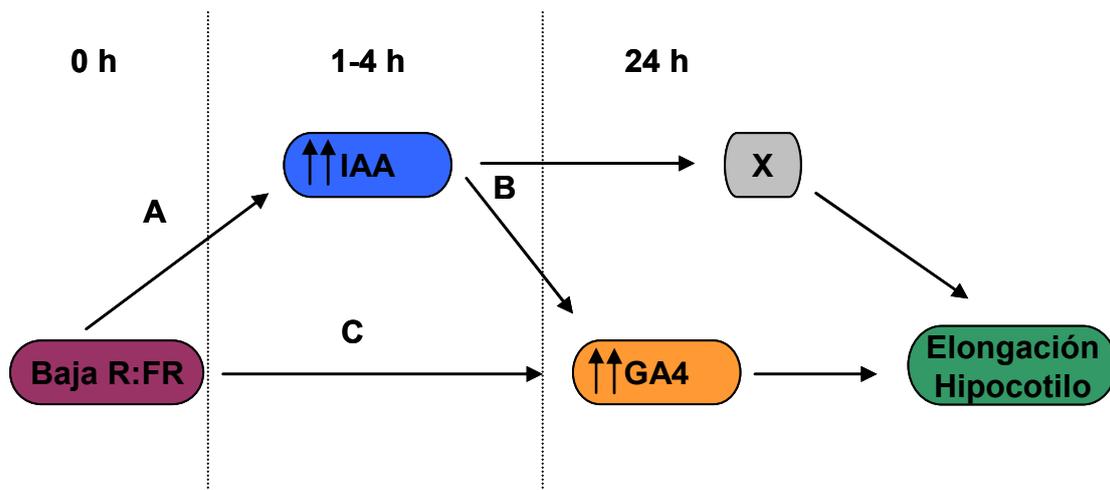
**Figura 15. Efecto de la sombra simulada en el alargamiento del hipocotilo en respuesta a la aplicación exógena de GA3.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en **Figura R11a** en placas GM-0,5x con PAC y 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de GA3. Se compara la respuesta de línea control. Valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas (tres réplicas); los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}\text{P} < 0.05$ ,  $^*\text{P} < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

La otra sugerencia radica en que quizás estas hormonas no actúan de forma independiente y hay pasos de por medio entre la captación de la baja R:FR y la elongación del hipocotilo, donde primero puede actuar una hormona y luego otra.

Se ha visto que los niveles de la giberelina activa GA4 incrementen después de 24 h de sombra simulada. Por otro lado, a 1 h en condiciones de W+FR hay un incremento en los niveles de auxina acompañado de un incremento en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de giberelinas, genes los cuales también están regulados por auxinas (Tao et al., 2008). Esta información nos podría decir que quizás la elongación del hipocotilo en respuesta a sombra puede deberse quizás a un mecanismo que involucra de

manera directa o indirecta a las auxinas en cuando a la regulación de giberelinas (**Figura 16**).

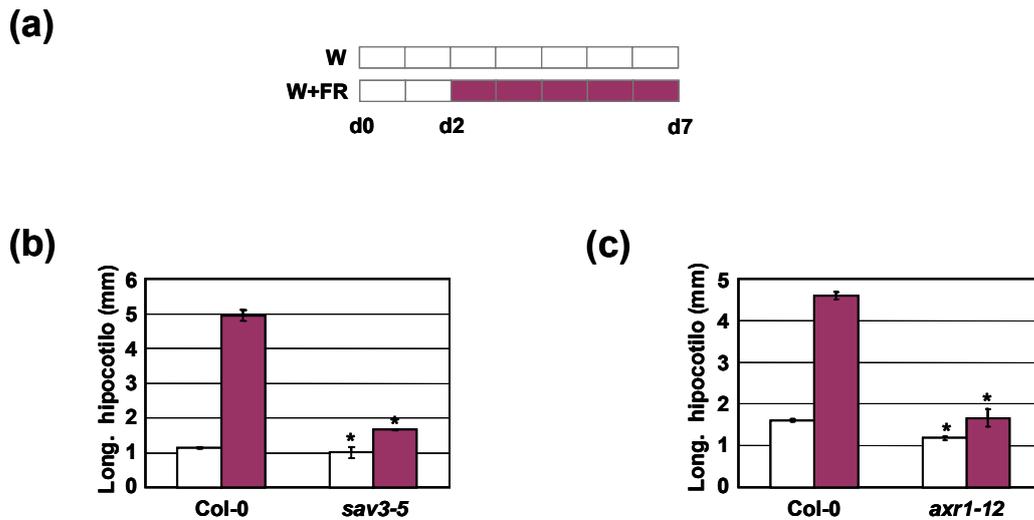
Esta implicancia de las auxinas y giberelinas en la elongación del hipocotilo ya ha sido vista en condiciones de luz W, en donde se ha descrito que las auxinas actúan de manera dependiente e independiente de las giberelinas para generar una elongación del hipocotilo, no a sí las giberelinas que al parecer requieren de la acción previa de auxinas (Chapman et al., 2012; Frigerio et al., 2006).



**Figura 16. Modelo del efecto de la sombra simulada en el alargamiento del hipocotilo intermediado por hormonas.** Se sugiere que la elongación del hipocotilo por el efecto de sombra podría depender del aumento de auxinas (Paso A) o independiente de este aumento (paso C).

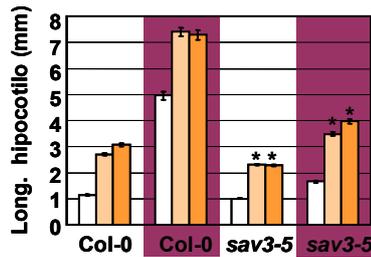
Para estudiar la posibilidad de una regulación integrada entre auxinas y giberelinas sobre la elongación del hipocotilo en respuesta a condiciones de sombra simulada, se realizaron experimentos moleculares y fisiológicos sobre mutantes de auxinas que tienen alterada su respuesta a sombra simulada.

El mutante *sav3-5* se ha mostrado que es deficiente en un paso de la biosíntesis de auxinas requerido para un incremento rápido en los niveles de IAA tras la exposición a W+FR; como consecuencia este mutante casi no responde a sombra simulada (Tao et al., 2008) (**Figura 17b**). Por otro lado, el mutante *arx1-12* está implicado también en la sensibilidad de auxinas pero a nivel de la maquinaria de ubiquitinación (Pierik et al., 2009), y como se ve en la **Figura 17c**, también muestra insensibilidad a W+FR.



**Figura 17. Respuesta a W+FR en líneas mutantes de auxinas, *sav3-5* y *axr1-12*.** (a) Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de la sombra simulada en el fenotipo morfológico de las plántulas *sav3-5* y *axr1-12*. (by c) Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en a. Se compara la respuesta de línea control Col-0 y las líneas mutantes de auxinas. Valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas (tres réplicas); los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}P < 0.05$ ,  $^{*}P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

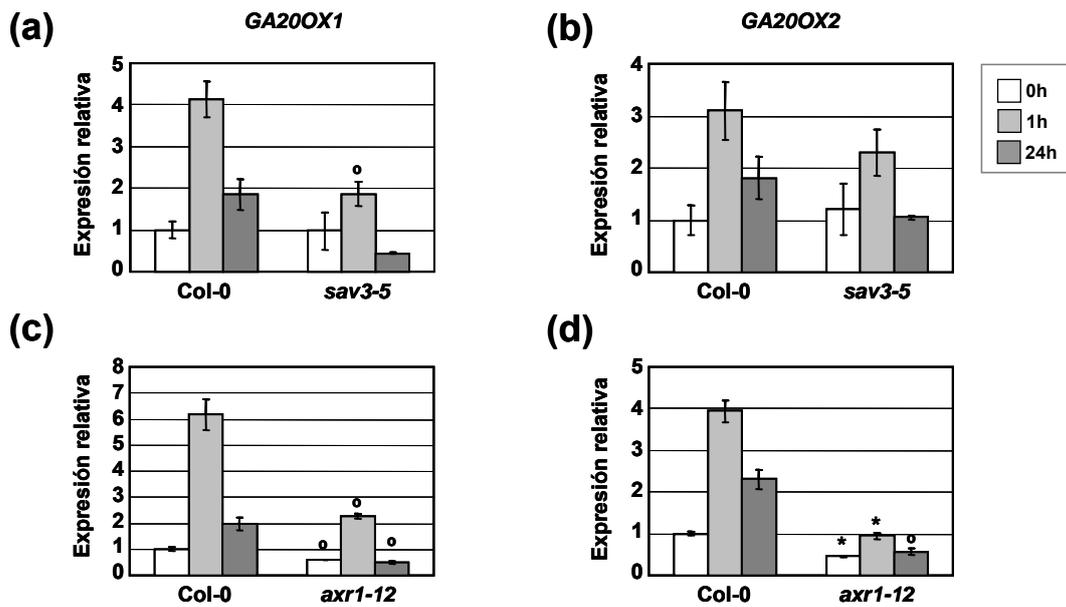
Se quizá estudiar si el efecto de las auxinas era directo sobre las giberelinas para provocar la elongación de hipocotilo, o si quizás existía otra ruta regulada por auxinas independiente de las giberelinas. Para esto se realizó un experimento de sombra simulada con tratamientos de 0, 5 y 10  $\mu$ M de GA3 sobre el mutante *sav3-5* y Col-0. Como se puede apreciar en la **Figura 18** la aplicación de giberelina exógena tiene afecta la elongación del hipocotilo en el mutante, sobre todo en W+FR donde es un poco mayor que en luz W. Pese a que hay respuesta la aplicación de giberelinas no es suficiente para que el *sav3-5* en condición de sombra recupere el fenotipo silvestre (Col-0), dándonos a entender que las auxinas estarían implicadas en la respuesta de la elongación del hipocotilo en sombra regulando a las giberelinas, pero que también estarían regulando otras vías implicadas en la elongación independiente de las giberelinas.



**Figura 18. Efecto de la sombra simulada en el alargamiento del hipocotilo en respuesta a la aplicación exógena de GA3.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en **Figura 11a**. Se compara la respuesta de línea control Col-0 y el mutante *sav3-5*. Valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas (tres réplicas); los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}P < 0.05$ ,  $^{*}P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

Recordando lo comentado inicialmente en este apartado sobre que se ha visto previamente que los niveles de la giberelina activa GA4 incrementan después de 24 h de sombra antes de lo cual a 1 h de tratamiento de sombra simulada hay un incremento en los niveles de auxina acompañado de una inducción en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de giberelinas, se decidió hacer experimentos moleculares en plántulas Col-0, *sav3-5* y *axr1-12* con 7 días sobre las cuales se hicieron tratamientos de 0, 1 y 24 h de W+FR para analizar el nivel de expresión de genes implicados en la biosíntesis de giberelinas. Luego de los tratamientos de sombra simulada las muestras fueron procesadas para obtener el RNA con el fin de sintetizar cDNA que se utilizó como molde para las reacciones de PCR Cuantitativo en Tiempo Real (qPCR). Los genes que fueron seleccionados para analizar fueron *GA20ox1* y *GA20ox2*. La selección de estos genes se basó en que su expresión esta regulada tanto por sombra (Franklin and Whitelam, 2007; Tao et al., 2008) como por auxinas (Curaba et al., 2004; Frigerio et al., 2006). Como se ve en la **Figura 19**, los niveles de *GA20ox1* y *GA20ox2* en el mutante *sav3-5* (**a** y **b**) eran iguales a los del control Col-0 antes del tratamiento con W+FR (0 h); tras 1 h de W+FR la expresión de estos genes se indujo 3-4 veces en Col-0, mientras que esta inducción era inferior en el mutante *sav3-5*, de manera significativa para *GA20ox1* ( $P < 0.05$ ). A las 24 h del tratamiento, los niveles bajaron tanto en las plántulas control, tal como se esperaba, como en las *sav3-5*.

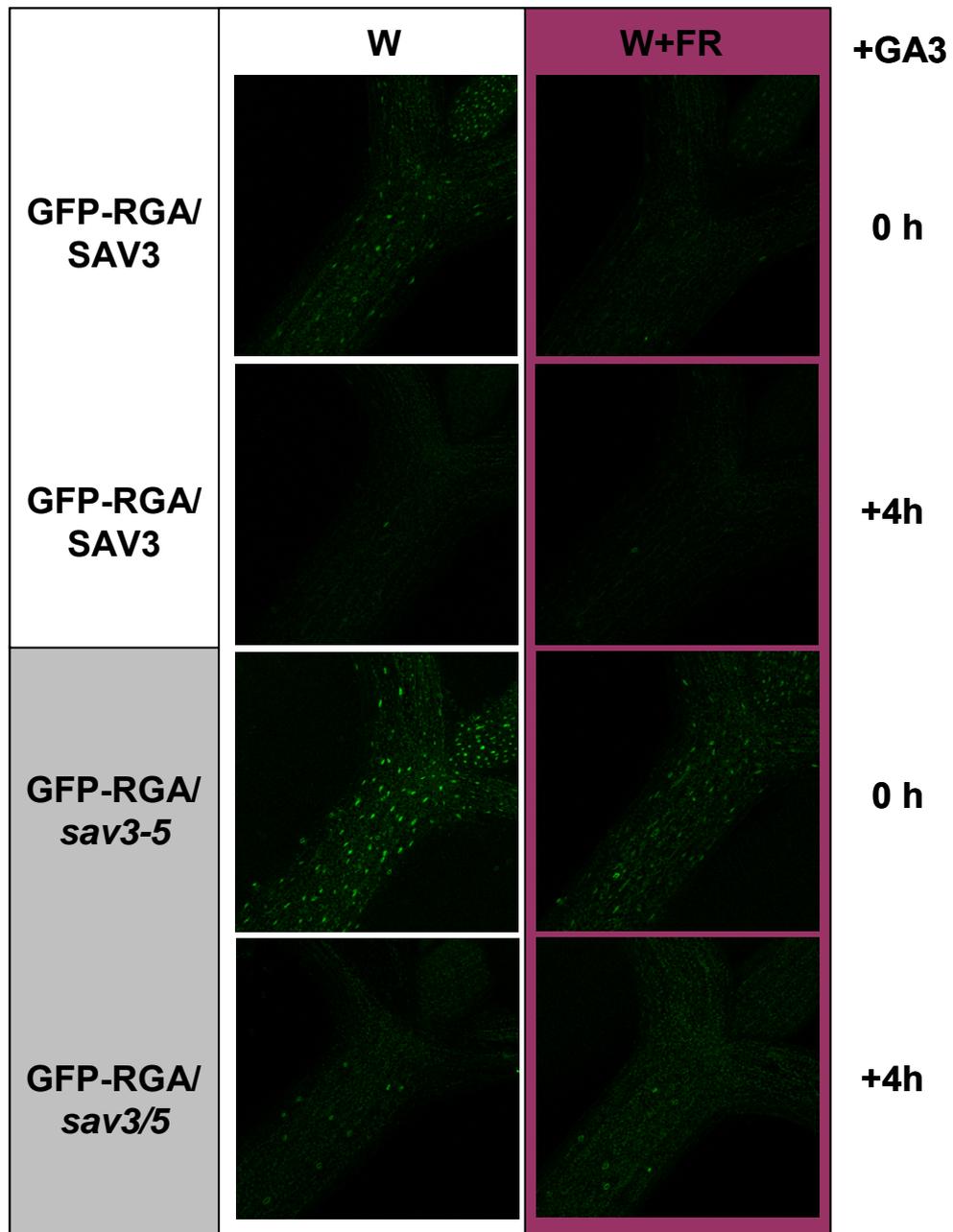
Para los análisis hechos entre Col-0 y el mutante *axr1-12* se vio que a antes del tratamiento el mutante respondía menos que el control; tras 1 h de tratamiento la expresión los genes *GA20ox1* y *GA20ox2* se indujo significativamente 3-4 veces ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente) en el control, mientras que en el mutante *axr1-12* esta inducción era inferior. A las 24 h del tratamiento, los niveles bajaron tanto en las plántulas control, tal como se esperaba, así como también en la línea mutante.



**Figura 19. Respuesta molecular de plántulas que mutantes *sav3-5* y *axr1-12*.** Análisis de la expresión de los genes de síntesis de giberelinas *GA20OX1* y *GA20OX2* en plántulas control (Col-0), en las líneas *sav3-5* y *axr1-12* crecidas durante 7 días en luz blanca continua después de los cual se hicieron tratamientos de 0, 1 y 24 hrs de sombra simulada. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de tres réplicas independientes de qPCR normalizada con *UBIQUITINA10* (*UBQ10*). La expresión de genes normalizados se presenta en relación con la expresión de las plántulas control (Col-0) sin tratar; los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}P < 0.05$ ,  $*P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

Los resultados observados nos indican que el tratamiento de sombra simulada incide directamente en la regulación de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de giberelinas, pero esta regulación no es suficiente para recuperar el nivel de expresión que tiene Col-0 cuando se analizan los dos mutantes de auxina, lo cual nos podría estar indicando que por lo visto las auxinas son necesarias para la regulación de la respuesta a giberelinas en condiciones de sombra.

Para confirmar esta sugerencia, se llevó a cabo el cruce entre la línea transgénica pRGA:GFP-RGA (GFP-RGA/SAV3) y el mutante *sav3-5*. Previos experimentos con la línea pRGA:GFP-RGA habían mostrado que la abundancia de RGA disminuía en condiciones de sombra simulada, mostrando así que una de las respuestas de SAS a nivel hormonal involucra síntesis de GAs (Djakovic-Petrovic et al., 2007b). El cruce se realizó entre los ovarios de flores emasculadas de la línea receptora (GFP-RGA/SAV3) con polen de la línea donadora (*sav3-5*). Aproximadamente a las tres semanas se cosecharon las semillas originadas del cruzamiento (F1), y se sembraron 3 semillas por cruce. La autofecundación de plantas F1 dio lugar a las semillas de la generación F2, en la que los diferentes alelos estaban segregando. Se sembraron unas 30 semillas de esta generación y tras transcurrir aproximadamente 3 semanas se identificaron las plantas dobles mutantes mediante genotipado por análisis por PCR. Con las líneas seleccionadas se espero la generación F3 con la cual se realizarían experimentos de sombra simulada para ver la abundancia de la proteína RGA. Para esto, semillas GFP-RGA/SAV3 y GFP-RGA/*sav3-5* se sembraron en placas de medio 0.5x GM-. Tras la estratificación, se realizó el experimento de sombra simulada como el comentado al inicio del capítulo. Luego del tratamiento de luz se hizo un tratamiento de 0 y 4 h con 50  $\mu$ M de GA3 en las mismas condiciones de luz donde se encontraban las placas. Las plantulas a 0 y 4 h de tratamiento fueron observadas en microscopio confocal para ver la señal GFP correlacionada con la abundancia de RGA. Tal como se observa en la **Figura 20**, en W tanto la línea control como el cruce presentaron señal óptima de GFP. En condiciones de W+FR, la línea RGA/SAV3 presentó una ausencia de la señal de GFP, mientras en el cruce GFP-RGA/*sav3-5* mostraba aun señal de GFP, dando a entender que el componente *sav3-5* estaba alterando la normal degradación de RGA (**Figura 20**). Finalmente todas las líneas tratadas con 50  $\mu$ M de GA3 mostraron degradación total de la proteína GFP-RGA, sugiriendo que la abundancia de RGA era totalmente dependiente de giberelinas. Estos resultados indican, al igual que los análisis de expresión, las auxinas son necesarias para la regulación de la respuesta a giberelinas en condiciones de sombra.



**Figura 20. Respuesta de hipocotilos a 5 días de tratamiento de sombra simulada.** Señal RGA-GFP de los hipocotilos de plántulas RGA-GFP/SAV3 y RGA-GFP/*sav3-5* es reducido bajo tratamiento de W+FR, y completamente abolido con tratamientos de 4 h de 50  $\mu$ M de GA3.

Figura R1.1b Long. Hipocotilo Col-0 (W) vs Col-0 (W+FR)					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	2,664	1,332	5,2	0,0068
GA3	2	72,98	36,49	142,4	P<0.0001
Genotipo	1	607,5	607,5	2371	P<0.0001
Error	124	31,77	0,2562	-	-

Figura R1.2b Long. Hipocotilo Col-0 vs PAR1-GG					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	13,41	6,707	56,67	P<0.0001
GA3	2	42,96	21,48	181,5	P<0.0001
Genotipo	1	63,39	63,39	535,5	P<0.0001
Error	146	17,28	0,1184	-	-

Figura R1.2b Long. Hipocotilo Col-0 vs PAR1-G					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	3,176	1,588	8,585	0,0003
GA3	2	77,56	38,78	209,7	P<0.0001
Genotipo	1	15,08	15,08	81,55	P<0.0001
Error	157	29,04	0,185	-	-

Figura R1.2c Long. Hipocotilo Col-0 vs PAR1-RNAi					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	0,1827	0,09134	1,159	0,3167
GA3	2	47,1	23,55	298,8	P<0.0001
Genotipo	1	0,01548	0,01548	0,1964	0,6583
Error	143	11,27	0,07881	-	-

Figura R1.2d Long. Hipocotilo Col-0 vs PAR2					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	13,06	6,529	58,78	P<0.0001
GA3	2	30,4	15,2	136,8	P<0.0001
Genotipo	1	86,75	86,75	781	P<0.0001
Error	128	14,22	0,1111	-	-

Figura R1.2d Long. Hipocotilo Col-0 vs PAR2-G					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	16,63	8,317	74,21	P<0.0001
GA3	2	23,83	11,92	106,3	P<0.0001
Genotipo	1	98,79	98,79	881,5	P<0.0001
Error	121	13,56	0,1121	-	-

Figura R1.2e Long. Hipocotilo Col-0 vs par2-1					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	0,2859	0,143	2,25	0,1089
GA3	2	39,48	19,74	310,7	P<0.0001
Genotipo	1	0,3775	0,3775	5,942	0,0159
Error	153	9,722	0,06354	-	-

Figura R1.3a Long. Hipocotilo Col-0 vs BIM1					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	1,169	0,5845	8,766	0,0003
GA3	2	52,38	26,19	392,8	P<0.0001
Genotipo	1	2,038	2,038	30,57	P<0.0001
Error	130	8,668	0,06668	-	-

Figura R1.3a Long. Hipocotilo Col-0 vs bim123					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	0,9942	0,4971	7,797	0,0006
GA3	2	60,12	30,06	471,5	P<0.0001
Genotipo	1	6,349	6,349	99,59	P<0.0001
Error	144	9,181	0,06375	-	-

Figura R1.3b Long. Hipocotilo Col-0 vs BEE1					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	1,165	0,5825	4,334	0,0148
GA3	2	121,4	60,69	451,5	P<0.0001
Genotipo	1	30,21	30,21	224,8	P<0.0001
Error	151	20,29	0,1344	-	-

Figura R1.3b Long. Hipocotilo Col-0 vs bee123					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	2,945	1,472	28,93	P<0.0001
GA3	2	72,2	36,1	709,2	P<0.0001
Genotipo	1	8,625	8,625	169,4	P<0.0001
Error	154	7,838	0,0509	-	-

Figura R1.4b Long. Hipocotilo Col-0 vs G-BH					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	1,875	0,9375	16,94	P<0.0001
GA3	2	34,31	17,15	310	P<0.0001
Genotipo	1	10,05	10,05	181,7	P<0.0001
Error	146	8,078	0,05533	-	-

Figura R1.4b Long. Hipocotilo Col-0 vs G-H					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	0,804	0,402	6,955	0,0013
GA3	2	41,43	20,71	358,3	P<0.0001
Genotipo	1	4,495	4,495	77,76	P<0.0001
Error	148	8,555	0,0578	-	-

Figura R1.4c Long. Hipocotilo Col-0 vs hfr1-5					
Fuente de la variación	D.L.	S.Q	Mediana	F	P valor
Interacción	2	0,1874	0,09372	1,951	0,1453
GA3	2	40,26	20,13	418,9	P<0.0001
Genotipo	1	0,1812	0,1812	3,771	0,0538
Error	171	8,216	0,04805	-	-

Tabla 2. Tabla de análisis estadístico Two-way Anova para los tratamientos con giberelinas.



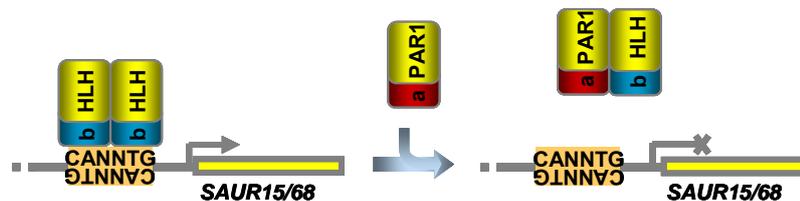
## **CAPITULO II.**

---



## 1. Análisis del mecanismo molecular de PAR1.

Como se mencionó en la introducción, genéticamente PAR1 es un regulador negativo del SAS que actúa en el núcleo reprimiendo directamente la expresión de genes como *SAUR15* y *SAUR68*. La secuencia primaria de PAR1 sugiere que esta BHLH atípica no une DNA ya que posee el dominio HLH (que permite dimerización) pero carece del dominio básico (b, de unión a DNA), que está reemplazado por un dominio ácido (a). PAR1 sí es capaz de interaccionar consigo misma o con otras proteínas a través del dominio HLH (Galstyan et al., 2011). Esto nos ha llevado a postular que se trataría de un cofactor transcripcional, es decir, que reprimiría la expresión de sus genes diana *SAUR15* y *SAUR68* sin unir directamente DNA pero heterodimerizando con factores de transcripción BHLH y modulando su capacidad de unir elementos reguladores en los promotores de estos genes diana (**Figura 21**). Para analizar



**Figura 21. Modelo de acción de PAR1.** El análisis de la estructura primaria de PAR1 y los resultados de expresión génica de genes marcadores como *SAUR15/68* sugieren que PAR1 reprimiría su expresión génica porque heterodimerizaría con otros factores del tipo BHLH impidiendo que estos puedan unirse a DNA y activar la expresión génica. **a**, dominio ácido de PAR1; **b**, dominio básico de una BHLH típica.

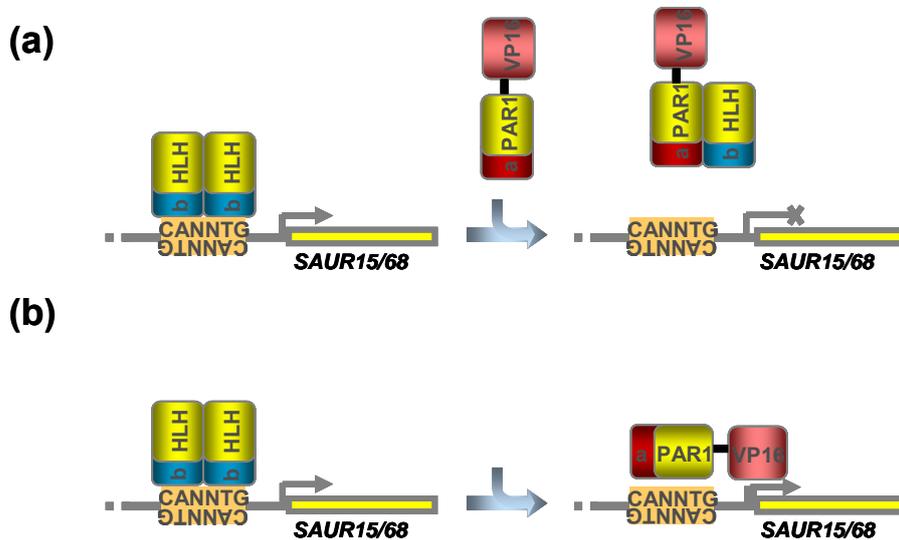
nuestra hipótesis nos planteamos fusionar la proteína PAR1 a algún dominio que permita analizar el mecanismo de acción de esta proteína. Se ha visto que la fusión de un dominio de activación de la transcripción puede ser capaz de transformar un represor en activador transcripcional si el represor ejerce su acción uniéndose directamente a secuencias reguladoras de los promotores de los genes que regula. Esto implica que el represor transcripcional tiene la capacidad de unir DNA de manera específica, es decir, posee un dominio de unión a DNA funcional. Por eso nos planteamos fusionar *PAR1* a un dominio

activador de la transcripción y sobreexpresarlo en plantas para analizar la expresión de sus genes diana directos *SAUR15* y *SAUR68*.

Los activadores de la transcripción son proteínas que típicamente poseen un dominio de interacción directa a secuencias reguladoras concretas del DNA en los promotores de los genes que regula, llamado **dominio de unión a DNA**, y otro que interactúa con componentes de la maquinaria transcripcional formando complejos que activarían la transcripción génica, llamado **dominio de activación** (Sadowski et al., 1988). Un conocido activador de la transcripción es el factor VP16, del virus herpes simplex de animales. Esta proteína consta de un dominio de unión a DNA, en la región N-terminal, y un dominio activador, en el extremo C-terminal (residuos 413-490). El dominio activador puede activar la transcripción cuando se fusiona a dominios de unión a DNA en varios sistemas heterólogos, e incluso convertir un represor transcripcional en activador (Shen et al., 1996). El dominio activador VP16, a pesar de ser de origen vírico, se ha utilizado con éxito en plantas (Aoyama et al., 1995; Groszmann et al., 2008; Tiwari et al., 2003).

Según lo anteriormente descrito, podemos analizar si *PAR1* es un cofactor transcripcional, es decir un factor de transcripción que no une DNA, fusionándolo con el dominio activador de *VP16* y sobreexpresándolo en plantas (líneas 35S:PAR1-V). Si *PAR1* no une DNA, la proteína de fusión resultante no se uniría a los promotores de los genes que regula, y las plantas transgénicas resultantes deberían tener una respuesta molecular similar a plantas que sobreexpresan *PAR1*. Es decir, la inducción de la expresión de los genes *SAUR15* y *SAUR68* por la aplicación de auxinas (descritos en introducción como dianas primarias de la acción de *PAR1*) debería estar reprimida, tal como se ha observado en las líneas que sobreexpresan *PAR1* fusionado al gen marcador *GFP* (líneas 35S:PAR1-G) y *PAR1* fusionado al doble marcador *GFP-GUS* (líneas 35S:PAR1-GG) (Roig-Villanova et al., 2007) (**Figura 22a**). A nivel fenotípico, la sobreexpresión de *PAR1-V* debería resultar en fenotipos similares a los que muestran plantas transgénicas que sobreexpresan *PAR1* (35S:PAR1-G o 35S:PAR1-GG), es decir enanas y de coloración verde oscura. Alternativamente, si nuestra hipótesis sobre el mecanismo de acción de *PAR1* es incorrecta y *PAR1* sí pudiera unirse a DNA, esperaríamos que a nivel molecular la sobreexpresión de *PAR1-V* incrementase los niveles de transcrito

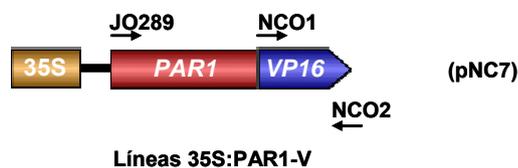
*SAUR15* y *SAUR18* por la acción del dominio activador de la transcripción VP16 fusionado a la proteína PAR1 (**Figura 22b**). A nivel fenotípico no sabríamos con certeza qué esperar, si bien parece razonable que el fenotipo fuese opuesto al de plantas transgénicas que sobreexpresan *PAR1*.



**Figura 22. Modelos de posible mecanismo de acción de PAR1-V.** (a) Si PAR1 no es capaz de unir DNA, la sobreexpresión de *PAR1-V* resultaría en fenotipos moleculares similares a los de líneas que sobreexpresan *PAR1* fusionado a *GUS-GFP* (líneas 35S:*PAR1-GG*). (b) Si PAR1 es capaz de unir DNA, la sobreexpresión de *PAR1-V* permitiría que el dominio activador de la transcripción accediese a los promotores de los genes directos de *PAR1*, como *SAUR15/68*, y activase su transcripción.

Con estas predicciones y para estudiar la hipótesis de que PAR1 es un cofactor transcripcional, se generaron líneas transgénicas que sobreexpresaban constitutivamente *PAR1-V* (**Figura 23**). El plásmido para obtener las líneas 35S:*PAR1-V* se generó mediante la fusión en marco de lectura del fragmento de DNA que codifica el dominio activador de VP16 (contenido en el plásmido pAlligator1, proporcionado por François Parcy, Universidad de Grenoble, Francia), con *PAR1*, para dar lugar a pNC7 (35S:*PAR1-V*, **Figura 23**). Este plásmido binario se usó para transformar plantas de *Arabidopsis* mediante *A. tumefaciens* usando el sistema del *floral dipping* (Clough et al., 1999). Luego de aproximadamente 4 semanas se recolectaron las semillas de las plantas transformadas (semillas T1) y se identificaron un total de 32 plantas transgénicas T1 por su resistencia al antibiótico Kanamicina (Km). Se confirmó la presencia del transgen mediante análisis por PCR con oligonucleótidos específicos en las 32 plantas

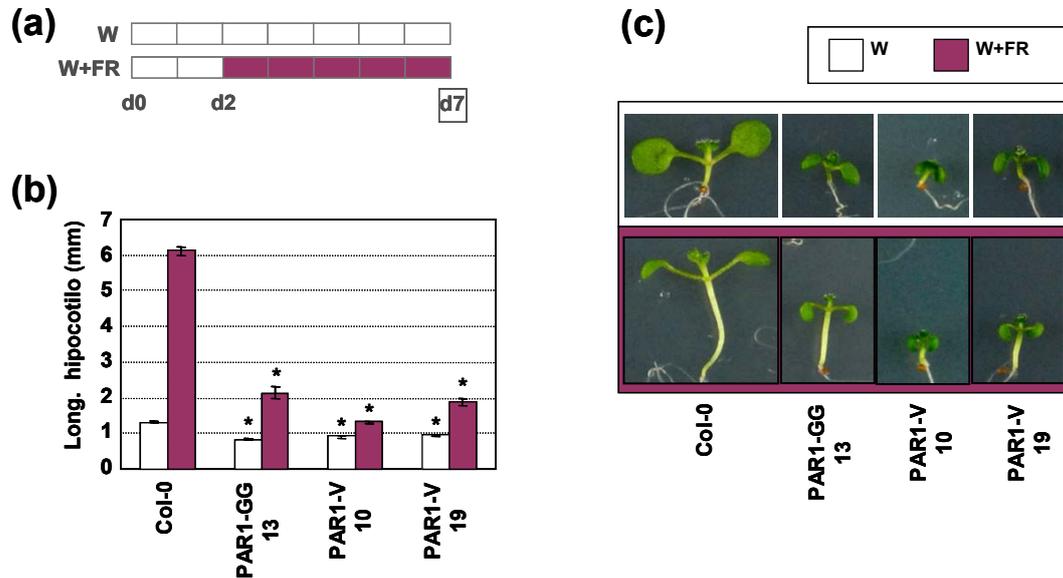
seleccionadas (**Figura 23, Tabla 3**). Con las semillas T2 de las 32 plantas identificadas se realizó el recuento de la segregación de la resistencia a Km, identificándose 14 líneas procedentes de 1 sólo evento de inserción de T-DNA. De éstas 14 líneas, 7 mostraban un fenotipo enano en estadio de plántula (05, 10, 11, 17, 19, 21 y 29), similar al de la sobreexpresión de *PAR1* (indicar alguna Figura de introducción donde salga el fenotipo de *PAR1*). Al menos 8 plántulas de cada una de las 7 líneas con fenotipo y con 1 T-DNA fueron pasadas a tiestos para producir semillas (generación T3) e identificar líneas homocigotas. De las 7 líneas seleccionadas, no se encontró plantas homocigotas en plantas de las líneas 11 y 29, por lo que se siguió haciendo experimentos con las 5 líneas restantes (**Tabla 3**).



**Figura 23. Esquema de la construcción empleada para la obtención de líneas transgénicas 35S:PAR1-V.** Se transformaron plantas Col-0 con el plásmido binario pNC7, para sobreexpresar la fusión traduccional de *PAR1* y el dominio activador de *VP16* bajo el control del promotor 35S. En paréntesis se indica el nombre de la construcción. Las flechas indican los oligonucleótidos empleados para genotipar las plantas transgénicas obtenidas.

A continuación se analizó la respuesta a sombra simulada de plántulas de las líneas homocigotas obtenidas. Se sembraron (en placas de medio 0.5x GM-) semillas de la línea no transgénica (Col-0), de una línea de sobreexpresión de *PAR1-GG* y dos líneas representativas 35S:PAR1-V (10 y 19). Las semillas se germinaron, luego de estar en estratificación (**ver Materiales y Métodos**), en luz blanca continua (W) durante 2 días, tras los cuales un grupo se mantuvo en luz W y el otro fue transferido a luz W enriquecida en luz rojo lejano (W+FR) durante 5 días adicionales (hasta día 7) (**Figura 24a**). Tal como se observa en la **Figura 24b**, la respuesta del hipocotilo a sombra simulada de las plántulas 35S:PAR1-V es similar a la de las 35S:PAR1-GG e inferior a la del Col-0. El conjunto de estos resultados indica que a nivel fenotípico las líneas de sobreexpresión de *PAR1-V* se comportan de manera similar a las líneas de sobreexpresión *PAR1-GG*. Otros caracteres afectados de forma similar en las plántulas de las líneas 35S:PAR1-V y

35S:PAR1-GG eran el tamaño (enanías) y la coloración (verde oscuro) (**Figura 24c**).

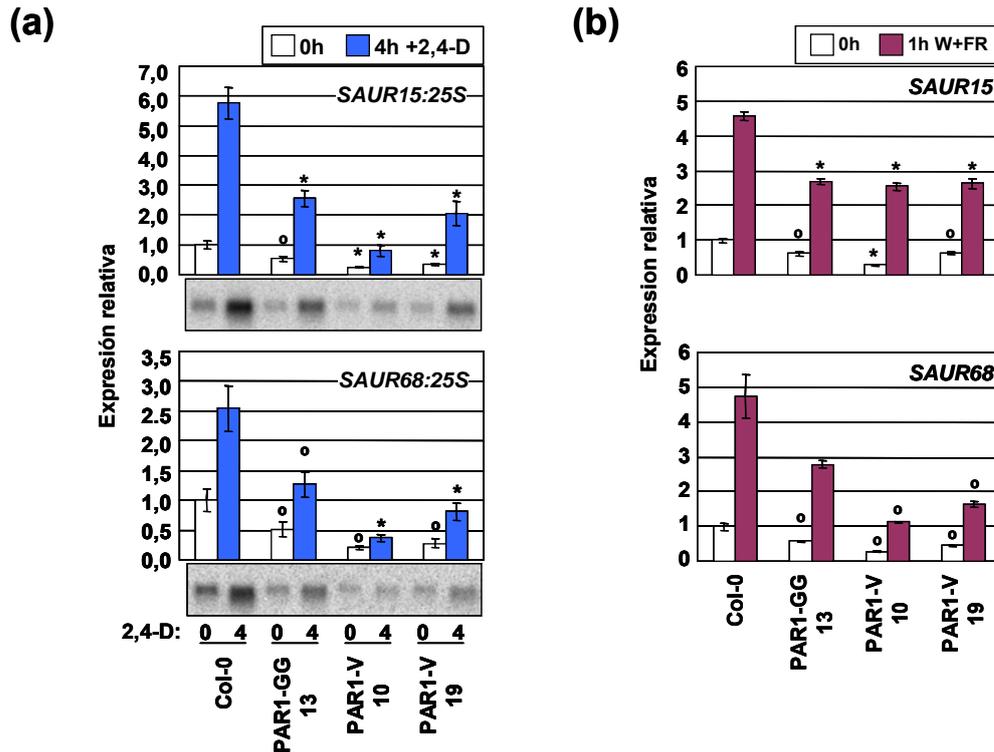


**Figura 24 Fenotipo morfológico de plántulas que sobreexpresan *PAR1-V*.** (a) Diseño experimental empleado para estudiar el efecto de la sombra simulada en el fenotipo morfológico de las plántulas. (b) Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en (a). Se compara la respuesta de líneas no transgénicas (Col-0), líneas que sobreexpresan *PAR1-GUS-GFP* (35S:PAR1-GG) y 2 líneas 35S:PAR1-V independientes. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones. (c) Aspecto en día 7 de plántulas representativas de las líneas descritas y analizadas en (b).

Una vez analizada la respuesta fisiológica de líneas independientes 35S:PAR1-V (10 y 19), se comparó la expresión de los genes *SAUR15* y *SAUR68*. Se ha visto que en luz W, la expresión de ambos genes es baja, y es difícil detectar diferencias notorias entre líneas Col-0 y sobreexpresoras de *PAR1*. La aplicación de auxinas (como 2,4-D) induce fuertemente la expresión de *SAUR15* y *SAUR68* en las líneas Col-0, la cual está claramente atenuada en líneas sobreexpresoras de *PAR1*. Similares resultado se han visto con tratamientos de sombra simulada (Roig-Villanova et al., 2007). Por lo que se sembraron en placas semillas de Col-0, 35S:PAR1-GG y las 2 líneas 35S:PAR1-V indicadas y posteriormente se crecieron en luz W. En día 7 las plantas se trataron con 50  $\mu$ M 2,4-D. Se recogió material vegetal inmediatamente antes (0 h) y tras 4 h de tratamiento con 2,4-D. Las muestras fueron procesadas y se extrajo el RNA. Utilizando este material se llevó a cabo un análisis de RNA blot para cuantificar la expresión de los genes *SAUR15* y *SAUR68*. Como se observa en la **Figura 25a**, los niveles de transcritos de

*SAUR15* y *SAUR68* estaban reducidos en las plántulas 35S:PAR1-V y 35S:PAR1-GG no tratadas (0 h) en comparación con la línea control Col-0 crecida en las mismas condiciones. En plántulas tratadas durante 4 h con 2,4-D, los niveles de transcrito de ambos genes estaba inducida en todas las líneas, pero los niveles eran significativamente menores en las líneas 35S:PAR1-V y 35S:PAR1-GG que en la línea Col-0. De manera similar se analizó la expresión de ambos genes en respuesta a tratamientos de 0 y 1 h con W+FR, pero los niveles de transcrito se cuantificaron con PCR Cuantitativo en Tiempo Real (qPCR). Los resultados obtenidos fueron similares a los observados en el experimento anterior (**Figura 25b**). El conjunto de estos resultados indicaban que a nivel molecular las líneas 35S:PAR1-V se comportaban de manera similar que la línea 35S:PAR1-GG, lo que indica que la proteína PAR1-V también reprimía la expresión de *SAUR15* y *SAUR68*.

Como VP16 es de origen no vegetal (virus de animales), su cDNA puede mostrar preferencia por codones diferentes a los de los genes vegetales. Esto podría reducir exclusivamente la eficiencia de la traducción de la parte de origen vírico del mRNA resultante de la transcripción del transgen *PAR1-V*. Por eso no podíamos descartar la posibilidad de que en estas plantas 35S:PAR1-V se tradujesen proteínas transgénicas que contuvieran la parte correspondiente a la proteína PAR1 entera y truncadas en la parte C-terminal, correspondiente al dominio VP16. Estas formas truncadas podrían mantener la actividad de PAR1 en ausencia de parte o todo el dominio VP16. Varios laboratorios han sugerido explicaciones similares para justificar la actividad basal observada en plantas transgénicas que sobreexpresan factores reguladores de la transcripción de origen vegetal (por ejemplo, *PAR1*, *ATHB4*, *AP3*) fusionados al dominio del receptor de glucocorticoide (*GR*), un gen de origen animal (Roig-Villanova et al., 2007; Sablowski and Meyerowitz, 1998; Sorin et al., 2009). Por lo tanto, era posible que el fenotipo observado en las líneas 35S:PAR1-V (**Figuras 24** y **25**), similar al descrito en las líneas 35S:PAR1-GG, fuese un artefacto causado por la producción de formas truncadas de la proteína de fusión PAR1-V.



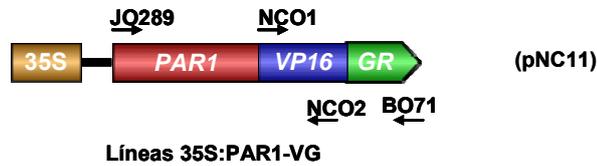
**Figura 25. Respuesta molecular de plántulas que sobreexpresan *PAR1-V*.** Análisis de la expresión de los genes marcadores *SAUR15* y *SAUR68* en plántulas no transgénicas (Col-0), de la línea 35S:*PAR1-GG* y en 2 líneas 35S:*PAR1-V* independientes. Las plántulas se crecieron durante 7 días en luz W después de los cuales se hicieron los tratamientos descritos. **(a)** Expresión normalizada relativa de *SAUR15* y *SAUR68* en respuesta a 0 y 4 h de tratamiento con 2,4-D. Los valores son medias  $\pm$  (SE / error estándar) de tres réplicas biológicas determinados por RNA blot. Los niveles de transcrito se normalizaron con los de 25S. **(b)** Expresión relativa de *SAUR15* y *SAUR68* en respuesta a 1 h de tratamiento con sombra simulada. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de tres réplicas biológicas calculados por análisis de qPCR normalizada con *UBIQUITINE10* (*UBQ10*). En **(a)** y **(b)** la expresión de genes normalizados se presenta en relación con la expresión de las plántulas control (Col-0) sin tratar; los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}P < 0.05$ ,  $*P < 0.01$ ) relativa al control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

Para estudiar esta posibilidad, se generó el plásmido 35S:*PAR1-VG* (pNC11; **Figura 26a**) para sobreexpresar constitutivamente en plantas *PAR1* fusionado al dominio *VP16* y al dominio *GR* (*PAR1-VG*), que codificaría una proteína de fusión triple cuya actividad *PAR1* sería inducible por la aplicación exógena del glucocorticoide sintético Dexametasona (DEX). El dominio *GR* forma parte del receptor de glucocorticoides, un miembro de la familia de receptores de hormonas esteroideas en vertebrados, el cual, en presencia de glucocorticoides se separa de la de la HSP90 y se transloca al núcleo para actuar como factor de transcripción, regulando la transcripción uniéndose a promotores que poseen elementos de respuesta a glucocorticoides (Aoyama and Chua, 1997). El sistema *GR* en plantas se ha empleado como sistema de

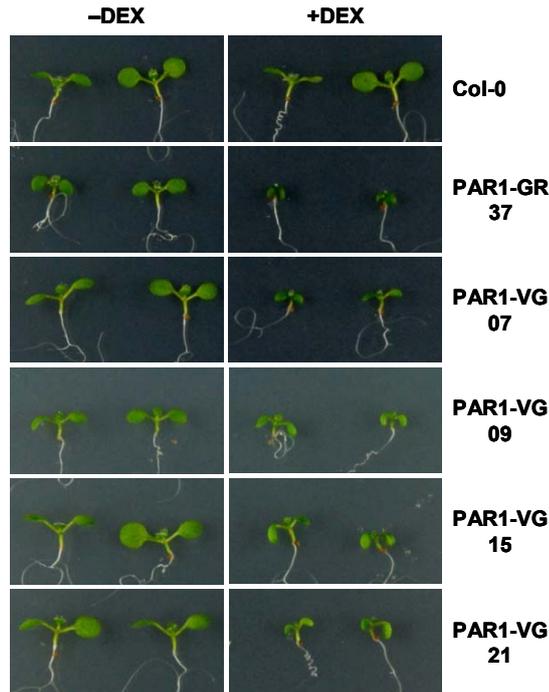
inducción de la expresión génica ya que es simple, no hay presencia natural de glucocorticoides en plantas y la aplicación de estas hormonas exógenamente no produce efectos pleiotrópicos. Este sistema consiste en que el dominio GR (residuos 512-795) fusionado a la proteína de interés se retiene en el citoplasma unida a una proteína similar a la HSP90 y solo se libera de esta heat shock y se trasloca al núcleo en presencia de DEX, debido a en plantas no existen glucocorticoides como en mamíferos, pero la localización nuclear se logra en presencia de DEX (Schena et al., 1991). En nuestro laboratorio hemos utilizado con éxito este sistema generando líneas 35S:PAR1-GR, observándose que las plantas transgénicas presentan el fenotipo de sobreexpresión de *PAR1* (enanas y de coloración de verde oscura) dependiente de DEX (Roig-Villanova et al., 2007).

El razonamiento en el que se basa esta construcción es que en las plantas transgénicas 35S:PAR1-VG crecidas en ausencia de DEX, la triple proteína de fusión PAR1-VG se retendría en el citosol y, en consecuencia, las plantas no presentarían fenotipo. Por el contrario, la aplicación de DEX debería resultar en un fenotipo como el de la sobreexpresión de *PAR1-V*, ya que este glucocorticoide permitiría que sólo la proteína PAR1-VG entera se translocase al núcleo para ejercer su acción (no así las formas truncadas, si se formasen). De las plantas de *Arabidopsis* transformadas con el plásmido 35S:PAR1-VG, se sembraron las semillas T1, seleccionándose 26 plántulas transgénicas resistentes a Km. De éstas, se confirmó la presencia del transgen mediante PCR y oligonucleótidos específicos en 25 casos. El recuento de la segregación de la resistencia a Km de las plántulas T2 identificó 15 líneas con 1 sólo evento de inserción de T-DNA. De estas líneas, 6 mostraban un fenotipo similar al de la sobreexpresión de *PAR1* y *PAR1-V* dependiente de la aplicación de DEX (**Tabla 3**). De cada una de estas 6 líneas se pasaron 8 plántulas resistentes a Km a tiesto para producir semillas de la generación T3 e identificar individuos homocigotos para la inserción. Tras la selección de líneas homocigotas, se procedió a hacer nuevos experimentos de inducción con DEX. Para ello, semillas de 4 líneas representativas de 35S:PAR1-VG (07, 09, 15 y 21), una

(a)



(b)



**Figura 26. Análisis fenotípico de las líneas PAR1-VG.** (a) Esquema de la fusión traduccional de los genes *PAR1*, *VP16* y *GR* bajo el control del promotor 35S empleada para transformar plantas Col-0. Las flechas indican los oligonucleótidos empleados para genotipar las plantas transgénicas obtenidas tras la transformación. (b) Aspecto de plántulas control (Col-0), líneas 35S:PAR1-GR y 4 líneas independientes 35S:PAR1-VG germinadas y crecidas durante 7 días en luz blanca continua en medio carente (-DEX) o suplementado (+DEX) con 5 µM Dexametasona.

línea control 35S:PAR1-GR y el control no transgénico (Col-0) se germinaron y crecieron en luz blanca continua durante 7 días, en placas sin (-DEX) o con 5 µm DEX (+DEX). Como se puede apreciar en la **Figura 26b**, la línea Col-0 presenta un fenotipo similar en -DEX y +DEX. Por otro lado la línea 35S:PAR1-GR presenta un fenotipo de sobreexpresión de *PAR1* dependiente de DEX, corroborando resultados anteriores del laboratorio (Roig-Villanova et al., 2007). En -DEX, las plántulas de las líneas 35S:PAR1-VG presentan un aspecto similar al de plántulas Col-0 y 35S:PAR1-GR. Por el contrario, en +DEX, el fenotipo de las plántulas 35S:PAR1-VG es similar al de las plántulas de la línea

35S:PAR1-GR y claramente diferenciado del de las plántulas Col-0 no transgénicas. Este resultado, indica que la proteína de fusión se transloca al núcleo en presencia de DEX, apoya que la triple proteína de fusión PAR1-VG se estaba traduciendo en su totalidad (por tanto que contiene el dominio VP16 completo) y que su actividad biológica no se generó por productos truncados. Por tanto, los fenotipos observados por la sobreexpresión de *PAR1-V* no son productos de la actividad de formas de la proteína truncada. El conjunto de estos resultados apoyan nuestro postulado de que PAR1 es un regulador de la transcripción que no une directamente el DNA. Los resultados presentados en este capítulo han sido publicados el artículo Galstyan, et al (2011).

Linea transgénica	Número de líneas obtenidas en				
	T1		T2 con 1 T-DNA		T3
	KmR	Genotipado por PCR	Líneas con 1 T-DNA	Fenotipo similar a 35S:PAR1-GG	Homocigotas
35S:PAR1-V (pNC7)	32	32	14	7	5
35S:PAR1-VG (pNC11)	26	25	15	6*	6

**Tabla 3. Selección de líneas transgénicas que sobreexpresan *PAR1-V* y *PAR1-VG*.** Se analizaron 2 líneas homocigotas independientes 35S:PAR1-V y 4 líneas homocigotas independientes 35S:PAR1-VG. \*, fenotipo dependiente de DEX.

## **CAPITULO III.**

---



## 1. Interactores de PAR1.

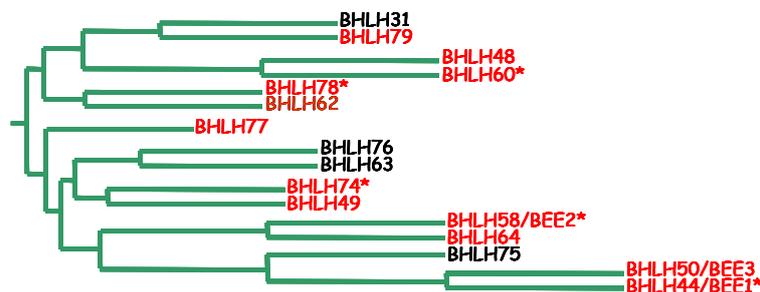
### 1.1. Caracterización funcional de genes *POF*.

Tal como se señaló en la Introducción, en el laboratorio se llevó a cabo un cribado mediante el sistema de Y2H para identificar genes que codifican proteínas que interactúan directamente con PAR1. Resultado del mismo fue la identificación de 12 genes que fueron denominados *POF* (*PARTNER OF PAR FACTOR*) que codificaban BHLH pertenecientes a la familia XII, compuesta por 16 miembros (**Figura 27a**) (Heim et al., 2003).

(a)

Gen	Número	Motivo de unión a DNA (Residuos H-E-R)
<i>BHLH044/BEE1</i>	At1g18400	Si
<i>BHLH048</i>	At2g42300	Si
<i>BHLH049</i>	At1g68920	Si
<i>BHLH050/BEE3</i>	At1g73830	Si
<i>BHLH058/BEE2</i>	At4g36540	Si
<i>BHLH060</i>	At3g57800	Si
<i>BHLH062</i>	At3g07340	Si
<i>BHLH064</i>	At2g18300	Si
<i>BHLH074</i>	At1g10120	Si
<i>BHLH077</i>	At3g23690	Si
<i>BHLH078</i>	At5g48560	Si
<i>BHLH079</i>	At5g62610	Si

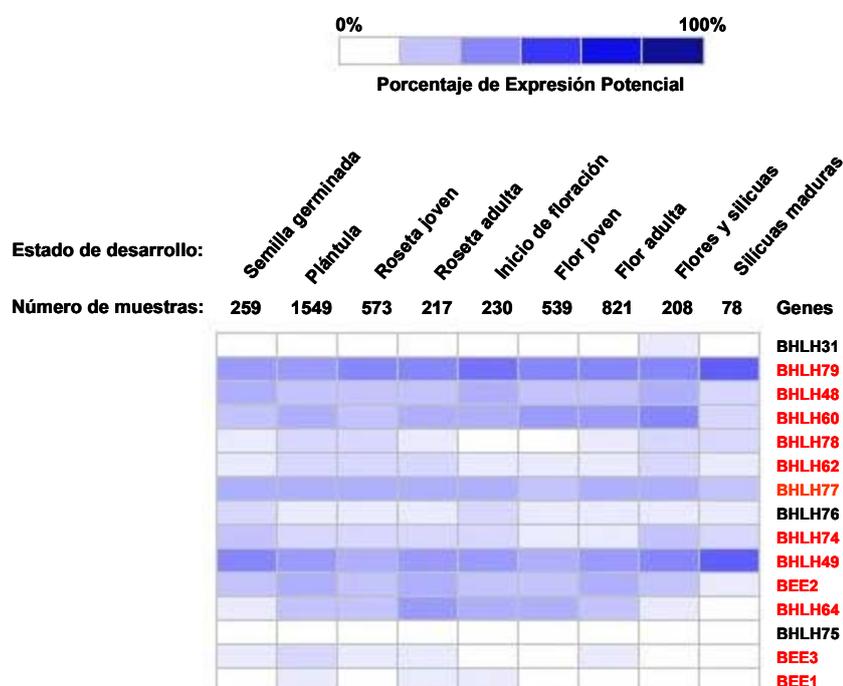
(b)



**Figura 27. Relaciones filogenéticas entre los genes *POF* pertenecientes a la familia XII.** (a) Listado de los genes *POF* pertenecientes a la familia XII. (b) Análisis filogenético basado en el método *Maximum Parsimony* de los genes pertenecientes a la familia XII. En rojo se marcan los genes *POF*. El asterisco indica que su expresión está regulada por sombra simulada.

Todos los miembros de esta familia presentan en su dominio básico los residuos H-E-R, importantes para la unión a secuencias de DNA del tipo G-box (CACGTG). Este resultado sugirió que había una preferencia de reconocimiento por parte de PAR1 de esta familia de BHLHs. Basado en esta información, se procedió a estudiar el rol de los factores POF en la regulación del SAS.

A nivel de expresión, con ayuda de la base de datos Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) se vio que la mayoría de estos genes se expresaban en nueve estados de desarrollo diferentes analizados. Además, todos los POF de esta familia se expresaban en estadio de plántula (**Figura 28**). Para analizar la función de los genes *POF* seleccionados en las respuestas del SAS, se identificaron inicialmente posibles líneas mutantes por inserción de T-DNA en la colección de mutantes del Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu>) (**Tabla 4**). Se intentó encontrar más de una línea de inserción por gen (alelos independientes), con el fin de incrementar la posibilidad de encontrar mutantes de pérdida de función en los diferentes genes *POF* y disponer de un análisis funcional más completo.



**Figura 28. Patrón de expresión en diferentes estados de desarrollo de los genes *POF*.** Listado del porcentaje de expresión de los genes *POF* pertenecientes a la familia XII en nueve diferentes estados de desarrollo en la planta *Arabidopsis thaliana*. En rojo se marcan los genes *POF*.

Además se obtuvo la línea triple mutante *bee1-1;bee2-1;bee3-1* (*bee123* a partir de ahora), descrita y caracterizada previamente (Friedrichsen et al., 2002) y que corresponde a un triple mutante de pérdida de función en los genes *BEE1* (*BHLH44*), *BEE2* (*BHLH58*) y *BEE3* (*BHLH50*) (cedida por el grupo de la Dra. J. Chory, Salk Institute, San Diego CA). También se incluyó en el análisis mutantes en los genes *BHLH75* y *BHLH31* por su similitud con algunos genes *POF* analizados (*BEE1* y *BEE3*, y *BHLH79* respectivamente) (**Figura 27b**). El resultado de la búsqueda de líneas de inserción fue de 34 posibles alelos en 14 genes diferentes distribuidos desigualmente: para algunos genes (*BHLH74*, *BEE1*) sólo identificamos un posible alelo mutante mientras que en otros genes (*BHLH77* y *BHLH78*) hasta 5 posibles alelos diferentes (**Tabla 4**).

El T-DNA en las líneas obtenidas de las colecciones públicas de mutantes podía encontrarse segregando (líneas segregantes) o en homocigosis (líneas homocigotas). Con el fin de identificar individuos homocigotos para la mutación, se crecieron en tiestos unas 12 plantas por línea segregante y 3-4 plantas por línea homocigota. Luego de 2-3 semanas, se extrajo DNA a partir de 1 hoja de cada planta para su genotipado por PCR empleando oligonucleótidos específicos (**ver Materiales y métodos, Tabla 10**). Resultado de este análisis fue la identificación de individuos mutantes homocigotos para 19 de las 34 líneas analizadas, en 12 de los 14 genes. Para las línea de inserción de T-DNA de los genes *BHLH74* y *BHLH79*, fue imposible detectar individuos mutantes, posiblemente debido a que las semillas que recibimos no eran ni mutantes ni estaban segregando.

Con los alelos seleccionados se procedió a realizar una caracterización molecular y fisiológica. En estos experimentos realizados siempre se usaron semillas de líneas control y de líneas mutantes obtenidas de plantas crecidas contemporáneamente, con el fin de evitar que diferencias en la edad de las semillas afectasen en los experimentos.

<b>Gen</b>	<b>Número</b>	<b>Código Salk</b>	<b>Alelo</b>
<i>BHLH48</i>	At2g42300	SALK_092968	<i>bhlh48-1</i>
<i>BHLH48</i>	At2g42300	SAIL_324_A08	<i>bhlh48-2</i>
<i>BHLH48</i>	At2g42300	SALK_013047	<i>bhlh48-3</i>
<i>BHLH49</i>	At1g68920	SALK_081687	<i>bhlh49-1</i>
<i>BHLH49</i>	At1g68920	SALK_081696	<i>bhlh49-2</i>
<i>BHLH49</i>	At1g68920	SALK_135188	<i>bhlh49-3</i>
<i>BHLH50/BEE3</i>	At1g73830	SALK_029329	<i>bee3-2</i>
<i>BHLH58/BEE2</i>	At4g36540	SAIL_527_C01	<i>bee2-2</i>
<i>BHLH60</i>	At3g57800	SALK_002003	<i>bhlh60-1</i>
<i>BHLH60</i>	At3g57800	SAIL_163_D11	<i>bhlh60-2</i>
<i>BHLH62</i>	At3g07340	SALK_122534	<i>bhlh62-1</i>
<i>BHLH62</i>	At3g07340	SAIL_27_A03	<i>bhlh62-2</i>
<i>BHLH62</i>	At3g07340	SALK_091124C	<i>bhlh62-3</i>
<i>BHLH64</i>	At2g18300	SAIL_77_D01	<i>bhlh64-1</i>
<i>BHLH64</i>	At2g18300	SALK_090958	<i>bhlh64-2</i>
<i>BHLH74</i>	At1g10120	SALK_027284	<i>bhlh74-1</i>
<i>BHLH77</i>	At3g23690	SALK_054791	<i>bhlh77-1</i>
<i>BHLH77</i>	At3g23690	SALK_054967	<i>bhlh77-2</i>
<i>BHLH77</i>	At3g23690	SALK_055159	<i>bhlh77-3</i>
<i>BHLH77</i>	At3g23690	SALK_054783	<i>bhlh77-4</i>
<i>BHLH77</i>	At3g23690	SAIL_383_B08	<i>bhlh77-5</i>
<i>BHLH78</i>	At5g48560	SALK_085759	<i>bhlh78-1</i>
<i>BHLH78</i>	At5g48560	SALK_127100	<i>bhlh78-2</i>
<i>BHLH78</i>	At5g48560	SALK_091535	<i>bhlh78-3</i>
<i>BHLH78</i>	At5g48560	SALK_076836	<i>bhlh78-4</i>
<i>BHLH78</i>	At5g48560	SALK_055840	<i>bhlh78-5</i>
<i>BHLH79</i>	At5g62610	SAIL_579_A06	<i>bhlh79-1</i>
<i>BHLH79</i>	At5g62610	SAIL_897_C08	<i>bhlh79-2</i>
<i>BHLH79</i>	At5g62610	SALK_142716	<i>bhlh79-3</i>
<i>BEE1, BEE2, BEE3</i>	-	-	<i>bee1-1, bee2-1, bee3-1</i>
<i>BHLH75</i>	At1g25330	SAIL_148_H01	<i>bhlh75-1</i>
<i>BHLH75</i>	At1g25330	SAIL_674_A01	<i>bhlh75-2</i>
<i>BHLH31</i>	At1g59640	SALK_089219	<i>bhlh31-1</i>
<i>BHLH31</i>	At1g59640	SAIL_865_G01	<i>bhlh31-2</i>

**Tabla 4. Líneas de inserción de T-DNA disponibles y analizadas hasta la fecha.** Se indican distintos alelos mutantes para un mismo gen. Las líneas y alelos homocigotas analizados y caracterizados en su mayoría en esta memoria se muestran en negrita. los alelos de los genes *BHLH31* y *BHLH75*, perteneciente al grupo XII pero no al grupo *POF*, se muestran en el recuadro amarillo.

## 1.2. Análisis de expresión de mutantes simples de genes *POF*.

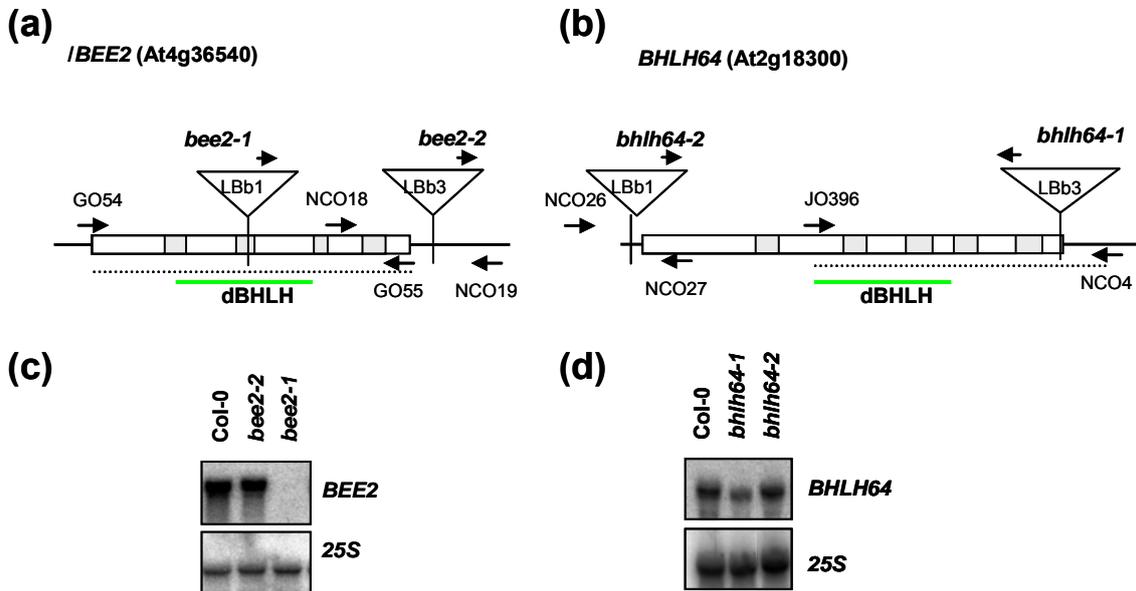
Con los diferentes mutantes identificados se determinó primero el sitio de inserción del T-DNA y, en algunos casos, luego se precedió a analizar la expresión génica del gen afectado. Para estudiar si la inserción del T-DNA resultaba en un mutante de pérdida o reducción de función, se emplearon dos

criterios: i) la ubicación de la inserción (puede interrumpir la proteína codificada en dominios importantes), y ii) los niveles de expresión del gen afectado.

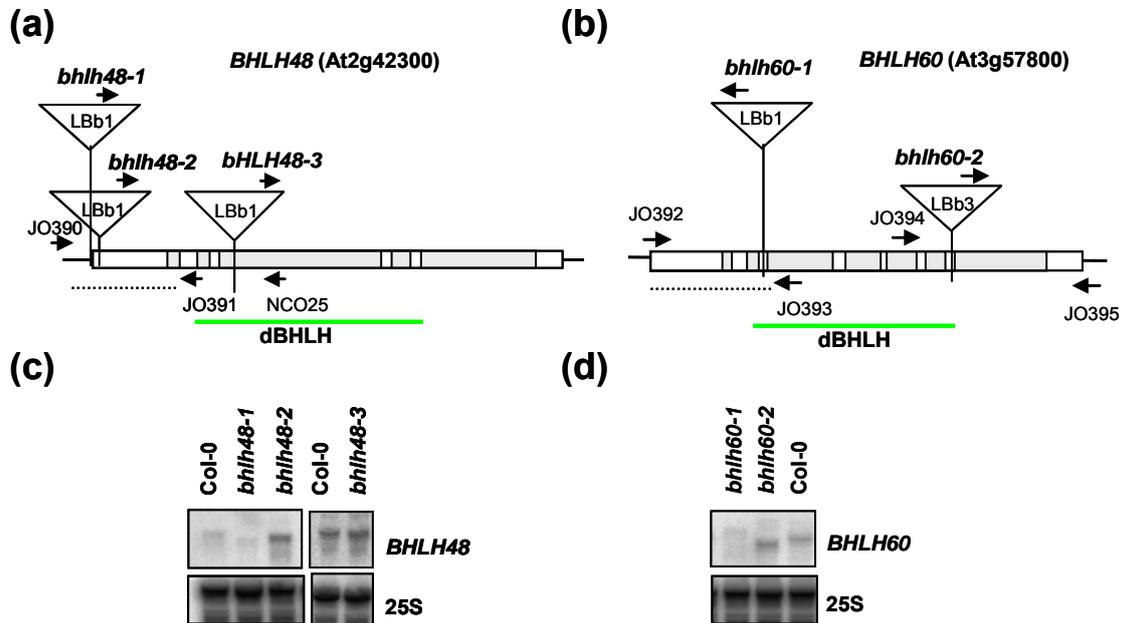
El sitio de inserción del T-DNA se determinó en base a la información disponible en la página web de la colección SIGnAL (como ejemplos, véase las **Figuras 29a, 29b, 30a, 30b, 31a y 31b**). Para estudiar si la inserción del T-DNA reducía la expresión del gen etiquetado, se comparó la expresión del gen respectivo por RNA blot en las líneas seleccionadas con la línea control (Col-0). Con el fin de inducir la expresión de los genes en estudio e incrementar la sensibilidad del análisis, se buscó en la base de datos Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp>) información de los tratamientos que incrementaban la expresión de los genes en estudio. Los tratamientos escogidos fueron de 1 h W+FR o de 1 h epibrasinólido (EBL) (**Tabla 5**). A continuación, plántulas crecidas en luz blanca continua durante 7 días fueron expuestas al tratamiento respectivo para cada línea por 1 h. Inicialmente se analizaron 11 líneas de las 19 líneas homocigotas determinadas en el genotipado: *bee2-2*, *bee123*, *bhlh64-1*, *bhlh64-2*, *bhlh48-1*, *bhlh48-2*, *bhlh48-3*, *bhlh60-1*, *bhlh60-2*, *bhlh62-1* y *bhlh78-2*. Análisis filogenéticos indicaban que las parejas de genes homólogos *BEE2-BHLH64*, *BHLH48-BHLH60* y *BHLH62-BHLH78* parecían haberse originado recientemente por duplicación (**Figura 27b**) (Heim et al., 2003). Por ello, los análisis moleculares y fisiológicos de las líneas de inserción se realizaron en parejas.

Gen	Número	Tratamiento
<i>BHLH48</i> <i>BHLH60</i>	At2g42300 At3g57800	1 h W+FR
<i>BHLH58/BEE2</i> <i>BHLH64</i> <i>BEE1, BEE2, BEE3</i>	At4g36540 At2g18300 -	1 h W+FR
<i>BHLH62</i> <i>BHLH78</i>	At3g07340 At5g48560	1 h EBL (1µM)

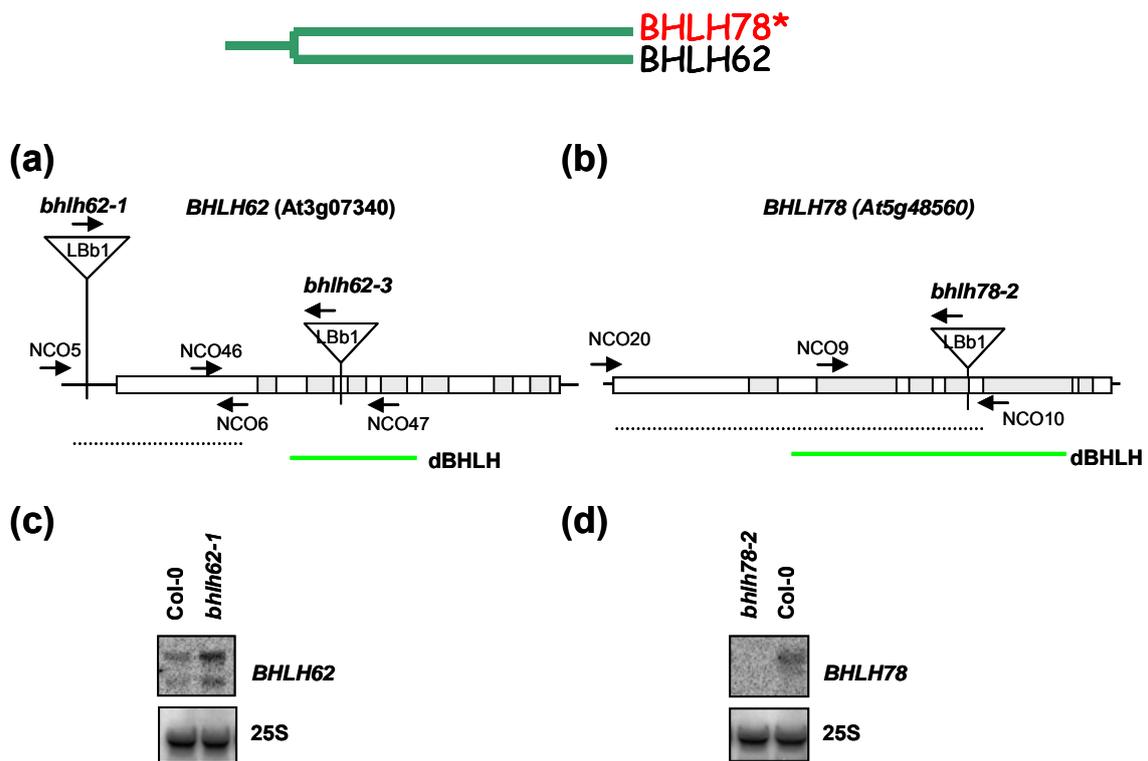
**Tabla 5. Tratamientos aplicados a las líneas mutantes para el análisis de la expresión del gen etiquetado.** Análisis por medio del programa GeneInvestigator mostraron que los tratamientos más óptimos para inducir la expresión génica de los genes analizados eran con 1 h de sombra simulada (W+FR) o 1 h con la hormona EBL.



**Figura 29. Caracterización molecular de las líneas mutantes en los genes *BEE2* y *BHLH64*.** Análisis de la expresión de los genes *BEE2* y *BHLH64* en plántulas control Col-0 y en líneas de inserción de T-DNA *bee2-1*, *bee2-2*, *bhlh64-1* y *bhlh64-1* crecidas durante 7 días en luz blanca continua después de los cual se hizo tratamiento de 1 h de sombra simulada. **(a)** Representación esquemática de la secuencia genómica de *BEE2* y sus inserciones de T-DNA (*bee2-1*, *bee2-2*). La línea de puntos indica la región empleada como sonda para los análisis de RNA blot, las flechas los oligos empleados para el genotipado de las líneas mutantes y generación de sonda. La línea verde señala el dominio BHLH (dBHLH). **(b)** Representación esquemática de la secuencia genómica de *BHLH64* y su inserción de T-DNA (*bhlh64-1*). La línea de puntos indica la región empleada como sonda para los análisis de RNA blot, las flechas los oligos empleados para el genotipado de la línea mutante y generación de sonda. La línea verde señala el dominio BHLH (dBHLH). **(c)** Análisis molecular por RNA blot de la expresión de *BEE2* en las líneas *bee2-1* y *bee2-2* en respuesta a 1 h de tratamiento de sombra simulada. **(d)** Análisis molecular por RNA blot de la expresión de *BHLH64* en la línea *bhlh64-1* en respuesta a 1 h de tratamiento de sombra simulada.



**Figura 30. Caracterización molecular de las líneas mutantes en los genes *BHLH48* y *BHLH60*.** Análisis de la expresión de los genes *BHLH48* y *BHLH60* en plántulas control Col-0, y en líneas de inserción de t-DNA *bhlh48-1*, *bhlh48-2*, *bhlh48-3*, *bhlh60-1* y *bhlh60-2* crecidas durante 7 días en luz blanca continua después de los cual se hizo tratamiento de 1 h de sombra simulada. **(a)** Representación esquemática de la secuencia genómica de *BHLH48* y sus inserciones de T-DNA (*bhlh48-1*, *bhlh48-2* y *bhlh48-3*). La línea de puntos indica la región empleada como sonda para los análisis de RNA blot, las flechas los oligos empleados para el genotipado de las líneas mutantes y generación de sonda. La línea verde señala el dominio BHLH (dBHLH). **(b)** Representación esquemática de la secuencia genómica de *BHLH60* y sus inserciones de T-DNA (*bhlh60-1* y *bhlh60-2*). La línea de puntos indica la región empleada como sonda para los análisis de RNA blot, las flechas los oligos empleados para el genotipado de las líneas mutantes y generación de sonda. La línea verde señala el dominio BHLH (dBHLH). **(c)** Análisis molecular por RNA blot de la expresión de *BHLH48* en las líneas *bhlh48-1*, *bhlh48-2* y *bhlh48-3* en respuesta a 1 h de tratamiento de sombra simulada. **(d)** Análisis molecular por RNA blot de la expresión de *BHLH60* en las líneas *bhlh60-1* y *bhlh60-2* respuesta a 1 h de tratamiento de sombra simulada.



**Figura 31. Caracterización molecular de las líneas mutantes en los genes *BHLH62* y *BHLH78*.** Análisis de la expresión de los genes *BHLH48* y *BHLH60* en plántulas control *Col-0*, y en líneas de inserción de t-DNA *bhlh62-1* y *bhlh78-2* crecidas durante 7 días en luz blanca continua después de los cual se hizo tratamiento de 1 h de BL. (a) Representación esquemática de la secuencia genómica de *BHLH62* y sus inserciones de T-DNA (*bhlh62-1*, *bhlh62-2* y *bhlh62-3*). La línea de puntos indica la región empleada como sonda para los análisis de RNA blot, las flechas los oligos empleados para el genotipado de las líneas mutantes y generación de sonda. La línea verde señala el dominio BHLH (dBHLH). (b) Representación esquemática de la secuencia genómica de *BHLH78* y sus inserciones de T-DNA (*bhlh78-1*, *bhlh78-2*, *bhlh78-3*, *bhlh78-4* y *bhlh78-5*). La línea de puntos indica la región empleada como sonda para los análisis de RNA blot, las flechas los oligos empleados para el genotipado de las líneas mutantes y generación de sonda. La línea verde señala el dominio BHLH (dBHLH). (c) Análisis molecular por RNA blot de la expresión de *BHLH62* en la línea *bhlh62-1* en respuesta a 1 h de tratamiento de BL (d) Análisis molecular por RNA blot de la expresión de *BHLH60* en la línea *bhlh78-2* en respuesta a 1 h de tratamiento de BL.

***BEE2*:** El alelo *bee2-1*, presente en el triple mutante *bee123*, contiene una inserción de T-DNA en mitad de la región codificante (Friedrichsen et al., 2002), mientras que en la línea *bee2-2*, el T-DNA se ubica en el extremo 3' no codificante (3'UTR) (Figura 29a). Los análisis de RNA blot mostraron que en el alelo *bee2-1* la expresión del gen *BEE2* está completamente anulada, de acuerdo con la información publicada (Friedrichsen et al., 2002); como el T-DNA está insertado en medio de la región que codifica el dominio BHLH, el conjunto de datos apoyaba que se trata de un alelo nulo. Por el contrario en el

alelo *bee2-2* no se ve afectada la expresión de *BEE2* (**Figura 29c**), lo cual sugirió que no sería un alelo nulo.

*BHLH64*: La línea *bhlh64-1*, cuya inserción se encuentra al final del último exón, mostró una disminución de la expresión de *BHLH64*. En la línea *bhlh64-2*, cuya inserción está en la región no codificante 5' (5'UTR), la expresión de *BHLH64* no se vio afectada (**Figura 29b y d**). Estos resultados sugerían que sólo la línea *bhlh64-1* tendría afectada la expresión, siendo un mutante de reducción de función.

*BHLH48*: Las inserciones de T-DNA en las líneas *bhlh48-1* y *bhlh48-2* se localizan inmediatamente antes y después del codón de inicio, respectivamente. En la línea *bhlh48-3* el T-DNA se encuentra en el tercer intrón el cual está flanqueado entre los exones que codifican el dominio BHLH (**Figura 30a**). Los análisis de expresión del gen *BHLH48* por RNA blot indicaron que el alelo *bhlh48-1* muestra leve reducción en la expresión, mientras que el alelo *bhlh48-2* se ve un incremento en la expresión. Por otro lado en la línea *bhlh48-3* no se vio cambio de expresión (**Figura 30c**). Eso sugería que el alelo *bhlh48-1* sería una línea de reducción de función. En la línea *bhlh48-2* el sitio de inserción del T-DNA (después del codón de inicio) sugiere que si bien los niveles de transcrito podrían ser similares o superiores a los del gene en Col-0, el mensaje puede estar interrumpido con lo que podría tratarse de un mutante de pérdida de función. No obstante no disponemos de pruebas suficientes para llegar a una conclusión definitiva. En el caso de la línea *bhlh48-3* la expresión no se vio afectada posiblemente porque la inserción de T-DNA no tiene efecto a nivel de expresión génica lo que no descarta que a nivel estructural no ocurra.

*BHLH60*: En ambos alelos analizados, *bhlh60-1* y *bhlh60-2*, el T-DNA se inserta en la región codificante: en *bhlh60-1* la inserción del T-DNA interrumpe la región que codifica el dominio BHLH Y en la línea *bhlh60-2* el T-DNA se inserta en el séptimo exón, también interrumpiendo el dominio BHLH (**Figura 30b**). Los análisis de expresión mostraron que en la línea *bhlh60-1* la expresión de *BHLH60* apenas se detecta, mientras que en la línea *bhlh60-2* la expresión es algo mayor si bien el transcrito detectado es de menor tamaño que el del control Col-0 (**Figura 30d**). Como en ambos casos el T-DNA se insertaban en exones de la región codificante, cabía esperar que en dichas líneas los mRNAs

transcritos, si los hubiere, estuviesen truncados y tradujesen proteínas truncadas afuncionales, con la consiguiente pérdida de función.

**BHLH62:** Si bien para este gen se encontraron 3 líneas mutantes, inicialmente se disponía solo de una (*bhlh62-1*) con la cual se hicieron los análisis de expresión. El T-DNA en esta línea se inserta en el extremo 5' no codificante (5'UTR) (**Figura 31a**) y la expresión de *BHLH62* se vio que era mayor que en las plántulas Col-0, lo cual sugería que esta línea podría ser de ganancia de función (**Figura 31c**).

**BHLH78:** La inserción de T-DNA en *bhlh78-2* se ubica al final del cuarto intrón del gen *BHLH78* contenido dentro del dominio BHLH (**Figura 31b**). Los análisis de expresión por RNA blot mostraron que no se detectaban transcritos del gen *BHLH78*, lo cual sugería que esta línea era de pérdida de función total (**Figura 31d**).

Para el resto de las líneas mutantes genotipadas, si bien no se realizaron experimentos moleculares, se identificó el lugar de la inserción y su posible acción en la expresión del gen etiquetado (**Figura 32**):

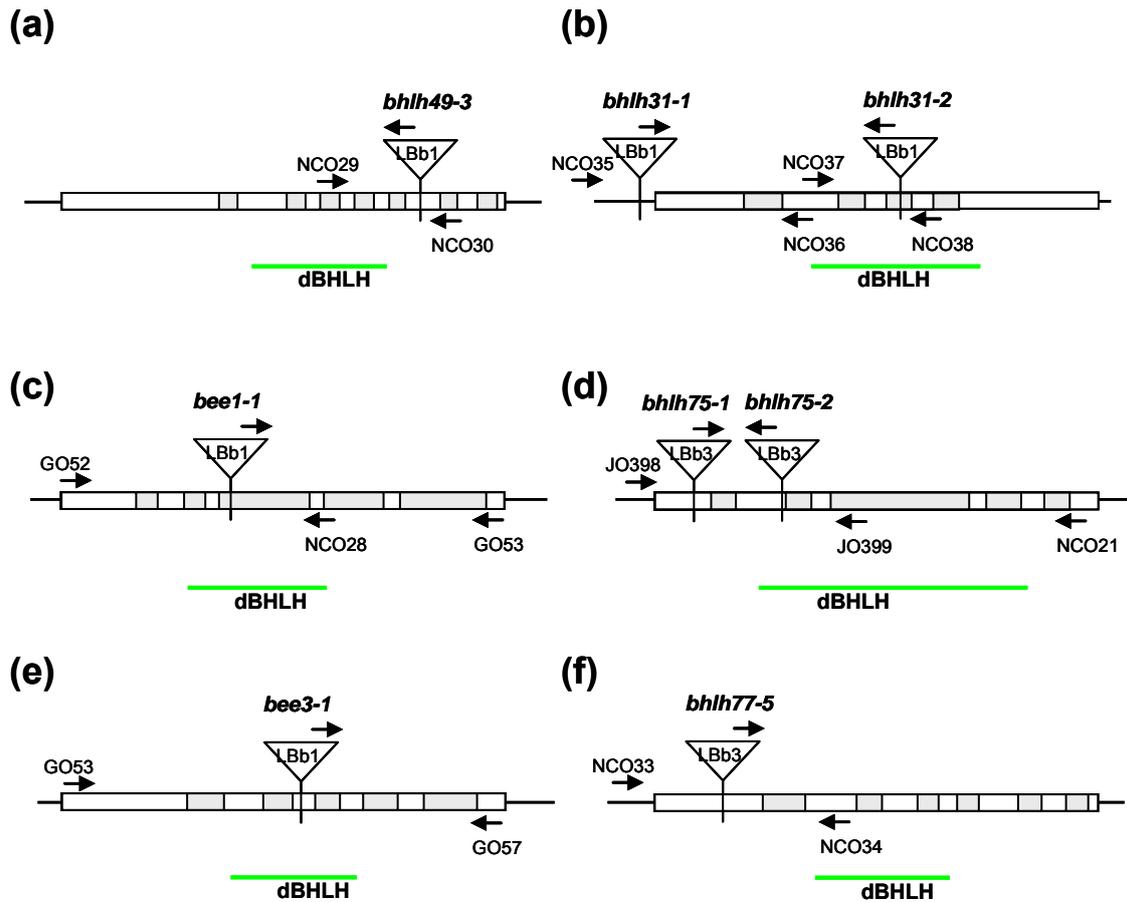
**BHLH49:** El alelo *bhlh49-3* tiene la inserción de T-DNA en el sexto exón, interrumpiendo la proteína después del dominio BHLH (**Figura 32a**), por lo cual sería posible que la proteína codificada estuviese truncada y fuese parcialmente funcional.

**BHLH31:** La inserción de T-DNA en el alelo *bhlh31-1* está en el 5'UTR y T-DNA en el alelo *bhlh31-2* interrumpe el tercer intrón e interrumpe el dominio BHLH (**Figura 32b**). Con lo que a falta de análisis moleculares es difícil alcanzar una conclusión.

**BEE1:** El alelo *bee1-1* (Friedrichsen et al., 2002) tiene su inserción en el tercer intrón, dentro del dominio BHLH (**Figura 32c**). Los análisis publicados de la expresión del gene *BEE1* han llevado a considerarlo un alelo nulo

**BEE3:** El alelo *bee3-1* (Friedrichsen et al., 2002) tienes su inserción en el tercer exón interrumpiendo el dominio BHLH (**Figura 32e**). En base a los análisis publicados de la expresión del gene *BEE3*, este mutante se considera un alelo nulo.

**BHLH75:** Ambos alelos tienen su inserción en el primer y segundo exón respectivamente (**Figura 32d**). De expresarse el mensaje, en ambos casos se esperaba la traducción de una proteína truncada.



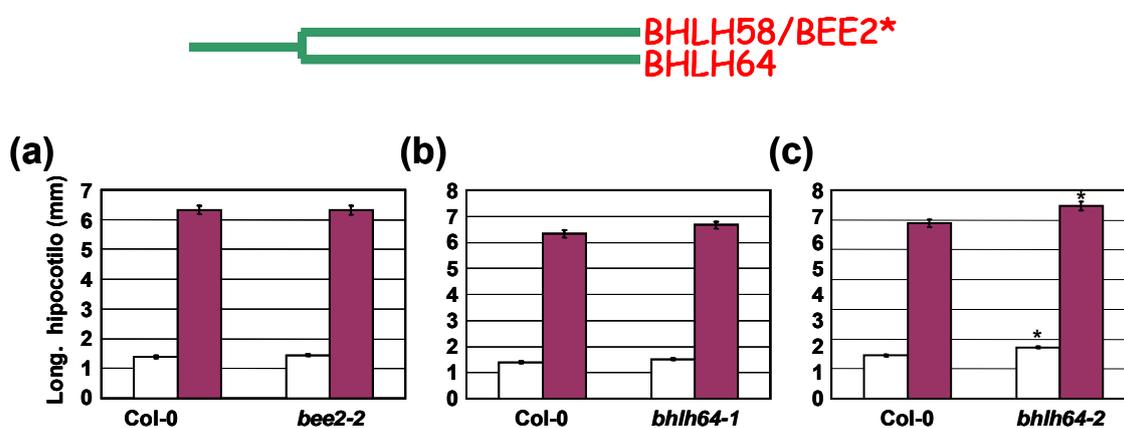
**Figura 32. Representación esquemática de la secuencia genómica de genes *POF*.** Representación esquemática de la secuencia genómica de los genes *BHLH49*, *BHLH31*, *BHLH75*, *BEE1*, *BEE3* y *BHLH75*, y sus respectivas. Las flechas indican los oligos empleados para el genotipado de las líneas mutantes. La línea verde señala el dominio BHLH (dBHLH).

*BHLH77*: El alelo *bhlh77-5* tiene su inserción en el primer exón interrumpiendo el dominio BHLH (**Figura 32f**) por lo cual quizás se esperaría una proteína truncada.

A la vista de los análisis moleculares, se siguió trabajando con estas líneas para ver si a nivel fisiológico tenían algún fenotipo diferencial con la línea silvestre (Col-0), sobre todo esperando ver algún efecto en aquellos alelos que con una expresión alterada. De igual forma también se realizaron experimentos fisiológicos con las líneas no caracterizadas molecularmente.

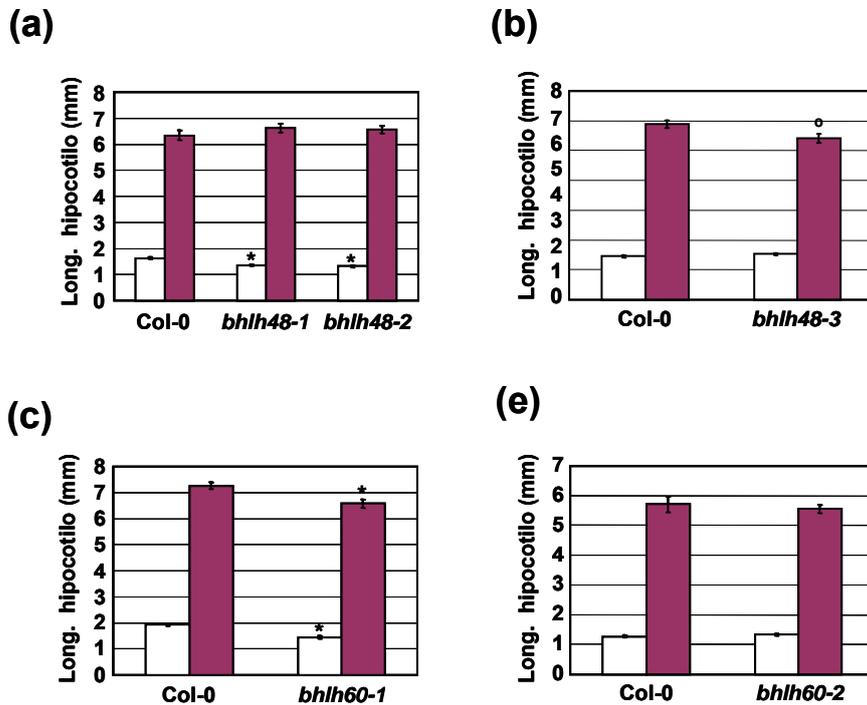
### 1.3. Respuesta de mutantes simples *POF* a sombra simulada.

Para ver si las líneas mutantes estudiadas presentaban algún defecto fisiológico en las respuestas del SAS, se realizaron tratamientos de sombra simulada en los diferentes alelos mutantes encontrados. Los experimentos de sombra simulada se realizaron tal como se ha descrito en el capítulo anterior (**Figura 24a**). El experimento incluyó un control (Col-0) para comparar la elongación del hipocotilo con la de las líneas de inserción de T-DNA (**Tabla 4**). Se analizaron conjuntamente las parejas de genes agrupados filogenéticamente. Estos experimentos se realizaron al menos 3 veces, y un experimento representativo se muestra en las figuras.



**Figura 33. Fenotipo morfológico de Líneas de inserción de T-DNA a respuesta a sombra.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en la **Figura 24a**. Se comparó la respuesta de líneas salvajes (Col-0) y de diferentes líneas de inserción de T-DNA de la pareja de genes relacionados filogenéticamente *BHLH58* (*BEE2*) y *BHLH64*. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones.

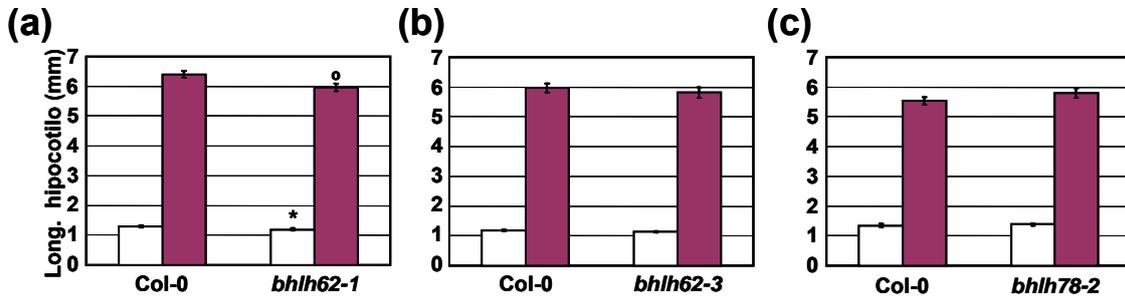
En general se observó que la mayoría de las líneas de inserción (y sus respectivas réplicas) el alargamiento del hipocotilo en respuesta al tratamiento con sombra simulada no presentaban diferencias significativas con el control (**Figura 33a y b, 34a y e, y 35b y d**). Por otro lado, se observaron algunas líneas que presentaban diferencia suaves con el control, tanto algo más (indicar las líneas en cuestión) (**Figura 33c**) como menos (indicar las líneas en cuestión) alargadas (**Figura 34b y c, y 35a**). Si bien había líneas con fenotipo, éste no era tan dramático como el que se observaba en líneas que sobreexpresaban *PAR1*.



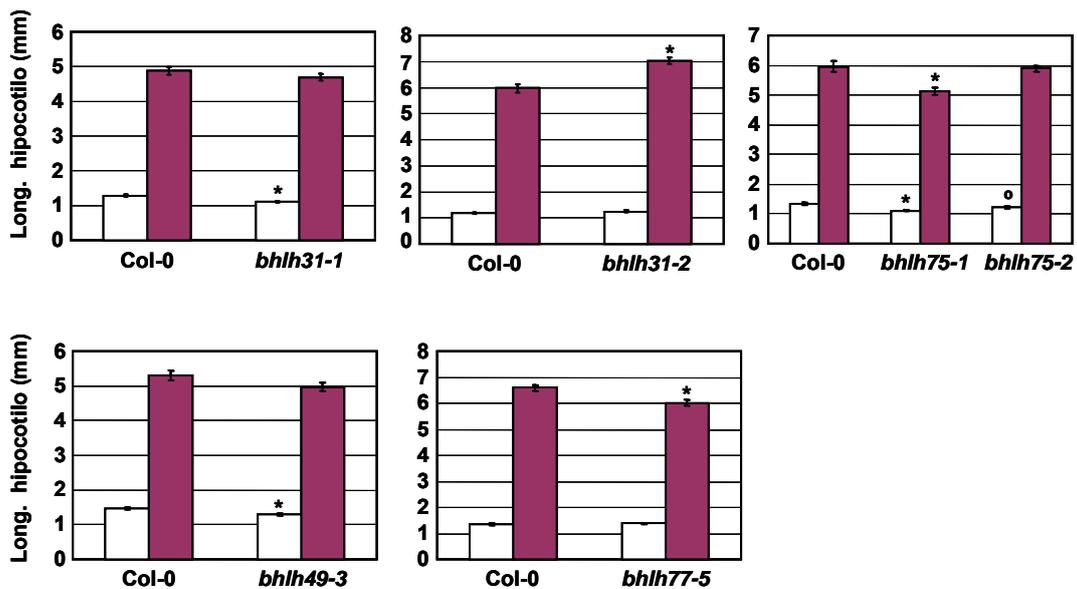
**Figura 34. Fenotipo morfológico de Líneas de inserción de T-DNA a respuesta a sombra.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en la **Figura 24a**. Se comparó la respuesta de líneas salvajes (Col-0) y de diferentes líneas de inserción de T-DNA de la pareja de genes relacionados filogenéticamente *BHLH48* y *BHLH60*. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones.

Paralelamente se realizaron experimentos de sombra en alelos mutantes de genes del grupo XII pero que no eran POF. En estos experimentos se vieron alelos que no respondían y otros que respondían más como menos a sombra (**Figura 36**).

En resumen, aunque en algunas líneas la inserción del T-DNA no parece afectar a la secuencia (*bee2-2*, *bhlh48-1*) y/o la expresión (*bhlh64-1* y *bee2-2*) del gen etiquetado, en otros casos, no podemos descartar que la ausencia de fenotipo sea debido a la existencia de redundancia de función con los genes homólogos más próximos según los estudios filogenéticos: por ejemplo, *BHLH48* y *BHLH60* (**Figura 27b**). Por tanto, se procedió a generar múltiples mutantes entre genes que estarían relacionados según análisis filogenéticos.



**Figura 35. Fenotipo morfológico de Líneas de inserción de T-DNA a respuesta a sombra.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en la **Figura 24a**. Se comparó la respuesta de líneas salvajes (Col-0) y de diferentes líneas de inserción de T-DNA de la pareja de genes relacionados filogenéticamente *BHLH62* y *BHLH78*. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones.



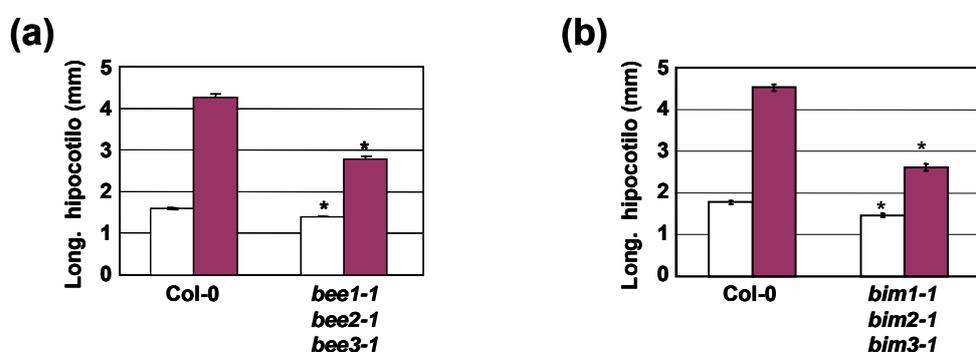
**Figura 36. Fenotipo morfológico de Líneas de inserción de T-DNA a respuesta a sombra.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en la **Figura 24a**. Se comparó la respuesta de líneas salvajes (Col-0) y de diferentes líneas de inserción de T-DNA de los genes relacionados *BHLH31*, *BHLH75*, *BHLH49* y *BHLH77*. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones.

#### 1.4. Identificación de dobles mutantes y análisis de su respuesta a sombra simulada.

La posible existencia de redundancia génica comentada anteriormente ya ha sido propuesta en miembros de la familia XII. Específicamente para los genes *BEE* (*BR-ENHANCED EXPRESSION*) se ha descrito esta redundancia a nivel de su rol en la señalización de BRs (Friedrichsen et al., 2002). Basándonos en este argumento, se usaron líneas triples mutantes para ver su respuesta en condiciones de sombra simulada. Experimentos de sombra simulada en líneas *bee123* mostraron una reducción en la elongación del hipocotilo del hipocotilo en comparación al Col-0 en condiciones de W+FR (**Figura 37a**). También se ha descrito que los genes *BIM1* (*BES1-INTERACTING MYC-LIKE*) *BIM2* y *BIM3*, que codifican BHLHs de la familia V (Heim et al), son redundantes en su papel como reguladores de las respuestas de BRs (Yin et al., 2005). La proteína BIM1 también ha sido clasificada como POF. Al igual que se había observado para los BEEs, los BIMs tienen un papel en la regulación del SAS ya que el triple mutante *bim123* tiene reducida su respuesta a sombra simulada (**Figura 37b**). Finalmente también hay datos que propone que PIF4 y PIF5, BHLHs de la familia VII (Heim et al., 2003) implicadas en la señalización de luz por fitocromos, son redundantes en la regulación de las respuestas del SAS, cuyo doble mutante muestras menos respuesta a SAS en comparación al control y los simples mutante (Lorrain et al., 2008). Todos estos datos apoyaban la posibilidad de que existiera redundancia génica entre varios de los genes *POF* analizados, hecho ya visto en otros integrantes de la red reguladora del SAS.

Con todo esto se procedió a obtener dobles mutantes entre los genes que estarían relacionados filogenéticamente, es decir entre alelos mutantes de *BHLH48* y *BHLH60*, *BHLH58* y *BHLH64*, y *BHLH62* y *BHLH78* (**Figura 38a**). Se generaron 7 combinaciones de líneas dobles mutantes mediante cruzamiento génico (**ver Materiales y Métodos**). Los cruces entre líneas se realizaron entre los ovarios de flores emasculadas de las líneas receptoras con polen de las líneas donadoras, tal como se detalla en la **Figura 38a**. Aproximadamente a las tres semanas se cosecharon las semillas originadas del cruzamiento (F1), y se sembraron 3 semillas por cruce. La autofecundación

de plantas F1 dio lugar a las semillas de la generación F2, en la que los diferentes alelos estaban segregando. Se sembraron unas 30 semillas de esta generación en placas con medio y se germinaron hasta día 7. En estas poblaciones no se observó ningún fenotipo diferente al de las plantas control (Col-0) crecidas al mismo tiempo. Se pasaron a tiestos 24 plántulas seleccionadas al azar. Tras transcurrir aproximadamente 3 semanas se identificaron las plantas dobles mutantes mediante genotipado por análisis por PCR con oligonucleótidos específicos (indicados en las **Figuras 29, 30 y 31**). Con las líneas seleccionadas se espero la generación F3 con la cual se realizaron experimentos de sombra simulada.



**Figura 37. Fenotipo morfológico de múltiples mutantes a respuesta a sombra.** Longitud del hypocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en la **Figura 24a**. Se comparó la respuesta de líneas salvajes (Col-0) y de los triples mutantes *bee123* y *bim123*. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones.

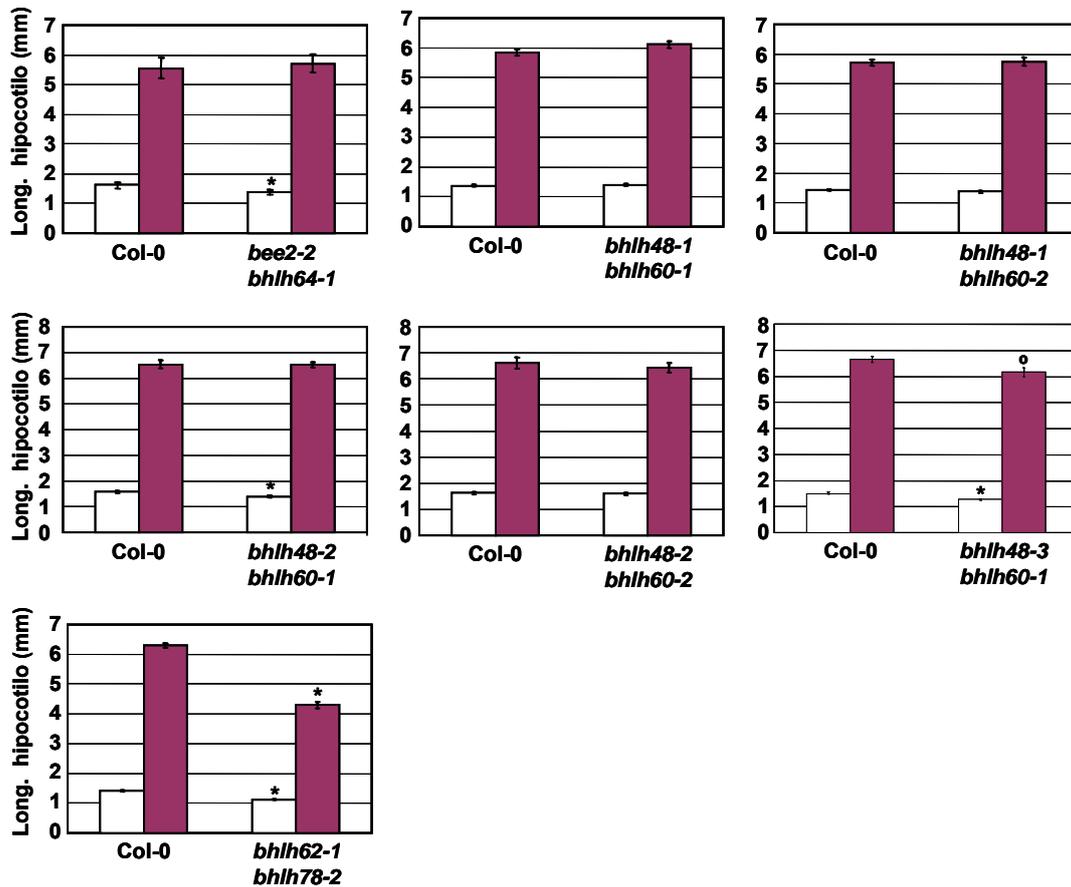
El doble mutante *bee2-2;bhlh64-1* apenas muestra un fenotipo diferente. (**Figura 38b**). De las combinaciones de alelos mutantes de *BHLH48* y *BHLH60*, sólo las plántulas dobles mutantes *bhlh48-3;bhlh60-1* respondían un poco menos a los tratamientos W+FR que las plántulas Col-0 (**Figura 38b**). Estos resultados sugieren que *BHLH48* y *BHLH60* actúan como reguladores positivos del SAS. Si bien la respuesta no fue muy fuerte comparada con los visto en los mutantes *bee123*, *bim123*, *pif4pif5*, el resultado es acorde con la idea de que su función es redundante con otros componentes próximos, como los genes *BEE*. Se observó que la respuesta a sombra de las plántulas del cruce *bhlh62-1;bhlh78-2* disminuye notablemente. Puesto que la línea *bhlh62-1* podría ser de ganancia de función y la *bhlh78-2* de pérdida, y tan solo las plántulas *bhlh62-1*

mostraban una pequeña reducción de la respuesta del hipocotilo a W+FR, resulta difícil explicar el comportamiento del doble mutante, si bien es posible que BHLH62 codifique un regulador negativo del SAS y BHLH78 positivo.

(a)

Genotipo de Plantas		
Receptora	Donadora	Descendencia
<i>bhlh60-1</i>	<i>bhlh48-1</i>	<i>bhlh48-1/bhlh60-1</i>
<i>bhlh48-1</i>	<i>bhlh60-2</i>	<i>bhlh48-1/bhlh60-2</i>
<i>bhlh48-2</i>	<i>bhlh60-1</i>	<i>bhlh48-2/bhlh60-1</i>
<i>bhlh48-2</i>	<i>bhlh60-2</i>	<i>bhlh48-2/bhlh60-2</i>
<i>bhlh48-3</i>	<i>bhlh60-1</i>	<i>bhlh48-3/bhlh60-1</i>
<i>bee2-2</i>	<i>bhlh64-1</i>	<i>bee2-2/bhlh64-1</i>
<i>bhlh62-1</i>	<i>bhlh78-2</i>	<i>bhlh62-1/bhlh78-2</i>

(b)



**Figura 38. Cruces generados entre líneas de genes *POF* relacionados filogenéticamente. (a)** Cruces realizados para obtener dobles mutantes generados a partir de ovarios de flores emasculadas de las líneas receptoras con polen de las líneas donadoras. **(b)** Fenotipo morfológico de dobles mutantes a respuesta a sombra. Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en la **Figura 24a**. Se comparó la respuesta de líneas salvajes (Col-0) y de los dobles mutantes. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones.

Estos resultados sugerirían que posiblemente existe una redundancia génica entre los genes *POF* analizados. La generación de múltiples mutantes probablemente permitirá ver un resultado más contundente y permitiría establecer la función positiva o negativa de los diferentes genes *POF* identificados y analizados. En la actualidad el grupo sigue caracterizando otras líneas mutantes en genes *POF* a nivel molecular y fisiológico y generando múltiples mutantes entre los diferentes alelos identificados.

## **2. Estudio de los genes *BEE* y *BIM*.**

A partir del cribado del sistema de Y2H usando como cebo PAR1, además de los genes *POF* mencionados en el capítulo anterior, también se identificaron los genes *BEE* y *BIM*. La expresión de varios de estos genes *BEE* (*BEE1* y *BEE2*) y *BIM* (*BIM1* y *BIM2*) también está inducida rápidamente por sombra simulada (Carabelli et al., 2007; Tao et al., 2008), lo que liga este aspecto de su expresión con el proceso que estamos analizando. Además los datos de experimentos de sombra simulada mostrados anteriormente (**Figura 37**) indicarían que actúan como reguladores positivos del SAS. Con esta información se quiso estudiar más a fondo el rol de ambos grupos de genes, primero confirmando la interacción con PAR1 y luego estudiando a nivel fisiológico y molecular la respuesta en líneas de pérdida de función.

### **2.1. Estudio de Interacción PAR1-BEE por Y2H.**

El resultado del cribado de Y2H hecho con PAR1 sobre una librería de cDNA de plántulas de 7 días de edad de *Arabidopsis* crecidas en luz W, dio como resultado docenas de posibles interactores que se clasificaron en cinco grupos dependiendo de cuán confiable era el resultado estadístico de la interacción (datos proporcionados por la empresa Hybrigenics, que ejecutó el cribado) (Galstyan, 2011). El sistema empleado por la empresa Hybrigenics se basa en el sistema LexA. De todos los *POF* identificados, los genes *BEE* se catalogaron dentro del grupo de alta (*BEE1*) o muy alta (*BEE2*, *BEE3*)

confianza de interacción. Con estos antecedentes se quiso corroborar estas interacciones utilizando otras estrategias experimentales.

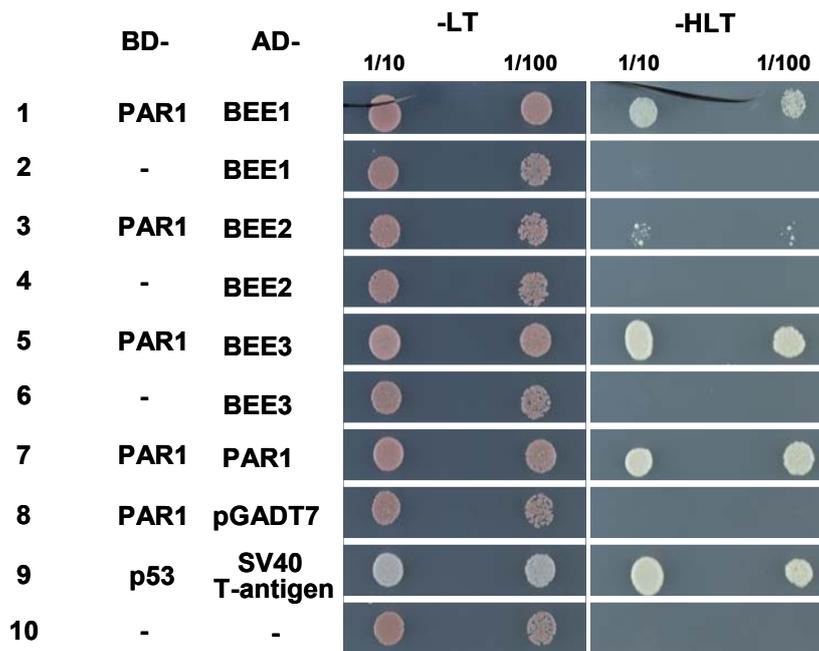
Primero se realizaron experimentos utilizando el sistema Y2H basado en GAL4, y empleando las cepas normalmente empleadas en el laboratorio (diferentes de las empleadas por Hybrigenics) y plásmidos que contenían los ORFs completos. En el laboratorio se disponía del plásmido pCL3 (BD-PAR1), que contenía el cDNA de *PAR1* clonado en marco de lectura con el dominio de unión a DNA de la proteínas Gal4 (BD, contenido en el plásmido pGBKT7). Esta construcción fue usada para analizar la habilidad de PAR1 para dimerizar con los BEE. Asimismo, el cDNA completo de *BEE1*, *BEE2* y *BEE3* se clonó en marco de lectura con el dominio de activación de la transcripción (AD) de un derivado del plásmido pGADGH (Bartel et al., 1993), obteniéndose los constructos pP6-BEE1, pP6-BEE2, pP6-BEE3, respectivamente, usados para la interacción con PAR1.

Para el análisis de interacción se llevo a cabo el Y2H por *mating*, que consiste en transformar dos cepas de levaduras de sexo diferentes (PJ694 $\alpha$  y YM4271a) con plásmidos diferentes, que le dan a cada cepa la capacidad de crecer en medios restrictivos. Estas cepas transformadas luego se juntan, y si logran cruzarse se podrá determinar analizando el crecimiento en medios selectivos específicos si las proteínas de interés interaccionan.

Células competentes de la cepa PJ694 $\alpha$  se transformaron con el plásmido pCL3, que expresa la proteína de fusión BD-PAR1, con el plásmido vacío pGBKT, que sólo tiene dominio de unión a DNA, o con el plásmido pVA3, que expresa la proteína fusión BD-p53. Las células competentes de la cepa YM4271a se transformaron con los plásmidos que contienen las proteínas de fusión AD-Y (pP6-BEE1, pP6-BEE2, pP6-BEE3), con el plásmido que expresaba la proteína de fusión AD-PAR1 (pCL1), con el plásmido vacío que solo tiene dominio de activación de GAL4 (pGADT7), o con el plásmido que expresaba la proteína fusión AD-SV40 T-antigen (pDT1)

La selección de las células transformadas de la cepa PJ694 $\alpha$  se realizó en medio mínimo sintético (SD) sin triptófano (SD-T) y las de la cepa YM4271a en medio SD sin leucina (SD-L), de forma separada. Obtenidas colonias de las células transformadas independientemente, se combinaron para el *mating* y se plaquearon diluciones seriadas (1/10 y 1/100) en medios SD-LT y medio SD sin

histidina, leucina y triptófano (SD-HLT). En SD-LT se observó crecimiento en todas las combinaciones y diluciones, lo que indicó que el *mating* había funcionado. La interacción entre proteínas se analizó en base al crecimiento en medio SD-HLT: no se observó crecimiento de las combinaciones de los diferentes controles negativos (2, 4, 6, 8 y 10) y sí de los dos controles positivos empleados (7 y 9), tal y como se esperaba (**Figura 39**). También se



**Figura 39. Análisis de la interacción de PAR1 con los BEE usando el método de Y2H por *mating*.** Diluciones de cultivos crecidos a partir de colonias resultantes del *mating* fueron crecidas en medio SD-LT. El crecimiento obtenido en todos los casos indicó que la cepa estaba transformada con los dos plásmidos de cada combinación. Para analizar la interacción entre las proteínas de interés las diluciones se hicieron en medio SD-HLT. El crecimiento en este medio nos indicó que las proteínas de interés analizadas en cada combinación interaccionaban en este ensayo. No se observa crecimiento en los controles negativos (2, 4, 6, 8 y 10). Se observó crecimiento en el control positivo (7 y 12) y en la combinación que expresa las proteínas híbridas BD-PAR1 y AD-BEE (1, 3 y 5).

observó crecimiento en las combinaciones que co-expresaban las proteínas BD-PAR1 y AD-BEE (1, 3 y 5), indicativo de la dimerización entre PAR1 y cada una de las tres proteínas BEE, validando así el resultado del cribado (**Figura 39**).

## 2.2. Estudio de Interacción PAR1-BEE por complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).

Una vez validados mediante Y2H los resultados del cribado se quiso confirmar la interacción pero empleando un sistema *in vivo* en células vegetales, para lo cual se utilizó la técnica de BiFC. Este sistema se basa en que la división de un fluoróforo, como la proteína fluorescente amarilla (YFP, del inglés *Yellow Fluorescent Protein*), en dos partes (N-terminal y C-terminal) se puede recuperar para formar un fluoróforo funcional cuando los elementos divididos se vuelvan a juntar, lo cual se puede conseguir si proteínas A y B fusionadas a cada fragmento del fluoróforo interaccionan entre sí.

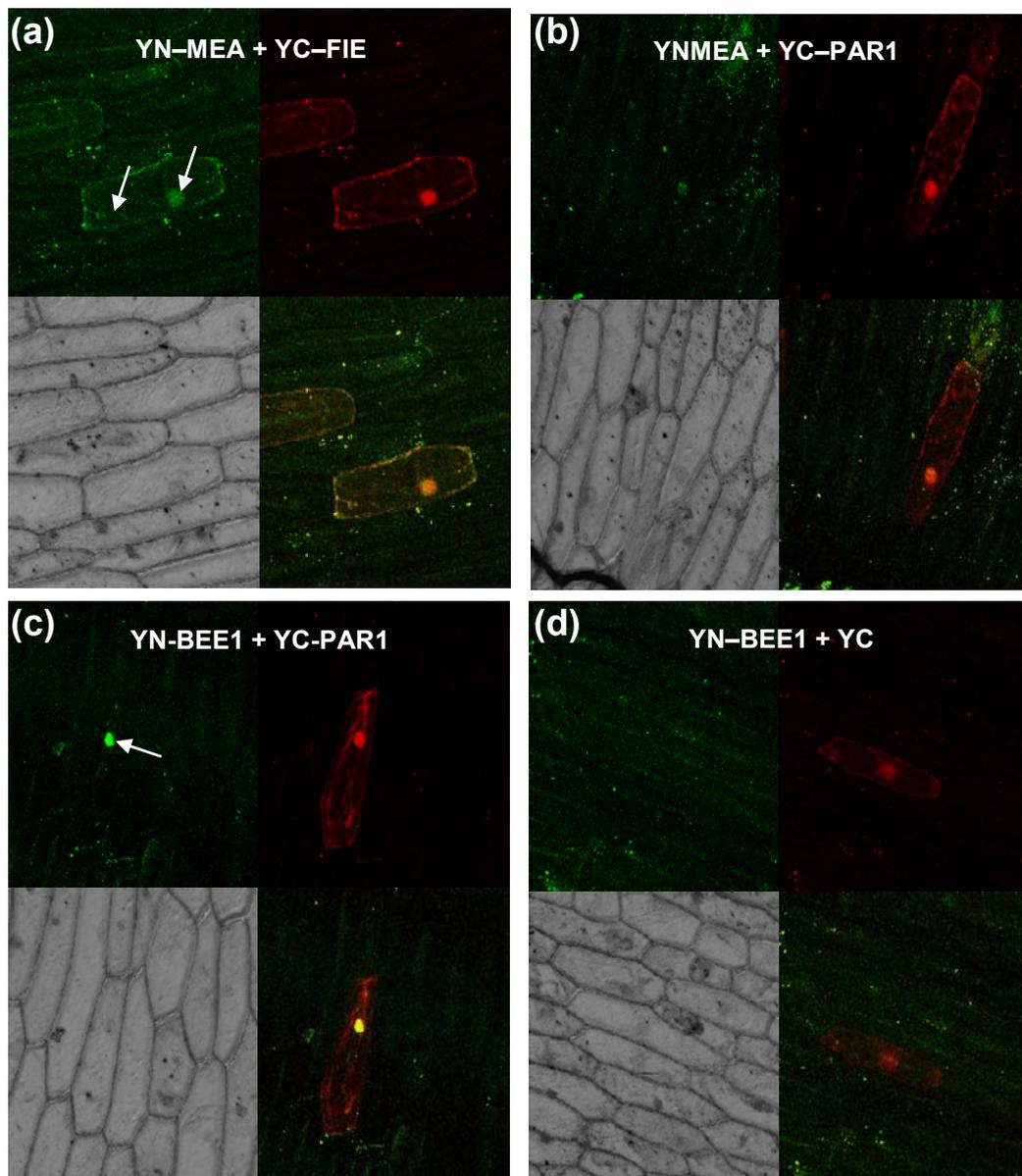
El cDNA de *PAR1* clonado en marco de lectura con el dominio C-terminal de la YFP contenido en el plásmido pSY735 (constructo pMS2, YC-PAR1) estaba disponible en el laboratorio. Por otro lado los cDNAs de *BEE1*, *BEE2* y *BEE3* se clonaron en marco de lectura con el dominio N-terminal de la YFP (contenido en el plásmido pSY736) obteniéndose los constructos pNC26 (YN-BEE1), pNC55 (YN-BEE2) y pNC27 (YN-BEE3).

Como control positivo de la interacción se emplearon los plásmidos pNO3, para expresar YN-MEA (MEDEA), y pNO4, para expresar YC-FIE (FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM), que son proteínas descritas como que interaccionan y reconstituyen la actividad de la YFP (Bracha-Drori et al., 2004). Como controles negativos se utilizaron el plásmido pSY735, para expresar el C-terminal de la YFP (YC) y pCM7, que expresa una versión de PAR1 mutada (PAR1<sub>L66E</sub>) fusionada al C-terminal de la YFP (YC-PAR1-L\*). Esta versión de PAR1 se ha descrito como incapaz de homodimerizar en ensayos de Y2H y carece de actividad biológica cuando se sobreexpresa en plantas transgénicas (Carretero-Paulet et al., 2010; Martinez-Garcia et al., 2010). Además para localizar las células transformadas por el sistema de BiFC, se utilizó el plásmido dsRed (pRFP) que permite la producción de la proteína fluorescente roja (RFP), que se localiza en el citoplasma y núcleo de las células.

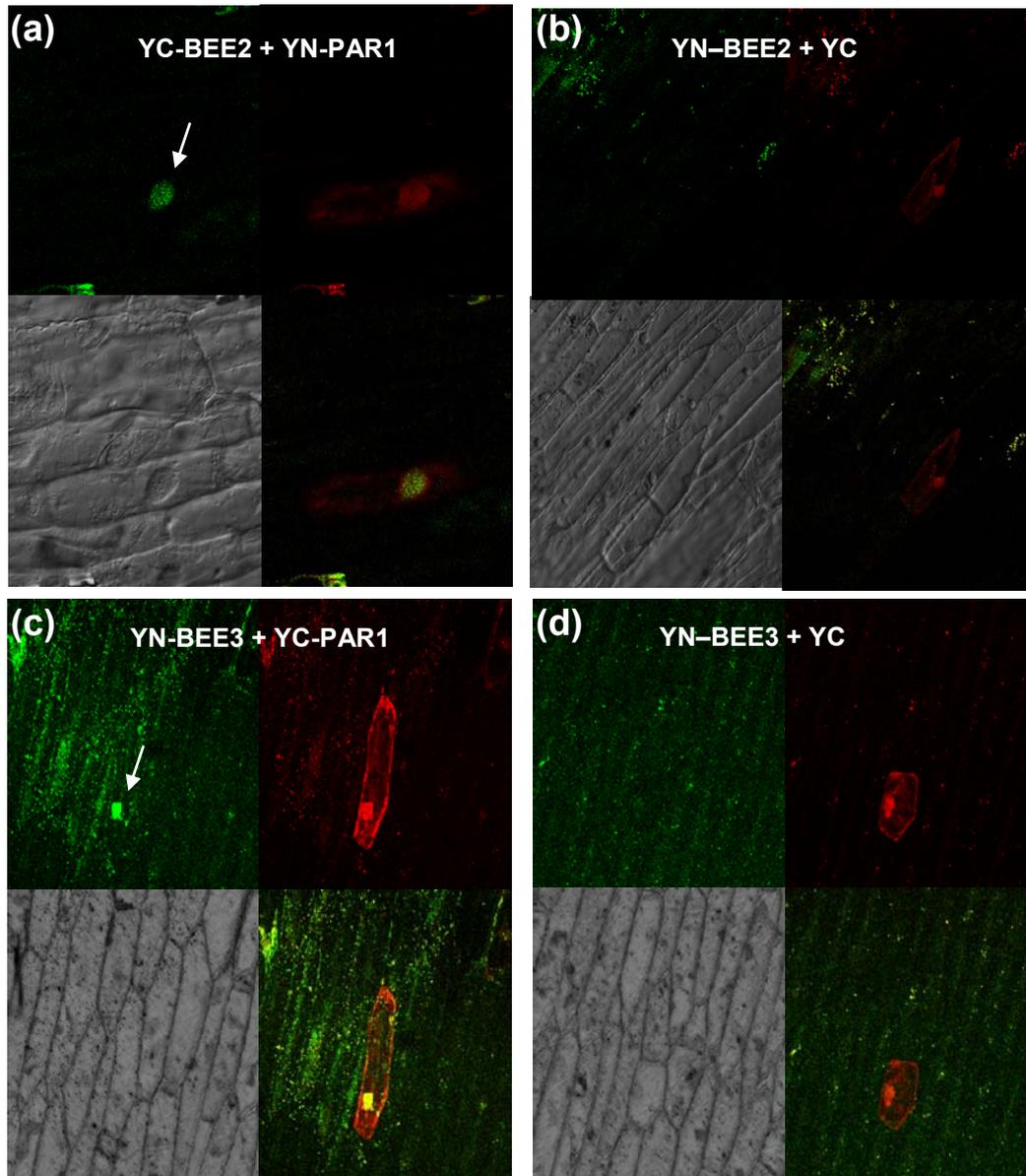
Con las construcciones indicadas se llevó a cabo el experimento de BiFC (**ver Materiales y Métodos**), que se detalla brevemente a continuación. Células de tejido epidermis de cebolla se bombardearon con una mezcla de 3

plásmidos: pRFP, un plásmido para producir la proteína que contiene el YC (pMS2, YC-PAR1; pCM7, YC-PAR1-L\*) y un plásmido para producir la proteína que contiene el YN (pNC26, YN-BEE1; pNC55, YN-BEE2; o pNC27, YN-BEE3).

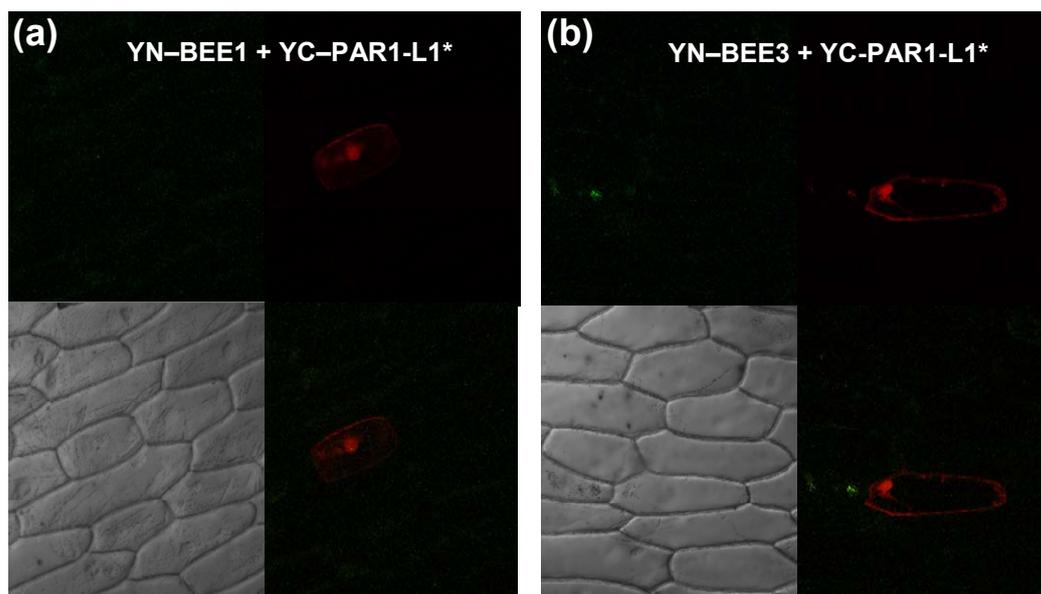
El resultado mostró reconstitución de la actividad YFP en las células co-transformadas con *YC-PAR1* y *YN-BEE1*, *YN-BEE2* o *YN-BEE3* lo cual confirmó que PAR1 interacciona con las proteínas BEE *in vivo* (**Figuras 40c, 41a y c**). Además en las transformaciones que co-expresaban el extremo Cterminal de la YFP sola (YC) o fusionada a la versión mutada de PAR1 (YC-PAR1-L\*), la YFP no se reconstitución, lo cual confirmó por un lado que PAR1 interacciona con las BEE, y que la interacción entre estas BHLH ocurre a través del dominio funcional HLH.



**Figura 40. Identificación de interacción in vivo entre PAR1 y BEE.** Localización subcelular del complejo YFP reconstituido en células vegetales. Células de cebolla fueron co-bombardeadas con las fusiones indicadas para YN y YC y DsRed. Amarillo (arriba a la izquierda), rojo (arriba a la derecha), superposición de fluorescencia (abajo a la derecha) y campo claro (abajo a la izquierda). **a** corresponde al control positivo de interacción, **b** y **d** controles negativos, y **c** interacción entre BEE1 y PAR1.



**Figura 41. Identificación de interacción in vivo entre PAR1 y BEE.** Localización subcelular del complejo YFP reconstituido en células vegetales. Células de cebolla fueron co-bombardeadas con las fusiones indicadas para YN y YC y DsRed. Amarillo (arriba a la izquierda), rojo (arriba a la derecha), superposición de fluorescencia (abajo a la derecha) y campo claro (abajo a la izquierda). **a** y **c** corresponden a las interacciones entre BEE2 y PAR1, y BEE3 y PAR1; **b** y **d** controles negativos respectivos.

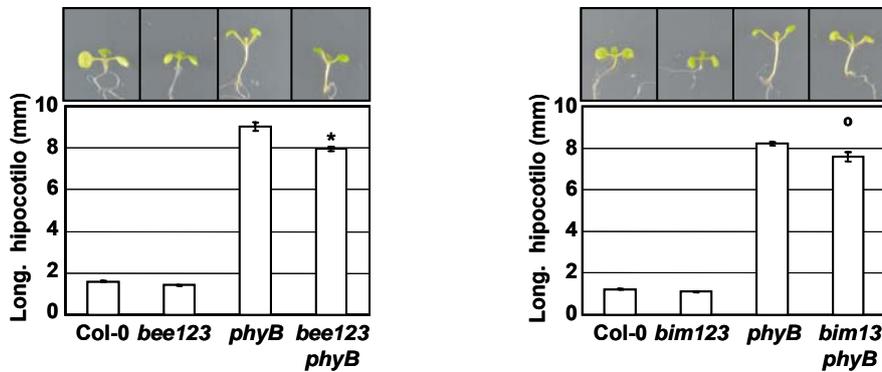


**Figura 42. Identificación de interacción in vivo entre PAR1 y BEE.** Localización subcelular del complejo YFP reconstituido en células vegetales. Células de cebolla fueron co-bombardeadas con las fusiones indicadas para YN y YC y DsRed. Amarillo (arriba a la izquierda), rojo (arriba a la derecha), superposición de fluorescencia (abajo a la derecha) y campo claro (abajo a la izquierda). a y b controles negativos de interacción entre BEE1 y PAR1-L1, y BEE3 y PAR1-L1.

### 2.3. Estudio de interacción entre phyB y elementos POF (BEE y BIM).

Tal como se ha mostrado anteriormente, los factores BEE y BIM actúan como reguladores positivos del SAS (**Figura 37**). Como se ha comentado en la introducción, phyB es el fitocromo más importante en la regulación del SAS, y mutantes *phyB-9* presentan un fenotipo de SAS constitutivo cuando crecen en luz W (R:FR alto, en ausencia de vegetación competidora) caracterizado por plántulas con hipocotilos largos (Devlin et al., 2003). Con esta información se quiso estudiar si los factores BEE y BIM actuaban en la ruta de señalización del phyB. Para esto se cruzaron los mutantes *bee123* y *bim123* con *phyB-9* (*phyB* a partir de ahora), con el fin de analizar en la descendencia la elongación del hipocotilo. Se hicieron los cruces entre *bee123* x *phyB* y *bim123* x *phyB*, fecundándose los ovarios de flores emasculadas de las líneas *bee123* y *bim123* con polen de *phyB*. Con las semillas T2 se seleccionaron en placa aquellas plántulas que tenían un hipocotilo alargado, lo cual daba a entender

que esas plantas eran *phyB*. Se pasaron a tierra, se dejaron crecer y se genotiparon estas plantas para ambos cruces identificándose cuádruples

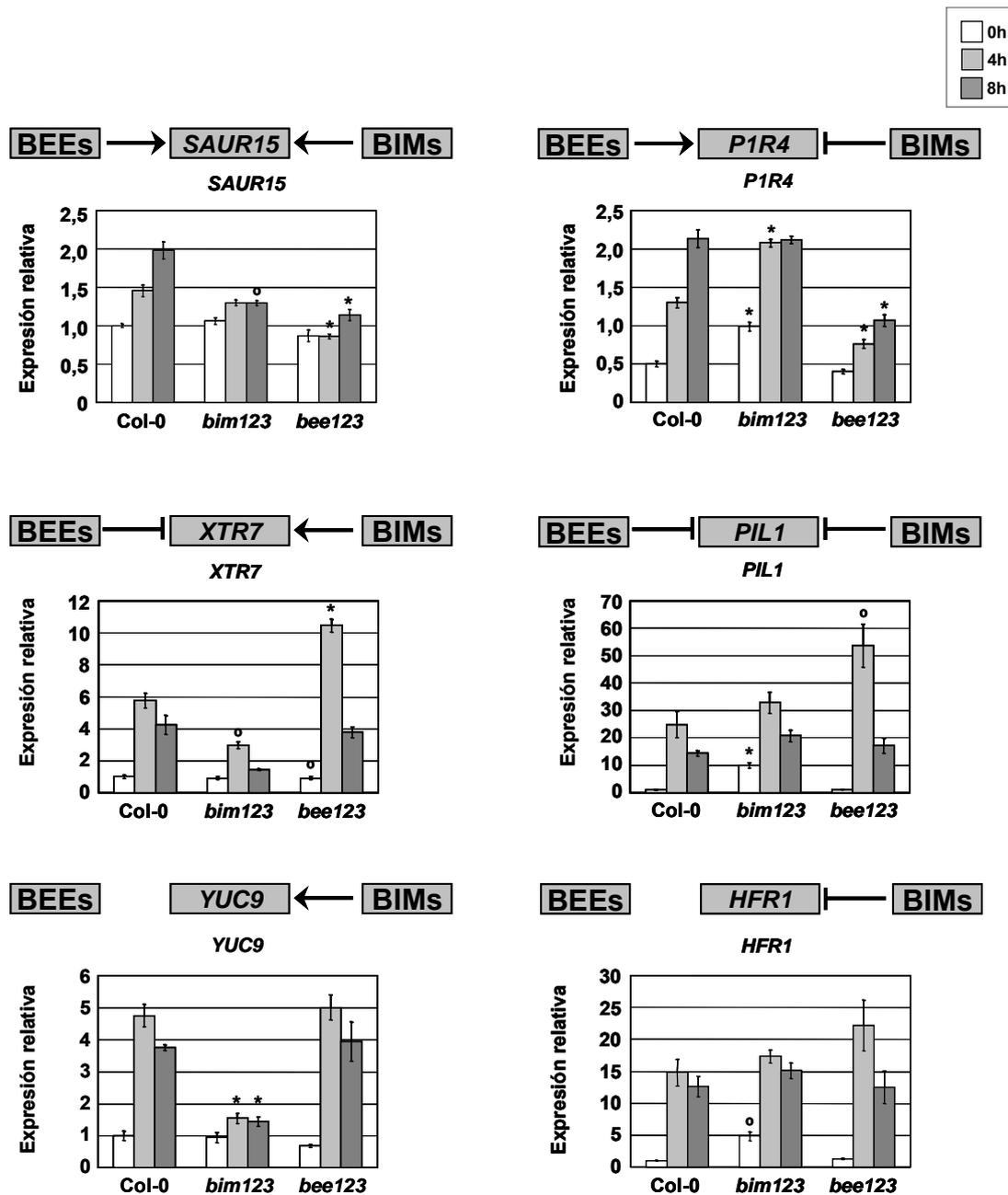


**Figura 43. Fenotipo morfológico de múltiples mutantes a respuesta a luz blanca.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas sólo en luz blanca durante 7 días. Se comparó la respuesta de líneas salvajes (Col-0) y de diferentes mutantes. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones.

mutantes *bee123;phyB*; para el otro cruce sólo se identificaron triples mutantes *bim13;phyB*. Cuando se comparó la longitud del hipocotilo de ambos grupos de múltiples mutantes con el simple mutante *phyB* crecidos en W, se aprecia que en ambos casos los hipocotilos mutantes *bee123;phyB* y *bim13;phyB* se alargaban significativamente algo menos que los del *phyB* y más que los *bee123* y *bim123* (**Figura 43**). Estos resultados muestran que las mutaciones *bee123* y *bim13* suprimirían el fenotipo de hipocotilo largo constitutivo de *phyB*, sugiriendo que tanto BEE como BIM estarían implicados en la ruta de señalización de *phyB*.

#### **2.4. Estudio de los factores BEE y BIM como módulos funcionales redundantes o módulos funcionales independientes reguladores del SAS.**

Se ha sugerido que en sistemas procariontes y eucariontes los componentes de redes transcripcionales regulatorias pueden estar organizados en módulos funcionales diferentes (Alon, 2003; Martinez-Garcia et al., 2002). Análisis de expresión génica obtenidos en el laboratorio han mostrado que los factores BIM y BEE modulan la expresión de un conjunto de genes concretos en respuesta a



**Figura 44. Efecto de los mutantes *bee123* y *bim123* en la expresión génica de genes que responden a sombra simulada.** Plántulas no transgénicas (Col-0), *bim123* y *bee123* crecidas durante 7 días en luz blanca continua después de los cual se hicieron los tratamientos de 0, 4 y 8 h de sombra simulada. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de tres réplicas biológicas calculados por análisis de qPCR normalizada con *UBIQUITINA10* (*UBQ10*). La expresión de genes normalizados se presenta en relación con la expresión de las plántulas control (Col-0) sin tratar; los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}P < 0.05$ ,  $^{*}P < 0.01$ ) relativa al control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

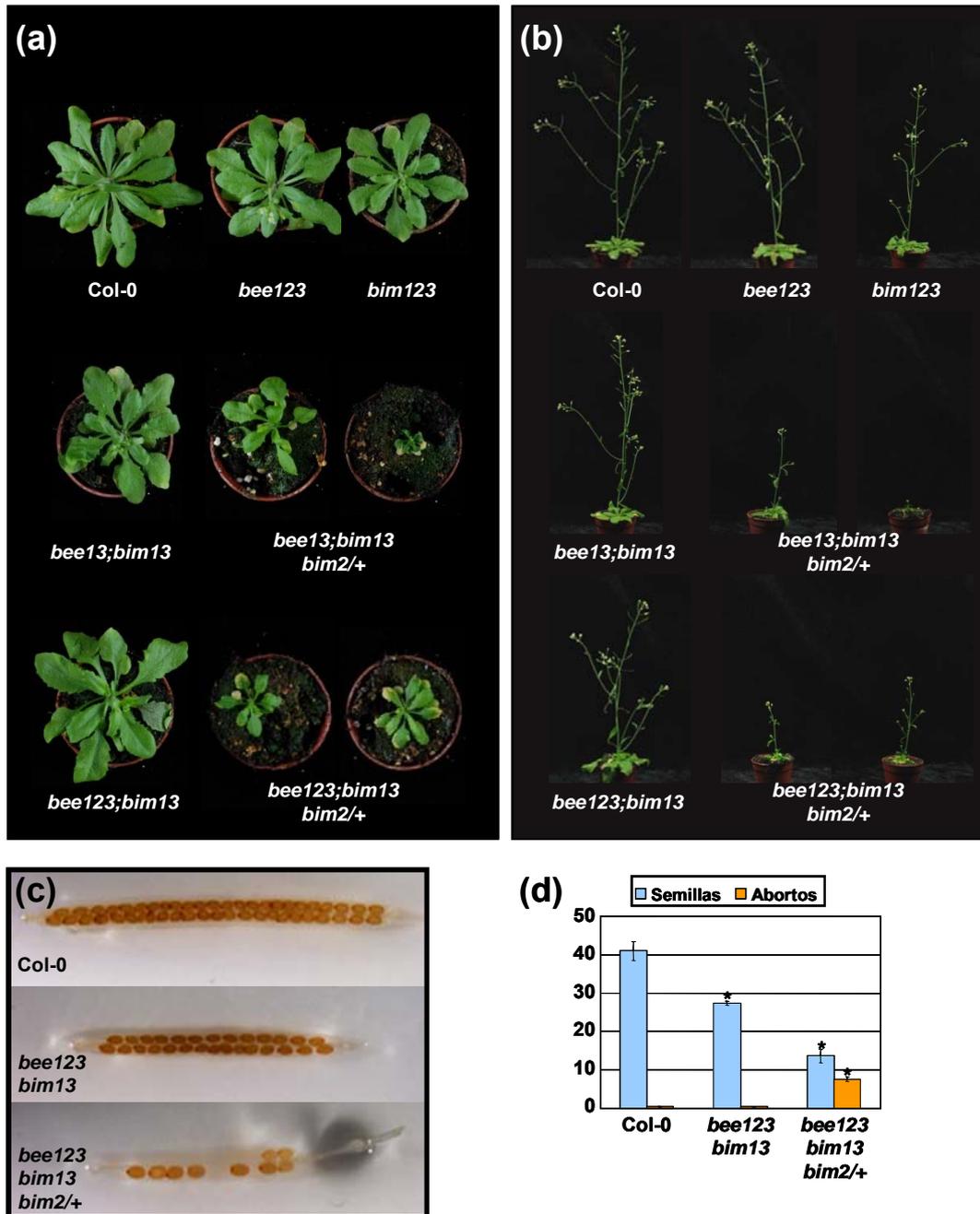
sombra de diferente manera, regulándolos en el mismo sentido (*SAUR15*), en sentido contrario (*P1R4*, *XTR7*), o sólo uno de ellos participando en la regulación (*PIL1*, *YUC9*) (Figura 44). Esto nos ha sugerido que los factores

BIM y BEE podrían ser parte de diferentes módulos funcionales dentro de la misma red transcripcional que regula el SAS. Aunque se sabe que alterando únicamente un módulo no se perturba necesariamente el comportamiento de todo el sistema, se ha propuesto que las características de un sistema son producto de la coordinación de diferentes módulos y que por lo tanto la alteración de esta coordinación puede tener efectos críticos (Hartwell et al., 1999). Según esto se pensó que anulando el funcionamiento de 2 módulos a la vez podría resultar en fenotipos sinérgicos (en vez de aditivos) en comparación con los mutantes de pérdida de un solo módulo. De no ser así podríamos hablar que el grupo de genes sería redundante y solo habría un efecto aditivo al afectar ambos módulos. Para analizar esta hipótesis (que los factores BEE y BIM son parte de módulos diferentes), se cruzaron las líneas *bee123* con las *bim123*. Luego de 4 generaciones genotipando e intentando identificar el séxtuple mutante, sólo pudimos obtener líneas con genotipos *bee13;bim13*, *bee123;bim13* y *bee123;bim13;bim2/+* (*bim2/+* indica que el alelo mutante *bim2* está en heterocigosis). Así, partir de la descendencia de plantas *bee123;bim13;bim2/+*, el gen BIM2 siempre se encontró en heterocigosis (*bee123bim13;bim2/+*) u homocigosis salvaje (*bee123;bim13*). Estos resultados los interpretamos como indicación de que *BIM2* podría ser necesario para la viabilidad de plantas en ausencia de los otros factores BIM y BEE.

Morfológicamente la descendencia de plantas *bee123;bim13;bim2/+* crecidas durante 7 días en luz W (plántulas) mostraban tres tipos de fenotipo en proporciones variables: algunas enanas (genotipo *bee123;bim13;bim2/+*, 10%), otras con un fenotipo similar a los triples mutantes (genotipo *bee123;bim13*, 40%), y un grupo con un fenotipo intermedio entre los dos antes comentados (genotipos *bee123;bim13;bim2/+* y *bee123;bim13* mezclados, 50%). En general la población de esta línea segregante siempre fue casi 50% *bee123;bim13;bim2/+* y 50% *bee123;bim13*, detectable con seguridad a simple vista en planta adulta (día 30).

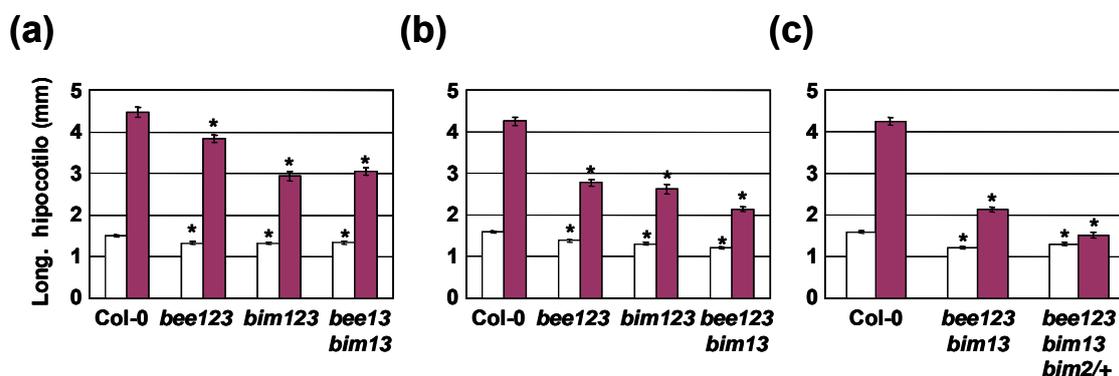
Como se observa en la **Figura 45a y b**, plantas de 36 o 43 días de edad con genotipos *bee13;bim13* y *bee123;bim13* no mostraron diferencias morfológicas importantes al compararse con los triples mutantes. Por el contrario, los individuos *bim2/+* en ambos fondos mutantes (*bee13;bim13* y *bee123;bim13*) mostraron varios fenotipos distintivos, tales como rosetas, tallos

florales enanos y baja producción de semillas. Al comparar las silicuas entre plantas Col-0, *bee123;bim13* y *bee123;bim13;bim2/+*, se vio que en éstas últimas las silicuas eran más cortas que las de las otras dos líneas y que presentaba un porcentaje de aborto muy alto (**Figura 45c y d**).



**Figura 45. Fenotipo de plantas deficientes en múltiples genes BEE y BIM.** (a y b) Plantas Col-0 y múltiples mutantes de *BEE* y *BIM* fueron crecidas en invernadero (día largo) durante 36 (a) o 43 (b) días. (c) Imagen del aspecto de silicuas de plantas adultas Col-0, *bee123;bim13* y *bee123;bim13;bim2/+* crecidas en el invernadero. Las silicuas fueron recolectadas, y luego fijadas y tratadas con hidrato cloral. (d) Cuantificación del número de semillas y abortos presentes en Col-0, *bee123;bim13* y *bee123;bim13;bim2/+*. 5 silicuas de 3 diferentes plantas de cada genotipo fueron procesadas como se comentó en c, luego de lo cual se realizó un conteo del número de semillas y el número de espacios libres (abortos) en cada una de ellas.

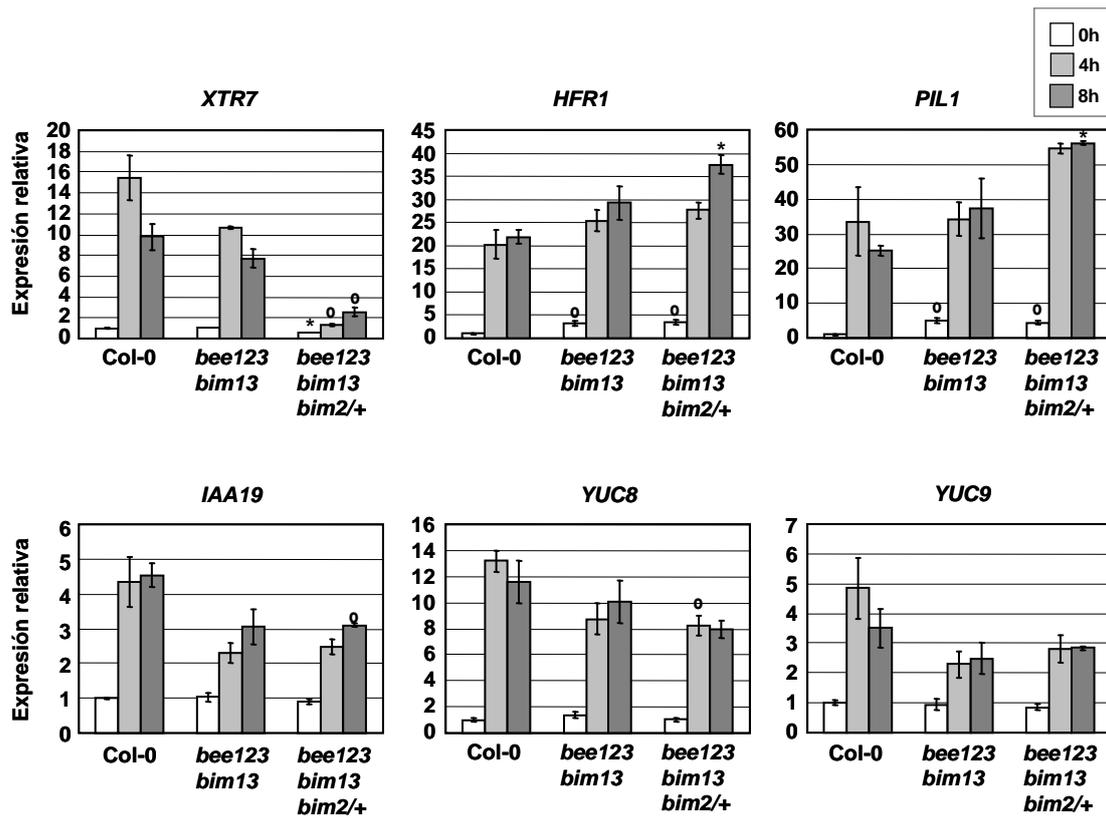
A continuación se procedió a hacer experimentos fisiológicos de W+FR con los diferentes mutantes. Como se observa en la **Figura 46**, en luz W los hipocotilos *bee13;bim13*, *bee123;bim13* y *bee123;bim13;bim2/+* presentan una elongación similar a los triples *bee123* y *bim123*. En W+FR los hipocotilos del quintuple mutante *bee123;bim13* (**Figura 46a** y **b**) eran algo más cortos que los triples y el cuádruple *bee13;bim13*, resultado que sugirió una contribución aditiva por parte de estos genes. Para analizar la respuesta del hipocotilo a sombra simulada en las líneas *bee123;bim13;bim2/+*, también se sembró una placa completa de las semillas producidas por plantas *bee123;bim13;bim2/+* (100 semillas de una población segregante), se trataron normalmente con W y W+FR y luego se midieron los hipocotilos de las plántulas con fenotipos enanos e intermedios. Estas plantas se pasaron a tierra y posteriormente se genotiparon, con lo que se determinó los valores de elongación del hipocotilo de las plantas con genotipo *bee123;bim13;bim2/+* crecidas en las dos condiciones de luz aplicadas.



**Figura 46. Fenotipo morfológico de múltiples mutante de BEE y BIM a respuesta a sombra. a, b, c.** Longitud del hipocotilo de plántulas germinadas y crecidas tal como se indica en la **Figura 24a**. Se comparó la respuesta de líneas salvajes (Col-0) y de diferentes múltiples mutantes de los genes BEE y BIM (*bee123*, *bim123*, *bee123;bim13* y *bee123;bim13;bim2/+*). Los valores son medias  $\pm$  error estándar de 30 plántulas analizadas; los símbolos representan la diferencia significativa (\* $P < 0.01$ ) relativa con el control (Col-0) crecido bajo las mismas condiciones.

Los experimentos de sombra simulada en las plántulas *bee123;bim13;bim2/+* mostraron que los hipocotilos apenas respondían a W+FR comparándolo con Col-0 y el mutante *bee123;bim13*, lo que indicaba que en ausencia de los otros factores BEE y BIM, los niveles de BIM2 son limitantes para la respuesta a sombra (**Figura 46c**). Estos resultados indicarían que los factores BIM y BEE también actuarían a un nivel muy importante en la

regulación del SAS. Para profundizar más sobre la posibilidad de que estos genes formasen parte de diferentes módulos funcionales, se comparó la expresión de genes marcadores de sombra a 0, 4 y 8 h de tratamiento (*XTR7*, *HFR1*, *PIL1*, *IAA19*, *YUC8* y *YUC9*) en plantas Col-0, *bee123;bim13* y *bee123;bim13;bim2/+*. Para llevar a cabo este experimento, semillas de los 3 genotipos mencionados se germinaron y crecieron durante 10 días en condiciones de W. A esta edad observamos que era más fácil reconocer visualmente la mayoría (pero no la totalidad) de los individuos heterocigotos en la población segregante que en día 7 (edad en la normalmente realizamos estos experimentos). A continuación las plántulas se trataron con W+FR. Se recogió el material vegetal inmediatamente antes (0 h) y después de 4 y 8 h de W+FR. Se extrajo el RNA y se llevó a cabo el análisis de expresión de los genes antes mencionados por qPCR. Los resultados obtenidos (**Figura 47**) mostraron que la expresión el gen marcador *XTR7* inducida por W+FR está fuertemente reducida en las plántulas *bee123;bim13;bim2/+* genotipo, presenta una fuerte reducción de la expresión cuando se comparó con el quintuple mutante (**Figura 47**). Una reducción tan fuerte no se observa en ninguno de los triples mutantes (**Figura 44**) lo que sugiere que podría tratarse de un efecto sinérgico. La expresión de los otros genes analizados mostraba comportamientos diferentes de lo visto previamente con los triples mutantes, como es el caso de *PIL1* y *HFR1*, que presentan una alta inducción a estos tiempos largos de exposición a sombra.



**Figura 47. Respuesta molecular de múltiples mutante de BEE y BIM a diferentes tratamientos de sombra.** Análisis de la expresión de los genes marcadores *XTR7*, *HFR1*, *PIL1*, *IAA19*, *YUC8* y *YUC9* en plántulas no transgénicas (Col-0), *bee123bim13* y *bee123bim13bim2/+* crecidas durante 7 días en luz blanca continua después de los cual se hicieron los tratamientos de 0, 4 y 8 h de sombra simulada. Los valores son medias  $\pm$  error estándar de tres réplicas biológicas calculados por análisis de qPCR normalizada con *UBIQUITINA10* (*UBQ10*). La expresión de genes normalizados se presenta en relación con la expresión de las plántulas control (Col-0) sin tratar; los símbolos representan la diferencia significativa ( $^{\circ}P < 0.05$ ,  $^*P < 0.01$ ) relativa al control (Col-0) bajo las mismas condiciones.

## **CAPITULO IV.**

---



## **1. Estudio de la unión de las proteínas BEE1, BEE2, BEE3 y BIM1 a DNA.**

Como se concluyó en el capítulo 2 de este trabajo, PAR1 es un cofactor transcripcional que regularía la expresión génica sin unir directamente DNA. Además en el capítulo anterior se demostró por medio de los sistemas del Y2H y BiFC que las proteínas BEE1, BEE2, BEE3 y BIM1 interactúan con PAR1. Ambos resultados sugerirían que PAR1 podría regular la expresión génica heterodimerizando con factores BHLH (como BEE1, BEE2, BEE3 y BIM1) y modulando su capacidad de unir elementos reguladores en los promotores de sus genes diana. Este mecanismo ya se ha descrito para PAR1 sobre PIF4 (Hao et al., 2012), para HFR1 sobre PIF4 y PIF5 (Hornitschek et al., 2009), para DELLAs sobre PIF3 (Feng et al., 2008) y phyB sobre PIF1 y PIF3 (Park et al., 2012). Para analizar esta posibilidad en nuestro trabajo primero se estudió la capacidad de los dominios BHLH de las proteínas BEE1, BEE2, BEE3 y BIM1 de unir DNA.

### **1.2. Ensayos de unión de dominios BHLH (dBHLH) a la caja G-box.**

Como se mencionó en el capítulo anterior las proteínas BEE1, BEE2, BEE3 y BIM1 son parte de la familia de las BHLH, familia que fue descrita en la introducción. Cuando proteínas BHLH típicas se unen a secuencias de DNA reguladoras, pueden controlar la expresión génica, normalmente activándola (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Hornitschek et al., 2012; Hornitschek et al., 2009; Sun et al., 2012; Yin et al., 2005).

Según lo descrito por (Heim et al., 2003), esta familia de factores se subdivide en 12 grupos, agrupados de acuerdo a la conservación aminoacídica fuera de la región BHLH. En general en la mayoría de los grupos se mantienen conservados los residuos H-E-R ubicados en el dominio básico y que han sido descritos como claves para la unión a DNA. Estos residuos se encuentran conservados en PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5, proteínas BHLHs pertenecientes a otro grupo de estas familias (familia VII) y que experimentalmente se unen a DNA, específicamente a la caja G-box (CACGTG) (Huq et al., 2004; Huq and Quail, 2002; Martinez-Garcia et al., 2000a). Estos residuos también están

conservados en los BEE y BIM (Heim et al., 2003). Además, se ha demostrado que BIM1 se une *in vitro* e *in vivo* a una secuencia E-Box (CANNTG) (Yin et al., 2005).

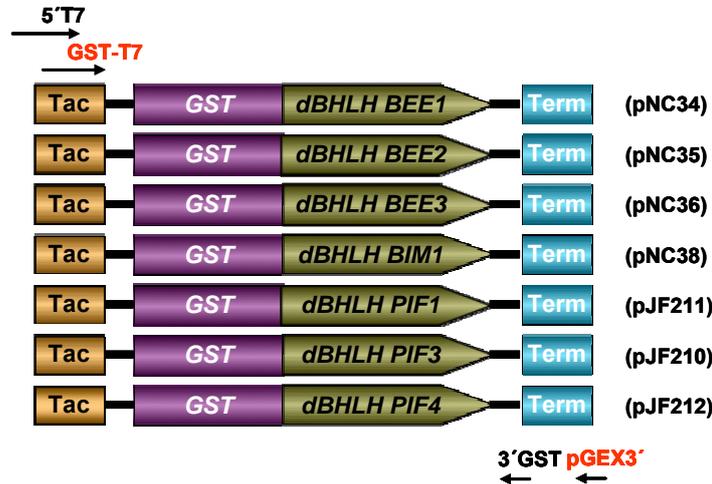
Previamente, en el laboratorio se intentó analizar sin éxito la unión a secuencias G-box de las proteínas completas BEE1, BEE3 y BIM1 producidas por el sistema *in vitro* de TnT o producidas en *E. coli* fusionadas al tag RGS. Así, las proteínas producidas mediante estas estrategias no funcionaron en las condiciones de los EMSAs ensayados, por lo que no pudimos analizar si BEE1 y BEE3 podían unir DNA, ni confirmar la unión de BIM1 a E-Box (Yin et al., 2005).

Previamente se había mostrado que sólo la parte de la proteína PIF3 que contenía el dominio de unión a DNA básico y el dominio de heterodimerización HLH (~61 residuos en total, que incluye 10 residuos adicionales en el extremo N-terminal y 12 en el extremo C-terminal) era suficiente para la unión a G-box (Martinez-Garcia et al., 2000a). Con esta información se determinó usar esta región (dBHLH, dominio BHLH) de las proteínas BEE1, BEE2, BEE3 y BIM1 para realizar el mismo estudio de unión a la caja G-box hecha para PIF3. Para ellos se alinearon los dBHLH de las proteínas BEE1, BEE2, BEE3, BIM1, PIF1, PIF3 y PIF4 usando el programa bioinformático ClustalW. El alineamiento resaltó la conservación de los residuos H-E-R dentro del dominio básico (**Figura 48a**), tal como se había publicado (Heim et al., 2003). Basándonos en este análisis de secuencias, se decidió producir los dBHLH de las siete proteínas mencionadas para analizar su unión a G-box. Para esto, los dBHLH correspondientes se clonaron en el plásmido pGEX-4T-1, que permitía producir los diferentes fragmentos como proteínas fusionadas a la glutatión S-transferasa (GST), generándose proteínas GST-dBHLH de una masa molecular calculada de unos 35 kDa (**Figura 48b**). Las construcciones obtenidas se usaron de moldes en dos PCRs secuenciales: la primera integró la secuencia del promotor T7 en 5' al gen GST-dBHLH (**Figura 48b**, oligos en rojo) y una segunda que agregó una cola de poly-A en 3' al gen GST-dBHLH (**Figura 48b**, oligos en negro), secuencia que se ha descrito que da estabilidad a los RNA producidos y a la vez potencia la traducción de proteínas en sistemas *in vitro* (Jackson and Standart, 1990).

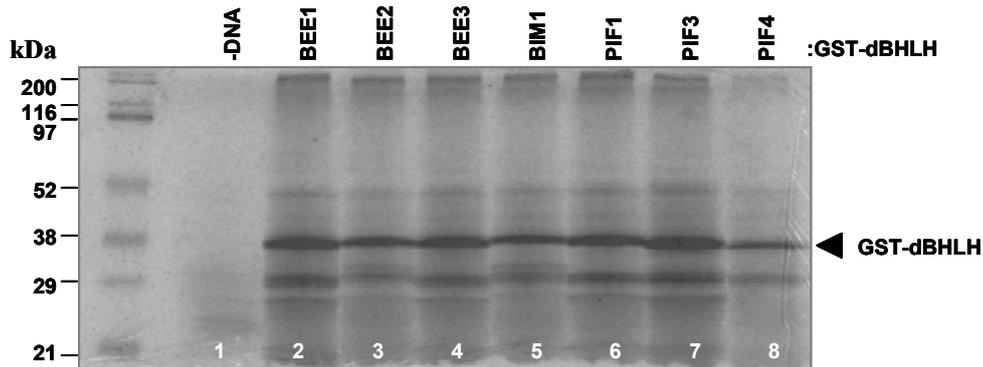
(a)

```
BEE1 KEREVVHVRARRGQATDSLSLAERVRRGKINERLRLCLQDMVPGCYKAMGMATMLDEIINYVQSLQNVQVEFLSMKLTAAASSFYDF
BEE3 KEREVVHVRARRGQATDSLSLAERVRRGKINERLRLCLQDIVPGCYKTMGMATMLDEIINYVQSLQNVQVEFLSMKLTAAASSYYDF
BEE2 QKPDYIHVRARRGEATDRHSLAERARREKISKMKKCLQDIVPGCNKVTGKAGMLDEIINYVQSLQQQVEFLSMKLSVINPELEC
BIM1 ADVRGSFNDQKLNTPRSKLSATLQRRRSKINDRFQMLRQLIPNSDQKRDKASFLEVEIYIQFLQEKADKYVTSYQGWHEPAK
PIF1 KQARVSTTSTKRSRAAEVNLSEKRRDRINERMKALQELIPRCNKSD-KASMLDEAIEYMKSLQLQIQMMSMCGMMPMMYPG
PIF4 NKSNGRSGSNRRRSRAAEVNLSEKRRDRINERMKALQELIPHCSTKTD-KASILDDEAIDYKSLQLQLQVMWMSGMAAAAASA
PIF3 AGPSRTGLGSKRSRSRAEVNLSEKRRDRINEKMRALQELIPNCNKVD-KASMLDEAIEYKSLQLQLQVQIMSMASGYLPPAVM
```

(b)



(c)



**Figura 48. Producción de proteínas *in vitro* para ensayos EMSA. (a)** Alineamiento de dominios BHLH (dBHLH) de las proteínas BEE1, BEE2, BEE3, BIM1, PIF1, PIF3 y PIF4. En celeste se enmarca el dominio básico y en amarillo el dominio HLH. En rojo se destacan los residuos H-E-R, importantes para la unión a DNA. **(b)** Esquema de las construcciones generadas para la producción *in vitro* de proteínas. Las construcciones se obtuvieron clonando en el mismo marco de lectura que la GST el dBHLH (83-84 residuos) de los genes *BEE1*, *BEE2*, *BEE3*, *BIM1*, *PIF1*, *PIF3* y *PIF4* en el plásmido pGEX-4T-1. Este plásmido permite la expresión en *E. coli* de proteínas fusionadas a la GST bajo el control de un promotor tac, que se induce químicamente. En paréntesis se indica el nombre de la construcción. Las flechas indican los oligos utilizados para la producción mediante PCR del molde a usar la síntesis *in vitro* de proteínas. **(c)** Las fusiones GST-dBHLH de los genes *BEE1*, *BEE2*, *BEE3*, *BIM1*, *PIF1*, *PIF3* y *PIF4*, fueron transcritos y traducidos *in vitro* por el sistema TnT de reticulocito de conejo. Se llevaron a cabo en paralelo dos reacciones, una con metionina fría y otra con [35S]Met. Los productos de la reacción radioactiva fueron resueltos en un gel SDS-12%PAGE. Los péptidos sintetizados se revelaron mediante autorradiografía utilizando el *PhosphorImager* (12 horas de exposición). La flecha señala la posición de las proteínas fusión GST-dBHLH (~35kDa).

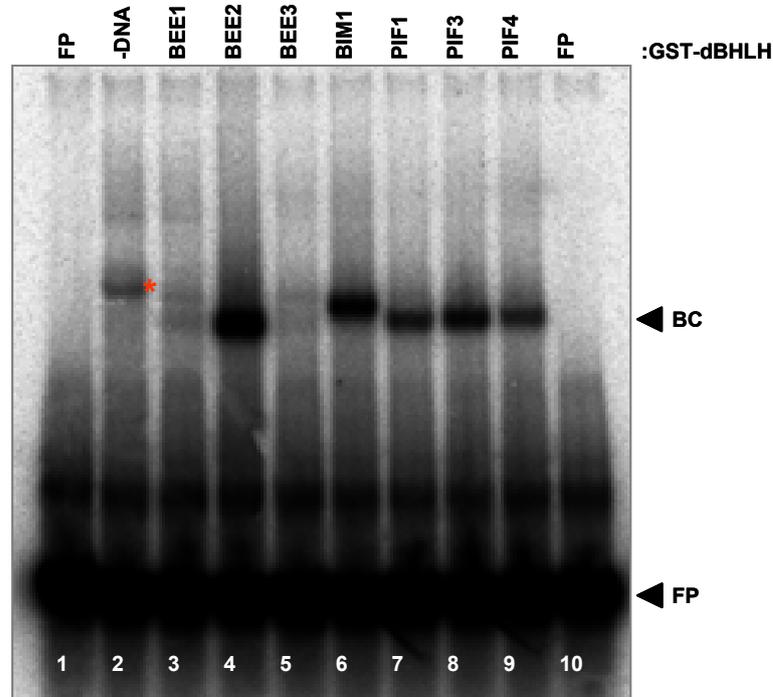
Los productos de PCR se purificaron y usaron como molde para la síntesis *in vitro* de proteína usando el sistema de transcripción y traducción (TnT) de reticulocito de conejo (Promega) (**ver Materiales y Métodos**). Al inicio de este trabajo la síntesis de cada proteína mediante TnT se llevó a cabo por duplicado, usando en una de ellas metionina fría y otra metionina marcada radiactivamente (Methionine L-[<sup>35</sup>S]-; *Perkinelme*). La reacción fría servía para producir proteínas a utilizar en análisis posteriores, y la reacción radiactiva permitía comprobar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y posterior autorradiografía del gel si funcionaba la síntesis proteica. Como se observa en la **Figura 48c**, la presencia de bandas de unos 35 kDa en las 7 reacciones donde fue incubado el producto de PCR respectivo de cada GST-dBHLH (marcada con una flecha, ausente en la muestra en la que no se añadió molde de DNA, carrera 1, -DNA), confirmó la síntesis para cada producto y posiblemente en buenas cantidades debido a la intensidad de la banda. Además como se aprecia la síntesis fue bastante similar en todos los casos ya que la intensidad no varió mucho entre muestras.

Como se mencionó anteriormente las proteínas PIF fueron descritas por unir específicamente a la caja G-box. Siguiendo lo descrito por Martínez-García (Martinez-Garcia et al., 2000a), una sonda de 36 nucleótidos que contenía la G-box internamente (**Figura 49a**) fue marcada radioactiva con dCTP (**ver Materiales y Métodos**). Para ver si las proteínas GST-dBHLH de BEE1, BEE2, BEE3 y BIM1 se unían a la caja G-box, se llevó a cabo un ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA, de sus siglas en inglés). En este ensayo se usaron dos controles negativos. Uno fue la incubación de la sonda marcada sin extracto proteico, que permitía ver la integridad de la sonda libre marcada en el EMSA (FP, del inglés *free probe*, carril 1). El otro control fue la incubación de la sonda marcada con un extracto proteico resultado de una reacción de TnT en ausencia de DNA (-DNA, carril 2). Esta reacción, que contiene sólo las proteínas del kit comercial (**ver Materiales y Métodos**), permite detectar la presencia de proteínas en el extracto TnT que interaccionen específica o inespecíficamente con la sonda marcada radioactiva. La comparación de estas reacciones con las de extractos que producen proteínas concretas permite identificar actividades específicas de unión a DNA de las proteínas de interés. Se utilizó como control positivo GST-dBHLH de PIF3 que, como se mencionó

(a)

G-box:  
ggCCGAGGTGAGTAGGACACGTGGACACGTCTTCCGAA--  
--GGCTCCACTCATCCTGTGCACCTGTGCAGAAGGCTTgg

(b)



**Figura 49. Ensayos de unión de proteínas GST-dBHLH a la caja G-box.** (a) Secuencia de la sonda nucleotídica que contiene la G-box (en azul). (b) EMSA entre las proteínas GST-dBHLH y la sonda G-box. La flecha superior indica el complejo GST-dBHLH/G-box (BC, binding complex); la flecha inferior indica la sonda libre (FP, free probe). El asterisco indica un complejo de unión inespecífico.

anteriormente, unía una G-box. Además, se incluyeron los dominios GST-dBHLH de PIF1 y PIF4 porque para ver si lo observado en con PIF3 era reproducible en los otros PIFs. Como se observa en la **Figura 49b** la presencia de una banda intensa en el carril de PIF3 (carril 8), así como en la de los otros PIF (carril 7 y 9), correspondería al dBHLH/G-box. Los resultados obtenidos con las proteínas PIF sugieren que la actividad de unión a DNA de los dBHLH reflejaría la actividad de unión a DNA de la proteína entera. Con respecto a nuestras proteínas de estudio, una banda de similar intensidad y movilidad a la de los PIF (carriles 7-9) se detectó en las reacciones con el GST-dBHLH de BEE2 y BIM1 (carriles 4, 6). También se observó en las reacciones incubadas con los extractos GST-dBHLH de BEE1 y BEE3 bandas de similar movilidad

pero mucha menor intensidad (carriles 3, 5). Estos datos mostraron que los dBHLH de BEE2 y BIM1 son suficientes para unir G-box, tal como ha sido descrito para los PIF. Esto no fue el caso para los dBHLH de BEE1 y BEE3. Esto sugiere que siendo las BEE del mismo grupo la actividad de unión a la G-box de sus dBHLH no es igual.

### 1.3. Mutagénesis de residuos en el dominio básico de BEE1 y BEE2.

Las diferencias encontradas en los ensayos EMSA sugerirían que podía haber residuos en el dominio básico, junto con los H-E-R, implicados en la unión a la G-box con diferente intensidad. El alineamiento de la secuencia aminoacídica de los dBHLHs de las proteínas analizadas (**Figura 50a**) permitía clasificar los 18 residuos del dominio básico (celeste) en diferentes grupos: (i) residuos iguales en todas las proteínas (marcados con la letra **i**); (ii) residuos iguales en BEE1, BEE2, BEE3 y a veces en PIFs (marcados con la letra **x**); y (iii) residuos iguales en BEE1 y BEE3 pero diferentes entre BEE2, BIM1 y PIFs (marcados con la letra **d**) (**Figura 50a**). De estos tres grupos nos interesamos en el último, ya que podría marcar la diferencia entre la variación de intensidad vista en los ensayos. Por tanto era posible que uno o más de los residuos marcados como “d” fueran responsables de la diferencia de unión a la G-box observada en los EMSAs. De los 4 residuos de este grupo, el único que mostraba diferencias consistentes entre los dos grupos de proteínas era el residuo en posición 18, de naturaleza polar en BEE2, BIM1 y los PIFs y apolar (G) en BEE1 y BEE3 (**Figura 50b**). Por lo cual se decidió analizar si el residuo en la posición 18 era responsable de la débil unión de los dBHLH de BEE1 y BEE3 a la caja G-box en comparación con las otras proteínas analizadas. Para esto se mutagenizó el codón de BEE1 que codifica la glicina (GGG, G) para que codificase ácido glutámico (GAG, E), forma que hemos llamado dBHLH BEE1<sub>G-E</sub>. Asimismo se mutagenizó el codón de la dBHLH de BEE2 que codifica el E (GAA) para que codificase G (GGA), forma que hemos llamado dBHLH BEE2<sub>E-G</sub> (**Figura 51a**). Estas dBHLH mutadas fueron clonadas en el plásmidos pGEX-4T-1 y se produjeron las fusiones proteicas GST-dBHLH en el sistema TnT siguiendo el procedimiento comentado anteriormente (**Figura 48**).

(a)

xxxxxxxixixdiid

**BEE1** KEREVVHVRARRGQATDSASLAERVRGKINERLRCLQDMVPGCYKAMGMATMLDEIINYVQSLQNVQVEFLSMKLTAAASSFYDF  
**BEE3** KEREVVHVRARRGQATDSASLAERVRGKINERLRCLQDIVPGCYKTMGMATMLDEIINYVQSLQNVQVEFLSMKLTAAASSYDF  
**BEE2** QKPDYIHVRARRGEATDRISLAERARREKISKMMKCLQDIVPGCNKVTGKAGMLDEIINYVQSLQQQVEFLSMKLSVINPELEC  
**BIM1** ADVRGSPNDQKLNTPRSKASATQRRRSKINDRFQMLRQLIPNSDQKRDKASFLLVIEYIQFLQEKADKYVTSYQGWNHPEPAK  
**PIF1** KQARVSTTSTKRSRAAEVNLSEKRRDRINERMKALQELIPRCNKSD-KASMLDEAIEYMKSLQLQIQMMSMGCGMPPMYPG  
**PIF4** NKSNGRSGSNRRSRAAEVNLSEKRRDRINERMKALQELIPHCCKTD-KASILDEAIDYKSLQLQLQVMMWMSGMAAAAASA  
**PIF3** AGPSRTGLGSKRSRAAEVNLSEKRRDRINEKMRALQELIPCNKVD-KASMLDEAIEYKSLQLQVQIMSMASGYLPPAVM

(b)

dBHLH	Residuos tipo d			
	Posición 4	Posición 8	Posición 18	Unión a sonda G-box
<b>BEE1</b>	Q	S	G	Débil
<b>BEE3</b>	Q	S	G	Débil
<b>BEE2</b>	E	R	E	Fuerte
<b>BIM1</b>	T	K	S	Fuerte
<b>PIF1</b>	R	V	D	Fuerte
<b>PIF3</b>	R	V	D	Fuerte
<b>PIF4</b>	R	V	D	Fuerte

**Figura 50. Análisis de los residuos aminoacídicos del dBHLH de las proteínas BEE1, BEE2, BEE3, BIM1, PIF1, PIF3 y PIF4. (a)** Alineamiento de dominios BHLH de las proteínas BEE1, BEE2, BEE3, BIM1, PIF1, PIF3 y PIF4 (tal como se muestra en la **Figura 48**). En celeste se enmarca el dominio básico y en amarillo el dominio HLH. En rojo se destacan los residuos H-E-R, importantes para la unión de DNA. En verde se señalan el residuo que podría también estar implicado en la especificidad por unir a la caja G-box por parte de BEE2. Sobre el alineamiento se señalan las letras correspondiente a la clasificación que se hizo de cada residuo. **(b)** Residuo perteneciente a cada dBHLH en las tres posibles posiciones implicada en la unión diferencial a G-box. En amarillo se indican los residuos con naturaleza polar y en verde los apolares.

A continuación se llevó a cabo un ensayo EMSA comparando la unión de ambas GST-dBHLH mutadas (BEE1<sub>G-E</sub> y BEE2<sub>E-G</sub>) y las GST-dBHLH silvestres (usadas en experimentos antes descritos) a la sonda G-box (descrita en la **Figura 49**). Tal como se había visto con anterioridad, dBHLH-BEE1 (carril 3) y dBHLH-BEE2 (carril 4) unían la sonda con diferente intensidad (**Figura 51b**). Cuando se analizó la actividad de unión a la G-box de las formas mutadas, se observó que el complejo de unión a DNA de dBHLH-BEE1<sub>G-E</sub> parecía menos intenso (carril 7) que el formado por la proteína no mutada. Para la proteína dBHLH-BEE2<sub>E-G</sub> (carril 8) se vio que la banda correspondiente al complejo de unión era más intensa que lo visto para la proteína silvestre (carril 4). Estos resultados indicaron que el residuo en la posición 18 afectaba

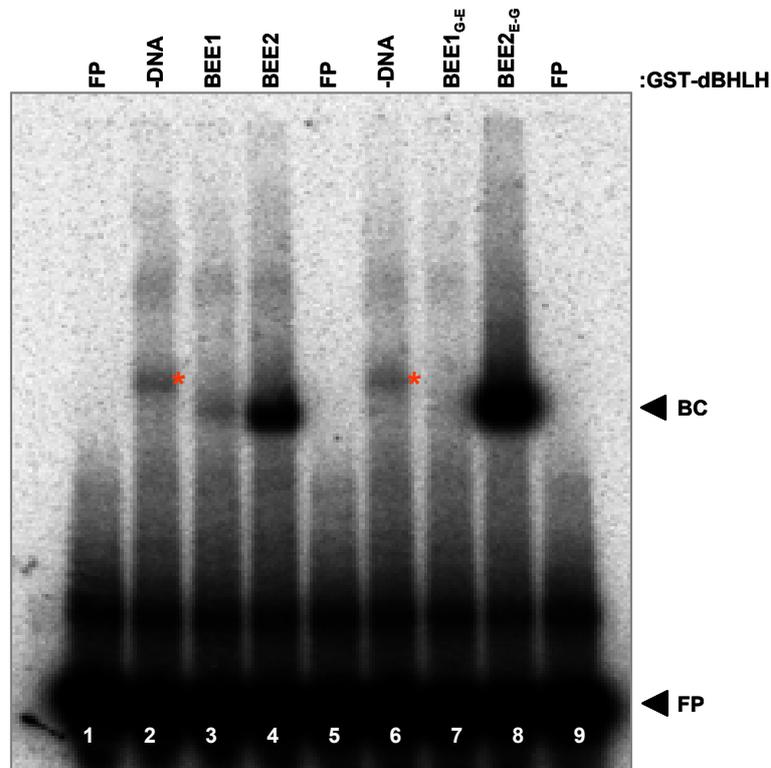
aparentemente era importante para la unión de los dBHLH de BEE1 y BEE3 a la caja G-box. Además, sugerían bien que otro u otros residuos eran responsables de que la unión entre dBHLH-BEE1 y G-box fuese débil, o que quizás BEE1 tiene preferencia por otro motivo de unión al DNA.

(a)

**Dominio BHLH silvestre**  
**BEE1** KEREVVHVRARRGQATDSISLARVRRGKINERLRCLQDMVPGCYKAMGMATMLDEIINYVQSLQNOVEFLSMKLTAASSFYDF  
**BEE2** QKPDYIHVRARRGEATDRISLARARRGKISKKMKCLQDIVPGCNKVTGKAGMLDEIINYVQSLQQQVEFLSMKLSVINPELEC

**Dominio BHLH mutado**  
**BEE1** KEREVVHVRARRGQATDSISLARVRRGKINERLRCLQDMVPGCYKAMGMATMLDEIINYVQSLQNOVEFLSMKLTAASSFYDF  
**BEE2** QKPDYIHVRARRGEATDRISLARARRGKISKKMKCLQDIVPGCNKVTGKAGMLDEIINYVQSLQQQVEFLSMKLSVINPELEC

(b)



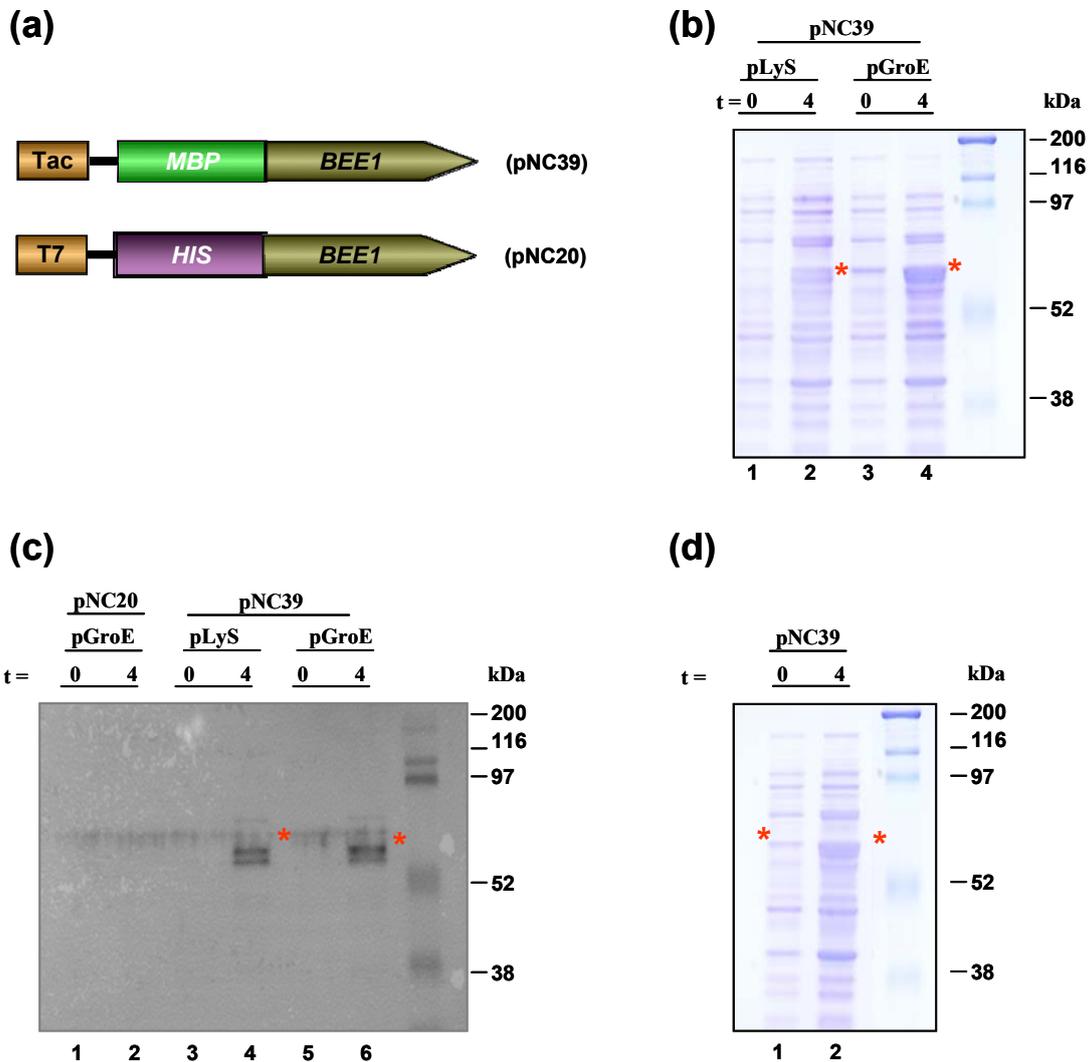
**Figura 51. Ensayos de unión de dBHLHs mutagenizadas y la caja G-box.** (a) Secuencia del dominio básico silvestre y mutagenizado de los dBHLHs de BEE1 y BEE2 usados en b. (b) EMSA entre las proteínas GST-dBHLHs silvestres (BEE1 y BEE2) y mutadas de (BEE1<sub>G-E</sub> y BEE2<sub>E-G</sub>). La flecha superior indica el complejo GST-dBHLH/G-box (BC, binding complex); la flecha inferior indica la sonda libre (FP, free probe). El asterisco indica un complejo de unión inespecífico.

#### 1.4. Identificación de los sitios de de la unión de BEE1 a DNA.

Con el fin de identificar la secuencia específica de DNA a la cual se une BEE1, se realizaron análisis *in vitro* de unión de BEE1 a DNA en colaboración con la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (<http://www.cnb.csic.es/~genomica/>, CSIC-UAM, Madrid), dirigido por el Prof. Roberto Solano. La técnica que empleamos se conoce como PMB (del inglés Protein-Binding Microarray) y consiste en un array que contiene diferentes combinaciones de secuencia de doble hebra de 11-mer y de menor tamaño (6 – 8 mers) que podrían contener secuencias o sitios de unión de factores de transcripción. Sobre este array se hibrida la proteína de interés producida en *E. coli* como fusión a la proteína MBP (del inglés Maltose Binding Protein), que se une con diferente afinidad a las secuencias contenidas en los oligos de doble hebra que reconoce. El complejo DNA-Proteína se detecta inmunológicamente con un anticuerpo primario anti-MBP y uno secundario conjugado con un fluoróforo Cy3. Después de esto se escanea el array a una determinada longitud de onda, permitiendo ver señales de diferentes intensidades, que son normalizadas y luego procesadas para graficarlas. Dichas intensidades son proporcionales a la fuerza de unión Proteína/DNA.

##### 1.4.1. Producción de proteína de fusión MBP-BEE1.

Para llevar a cabo en análisis *in vitro* descrito anteriormente, primero había que obtener la proteína de fusión MBP-BEE1. Para ello se clonó el ORF completo de *BEE1* en el plásmido pMALc2x en el mismo marco de lectura del gen *MBP*, generándose el plásmido pNC39 (**Figura 52a**). En este plásmido de expresión en *E. coli*, el gen *MBP-BEE1* se encuentra bajo el control de un promotor *tac*, que se induce químicamente por la aplicación al medio de cultivo de IPTG (**Figura 52a**). Obtenida la construcción se realizó la producción de la proteína fusión a baja escala en *E. coli* (**ver Materiales y Métodos**). Se transformó la construcción pNC39 en las cepas pGroE y pLyS, empleadas habitualmente para la producción de proteínas recombinantes, con el fin de ver



**Figura 52. Obtención de la proteína fusión MBP-BEE1 en bacteria a utilizar en los ensayos *in vitro* de unión de Proteína/DNA.** (a) Esquema de la construcción generada para la producción en bacteria de la proteína MBP1-BEE1. La construcción se obtuvo clonando en el mismo marco de lectura que la MBP el gen BEE1 completo en el plásmido pMALc2x. pNC20 corresponde a una construcción hecha para producir en bacteria la proteína His-BEE1, usada como control en d. (b) Tinción Coomassie de extractos proteicos sometidos a electroforesis desnaturalizante en un gel SDS-12%PAGE. Los extractos contienen la proteína de fusión MBP-BEE1 producida en las cepas bacterianas pLyS (carriles 1 y 2) y pGroE (carriles 3 y 4) y transformadas con la construcción pNC39. La proteína de fusión se indujo tras la adición de 1mM IPTG. Se llevaron a cabo extractos de cultivos a pequeña (líneas 3-6). El asterisco indica la posición de una banda que correspondería a la proteína MBP-BEE1 ( $\approx 72$  kDa) y que aparece en las muestras tratadas durante 4 h con IPTG. (c) Análisis por western-blot de las muestras producidas a pequeña escala comentadas en a (carril 3-6) y de una muestra de la control de la proteína BEE1 fusionada al tag His (carril 1 y 2). La proteína fusión MBP-BEE1 fue detectada usando un anticuerpo primario anti-MalE-RPS2X (1/500) y un secundario anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a la HRP (1/1000). (d) Tinción Coomassie en las mismas condiciones que en b, de los extractos producidos en las cepas bacterianas pGroE a gran escala. El asterisco indica la posición de una banda que correspondería a la proteína MBP-BEE1 ( $\approx 72$  kDa) y que aparece en la muestra tratada durante 4 h con IPTG.

en cuál de las dos era más eficiente la síntesis de la proteína MBP-BEE1. Se tomaron muestras de 1 mL a las 0 y 4 h de la aplicación de IPTG (T0 y T4, respectivamente) de ambas cepas. Los extractos proteicos obtenidos (proteína total) se separaron en electroforesis desnaturizante y las proteínas se tiñeron mediante azul de Coomassie. Como se observa en la **Figura 52b**, la tinción era más fuerte en las muestras T4 que las T0 (carriles 1-2 y 3-4), indicando una mayor cantidad de proteína total en los extractos inducidos durante 4 h con IPTG. Además, en las muestras T4 se observaba una banda extra entre los marcadores de 52 y 97 kDa, que podría corresponder a la proteína MBP-BEE1 (peso molecular estimado de ~72kDa). Al comparar la eficiencia de síntesis entre ambas cepas, se vio que había más cantidad de proteínas en los extractos obtenidos de la cepa pGroE (carriles 2 y 4, **Figura 52b**).

Para corroborar que la banda intensa inducida en los extractos T4 era la proteína de fusión MBP-BEE1, se analizó por western-blot los extractos producidos utilizando anticuerpo anti-MalE-RPS2x, que reconoce la MBP (Fernandez-Calvino et al., 2010). En paralelo se produjo a baja escala la proteína His-BEE1 (pNC20, **Figura 52a**), que se usó de control negativo para este experimento (carril 1 y 2, **Figura 52c**). En las muestras T4 de los extractos pNC39 producidos en pLyS y pGroE (carril 4 y 6) se detectó bandas de ~72 kDa, que estaban ausentes en la muestra T4 del extracto pNC20 (carril 2, **Figura 52c**). Todo esto indicó que la proteína se produjo exitosamente. Con este resultado se decidió producir MBP-BEE1 a gran escala (**ver Materiales y Métodos**) con la cepa pGroE inducida durante 4 h con IPTG. Una alícuota de del cultivo bacteriano a T0 y T4 de inducción confirmó la producción de la proteína de interés (**Figura 52d**, carril 2). El pellet obtenido de alrededor de unos 200 mL de cultivo fue congelado y preparado para el análisis *in vitro*.

#### **1.4.2. Análisis *in vitro* de especificidad de unión de BEE1 a diferentes motivos de DNA.**

Los pellet bacterianos congelados se enviaron la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología, donde se extrajo/purificó la proteína MBP-BEE1 y se usó para hibridar el PBM. Por medio de esta técnica se puede

identificar las secuencias de DNA a la cual se podría unir la proteína MBP-BEE1 *in vitro*. El análisis informático de los resultados mostró que BEE1 tenía una preferencia de unión por la secuencia que contenía una G-box al tener los valores de E-score más altos, dado que este valor es un índice de enriquecimiento de la secuencia determinada, que da una idea de la proteína por ese motivo de DNA (**Figura 53c**).

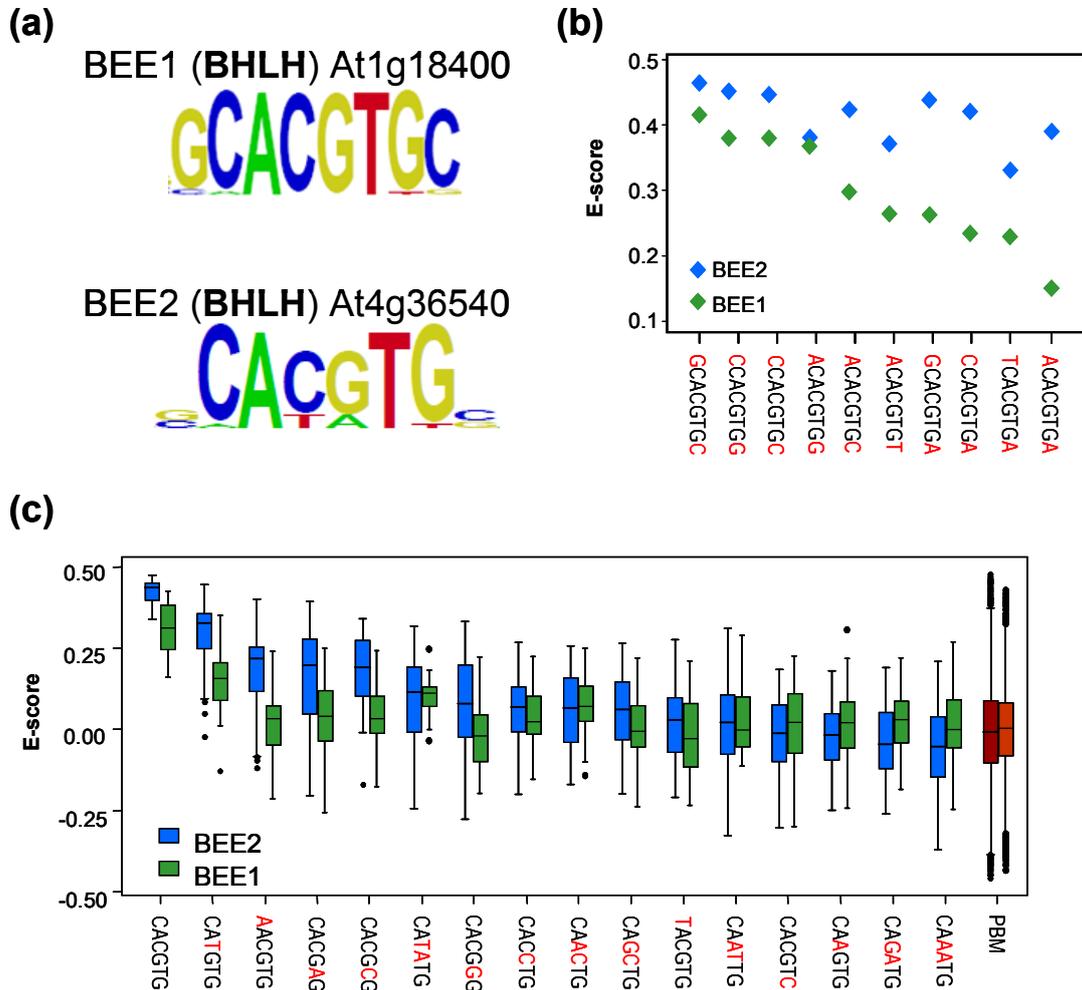
Cuando se analizó si había una variación de la la unión por la G-box dependiendo se los nucleótidos adyacentes a esta secuencia, se vio que esta sí se veía influida por los nucleótidos que flanquean la G-box, encontrándose los valores más altos de E-score en la caja con una una G en posición 5' y una C en 3' (**Figura 53b**). El análisis de estos resultados *in vitro* y procesados *in silico*, mostraron que la putativa secuencia de DNA a la cual se podría unir mejor BEE1 sería **GCACGTGC** (**Figura 53a**).

### **1.5. Comparación de los sitios de unión de BEE1 y BEE2 al DNA.**

Previamente habíamos visto por ensayos EMSA que BEE2 se une a la caja G-box y (**Figura 49b**). Como parte del proyecto de colaboración con el grupo de Roberto Solano, tuvimos acceso a los datos del experimento PMB con la proteína MBP-BEE2 para identificar la putativa secuencia de DNA a la cual se podría unir mejor BEE2. Los resultado proporcionados para BEE2, al igual que para BEE1, mostraban que los mejores valores de E-score correspondían a los obtenidos con la unión de la proteína a las sonda que contenían G-box (**Figura 53c**). Cuando se analizó si la unión de BEE2 a G-box variaba dependiendo de los nucleótidos vecinos, se vio que si bien los valores de E-score no eran iguales en todos los casos tampoco había una gran variación (**Figura 53b**), llegándose a generar por estos datos analizados una secuencia consenso de G-box a la cual se une BEE2 donde los nucleótidos adyancetes no son importantes (**Figura 53a**).

Los resultados de la identificación de las mejores secuencia de unión de BEE1 a DNA *in vitro* mostraron esta unión es más restrictiva ya que es dependiente de los residuos situados en los extremos de motivo analizado. La secuencia reconocida con mayor afinidad por BEE1 fue el **GCACGTGC**, al cual

nosotros denominamos G-box+. Por el contrario BEE2 mostraba una alta afinidad por la G-box independientemente de las secuencias que la flanqueaban.



**Figura 53. Identificación de los motivos de unión a DNA de BEE1 y BEE2 en ensayos *in vitro* de unión de Proteína/DNA. (a)** Representación de la composición nucleotídica (Position weight matrix) de la mejor sonda de 8-nucleótidos que se uniría a BEE1 y BEE2. **(b)** Representación gráfica de la puntuación de enriquecimiento (E-score) para las proteínas analizadas de todas las posibles sondas de 8-mer que contenían una caja G-box. **(c)** Representación de diagrama de cajas de la puntuación de enriquecimiento (E-score) para ambas proteínas de secuencias de 6-mer analizadas *in silico*. La caja corresponde a una representación gráfica del conjunto de datos basados en cuartiles, siendo la parte inferior de la caja el cuartiles Q1, la parte superior de la caja el Q3 y la línea negra representa la mediana de la distribución correspondiente al cuartil Q2. Las líneas que se extienden desde la caja los límites superior e inferior dentro de los valores no atípicos y los puntos indican los valores atípicos de la distribución.

## 1.6. Ensayos de unión de dBHLH de BEE1 y BEE2 a la G-box y G-box+.

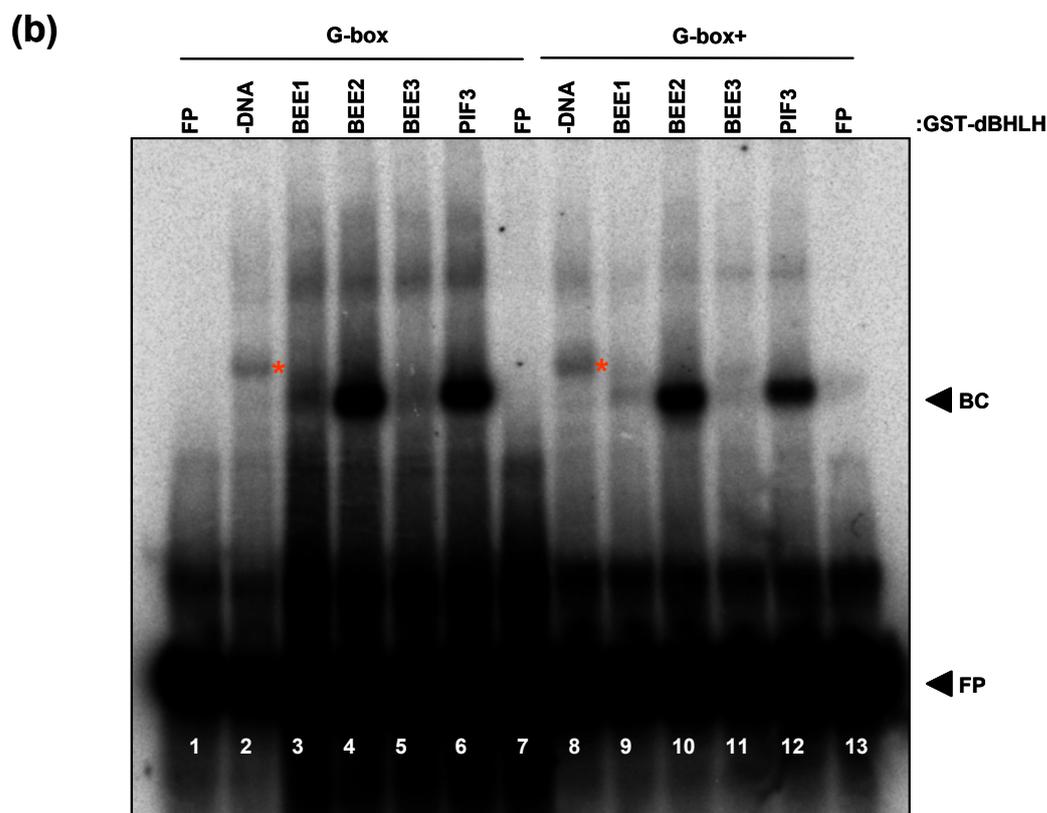
Para probar los resultados de la identificación de la mejor secuencia de unión de BEE1 y BEE2 a DNA en nuestras condiciones *in vitro* se generó una sonda que contenía la G-box+ para realizar ensayos EMSAs, comparándolos con reacciones que contenían la sonda con la G-box (**Figura 54a**). Se usaron los dBHLH de BEE1 y BEE2, y se incluyó el dBHLH de BEE3, que según análisis filogenéticos está muy relacionado con BEE1, por lo cual se esperaba que se comportase con BEE1. Además se incluyeron los controles de dBHLH de PIF3, -DNA y FP. Estos extractos de proteínas se habían usado en experimentos previos (**Figura 48**). Como ya habíamos visto con anterioridad (**Figura 49**), dBHLH de BEE2 y PIF3 unen fuertemente la sonda G-box (carriles 4 y 6, **Figura R54b**), mientras que los dBHLH de BEE1 y BEE3 se unen débilmente (carriles 3 y 5). Las mismas muestras y condiciones se ensayaron utilizando la sonda con G-box+ y, como se observa en la **Figura 54b**, el patrón de unión de las proteínas con esta sonda es similar al visto con la sonda con la G-box, es decir se ve unión intensa con los dBHLH de BEE2 y PIF3 (carril 10 y 13) y unión de baja intensidad (se visualiza una sombra) con los dBHLH de BEE1 y BEE3 (carril 9 y 12). Estos datos nos mostraron que el patrón de unión observado de las diferentes proteínas no varía en gran manera entre las dos sondas usadas.

Este ensayo fue hecho con la finalidad de probar los resultados de la identificación de la mejor secuencia de unión de BEE1 y BEE2 a DNA. Si bien para BEE2 se pudo comprobar el resultado del PMB, esto no fue posible para BEE1. Quizás una explicación es que el análisis del array fue realizado con la proteína completa mientras que los ensayos EMSAS se hicieron con el dBHLH, pudiendo haber otros residuos fuera del dBHLH involucrados en la unión de BEE1 a G-box+.

(a)

**G-box:**  
 ggCCGAGGTGAGTAGGACACGTGGACACGTCTTCCGAA--  
 --GGCTCCACTCATCCTGTGCACCTGTGCAGAAGGCTTgg

**G-box+:**  
 ggCCGAGGTGAGTAGGGCACGTGCACACGTCTTCCGAA--  
 --GGCTCCACTCATCCCGTGCACGTGTGCAGAAGGCTTgg

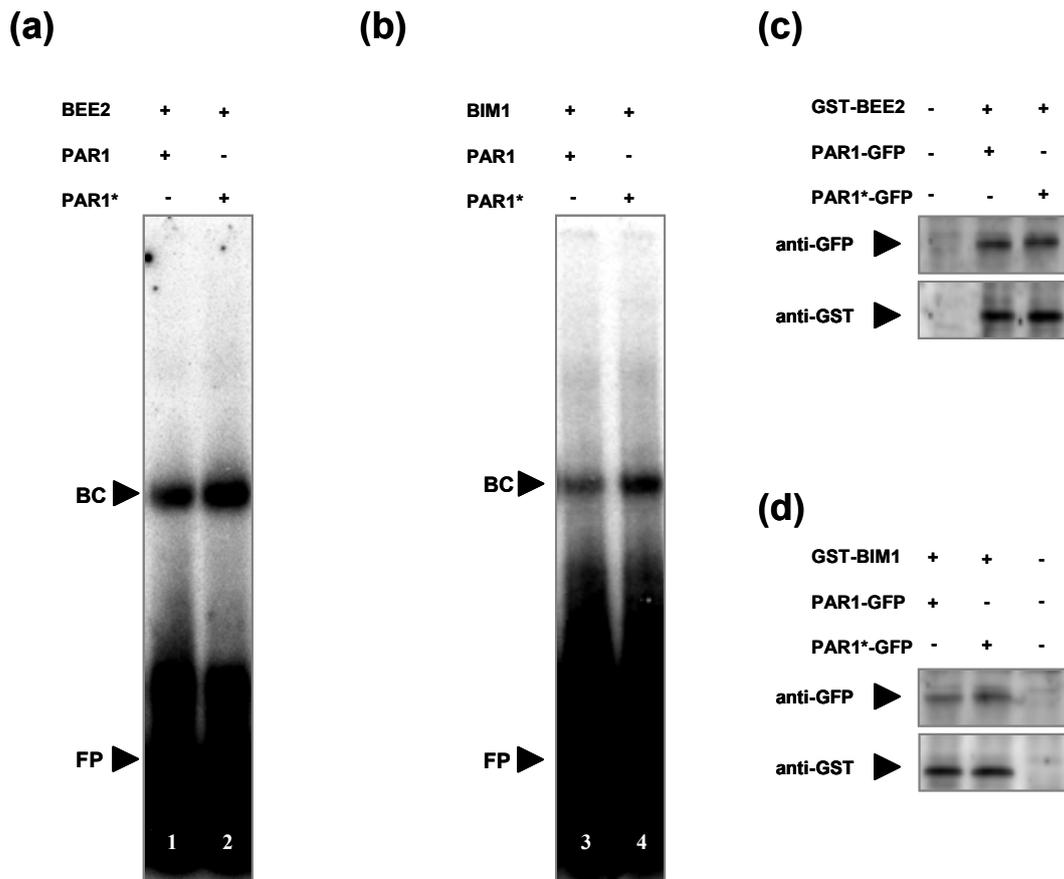


**Figura 54. Ensayos de unión de las proteínas de fusión GST-dBHL a las cajas G-box y G-box+.** (a) Secuencias de las sondas nucleotídicas que contienen la G-box y G-box+. Las cajas G-box y Gbox+ se resaltan en azul. (b) EMSA de las proteínas de fusión GST-dBHLH y la caja G-box (Carriles 1-7) y EMSA de las proteínas de fusión GST-dBHLH y la caja G-box+ (Carriles 8-13). La flecha superior indica el complejo GST-dBHLH/G-box (BC, binding complex); la flecha inferior indica la sonda libre (FP, free probe). El asterisco indica un complejo de unión inespecífico.

### 1.7. Ensayos de unión de dBHLH de BEE2 y BIM1 a la G-box en presencia de PAR1 y PAR1<sub>L66</sub>.

Como se comentó en el capítulo 2 de este trabajo, PAR1 sería un cofactor transcripcional. Una forma de ejercer su función sería heterodimerizando con otras BHLHs, de igual manera que ha sido publicado para HFR1 con PIF4 y PIF5 (Hornitschek et al., 2009). Para analizar si PAR1 podría interferir con la unión a DNA, se escogieron los dBHLH de BEE2 y BIM1 por el complejo intenso Proteína/DNA que formaban (**Figura 49b**), para ensayar la supuesta inhibición por parte de PAR1. Con esta información, PAR1-GFP y el GST-dBHLH respectivo de cada proteína fueron co-producidos *in vitro* por reacción de TnT y usados en ensayos de EMSA. Paralelo a esto se realizó la co-producción de los dBHLH con la versión de PAR1 mutada en la leucina 66 (PAR1<sub>L66</sub>-GFP), publicada como una forma incapaz de dimerizar (Carretero-Paulet et al., 2010). Los ensayos EMSAs mostraron que, en presencia de PAR1, el complejo de unión dBHLH/DNA es menos intenso al compararlos con lo observado en las reacciones con PAR1<sub>L66</sub>. Esto sugeriría que PAR1 inhibe la capacidad de unir DNA de BEE2 y BIM1 (**Figura 55a y b**). Para confirmar que lo observado no estaba dado por una producción diferencial de las proteínas, se hizo un análisis de western-blot. Similar producción de proteínas fue verificada por este ensayo (**Figura 55c y d**).

Estos experimentos confirmaron que PAR1 siendo un cofactor transcripcional inhibe la unión a DNA de BEE2 y BIM1 por formación de heterodímeros que no son capaces de unir DNA. Este posiblemente podría ser el mecanismo de acción por el cual se regula la expresión de genes regulados por sombra que contienen G-box, como *PIL1*, *YUC9* y *XTR* entre otros.



**Figura 55. PAR1 previene la unión de BEE2 y BIM1 a la secuencia de G-box. (a y b)** Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) fueron hecho usando proteínas transcritas y traducidas in vitro, y sonda de la G-box marcada radiactivamente con  $^{32}P$ . Ensayos usando la proteína GST-dBHLH (BEE2 y BIM1) con PAR1-GFP o PAR1<sub>Leu66</sub>-GFP, muestran una disminución de intensidad del complejo dBHLH/DNA en presencia de PAR1 (Carriles 1 y 3) al compararlos cuando hay PAR1<sub>Leu66</sub> (carriles 2 y 4). La flecha superior indica el complejo GST-dBHLH/G-box (BC, binding complex); la flecha inferior indica la sonda libre (FP, free probe). PAR1\* = PAR1<sub>Leu66</sub>-GFP. **(c y d)** Análisis por western-blot de las muestras producidas por el sistema TnT, usadas en a y b respectivamente. Las proteínas fusión GST-dBHLH fueron detectada usando un anticuerpo primario anti-GST (1/2500) y las proteínas PAR1-GFP y PAR1<sub>Leu66</sub>-GFP detectadas con anticuerpo primario anti-GFP (1/2500). En todos los casos se usó un secundario anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a la HRP (1/5000).



## **4. DISCUSSION.**

---



## **Discusión**

La proximidad vegetal se detecta como una señal de luz caracterizada por la baja razón R:FR. Esta señal, captada por los fitocromos, desencadena la puesta en marcha de mecanismos de transducción que tienen como finalidad generar una respuesta a la alta densidad vegetal, que en su conjunto es conocido como síndrome de huida a la sombra (SAS). En el caso de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*, dentro de las respuestas fisiológicas visibles del SAS está la elongación del hipocotilo. Dicho carácter también responde a las hormonas auxinas y giberelinas, con lo cual se podría interpretar que vías del SAS y hormonales están interaccionando para permitir una respuesta común. En este trabajo nos enfocamos en el análisis de la interconexión entre rutas transcripcionales hormonales y del síndrome de huida de la sombra.

### **4.1. La sensibilidad y niveles de hormonas en plántulas cambian tras la percepción de la proximidad vegetal.**

Si bien hoy en día se han identificado nuevos componentes involucrados en el SAS, se desconoce los mecanismos mediante los cuales se producen cambios fisiológicos como es la elongación del hipocotilo. En este trabajo se vio como la exposición a sombra simulada alteraba parcialmente la sensibilidad de la plántula a giberelinas (**Figura 11**). Por otro lado, en experimentos utilizando líneas mutantes con niveles de expresión altos o bajos de *PAR1* y *HFR1*, se observó que los factores *PAR1* y *HFR1* reducían con diferente intensidad la sensibilidad de las plántulas a GAs (**Figuras 12 y 14**), *PAR1* afectando más fuertemente que *HFR1*. Puesto que tanto los niveles de *PAR1* como *HFR1* se incrementan rápidamente tras la exposición a W+FR, postulamos que este mecanismo contribuiría al cambio en la sensibilidad a GAs modulado por sombra simulada observado en las plántulas silvestres. Datos no publicados del laboratorio muestran que estos factores también alteran la sensibilidad de las plántulas a auxinas o BRs (Galstyan, 2011).

Otros componentes reguladores del SAS, como *PIF3* y *PIF4*, también han mostrado modular la sensibilidad de las plántulas a giberelinas (de Lucas

et al., 2008; Feng et al., 2008). Datos más recientes indican que otros PIFs, como PIF4 y PIF5, también alteran la sensibilidad a auxinas (Hornitschek et al., 2012; Nozue et al., 2011). Análisis de mutantes en otros genes *PAR*, como *HAT2*, *HAT3* y *ATHB4*, también ha mostrado que estos factores modulan la sensibilidad a varias hormonas, incluyendo las GAs (Sawa et al., 2002; Sorin et al., 2009). En conjunto, estos resultados indican que tras la percepción de sombra simulada por los fitocromos, el rápido reajuste en los niveles celulares de los componentes de la red transcripcional implicada resulta en cambios en la sensibilidad (y por tanto en la respuesta) de la planta a varias hormonas implicadas en la modulación del alargamiento y crecimiento, entre las cuales se encuentran las GAs.

Adicional a lo anterior, datos no publicados de nuestro grupo han mostrado que la percepción de sombra simulada no solo afecta a la sensibilidad hormonal (**Figura 11**) sino también a los niveles de hormonas bioactivas, como GA4, IAA y CS (castasterona), involucradas en la elongación del hipocotilo. Tras 1-4 h de tratamiento de sombra simulada hay un aumento transitorio de los niveles de IAA a la par de una inducción de genes de biosíntesis de giberelinas. A las 24 h de tratamiento se detecta un aumento en la concentración de GA4, la giberelinas bioactiva más abundante en *Arabidopsis*, mientras que los niveles de IAA son similares a las de las plantas controles (Galstyan, 2011; Tao et al., 2008). Previamente se ha visto que la aplicación exógena de auxinas, como NAA, induce la expresión de genes de biosíntesis de giberelinas, como *GA20ox1* y *GA20ox2*, entre otros. Esto llevó a sugerir que cambios en el metabolismo (y niveles) de giberelinas podrían mediar parcialmente la acción de las auxinas durante el desarrollo (Frigerio et al., 2006). Esta información nos llevó a considerar la posibilidad de que también los niveles de estas hormonas podrían regularse entre sí en la puesta en marcha del SAS, de forma que los cambios rápidos y transitorios en los niveles de IAA inducidos por sombra simulada pueden ser importantes para el incremento más tardío de los niveles de GA4.

Experimentos hechos en mutantes de auxinas (*sav3-5* y *axr1-12*) mostraron que la inducción de genes de la biosíntesis de giberelinas estaba reducida en comparación a la línea control Col-0 a 1 y 24 h de tratamientos de sombra (**Figura 19**), lo cual es consistente con la idea de que las auxinas

regulan a las giberelinas, y posiblemente la elongación del hipocotilo es consecuencia de esto. Los experimentos hechos con la línea marcadora GFP-RGA en el fondo silvestre SAV3 y mutante *sav3-5* (**Figura 20**) también parecían apoyar esta posibilidad. Así en experimentos de sombra simulada, la proteína GFP-RGA no se degradaba totalmente en el fondo *sav3*, en comparación con la práctica desaparición observada en la línea control GFP-RGA/SAV3. Esta menor degradación de GFP-RGA se interpretó como causado por unos menores niveles de giberelinas, consecuencia de la disrupción de la biosíntesis de auxinas en el fondo mutante *sav3-5*. A pesar de esto, parece ser que la elongación del hipocotilo no es consecuencia única del control de auxinas sobre giberelinas, ya que el mutante *sav3-5* no logró recuperar el fenotipo silvestre al aplicarle giberelinas exógenas (**Figura 18**). Esto sugiere que posiblemente existen otras rutas que regulan las auxinas, independiente de GAs, implicada también en la elongación del hipocotilo. Pero además habría que recalcar que posiblemente hay otras regulaciones independientes de auxinas. Lo sugerido puede basarse en que en condiciones de luz W dependiente de auxinas puede ir o no vía giberelinas (Curaba et al., 2004; Chapman et al., 2012).

Experimentos moleculares en las líneas *sav3-5* y *axr1-12* similares a los realizados por Frigerio (Frigerio et al., 2006), en donde se analice la expresión de genes de la biosíntesis de giberelinas en respuesta a la aplicación de auxinas exógenas, podrían mostrar dicha expresión es dependiente de la sensibilidad auxinas. Esta sugerencia es basada en que se esperaría que la aplicación de auxinas activas (NAA) desencadenara aumentase los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de giberelinas en comparación a muestras no tratadas. Por último, la cuantificación de los niveles de giberelinas activas (GA4) en mutantes como *sav3-5* o *axr1-12* en plántulas crecidas 24 h en sombra simulada podría ayudarnos a confirmar esta hipótesis de la regulación de giberelinas por parte de las auxinas en respuesta a sombra simulada.

## **4.2. PAR1 actúa como Cofactor Transcripcional.**

La base molecular de cómo se promueven los cambios en la sensibilidad y niveles hormonales en respuesta a proximidad vegetal es escasa. Los resultados obtenidos en este trabajo sobre la caracterización y funcionamiento de PAR1 y sus interactores (llamados genéricamente factores POF) podrían dar noción del mecanismo molecular por el cual factores reguladores del SAS regulan la respuesta hormonal. En ese sentido es importante resaltar que muchos de estos interactores de PAR1, como los BEEs y BIMs (**Figuras 39, 40, 41 y 42**), se han identificado previamente como componentes de señalización de las hormonas BRs (Friedrichsen et al., 2002; Yin et al., 2005). Datos no publicados del laboratorio empleando plantas deficientes en estos factores indican que no sólo los mutantes *bee123* y *bim123* muestran una sensibilidad alterada a BRs, tal como se había descrito, sino que también a auxinas (Galstyan, 2011) y a GAs (**Figura 13**).

La identificación de que PIF4, PIF5 y PIF7, reguladores positivos del SAS, modulan también directamente la expresión de genes relacionados con auxinas, da una posible idea de cómo podría estar dada esta conexión (Hornitschek et al., 2012). HFR1, que interacciona con PIF4 y PIF5, impide que se unan a los promotores de sus genes dianas, algunos de ellos implicados con diferentes aspectos de la acción de las auxinas, como por ejemplo *IAA29* y *YUC8* (Hornitschek et al., 2012; Hornitschek et al., 2009). Tal y como veremos, un mecanismo similar parecería también ser empleado por PAR1.

PAR1 y PAR2, codificados por genes homólogos, difieren de las BHLHs clásicas por su tamaño pequeño (118 aa) y por tener un dominio ácido que sustituye al básico. Inicialmente, con el análisis de la estructura primaria de PAR1 y PAR2 se propuso que podrían unirse a otro tipo de secuencias de DNA E-box o que no se unen a DNA, actuando como cofactores transcripcionales (Fairchild et al., 2000; Roig-Villanova et al., 2007; Wray et al., 2003).

Análisis de estructura-función de formas derivadas de PAR1 sobreexpresadas en *Arabidopsis* han mostrado que la actividad biológica de este factor se debería exclusivamente a la capacidad de interactuar a través de su dominio HLH quizás consigo misma u otras proteínas con dominio HLH (Galstyan et al., 2011). Estos resultados parecían descartar la opción de la

PAR1 se uniese a otros motivos de DNA, por lo cual la explicación de cómo este factor podría regular directamente la expresión génica sería que PAR1 podría regular la expresión génica interaccionando con factores de transcripción mediante la interacción entre los dominios HLH (**Figura 21**).

En este trabajo nosotros fusionamos PAR1 al dominio activador de la transcripción de VP16 (VP16-AD) con el fin de ver si PAR1 unía o no DNA y actuaba como un cofactor de la transcripción. Al comparar el efecto de la sobreexpresión en plantas de fusiones derivadas de *PAR1* (como PAR1-GUS-GFP, 35S:PAR1-GG; *PAR1-VP16*, 35S:PAR1-V; y *PAR1-VP16-GR*, 35S:PAR1-VG), se vio que a nivel fisiológico (plantas enanas) y respuesta a sombra no habían cambios (**Figuras 24 y 26**), incluyendo también la capacidad de reprimir sus genes diana directos *SAUR15* y *SAUR68* (**Figura 25**). Debido que en presencia de un dominio de activación transcripcional tal como VP16-AD en fusiones transcripcionales de PAR1 no causa un fenotipo molecular y fisiológico diferente, se llegó a la conclusión que estas proteínas regularían la transcripción de genes sin unirse a DNA. Por lo tanto PAR1 probablemente es un cofactor transcripcional, como también ha sido descrito para HFR1 (Galstyan et al., 2011; Hornitschek et al., 2009), característica que se ha descrito también en factores transcripcionales de animales los cuales modulan la expresión génica sin unión a ADN (Norton, 2000; Ruzinova and Benezra, 2003).

#### ***4.3. Identificación de nuevos componentes del SAS que interaccionan con PAR.***

Como es sabido PAR1 es un regulador negativo del SAS, el cual, al igual que HFR1, actuaría como cofactor transcripcional (Galstyan et al., 2011; Hornitschek et al., 2009). Estas características llevan a postular que en su actividad como cofactores estaría involucrada su interacción con otras BHLHs impidiendo que se unan a los promotores de sus genes dianas, regulando de esa manera la actividad transcripcional. En el caso de HFR1 ya se ha visto que al interaccionar con las BHLH PIF4/PIF5 hay un cambio en la expresión génica de los genes marcadores *PIL1* y *XTR7* (Hornitschek et al., 2009). La reciente

demostración de que PAR1 interacciona con PIF4 da cuenta de la posibilidad de que la actividad como cofactor radica en la interacción con otras BHLH impidiendo su unión a DNA (Hao et al., 2012).

Así pues la identificación de otras BHLHs, como PIF4, que interaccionen con PAR1 permitiría poder dar más información y definir mejor la red regulatoria del SAS. Usando PAR1 como cebo en un cribado de Y2H se identificaron decenas de BHLHs que interaccionaban con este factor. Muchas de las proteínas identificadas pertenecían al grupo XII, formado por 16 factores, de los cuales 12 se identificaron como POFs y alguno de ellos descritos que su expresión estaba regulada por luz. Por esta razón nos centramos en el análisis de la función de este subgrupo de interactores de PAR1.

El análisis de los sitios de inserción de mutantes simples de la colección SALK de *Arabidopsis*, mostró que habían líneas con inserciones en regiones no codificantes (URTs) así como en la región codificante, donde estaba presente el dBHLH importante para el funcionamiento de estos factores según lo descrito (Heim et al., 2003). Esta observación sugeriría que posiblemente las líneas con la inserción en el dBHLH podrían tener afectado su actividad. Los resultado de expresión de algunas de estas líneas, mostraron que las que tenían la inserción en el dBHLH tenían anulada la expresión en casi todos los casos. Para líneas que presentaban inserciones en otros sitios, también se vieron ejemplos de expresión afectada. Indicando que independiente de donde estaba la inserción podía verse un efecto. Además quizás las líneas con expresión anulada podrían tener afectado su funcionamiento. Sin embargo cuando se realizaron experimentos de sombra simulada en los simples mutantes, la respuesta no parecía verse muy afectadas (**Figuras 33, 34, 35 y 36**). Estos resultados sugieren que estos genes no tendrían rol en el SAS o sería mínimo, o actuarían en otros estadios de desarrollo. Se sabe por perfiles transcriptómicos que la BHLH48 (Mandaokar et al., 2006) podría estar implicada en el desarrollo del estamen y que la BHLH75 es un regulador positivo de la biosíntesis de brasinosteroides (Poppenberger et al., 2011). Además otras de las BHLH encontradas en el cribado, y confirmadas por nuestro ensayos de Y2H y BiFC (**Figuras 39, 40, 41 y 42**), como son los factores BEEs (BEE1, BEE2 y BEE3) y BIMs (BIM1, BIM2 y BIM3) han sido identificados como componentes de la señalizaciones de brasinosteroides (Friedrichsen et al., 2002; Yin et al., 2005).

Por lo tanto no sería raro que estos genes participen a otras vías regulatorias y al analizar su respuesta a sombra simulada no se vea un efecto claro a pesar de ser interactores de PAR1.

Cuando se analizó la respuesta a sombra simulada a en los triples mutantes *bee123* y *bim123* se vio que sus hipocotilos respondían menos que el control (**Figura 37**). Al realizar cruces entre las líneas estudiadas, si bien se observó un cierto fenotipo en algunos dobles mutantes (**Figura 38a**), estos no eran tan fuertes como los observados en los triples (**Figura 38b**). Una posible explicación es que la ausencia de fenotipos notorios se deba a la existencia de redundancia génica, hecho por el cual se conoció la participación en la señalización de brasinosteroides de los BEEs y BIMs. La redundancia génica se da cuando existen dos o más genes que llevan a cabo funciones similares, de forma que no hay cambios en el fenotipo aún cuando uno de los genes se encuentre afuncional, y también dan a entender quizás no es la función principal del gen, como se comento anteriormente. Este es el caso de varias parejas de genes como *PIF4* y *PIF5* (en la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada o cuando crecen en ciclos fotoperiodicos de día corto) (Lorrain et al., 2008; Nozue et al., 2007) y *ATHB4* y *HAT3* (en el desarrollo vegetal y la regulación del alargamiento del hipocotilo en respuesta a sombra simulada (Bou-Torrent et al., 2012; Sorin et al., 2009), entre otros. Estas observaciones sugieren que esta redundancia impone que, para detectar fenotipos, se requiera de la ausencia de más de dos componentes ya que los dobles mutantes tampoco mostraron una respuesta clara en la mayoría de los casos (**Figura 38b**). Este es el caso de proteínas codificadas por pequeñas familias multigénicas, como es el caso de los PIFs (codificados por al menos 7 genes) y DELLAs (5 genes) que se ha determinado por análisis en múltiples mutantes (Achard et al., 2007; Leivar et al., 2008; Leivar et al., 2012b).

Como se comentó previamente las líneas *bee123* y *bim123* mostraban una reducción de la elongación del hipocotilo en sombra (**Figura 37**). Esto definía a estos factores como reguladores positivos del SAS como es el caso de *PIF4* y *PIF5* (Lorrain et al., 2008). Además, de igual forma que *PIF4* y *PIF5* se mostraron como promotores del SAS al revertir el fenotipo constitutivo de sombra de *phyB-9* en el triple mutante *phyB;pif4;pif5* (Lorrain et al., 2008) , el

triple *bim13;phyB* y el cuádruple *bee123;phyB* también revierten parcialmente el fenotipo de *phyB* (**Figura 43**). Esto sugiere que dichos factores serían parte de la ruta de señalización de *phyB*, fitocromo definido como el más importante en la regulación del SAS (Devlin et al., 2003). Conjeturas similares se han hecho para *ATHB4* y *HAT3*, otros reguladores del SAS que también atenúan el fenotipo de hipocotilo largo del mutante *phyB* (Salla-Martret, 2012).

La identificación de nuevos componentes del SAS como los BEE y BIM puede ayudar a comprender mejor cómo interacciona toda esta red regulatoria. Los datos de respuesta fisiológica y molecular sugieren que estos factores son reguladores positivos del SAS, posiblemente regulados por PAR1 mediante la heterodimerización. Esto tendría un efecto a nivel de regulación de la transcripción, mecanismo similar al que se ha descrito que utiliza HFR1 sobre PIF4 y PIF5 (Hornitschek et al., 2012; Hornitschek et al., 2009), y de PAR1 que sobre PIF4 (Hao et al., 2012).

Un aspecto fundamental del mecanismo de acción de los componentes BEEs y BIMs es entender qué secuencias reguladoras une y qué genes regula. Por eso se caracterizó los sitios de unión a DNA mediante dos tipos de técnicas: EMSA y microarrays (PBM). Los factores BEE y BIM al igual que los PIFs, son proteínas que pertenecen a la familia BHLH. Basándonos en lo que se sabe acerca de las características de unión a DNA de las BHLH, se preveía que las proteínas BEE y BIM se unirían preferentemente a secuencias G-box (CACGTG) en los promotores de genes dianas para regular la expresión génica, tal como se ha confirmado para los PIFs (Heim et al., 2003; Hornitschek et al., 2012; Hornitschek et al., 2009; Leivar et al., 2012b; Li et al., 2012; Martinez-Garcia et al., 2000a; Toledo-Ortiz et al., 2003; Toledo-Ortiz et al., 2010). Datos previos (realizados mediante ensayos EMSA e inmunoprecipitación de cromatina CHIP) habían mostrado que BIM1 se unía específicamente a unas E-box presentes en el promotor del gene *SAUR15* (Yin, 2005). En el laboratorio previamente se intento, sin éxito, detectar mediante ensayos CHIP esta unión utilizando plantas transgénicas 35S:BIM1-GFP (Galstyan, 2011). Además en análisis de EMSA la unión de BIM1 a una sonda que contenía un E-box era muy débil y difícil de detectar (Bou-Torrent, datos sin publicar). Sin embargo, en este trabajo hemos demostrado que el dBHLH de BIM1 se unía fuertemente a secuencias G-box *in vitro* (**Figura 49b**).

A pesar de que hemos empleado una forma truncada de BIM1 (el dBHLH), datos publicados indican que tanto la proteína PIF3 entera como sólo su dBHLH correspondiente (igual al empleado en la **Figura 49b**) unían fuertemente al DNA en estos ensayos EMSA (Martinez-Garcia et al., 2000a). Estos resultados sugieren que probablemente la forma truncada dBHLH y la proteína entera de BIM1 se comporta en estos ensayos de manera parecida, al igual que se ha visto para PIF3. Una intensa banda correspondiente al complejo de unión Proteína/DNA se vio para el dBHLH de BEE2 (similar al de BIM1) pero no para los otros BEE (BEE1 y BEE3) (**Figura 49b**), sugiriendo que a pesar de que son parte de la misma familia quizás su estructura proteica requiere de otras secuencias de reconocimiento para la unión a DNA dentro o fuera del dBHLH. Al estudiar la composición aminoacídica del dBHLH se identificaron residuos diferentes entre los dBHLH de BEE1 y BEE2 que podrían ser responsables de la variación en la unión a la sonda que contenía la G-box (**Figura 50**). Ensayos EMSAS empleando versiones mutadas de estos dBHLH mostraron que este residuo afectaba la unión a DNA de ambos factores. Principalmente en el caso de BEE1 la mutación hizo más débil el complejo Proteína/DNA. Esto sugeriría que la glicina de la posición 18 del dBHLH de BEE1 es un residuo importante para su unión a DNA. Además, los resultados de los EMSAS con las versiones mutadas indicaban que las diferencias de unión observadas entre los BEEs no dependían sólo de ese aminoácido diferente. Por tanto, contrariamente a lo hipotetizado en base a su secuencia primaria sobre sus capacidades de unión al DNA, BEE1 tiene preferencia por otro tipo de E-box o un subtipo de secuencia G-box de más de 6 pares de bases (**Figuras 50 y 51**).

Ensayos *in vitro* usando la técnica PBM mostraron que BEE1 tiene una preferencia de unión a una variante de G-box, que hemos llamado G-box+, que está flanqueada por algunos nucleótidos específicos (**GCACGTGC**) (**Figura 53**). Empleando la misma técnica vimos que BEE2 mostró preferencia de unión por el motivo G-box, pero que las secuencias flanqueantes parecían tener poco efecto en este reconocimiento (**Figura 53**).

A pesar de la diferencia de preferencia de unión entre BEE1 y BEE2 detectadas, el motivo de este último factor está contenido dentro del de BEE1, por lo cual quizás tendrían genes dianas en común; esto sería consistente

con los fenotipos aditivos de múltiples mutantes en estos factores, de similar manera que PIF4 y PIF5 (Hornitschek et al., 2012; Lorrain et al., 2008; Lorrain et al., 2009; Nozue et al., 2007). También es posible que las diferencias de unión a DNA *in vitro* tengan menor relevancia *in vivo*. Por otro lado la secuencia variante de BEE1 podría dar una explicación de alguna función específica de este factor. Esto podría ser visto comparando sobreexpresores de ambos genes como ya se ha visto para otros factores (Lorrain et al., 2008). En el laboratorio hemos generado plantas 35S:BEE1-GR y 35S:BEE2-GR, que nos permitirán en un futuro próximo analizar esta posibilidad.

Ensayos EMSAS empleando sondas que contenían los motivos de unión obtenidos por técnica PBM y los dBHLH de BEE1 y BEE2, mostró un fuerte complejo en el caso de BEE2 con G-box, no así la de BEE1 a G-box plus donde no se veía casi señal del complejo (**Figura 54**). El resultado indicaba que, para el caso de BEE2, su dBHLH es suficiente para unirse a el motivo de DNA. Para BEE1 el resultado sugeriría que posiblemente existen residuos afuera de su motivo dBHLH implicados en la unión a DNA.

En cualquier caso, el conjunto de estos resultados confirmaban que tanto BEE1 como BEE2 unían el DNA específicamente, lo cual es similar a lo visto para otras BHLH (PIF4, PIF5, BIM1) también implicadas en el SAS (Hornitschek et al., 2012; Yin et al., 2005). Por lo cual no sería raro que muchos de los genes dianas regulados por PIF4 y PIF5 también estén regulados por BEEs o BIMs. Entre este grupo de genes se encontrarían *PIL1*, *YUC9*, *XTR7* y *HFR1*, entre otros (Hornitschek et al., 2012; Leivar et al., 2012b), que tienen motivos G-box en sus regiones promotoras. De hecho como se observó en los resultados de expresión del triple mutante *bee123* (como también de *bim123*) estos genes tienen afectada su expresión en estas líneas indicando que estos factores estarían regulando a estos genes (**Figura 55**).

Como se de dijo anteriormente, la identificación de factores como BEE y BIM puede ayudar a describir e interpretar la composición y organización de las redes regulatorias en las que están implicaos estos factores, como las del SAS u hormonales. Confirmando la unión de BEE2 y BIM1 a G-box, pudimos ver que esta unión se ve ligeramente afectada en presencia de PAR1 comparada con lo que ocurre con la versión mutada de PAR1 (PAR1<sub>Leu66</sub>) (**Figura 4.8**). Esto sugiere que PAR1, en su rol de cofactor, heterodimerizaría con BIM1 o

BEE2 impidiendo que se unan a los promotores de sus genes dianas (**Figura 21**). De tal forma se estaría generando un mecanismo regulador usando uno similar a lo publicado entre PAR1 y PIF4 (Hao et al., 2012).

BEEs y BIMs están implicados con brasinosteroides (Friedrichsen et al., 2002; Yin et al., 2005), así como también con auxinas (Galstyan, tesis doctoral 2010). En este trabajo, en presencia de giberelinas líneas con altas o bajas cantidades de estos factores muestran que tanto BEEs como BIMs, tendrían un rol en la modulación de la sensibilidad de giberelinas, así como anteriormente se describió para PAR1, PAR2 y HFR1 (**Figura 13**). Posiblemente BIM1 o BEE1 estén regulando genes, directos o no, implicados con el metabolismo o señalización de giberelinas. Por lo cual la heterodimerización de estos factores con PAR1 impide que estos genes se expresen, teniendo como resultado afectos a nivel fisiológicos como la elongación del hipocotilo. Un ejemplo de esta suposición es lo sugerido para el complejo regulatorio entre PIFs-DELLAS-BZR1 (Bai et al., 2012; Gallego-Bartolome et al., 2012) donde componentes hormonales (BZR1) y de luz (PIF4) tienen genes diana en común y se ven regulados por un cofactor (DELLA).

#### **4.4. BEEs y BIMs como componentes de la red del SAS.**

Si bien sabemos que el inicio de la señalización en la respuesta a la proximidad vegetal es phyB, tendríamos que comprender como se organizan el resto de los componentes reguladores del SAS en la red transcripcional. De esta forma se ha especulado que el resto de los componentes estén organizados en módulos funcionales que regulan el SAS. Cada módulo estaría compuesto por factores negativos y positivos que interaccionan entre sí (BEE-PAR1, HFR1-PIF, ATHBs-HATs), con características estructurales similares o diferentes (BHLHs, HD-Zips o B-BOX DOMAIN PROTEIN (BBX)), y con respuestas similares o diferentes en el tiempo/espacio. La existencia de múltiples componentes es consistente con la alta cantidad de factores identificados como reguladores del SAS y proporciona una base molecular sobre la robustez de la respuesta en la plántula en situación de sombra, ilustrando diferentes tipos de fenotipos visualizados en simples o múltiples

mutantes de estos factores que se han visto previamente y también en este trabajo (Crocco et al., 2010; Roig-Villanova et al., 2007).

Resultados moleculares del laboratorio mostraron que los factores BEEs y BIMs, modulan la expresión de una serie de genes implicados en el SAS de forma similar o diferencial (**Figura 44**). Además a nivel temporal se vio que los BIMs estarían regulando la expresión de algunos de estos genes antes que los BEEs (**Figura 44**). Esto podría sugerir que a pesar de que estos componentes son reguladores positivos del SAS, su función la hacen en diferentes niveles, formando parte de diferentes módulos. La generación de un múltiple mutante entre los factores BEEs y BIMs, y los análisis moleculares y fisiológicos, permitió argumentar la posibilidad de que estos factores estuviesen actuando de manera separada. Múltiples mutantes con actividad reducida de BEE y BIM (*bee123;bim13;bim2/+*) mostraron un fenotipo enano adulto y respuesta a sombra fuertemente atenuada (**Figuras 45 y 46**). Dichos rasgos tan robustos sugerían que la atenuación de ambos conjunto de genes podían ir más allá de una aditividad, pasando a ser un carácter sinérgico. Este sinergismo podría dar a entender la posibilidad de que estos genes se encontrasen en módulos diferentes.

Nuestros resultados de niveles de expresión de diferentes genes en la línea *bee123;bim13;bim2/+* mostraron perfiles con tendencia similares a las del triple mutante *bim123*. Es decir en genes regulados opuestamente entre *bee123* y *bim123* (**Figura 44**), el mutante *bee123;bim13;bim2/+* presentaba la misma regulación que este último (**Figura 47**). El único caso en que el múltiple mutante tuvo similar perfil de expresión que *bee123* fue en el gen *IAA19*, pero este gen no mostraba regulación por BIMs, y la regulación por BEEs tampoco era de gran significancia. Por otro lado, independiente del tipo de regulación, las diferencias más notorias de expresión entre los triples y el múltiple mutante fue en *XRT7* en los 3 tiempos analizados, aunque también se observaron diferencias puntuales de expresión como en *PIL1* y *HFR1* a 8 h. Estos resultados insinuarían algún grado de sinergia y por lo tanto que BEEs y BIMs podrían estar en diferentes módulos. Pero lo comentado que la tendencia regulatoria de la expresión de los genes analizados del mutante *bee123;bim13;bim2/+* sigue similar patrón que *bim123*, es más sugerente habrían diferentes módulos, ya que da a entender que los genes BIMs están

sobre los BEEs, y que en un múltiple mutante de estos factores predomina la actividad de los BIMs.

Al intentar conseguir un sexto mutante *bee123;bim123*, solo se logró conseguir mutantes *bee123;bim13;bim2/+*, que como comentamos anteriormente presentaban fenotipos enanos en planta adulta, respuesta a sombra simulada reprimida, tamaño de silicuas y aumento en el número de aborto (**Figuras 45**). La imposibilidad de conseguir el séxtuple mutante y el análisis de los fenotipos sugeriría la importancia de estos factores en la viabilidad de la planta y su implicación en procesos de desarrollo. Se sabe que por ejemplo BIM1 está implicado con el desarrollo embrionario interaccionando con factores como DORNROESCHEN (DRN), DORNROESCHEN-LIKE (DRNL) y PHAVOLUTA (PHV) (Chandler et al., 2009). Además tanto BEEs y BIMs son componentes de la vía regulatoria de los brasinosteroides, hormonas descritas que tienen un papel esencial en el crecimiento y desarrollo, y cuya ausencia genera cambios drásticos del fenotipo de las plantas como son enanismo dramático, fertilidad disminuida, raíces poco desarrolladas poco desarrollo de las raíces, cambios en la morfología de las hojas, etc. (Wang et al., 2012). Por lo tanto no sería raro pensar que estos factores están implicados en el desarrollo, además de tener su función en el SAS.

Así como estos resultados han mostrado que los factores BEEs y BIMs además de ser reguladores del SAS tendrían un rol en el desarrollo, hay información que describe a componentes del SAS implicados con procesos de desarrollo o viceversa. Por ejemplo REV, mencionada anteriormente, pertenece a la familia HD-ZipIII, y está implicado en procesos de patrones de desarrollo básicos. Además regula directa y positivamente varios genes involucrados en el crecimiento mediado por sombra (*HAT2*, *HAT3*, *HAT4*, *ATHB4*) así como también componentes de la biosíntesis de auxinas (*YUCA5* y *TAA*) (Brandt et al., 2012). En el mismo contexto las plantas dobles mutantes *athab4hat3*, deficientes en los reguladores del SAS *ATHB4* y *HAT3*, muestran cambios a nivel de desarrollo de embrión, cotiledones y hojas. El cambio en los cotiledones y hojas es a nivel de la polaridad entre los dominios adaxial y abaxial, un proceso en el cual también participan varias HD-ZipIII, como REV, PHB y PHV (Bou-Torrent et al., 2012). Por otro lado PIF4 y PIF5, definidos como reguladores positivos del SAS, también se han implicado en el desarrollo

del carpelo (Reymond et al., 2012). El conjunto de observaciones permitiría especular que los factores BEEs y BIMs podrían estar implicados en procesos de desarrollo quizás mediante interacciones con otros factores formando diferentes complejos reguladores, generando así la capacidad de actuar en diferentes programas de regulación génica, como por ejemplo en el desarrollo.

En resumen, aquí se han presentado resultados sobre el posible mecanismo molecular por el cual PAR1, regulador negativo del SAS, podría modular la actividad de unión al DNA (y por tanto la actividad transcripcional) de otros factores. Entre estos factores hemos identificados a los BEEs y BIMs, que actúan como reguladores positivos del SAS. Hormonas como auxinas y giberelinas están implicadas en el SAS, y su regulación podría depender de factores como los nombrados anteriormente. Todo esto nos lleva a sugerir un esquema de la composición de redes regulatorias como el SAS u hormonales (**Figura 56**), que muestra que la red reguladora del SAS no es una respuesta independiente y comprometida con la regulación del SAS únicamente. Por el contrario, la gran cantidad de factores en común y compartidos con otras redes reguladoras, apuntan que esta red preexistente también participa en la regulación de procesos de desarrollo vegetal.

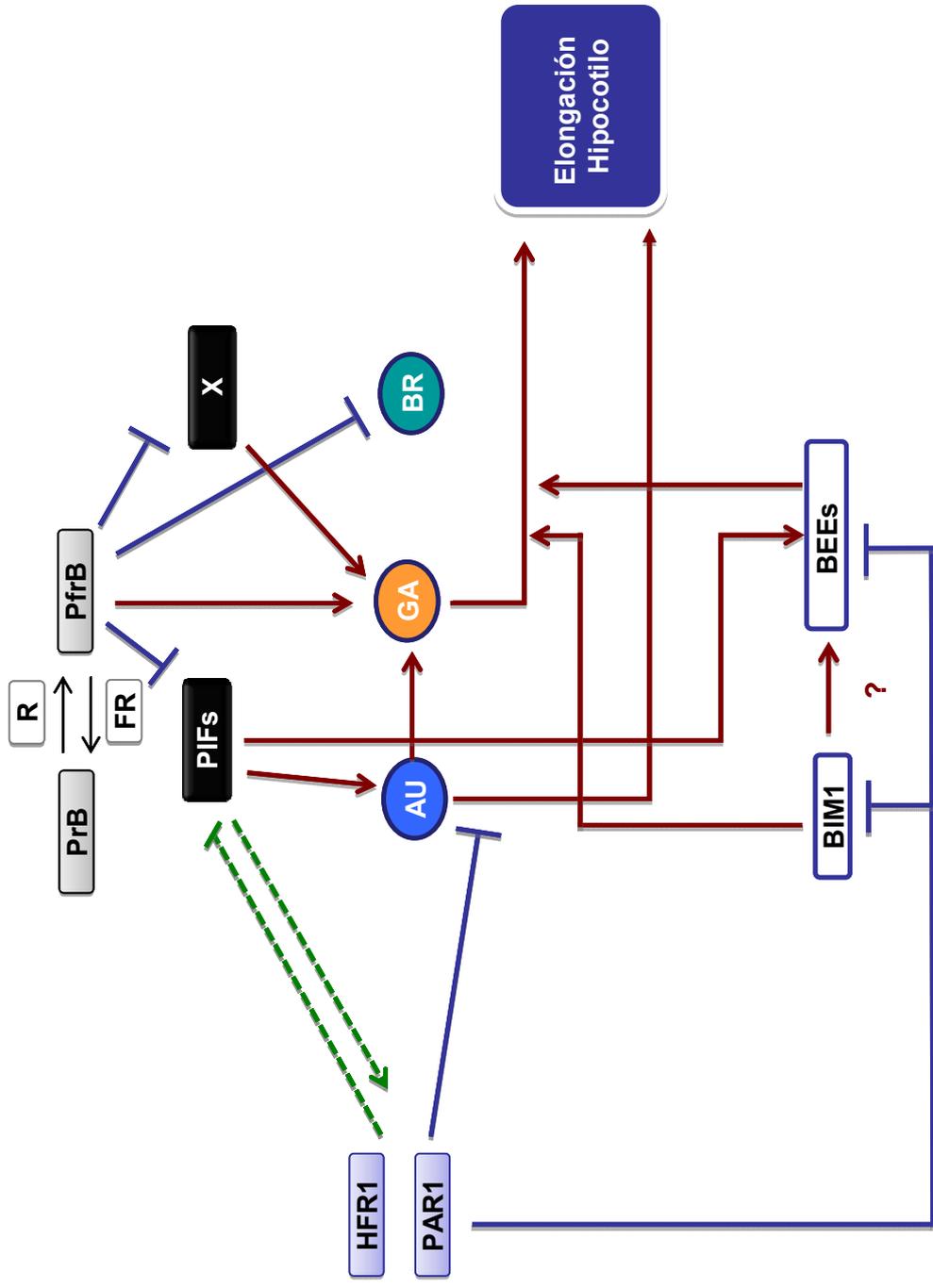


Figura 56. Modelo de interconexión entre rutas transcripcionales hormonales y del síndrome de huida de la sombra .



## **5. CONCLUSIONES.**

---



## **Conclusiones**

1. La proximidad vegetal afecta la sensibilidad a giberelinas. Además, reguladores del SAS como PAR1, PAR2, HFR1, BEEs y BIMs, cuyos niveles se modifican por sombra simulada, también alteran la sensibilidad de las plántulas a giberelinas. Esto sugiere la posibilidad de que esta modificación de la sensibilidad se deba a cambios en los niveles de factores reguladores del SAS modulados por las condiciones de sombra simulada.
2. El efecto de tratamientos de sombra simulada en la expresión de genes de la biosíntesis de giberelinas y la estabilidad de la proteína marcadora GFP-RGA estaba alterado en mutantes de síntesis o señalización de auxinas. Esto sugiere que el rápido incremento en los niveles de auxinas tras la percepción de sombra simulada podría ser necesario para la biosíntesis y acción de las giberelinas en este proceso.
3. Los análisis de la sobreexpresión de fusiones traduccionales de PAR1 al activador de la transcripción VP16 apoya que PAR1 no es capaz de unir DNA, por lo cual actuaría como un cofactor transcripcional para regular la expresión de genes como *SAUR15* y *SAUR68*.
4. Se identificaron factores interactores de PAR1 (o POFs) pertenecientes a la familia de BHLHs. Los análisis fisiológicos y moleculares de varios mutantes simples y dobles de inserción de T-DNA deficientes en estos POFs sugirió la existencia de redundancia génica entre estos componentes.
5. Los factores BEEs y BIMs fueron identificados previamente como interactores de PAR1 mediante cribado empleando el sistema de Y2H. Estos factores son reguladores positivos del SAS, y actuarían en la vía del fitocromo B. Mediante la técnica de Y2H y BiFC se confirmó la interacción de PAR1 con los factores BEEs. Análisis EMSA y PBM han demostrado que las proteínas BEE1, BEE2 y BIM1 se unen a secuencias de DNA que contienen la G-box; la

unión de BEE1 es más restringida que la de BEE2 por los residuos aledaños al motivo mencionado. Además la unión a DNA de BIM1 y BEE2 se vio atenuada en presencia de PAR1, apoyando que el mecanismo molecular de PAR1 sería el de heterodimerizar con BIM1 y BEE2 (y otros POFs con capacidad de unir DNA), impidiendo que estos factores se unan a los promotores de sus posibles genes dianas.

6. Análisis moleculares de los mutantes *bee123* y *bim123* sugieren que los BEEs y BIMs controlan diferentes respuestas moleculares. Esto sugiere que estos factores actúan en diferentes módulos de la red transcripcional reguladora del SAS. Finalmente, además de los análisis genéticos, los fenotipos enanos robustos y la baja fertilidad del múltiple mutante *bee123;bim13;bim2/+*, y la imposibilidad de lograr un séxtuple mutante indicaron que los BEEs y BIMs no sólo estarían participando en la regulación del SAS sino también en la del desarrollo, ya que se requieren para la viabilidad de la planta que crece en ausencia de proximidad vegetal.

## **6. MATERIALES Y METODOS.**

---



## **Materiales y métodos.**

Los protocolos usados en este trabajo fueron realizados de acuerdo a lo descrito en *Molecular cloning: A laboratory Manual* (Sambrook, 2001) y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, 1989).

Para la mayor parte de los experimentos se usó agua destilada. En el caso de experimentos moleculares se utilizó agua Milli-Q (ddH<sub>2</sub>O). En ambos casos y en la preparación de soluciones y medios, estos se esterilizaron por autoclave de vapor de agua a 120°C de 12 a 20 min dependiendo del material a autoclavar. El pH del material fue ajustado antes de la esterilización.

### **6.1. Material Biológico.**

#### **6.1.1. Material Bacteriológico.**

##### **6.1.1.1. Cepas bacterianas.**

En este trabajo se usaron las siguientes cepas:

- DR5αF'**: cepa de *Escherichia coli* usada en clonación de vectores.
- TOP10**: cepa de *E. coli* usada en clonación de vectores.
- C1C58/GV2260**: cepa de *Agrobacterium tumefaciens* usada para transformar vectores binarios empelados en la transformación de plantas.

##### **6.1.1.2. Medios de cultivos.**

Los medios, tampones y soluciones usadas fueron las siguientes:

- **Medio LB pH 7,5 (autoclavado)**: bactotripton 100 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y agua destilada. Ajustar el pH con NaOH 10 N. Para el medio sólido se agregan 15 g/L de agar.
- **Medio YEB pH 7,2 (autoclavado)**: extracto de carne 5 g/L, extracto de levadura 1 g/L, peptona 5 g/L, sacarosa 5 g/L, MgSO<sub>4</sub> 1 M y agua destilada. Para el medio sólido se agregar 15 g/L de agar.

##### **Antibióticos utilizados en los medios de cultivos bacterianos.**

A continuación se presenta la **Tabla 6** con los diferentes antibióticos utilizados en los medios bacterianos utilizados:

Antibiótico	Stock	Disolvente	Concentración de Trabajo		
			<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. thaliana</i>
Carbincilina (Cb)	100 mg/mL	Etanol 50%	100 ug/mL	100 ug/mL	
Kanamicina (Km)	50 mg/mL	Agua	25 ug/mL	25 ug/mL	25 ug/mL
IPTG	28,3 mg/mL	Agua	23,8 ug/mL		
X-GAL	20 mg/mL	DMF	40 ug/mL		
Rifampicina (Rf)	50 mg/mL	DMSO		100 ug/mL	
Higromicina (Hyg)	50 mg/mL	AGUA			30 ug/mL
Cefotacima (Cf)	100 mg/mL				100 ug/mL

**Tabla 6.** Antibióticos utilizados para trabajar con *E. coli*, *A. tumefaciens* y con *A. thaliana*

### 6.1.1.3. Condiciones de cultivos de bacterias.

*E.coli* se creció a 37°C. En el caso de cultivos líquidos, se crecieron a la temperatura señalada con agitación a 250 rpm.

*A.tumefaciens* se creció a 28°C. Para los cultivos líquidos se crecieron a la temperatura señalada con agitación a 250 rpm.

### 6.1.1.4. Obtención de células competentes para choque térmico.

Protocolo utilizado para la obtención de células competentes por choque térmico de *E. coli*:

1. Inocular 50 mL de medio LB con 1 colonia aislada.
2. Incubar en agitación (300 rpm) a 37°C hasta una D.O.600= 0,5 ± 0,1 (~2-3 h).
3. Enfriar el cultivo en hielo durante 10 min.
4. Centrifugar el cultivo por 10 min a 4000xg (4°C).
5. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 15 mL de tampón TBF1.
6. Incubar en hielo durante 10 min.
7. Centrifugar durante 10 min a 4000xg (4°C).
8. Descartar el sobrenadante e invertir el tubo durante 1 min para eliminar cualquier resto de tampón TBF1.
9. Resuspender el sedimento en 2 mL de tampón TBF2 (frío).

10. Preparar alícuotas de 100  $\mu$ L las células en tubos Eppendorf estériles (en hielo). Congelarlas en nitrógeno líquido. Almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Las células competentes se deben de probar antes de utilizarlas con 10 ng de un plásmido control y así determinar la eficiencia.

Soluciones empleadas:

- **Tampón TBF1 (esterilización por filtración):** KOAc 30 mM pH 5,8 (ajustar con AcOH 2 N), MnCl<sub>2</sub> 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, RbCl 100 mM, glicerol 15 % (v/v).

- **Tampón TBF2 (esterilización por filtración):** MOPS 10 mM pH 7 (ajustar con NaOH 10 N), CaCl<sub>2</sub> 75 mM, RbCl 10 mM, glicerol 15 % (v/v).

#### **6.1.1.5. Obtención de células electrocompetentes.**

Descripción del protocolo utilizado para la obtención de células competentes por electroporación de *A. tumefaciens* **C1C58/GV2260**.

1. Inocular 2-3 mL de medio YEB suplementado con rifampicina (+Rf) y carbenicilina (+Cb) con una colonia de la cepa de *A. tumefaciens*. Crecer toda la noche (O/N, del inglés overnight) en agitación a  $28^{\circ}\text{C}$ .
2. Inocular un cultivo de 200 mL de medio YEB+Rif/Cb con 2 mL (1/100 vol) del cultivo crecido O/N. Incubar a  $28^{\circ}\text{C}$  en agitación hasta que la D.O.600=0,5-0,8 (~2,5-3 h).
3. Enfriar el cultivo en hielo de 15 a 30 min.
4. Centrifugar durante a 20 min a 4000xg a  $4^{\circ}\text{C}$  y descartar el sobrenadante.
5. Resuspender las células en 1 volumen del cultivo inicial de agua estéril enfriada en hielo. Tener precaución de no lisar las células.
6. Centrifugar durante 20 min a 4000xg a  $4^{\circ}\text{C}$  y descartar el sobrenadante.
7. Resuspender las células en  $\frac{1}{2}$  volumen del cultivo inicial de agua estéril enfriada en hielo. Repetir el paso 6.
8. Resuspender las células en 1/50 volumen del cultivo inicial en glicerol 10% enfriado en hielo. Repetir el paso 6.

9. Resuspender las células en 1/100 volumen del cultivo inicial de glicerol 10% enfriado en hielo. La concentración de células debe ser  $1-3 \times 10^{10}$  células/mL.
10. Hacer alícuotas de 50  $\mu$ L, congelar en nitrógeno líquido y guardar a -80°C.

## **6.1.2 Material de levadura.**

### **6.1.2.1. Cepas de levaduras.**

Las siguientes cepas fueron usadas en este trabajo:

- **AH109**: cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, auxotrófica para triptófano (T) y leucina (L), usada para el sistema doble híbrido, del tipo **Cotransformación**.
- **PJ694 $\alpha$** : cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, auxotrófica para triptófano (T) usada para el sistema doble híbrido, del tipo **Mating**.
- **YM4271a**: cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, auxotrófica para leucina (L) usada para el sistema doble híbrido, del tipo **Mating**.

### **6.1.2.2. Medios de cultivos.**

- **Medio SD- (450 mL)**: 3,35 g de Yeast Nitrogen Base (without amino acids), 10 g D-glucosa, 10 g Agar (Difco o BD). Ajustar el pH a 5,8 en un volumen de 450 mL. Autoclavar el medio durante 15 min.

### **6.1.2.3. Condiciones de cultivos de levaduras.**

Todas las cepas usadas se crecieron a 28°C. Para los cultivos líquidos se crecieron a la temperatura señalada con agitación a 250 rpm.

## **6.1.3. Material Vegetal.**

En este trabajo se ha utilizado la especie *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio. Los ecotipos utilizados han sido: Columbia-0 (Col-0) y Landsberg erecta (Ler).

### 6.1.3.1. Líneas de ganancia y pérdida de función utilizadas.

En las **Tablas 7 y 8** se describen las líneas de ganancia y pérdida de función utilizadas.

<b>Mutante</b>	<b>Ecotipo</b>	<b>Información relevante</b>
<i>bee3-2</i>	Col-0	SALK_029329
<i>bee2-2</i>	Col-0	SAIL_527_C01
<i>bhlh48-1</i>	Col-0	SALK_092968
<i>bhlh48-2</i>	Col-0	SAIL_324_A08
<i>bhlh48-3</i>	Col-0	SALK_013047
<i>bhlh49-1</i>	Col-0	SALK_081687
<i>bhlh49-2</i>	Col-0	SALK_081696
<i>bhlh49-3</i>	Col-0	SALK_135188
<i>bhlh60-1</i>	Col-0	SALK_002003
<i>bhlh60-2</i>	Col-0	SAIL_163_D11
<i>bhlh62-1</i>	Col-0	SALK_122534
<i>bhlh62-2</i>	Col-0	SAIL_27_A03
<i>bhlh62-3</i>	Col-0	SALK_091124C
<i>bhlh64-1</i>	Col-0	SAIL_77_D01
<i>bhlh64-2</i>	Col-0	SALK_090958
<i>bhlh74-1</i>	Col-0	SALK_027284
<i>bhlh77-1</i>	Col-0	SALK_054791
<i>bhlh77-2</i>	Col-0	SALK_054967
<i>bhlh77-3</i>	Col-0	SALK_055159
<i>bhlh77-4</i>	Col-0	SALK_054783
<i>bhlh77-5</i>	Col-0	SAIL_383_B08
<i>bhlh78-1</i>	Col-0	SALK_085759
<i>bhlh78-2</i>	Col-0	SALK_127100
<i>bhlh78-3</i>	Col-0	SALK_091535
<i>bhlh78-4</i>	Col-0	SALK_076836
<i>bhlh78-5</i>	Col-0	SALK_055840
<i>bhlh79-1</i>	Col-0	SAIL_579_A06
<i>bhlh79-2</i>	Col-0	SAIL_897_C08
<i>bhlh79-3</i>	Col-0	SALK_142716
<i>bhlh75-1</i>	Col-0	SAIL_148_H01
<i>bhlh75-2</i>	Col-0	SAIL_674_A01
<i>bhlh31-1</i>	Col-0	SALK_089219
<i>bhlh31-2</i>	Col-0	SAIL_865_G01
<i>phyB-9</i>	Col-0	Cedida por el Dr. P. Quail
<i>hfr1-5</i>	Col-0	SALK_049497
<i>pil1-4</i>	Col-0	SALK_043937
<i>sav3-5</i>	Col-0	SALK_022743
<i>par2-1</i>	Col-0	SALK_109270
<i>PAR1 RNAi</i>	Col-0	Cedida por la Dra. I Roig-Villanova
<i>bim123</i>	Col-0	Cedida por la Dra. J. Chory
<i>bee123</i>	Col-0	Cedida por la Dra. J. Chory

Tabla 7. Lista de mutantes de pérdida de función usados.

Línea trasngénica	Descripción	Información Relevante
35S:PAR1-G	Sobreexpresión PAR1-GFP	Plantas transformadas con pBF1 (Roing Villanova et al, 2007)
35S:PAR1-GG	Sobreexpresión PAR1-Gus-GFP	Plantas transformadas con pSP14 (Roing-Villanova et al, 2007)
35S:PAR2	Sobreexpresión de PAR2	Plantas transformadas con pJB2 (Roing Villanova et al, 2007)
35S:PAR2-G	Sobreexpresión de PAR2-GFP	Plantas transformadas con pJB4 (Roing Villanova et al, 2007)
35S:PAR1-GR	Sobreexpresión PAR1-GR	Plantas transformadas con pIR33 (Roing-Villanova et al, 2007)
35S:PAR1-V	Sobreexpresión PAR1 fusionado al dominio de activacion de VP16	Plantas transformadas con pNC7 (Galstyan et al, 2010)
35S:PAR1-VG	Sobreexpresión PAR1 fusionado al dominio de activacion de VP16 y a GR	Plantas transformadas con pNC11 (Galstyan et al, 2010)
BIM1OX	Sobreexpresión de BIM1-HA	Cedida por la Dra. J. Chory (Yin et al. 2005)
BEE1OX	Sobreexpresión de BEE1-LUC	Cedida por la Dra. J. Chory (Friedichsen et al. 2002)
35S:G-BH	Sobreexpresión de GFP-BH, HFR1	Plantas transformadas con pJB43 (Galstyan et al, 2010)
35S:G-H	Sobreexpresión de GFP-H, HFR1	Plantas transformadas con pJB44 (Galstyan et al, 2010)
RGA:GFP-RGA	Sobreexpresión de RGA-GFP	Djakovic-Petrovic et al, 2007

Tabla 8. Lista de líneas transgénicas usadas.

### 6.1.3.2. Condiciones cultivo en invernadero y fitotrón

-**Condiciones del invernadero:** de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura, humedad ambiental del 55%, 14h de luz y 10h de oscuridad, aproximadamente.

- **Condiciones de fitotrón Dia Corto (SD):**  $22^\circ\text{C}$  de temperatura, 8h de luz y 16h de oscuridad. Sin control de humedad.

- **Condiciones de fitotrón Dia Largo (LD):**  $22^\circ\text{C}$  de temperatura, 16h de luz y 8h de oscuridad. Sin control de humedad.

Soluciones empleadas:

- **Solución de fertirrigación:** Solución de Hoagli y Arnon (Hoagli i Arnold, 1938) modificada por Johnson y col., (1957).  $\text{NO}_3\text{K}$  8,4 mM,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,2 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2,5 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,7 mM,  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,6 mM. Esta solución se complementa con el quelante de hierro Kelamix 35 mg/L y con microelementos 0,4 g/L.

### 6.1.3.3. Condiciones de cultivo en placa.

Las plántulas van a crecer en placas en cámaras de luz continua o día largo (SD).

- **Condiciones de cámara de luz continua:** 22°C de temperatura y con humedad del 94%.
- **Condiciones de fitotrón Dia Corto (SD):** 22°C de temperatura, 14 h de luz y 10 h de oscuridad. Sin control de humedad.

### 6.1.3.4. Medios de cultivos.

Para la germinación y crecimiento de las plántulas en placas de Petri, se va a utilizar medio Murashige y Skoog (MS).

- **Medio GM-0,5x pH 5,8 (autoclavado):** medio *Murashige & Skoog* con vitaminas 2,15 g/L, MES 0,25 g/L. Ajustar el pH con KOH 10 N, y 8 g/L de bactoagar.
- Suplementos utilizados en los medios de cultivos de plantas. En la **Tabla 6** se presentan los antibióticos usados en planta

### 6.1.3.5. Plásmidos.

#### 6.1.3.5.1. Vectores.

##### a) Vectores de clonaje de productos de PCR.

- pCRII-TOPO (Invitrogen): Vector utilizado para clonar productos de PCR por el sistema T/A, Cb<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>.
- pCR2.1 (Invitrogen): Vector utilizado para clonar productos de PCR por el sistema T/A, Cb<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>.

##### b) Vectores Binarios para transformación en plantas.

- pCambia1302: Permite la sobreexpresión de fusiones traduccionales de un gen de interés en marco de lectura con GFP, bajo el promotor constitutivo 35S. Km<sup>R</sup> en bacterias, Hyg<sup>R</sup> en plantas.

- pBinAr: Permite la sobreexpresión de un gen de interés bajo el control del promotor constitutivo 35S. Km<sup>R</sup> en bacterias, Km<sup>R</sup> en plantas.

### **c) Vectores de Doble Híbrido.**

- pGADT7: Vector utilizado para fusión traduccional entre el dominio de activación GAL4 con el gen de interés. Cb<sup>R</sup> en bacterias, y Leu en levaduras.
- pGBKT7: Vector utilizado para fusión traduccional entre el dominio de unión a DNA GAL4 el gen de interés. Km<sup>R</sup> en bacterias, y Trp en levaduras.
- pDT1: Vector usado como control positivo en los experimentos de Y2H. Posee el dominio N-terminal de antígeno SV40 fusionado el dominio de activación GAL4. Cb<sup>R</sup> en bacterias, y Leu en levaduras.
- pVA3: Vector usado como control positivo en los experimentos de Y2H. Posee el dominio N-terminal de p53 fusionado al dominio de unión a DNA de GAL4. Km<sup>R</sup> en bacterias, y Trp en levaduras.

### **d) Vectores de producción de proteína.**

- pGEX: Vector usado para producir una proteína de interés fusionada a la GST. Cb<sup>R</sup> en bacterias.
- pMALc2x: Vector usado para producir una proteína de interés fusionada a la MBP. Cb<sup>R</sup> en bacterias.

### **f) Vectores de bombardeo.**

- 35S:RFP: Sobreexpresión constitutiva de la proteína roja fluorescente (RFP).

### **6.1.3.5.2. Constructos.**

A continuación se muestran en la **Tabla 9** los constructos utilizados y generados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Vector	Inserto
pNC6	Fragmento del motivo de activación de VP16	pCR2.1	pAlligator 1
pNC7	36S:PAR1-Y	pIR38 (BamHI)	pNC6 (BamHI)
pNC10	36S:PAR1-GR	pB1/GR (XbaI/BamHI)	pACy9 (XbaI/BamHI)
pNC11	36S:PAR1-YG	pNC10 (BamHI)	pNC6 (BamHI)
pNC12	Fragmento de <i>BHLH69</i> para RNA biot	ACRII-TOPO	Fragmento de <i>BHLH69</i>
pNC13	Fragmento de <i>BHLH60</i> para RNA biot	ACRII-TOPO	Fragmento de <i>BHLH60</i>
pNC14	Fragmento de <i>BHLH64</i> para RNA biot	ACRII-TOPO	Fragmento de <i>BHLH64</i>
pNC15	Fragmento de <i>BHLH62</i> para RNA biot	ACRII-TOPO	Fragmento de <i>BHLH62</i>
pNC16	Fragmento de <i>BHLH78</i> para RNA biot	ACRII-TOPO	Fragmento de <i>BHLH78</i>
pNC18	Fragmento de <i>BHLH69</i> para RNA biot	ACRII-TOPO	Fragmento de <i>BHLH69</i>
pNC20	Producción de proteína RGS-BEE1	PRSETb (EcoRI)	pAG49 (EcoRI)
pNC21	Producción de proteína RGS-BEE3	PRSETb (EcoRI)	pAG46 (EcoRI)
pNC24	CDNA de BEE7 con modificaciones para clonarlo en vector de bombardeo	ACRII-TOPO	pNC20
pNC25	CDNA de BEE3 con modificaciones para clonarlo en vector de bombardeo	ACRII-TOPO	pNC21
pNC26	BEE1 en vector de bombardeo	ASY736 (SalI/BamHI)	pNC24 (SalI/BamHI)
pNC27	BEE3 en vector de bombardeo	ASY736 (SalI/BamHI)	pNC25 (SalI/BamHI)
pNC29	Producción de proteína GST-BEE2	PGEX-4X-2 (BamHI/NcoI)	pAG44 (BamHI/NcoI)
pNC30	Fragmento dBHLH de BEE7 para secuenciar	ACRII-TOPO	pNC20
pNC31	Fragmento dBHLH de BEE2 para secuenciar	ACRII-TOPO	pAG44
pNC32	Fragmento dBHLH de BEE3 para secuenciar	ACRII-TOPO	pNC21
pNC34	Producción de proteína GST-dBHLH de BEE1	PGEX-4T-1 (EcoRI/SalI)	pNC30 (EcoRI/SalI)
pNC35	Producción de proteína GST-dBHLH de BEE2	PGEX-4T-1 (EcoRI/SalI)	pNC31 (EcoRI/SalI)
pNC36	Producción de proteína GST-dBHLH de BEE3	PGEX-4T-1 (EcoRI/SalI)	pNC32 (EcoRI/SalI)
pNC37	Fragmento dBHLH de BIM1 para secuenciar	ACRII-TOPO	pNC8
pNC38	Producción de proteína GST-dBHLH de BIM1	PGEX-4T-1 (EcoRI/SalI)	pNC37 (EcoRI/SalI)
pNC39	Producción de proteína MBP-BEE1	BMAL-C2X (EcoRI)	pAG49 (EcoRI)
pNC44	Fragmento dBHLH mutado de BEE1 para secuenciar	ACRII-TOPO	pNC20
pNC45	Fragmento dBHLH mutado de BEE2 para secuenciar	ACRII-TOPO	pNC29
pNC49	Producción de proteína GST-dBHLH mutado de BEE1	PGEX-4T-1 (EcoRI/SalI)	pNC44 (EcoRI/SalI)
pNC50	Producción de proteína GST-dBHLH mutado de BEE2	PGEX-4T-1 (EcoRI/SalI)	pNC45 (EcoRI/SalI)
pNC55	CDNA de BEE1 con modificaciones para clonarlo en vector de bombardeo	ACRII-TOPO	pNC29
pNC56	BEE2 en vector de bombardeo	ASY736 (SalI/BamHI)	pNC55 (SalI/BamHI)
pAG49	CDNA de BEE7	ACRII-TOPO	Fragmento BEE7
pAG44	CDNA de BEE2	ACRII-TOPO	Fragmento BEE2
pAG45	CDNA de BEE3	ACRII-TOPO	Fragmento BEE3
pCL1	AD-PAR1 para Y2H	ACRII-TOPO	Fragmento BEE2
pCL3	BD-PAR1 para Y2H	ACRII-TOPO	Fragmento BEE2
		PGBKT7 (NcoI/BamHI)	pACy9 (NcoI/BamHI)
		PGADT7 (NcoI/BamHI)	pACy9 (NcoI/BamHI)

Tabla 9. Plásmidos generados y usados.

### 6.1.3.6. Oligonucleóticos.

Lista de oligos usados de detalla la **Tabla 10**:

Oligo	Secuencia	Gen	Descripción
N001	CCGGATCCTAACCATAACGACGTTCCGG	VP16-AD, con sitio BamHI en 5'	Clonación
N002	CCGGATCCAAACTTGTGATCTGCTAG	VP16-AD, con sitio BamHI en 3'	Clonación
N004	GCTATCTCCAGTTCTTCTGG	bhlh64-1	Genotipado y sonda para RNA blot
N005	GAAAGTCATTGATGGTGC	bhlh62-1	Genotipado y sonda para RNA blot
N006	AGGCTTAAAACTGGGCTGC	bhlh62-1	Genotipado y sonda para RNA blot
N009	TTGGAACACTAGTTGCGAGG	bhlh78-2	Genotipado
N0010	CATCCTTTGACACAAGAGCG	bhlh78-2	Genotipado y sonda para RNA blot
N0018	TCACAGTCTCCAGAAGG	bee2-2	Genotipado
N0019	CAGGCCAAAAGCATCTCC	bee2-2	Genotipado
N0020	AGAGAAAATGGACAACGAGC	bhlh78-3	Genotipado y Clonaje
N0024	AAACGCACGAATGAAGCTGC	bhlh48-3	Genotipado
N0025	ACGATACTACACTCCTCAC	bhlh48-3	Genotipado
N0026	GGCGTATAAAAAAGTGTGG	bhlh64-2	Genotipado
N0027	ATTGGCTGAACTACTCTCC	bhlh64-2	Genotipado
N0028	ATCTCGTCAAGCATCGTAGC	bee1-1	Genotipado
N0029	CTTTGCGATGATAGGTTAGG	bhlh49-1, bhlh49-2 y bhlh49-3	Genotipado
N0030	TGCAATCACCTCCATCC	bhlh49-1, bhlh49-2 y bhlh49-3	Genotipado
N0031	ATGCCCTTGTATGCAAAGGC	bhlh74-1	Genotipado
N0032	AGACTGTGACTATTAGTGGC	bhlh74-1	Genotipado
N0033	GGGTTTCTTTCAGAAATCC	bhlh77-1, bhlh77-2, bhlh77-3, bhlh77-4 y bhlh77-5	Genotipado
N0034	AGACTATGGCTATCAGTTGC	bhlh77-1, bhlh77-2, bhlh77-3, bhlh77-4 y bhlh77-5	Genotipado
N0035	ATCCACAACCCATCATTGC	bhlh31-1	Genotipado
N0036	TOCGCTAGATTAACCGTCC	bhlh31-1	Genotipado
N0037	TAGATGAAGTGTGTGATGGG	bhlh31-2	Genotipado
N0038	CACCTCGTTTATTGCAATGC	bhlh31-2	Genotipado
N0039	AGAGATGCATTGTCTTTGG	bhlh79-1	Genotipado
N0040	GAGCGAGTAAAGACTCGAACC	bhlh79-1	Genotipado
N0041	CTGAGGAATCTACAGTCAAC	bhlh79-2	Genotipado
N0042	CTCGCTCTGCTAAACTATGC	bhlh79-2	Genotipado
N0043	AAACTAGGAGATGGAGAAGC	bhlh78-3	Genotipado
N0044	TACTGGAAAAGCACTGATGC	bhlh78-4 y bhlh78-5	Genotipado
N0045	TAAGTGAAGTGAAGCTTCTGG	bhlh78-4 y bhlh78-5	Genotipado
N0046	CGATTAAATAACGAACCCACC	bhlh62-3	Genotipado
N0047	CTTGTCTGTGCAATGATTGG	bhlh62-3	Genotipado
N0051	CCGTGCACTATTATGGCAAATTCGAG	BEE1, con sitio Sall en 5'	Clonaje
N0052	CCGTGCACTCAGAAATGGGAATCTC	BEE3, con sitio Sall en 5'	Clonaje
N0053	AACCATGTGCAAACTTTACAGC	bhlh48-3	sonda para RNAblot
N0054	aacTTAGAGCTCCATTTTCACC	bhlh48-3	sonda para RNAblot
N0055	CGGAATTCAAAGAGAGAGAAGTTGTTTCATG	dBHLH-BEE1, con sitio EcoRI en 5'	Clonaje
N0056	CCGTGCAAAAGTCAATAAACGAACCTGC	dBHLH-BEE1, con sitio Sall en 3'	Clonaje
N0057	CGGAATTCAGAAACAGATTACATTCATG	dBHLH-BEE2, con sitio EcoRI en 5'	Clonaje
N0058	CCGTGCAACACTCAAGTTCTGGATTTATG	dBHLH-BEE2, con sitio Sall en 3'	Clonaje
N0059	CGGAATTCAAAGAGAGAGAAGTTGTTTCATG	dBHLH-BEE3, con sitio EcoRI en 5'	Clonaje
N0070	CCGTGCAAAAGTCAATAACGAACCTGC	dBHLH-BEE3, con sitio Sall en 3'	Clonaje
N0077	CGGAATTCGAGATGTGAGAGGCTCTCCTA	dBHLH-BIM1, con sitio EcoRI en 5'	Clonaje
N0078	CCGTGCAACCTTCGAGGTTGATTCAT	dBHLH-BIM1, con sitio Sall en 3'	Clonaje
N0079	CTTCATCAACGTTCTCGAGC	GA20ox1, (Ourabaetal.,2004)	qPCR
N0080	GTTTTGAAGTTCGATGAGAGG	GA20ox1, (Ourabaetal.,2004)	qPCR
N0081	AGAAACCTTCCATTGACATTCCA	GA20ox2, (Ourabaetal.,2004)	qPCR
N0082	AGAGATGATGAACGGGACG	GA20ox2, (Ourabaetal.,2004)	qPCR
N0086	GGCGAGGTGAGTAGGGCACTGCACACGCTTCCGAA	G-box+	Generación de sonda para EMSA
N0097	GGTTCCGAAGAGTGTCCACGTCGCCACTCACCTCGG	G-box+	Generación de sonda para EMSA
N00102	CGGGTTGGCGAGAGAAAATAAACGAGAGATTAAG	mutacion de glicina por glutámico en BEE1	Clonaje
N00103	CITTAATCTCTGTTTATTTCTCTCGCCGAACCCG	mutacion de glicina por glutámico en BEE1	Clonaje
N00104	AGGCAAGAGAGGAAAGATAAGCAAGAGATG	mutacion de glutámico por glicina en BEE2	Clonaje
N00105	CATCTTCTGCTTATCTTCTCTCTTCCOCT	mutacion de glutámico por glicina en BEE2	Clonaje
N00106	CCGTGCAACCTTCATGGACTTGTCTGTA	BEE2, con sitio Sall en 5'	Clonaje
JO390	ACCTCGTTGGGTTAACTGTC	bhlh48-1 y bhlh48-2	Genotipado y sonda para RNA blot
JO391	GCTATGGTTATCAGTAGCTTG	bhlh48-1 y bhlh48-2	Genotipado y sonda para RNA blot
JO392	CGTTTATGGATCTGACTGGAG	bhlh60-1	Genotipado y sonda para RNA blot
JO393	ACAGCTGGGACCACTTCTG	bhlh60-1	Genotipado y sonda para RNA blot
JO394	TCATTACAACGTCAGTGGAG	bhlh60-2	Genotipado y sonda para RNA blot
JO395	AACCTACAGCTCCATTTTGAC	bhlh60-2	Genotipado y sonda para RNA blot
JO396	AGACACAGCTTAGCAGAAAAGG	bhlh64-1	Genotipado y sonda para RNA blot
JO397	TGCTTAGTAATGAAAACCGAG	bhlh64-1	Genotipado
2X35S	CTTCGCAAGACCTTCC	pNC7	Genotipado
UNIVERSAL	GTAACACGACGGCCAGT	pNC6	Genotipado
JO289	TCAATGGAAAGAACTCTAGCCAC	pNC7	Genotipado
REVERSE	CAGGAAACAGCTATGAC	pNC6	Genotipado
GO26	AAGATGAGAACCAGAAAAGC	BIM2	Genotipado y Clonaje
GO27	GAGAAATGTACAGTGTTTTC	BIM2	Genotipado y Clonaje
GO28	ACTAGTAACCTCTCATGATATC	BIM3	Genotipado y Clonaje
GO29	CAGATCTTATCGTATCTC	BIM3	Genotipado y Clonaje
GO30	ACCTCTCATGTTACTCTCTC	BIM1	Genotipado y Clonaje

Tabla 10. Oligonucleóticos usados en este trabajo.

## **6.2. Metodología.**

### **6.2.1. Técnicas de biología molecular de los ácidos nucleicos.**

#### **6.2.1.1. Obtención de DNA plasmídico.**

Se emplearon 2 métodos de extracción de DNA plasmídico dependiendo del grado de pureza deseado.

**a) Minipreparación mediante lisis alcalina.** Este método, basado en lo descrito por (Sambrook, 2001), se utilizó en pasos intermedios de clonaje y para la comprobación de los plásmidos mediante digestión por PCR.

#### Procedimiento:

1. Inocular una colonia aislada en 3 mL de medio LB suplementado con los antibióticos requeridos. Incubar O/N
2. Transferir todo el cultivo a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y centrifugar 1 min en microcentrífuga a velocidad máxima (13000 rpm). Descartar el sobrenadante.
3. Agregar 150  $\mu$ L de tampón P1. Resuspender el pellet de bacteria con ayuda del vórtex.
4. Agregar 150  $\mu$ L del tampón P2. Agitar suavemente el tubo por inversión unas 4-5 veces. Incubar < 5 min a temperatura ambiente (TA).
5. Agregar 150  $\mu$ L del tampón P3 y mezclar rápidamente por inversión unas 4-5 veces. Dejar reposar 15-20 min en hielo. Centrifugar 10 min a velocidad máxima.
6. Pasar el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf, agregar 900  $\mu$ L de etanol absoluto. Incubar 2 min a TA. Centrifugar 10 min a velocidad máxima.
7. Descartar el sobrenadante y agregar 700  $\mu$ L de 70% (v/v) etanol. Centrifugar 5 min a velocidad máxima.
8. Descartar el etanol y dejar secar el sedimento de DNA al aire por 10 min hasta que se evapore todo el etanol.
9. Agregar 50  $\mu$ L de TE 1x o agua. Guardar a 4°C.

Soluciones empleadas:

-**Tampón P1 (guardar a 4°C):** Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, RNasa 100 ug/mL.

-**Tampón P2 (guardar a TA):** NaOH 200 mM, SDS 1% (p/v).

-**Tampón P3 (guardar a 4°C):** KAc 3 M pH 5,5.

-**Tampón TE 1x pH 7,4:** Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM.

**b) Minipreparación de DNA plasmídico de alta calidad.** Se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep de Quiagen, siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

### **6.2.1.2. Clonaje de fragmentos de DNA en vectores.**

Se emplearon las siguientes técnicas de ingeniería genética, las cuales se detallan a continuación.

#### **6.2.1.2.1. Reacciones de modificación de DNA.**

Para las reacciones de modificación de DNA (como la digestión de fragmentos de DNA con enzimas de restricción, ligaciones, desfosforilación de extremos de DNA, relleno de extremos cohesivos, etc.), se utilizaron enzimas comerciales (Promega, Boehringer-Manheim, NewEngland Biolabs, etc.) siguiendo el protocolo general descrito por (Ausubel, 1989; Sambrook, 2001), y las condiciones aconsejadas por cada fabricante. En la presente memoria sólo se detalla aquellas que fueron de especial importancia o si el protocolo supuso alguna modificación sobre el original.

#### **6.2.1.2.2. Transformación de células competentes de *E. coli* por choque térmico.**

La transformación de células de *E. coli* se utilizó para la obtención de plásmidos de ligaciones. Las células competentes se transformaron por choque térmico según el siguiente protocolo.

Procedimiento:

1. Descongelar en hielo el tubo que contiene una alícuota de 50  $\mu$ L células competentes.
2. Agregar 1-5  $\mu$ L (10-20 ng) de DNA y mezclar suavemente.
3. Mantenerme la mezcla en hielo por 30 min.
4. Hacer un shock térmico de 1,5 min a 42°C.
5. Transferir el tubo a hielo por 2 min.
6. Agregar 900  $\mu$ L de medio LB sin antibióticos. Incubar el tubo en agitación a 250 rpm a 37°C por 1 h para recuperarlas del choque térmico.
7. Plaques diferentes volúmenes de la transformación en medio LB sólido con el antibiótico de selección escogido.
8. Incubar las bacterias a 37°C O/N.

#### **6.2.1.2.3. Transformación de células competentes de *A. tumefaciens* por electroporación.**

La transformación de células de *A. tumefaciens* con plásmidos binarios permite introducir transgenes en *Arabidopsis* mediante transformación por infiltración floral. Las células competentes se transformaron por electroporación según el siguiente protocolo.

##### Procedimiento:

1. Descongelar una alícuota (50  $\mu$ L) de células electrocompetentes en hielo. Agregar 1-2  $\mu$ L de DNA (el DNA ha de estar disuelto en una solución de baja fuerza iónica, como por ejemplo TE, o agua desionizada). Mezclar bien e incubar en hielo por 5 min.
2. Enfriar las cubetas de electroporación (de 0,1 cm) en hielo, previamente esterilizadas con etanol. Agregar la mezcla de células y DNA.
3. Electroporar a un voltaje de 1,7 kV. Inmediatamente, transferir las células a un tubo con 1 mL de medio de cultivo YEB sin antibióticos.
4. Incubar las células a 28°C durante 2 h para recuperarlas de la electroporación.
5. Plaques diferentes volúmenes en medio YEB con los antibióticos selectivos añadidos.
6. Incubar a 28°C durante 2-3 días hasta la aparición de colonias.

7. Comprobar las colonias por PCR con oligos específicos.

#### **6.2.1.2.4. Transformación de células competentes de levaduras por choque térmico.**

La transformación de células Se parte de células competentes de levadura congeladas a -80°C.

##### Procedimiento:

Preparar la siguiente mezcla: 240 µL PEG 50%, 36 µL LiAc 10x (1 M), 10 µL ssDNA (10mg/ml)\*, 69 µL agua estéril (Volumen total de 360 µL para 1 transformación). Agitar la mezcla con vórtex.

1. Dejar descongelar las células competentes en hielo. Centrifugar el tubo 1 min a 14000 rpm. Retirar el sobrenadante con cuidado.
2. Agregar los 360 µL de la mix. Añadir 5 µL del plásmido de DNA (0,1 µg/µL). Incubar a 28°C-30°C en agitación durante 30 min.
3. Añadir 36 µL de DMSO. Incubar en baño a 42°C durante 15 min.
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 min. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en 200 µL de agua estéril. Plaquear 50 µL y 100 µL en dos placas del medio adecuado de selección.
5. Incubar placas a 30°C durante 2-5 d.

\*El ssDNA (DNA de esperma de salmón congelado a -20°C) se desnaturaliza durante 3 min a 95°C

#### **6.2.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La amplificación de fragmentos de DNA mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés polymerase chain reaction) (Saili y col., 1988) se llevó a cabo empleando oligonucleótidos específicos y como sustrato DNA plasmídico, DNA complementario (cDNA) o genómico (según el caso). La base teórica se encuentra en todos los manuales de biología molecular (Sambrook, 2001). Para generar fragmentos de PCR se utilizaron dos tipos de enzimas DNA polimerasa termoestable: una no comercial, utilizada para comprobación de clonajes, colonias y genotipados, y una comercial (Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity, de Invitrogen), que se

caracteriza por tener una baja tasa de error. Estas enzimas disponen de sus propios tampones y se utilizaron según las instrucciones del fabricante (**Tabla 11**).

Reacción de PCR		Programa de PCR			
Componentes	Concentración de trabajo	Fase	Tiempo	Temperatura	
DNA	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>6</sup> copias	Denaturalización inicial	3 min	94°C	
Tampon PCR	1x	Denaturalización	30 seg	94°C	30 Ciclos
dNTP	200 uM	Alineamiento	30 seg	55°C	
Oligo directo	200 nM	Extensión	X	72°C	
Oligo reverso	200 nM	Extensión Final	3 min	72°C	
Taq Polimerasa	1-2 Unidades				
Agua					

**Tabla 11. PCR.**

El tiempo de extensión X fue ajustado de acuerdo al fragmento de DNA a amplificar (~1 min por kb)

#### 6.2.1.4. Retrotranscripción.

Para los experimentos de qPCR detallados en el apartado **2.1.3.3**, el RNA (2 µg/µL) de cada muestra fue utilizado como sustrato para la síntesis de cDNA de hebra simple mediante una reacción de transcripción inversa, utilizando 200 U de la enzima MMLV-RT (Invitrogen) y 2,5 µM de Oligo dT (18 nucleótido) como primer para la reacción. Previo a la síntesis de cDNA se llevó a cabo un tratamiento con DNasa de las muestras de RNA a utilizar.

La síntesis fue llevada a cabo siguiendo el protocolo del kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* de Roche. Finalmente, se prepararon diluciones de 1:2 y luego 1:10 (concentración 15-25 ng/µL) para su uso como sustrato para los experimentos de qPCR.

Procedimiento:

- a) Tratamiento con DNasa de RNA usando DNase free de AMBION.
  - X µL muestra RNA (8,5 µg), H<sub>2</sub>O hasta los 44 µL.
  - 5 µL tampón DNasa I 10X
  - 1 µL DNasa.

Se incuba por 20-30 min a 37°C.

Se agregan 5  $\mu\text{L}$  DNase Inactivation Reagent, y se incuba por 2 min a TA, luego de lo cual se centrifuga a 10000 xg durante 90 seg. Se trasfiere el RNA a un tubo nuevo.

b) Retrotranscripción: Se utilizan 10,5  $\mu\text{l}$  (~2 g) de la reacción anterior:

- 10,5  $\mu\text{L}$  muestra RNA del paso anterior
- 1  $\mu\text{L}$  of oligo(dT)18 (50 pmol/ $\mu\text{L}$ ).
- 1,5  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O.

Incubar a 65°C durante 10 min, rápidamente poner en hielo.

Agregar:

- 4  $\mu\text{L}$  tampón TRT 5x.
- 0,5  $\mu\text{L}$  Protector RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ ).
- 2  $\mu\text{L}$  Mezcla Deoxinucleótidos (10 mM cada uno)
- 0,5 Transcriptasa Inversa (20 U/ $\mu\text{L}$ ) RNA guard.

Incubar a 55°C durante 30 min, inactivar la Transcriptasa Inversa incubando 5 min a 85°C. Poner la reacción en hielo y preparar las diluciones a utilizar.

#### **6.2.1.5. PCR Cuantitativo en tiempo real (qPCR).**

En los ensayos de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) se utilizó como sustrato la dilución 1:10 de cDNA descrita en el apartado 2.1.3.1. Las reacciones de amplificación se realizaron en el equipo Roche Light Cycler®480 bajo las siguientes condiciones generales: 10  $\mu\text{L}$  Roche Light Cycler®480 SYBR Green I master MIX, 300 nM de cada oligonucleótido, 15-25 ng/ $\mu\text{L}$  de cDNA, en 20  $\mu\text{L}$  de reacción. El programa de amplificación fue diseñado utilizando el Roche Light Cycler® 480 (versión 1.5.0SP3). Este programa incluyó una etapa de activación a 95°C por 10 min, una etapa de amplificación de 45 ciclos con denaturación 95°C por 10 seg, alineamiento a 60°C por 30 seg y una extensión 72°C por 25 seg.

La cuantificación de la abundancia de cada transcrito en las muestras se realizó mediante el programa Roche Light Cycler® 480 (versión 1.5.0SP3).

#### **6.2.1.6. Clonaje de fragmentos de DNA.**

a) **Amplificados por PCR:** Los productos obtenidos de la reacción de PCR y purificados, se clonaron en el sistema PCRII-TOPO (Invitrogen), siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

b) **De digestiones:** Los fragmentos de DNA tratados con enzimas de restricción y purificados de geles Agarosa/TBE, se clonaron en vectores de clonaje, binarios, etc, usando el método de la ligación

**Ligación:** 2  $\mu$ L de fragmento purificado, 1  $\mu$ L vector digerido, 1  $\mu$ L tampón de ligación 10x, 1  $\mu$ L enzima ligasa y 5  $\mu$ L agua. Incubación O/N a 16°C

### 6.2.1.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Los productos de PCR o fragmentos de DNA procedentes de digestiones se separaron en geles de agarosa/TBE con 1% (p/v) agarosa con el colorante de ácidos nucleicos *GelRed* de BIOTIUM (1:10000), en TBE 0,5x, junto con un marcador de peso molecular.

Soluciones empleadas:

**-Tampón de carga 6x:** glicerol 30% (v/v), xilencianol FF 0,25% (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), EDTA 0,5 M pH 8,0.

**-Tampón TBE 10x:** Tris base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 20 mM pH 8,0.

### 6.2.1.8. Secuenciación del DNA.

Los fragmentos clonados por PCR fueron secuenciados para verificar la identidad de la clones en el Servicio de Secuenciación del CRAG. El método de secuenciación automática usado se basa en la secuenciación por terminador fluorescente y da un promedio de 600 – 700 pb lecturas por reacción. Las secuencias obtenidas se procesaron mediante programas bioinformáticos gratuitos de Internet, como Bioedit, ClustalW, BLAST, etc.

### 6.2.1.9. Purificación de fragmentos de DNA.

El DNA se purificó según diferentes protocolos según su procedencia y la pureza final deseada. A continuación se presenta los principales métodos de purificación usados.

#### **6.2.1.9.1. Purificación de DNA a partir de geles de Agarosa/TBE.**

Los fragmentos de DNA resultantes en geles de agarosa/TBE se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **6.2.1.9.2. Purificación de productos de PCR.**

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **6.2.1.10. Precipitación de DNA.**

La precipitación de fragmentos de DNA se realizó siguiendo el protocolo de precipitación de ácidos nucleicos por acetato de sodio (Sambrook, 2001).

##### Procedimiento:

1. Agregar 1 volumen de fenol:cloroformo, mezclar con el vórtex y centrifugar por 5 min en microfuga a velocidad máxima. Recuperar la fase acuosa (superior).
2. Agregar 0,1 volúmenes de AcNa 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.
3. Mezclar y dejar 2-5 min en hielo.
4. Centrifugar 10 min a velocidad máxima. Descartar el sobrenadante.
5. Agregar 250  $\mu$ L de etanol 70% (v/v). Centrifugar 5 min a velocidad máxima y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender los ácidos nucleicos en 50  $\mu$ L de tampón TE.

#### **6.2.1.11. Obtención de RNA total de Arabidopsis.**

El aislamiento de RNA se hizo a partir de plántulas de arabidopsis congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dependiendo del uso que se le daría al RNA se utilizaron 2 diferentes métodos.

### a) Método Fenol/Cloroformo.

El RNA obtenido con este método fue usado para *RNA-blot*.

#### Procedimiento:

1. Triturar la muestra (100-300 mg) en un mortero con nitrógeno líquido hasta que quede un polvo fino. La muestra no se ha de descongelar en ningún momento.
2. Pasar el tejido triturado en un tubo Eppendorf de 2 mL previamente enfriado en nitrógeno líquido. Agregar 500  $\mu$ L de tampón de extracción y 500  $\mu$ L de fenol:cloroformo. Mezclar bien con el vórtex y mantener el tubo en hielo hasta que se procesen todas las muestras. Centrifugar en microcentrífuga 10 min a 13000 rpm a 4°C.  
Transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo Eppendorf de 1,5 mL. Agregar 1 volumen de cloroformo, mezclar con el vórtex. Centrifugar 10 min a 13000 rpm a 4°C.
3. Transferir la fase acuosa (superior) a un nuevo Eppendorf de 1,5 mL. Agregar 1 volumen de 4M acetato de litio, mezclar con el vórtex. Dejar en hielo O/N.
4. Centrifugar 10 min a 13000 rpm a 4°C.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender inmediatamente el sedimento en 300  $\mu$ L de agua estéril y 30  $\mu$ L de 3 M acetato de sodio.
6. Agregar 2,5 volúmenes de etanol 100% para precipitar el RNA. Centrifugar 10 min a 13000 rpm a 4°C.
7. Eliminar el sobrenadante y agregar 500  $\mu$ L de etanol 70% (v/v). Centrifugar 10 min a 13000 rpm a 4°C.
8. Eliminar el sobrenadante y dejar que el sedimento se seque totalmente a TA.
9. Resuspender el sedimento en 50-100  $\mu$ L de agua estéril. Guardar el RNA a -20°C o -80°C.

Soluciones empleadas:

- **Tampón de extracción:** Tris-HCl 10 mM pH7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM.  
Después de autoclavar se le agrega SDS 1% (p/v).

- **4M Acetato de litio:** 40,8 g de acetato de litio en 100 mL de agua.

#### **b) Purificación por Kit.**

Con el fin de obtener RNAs puros para usarlos como molde para la generación de cDNA y análisis de expresión por qPCR, las extracciones se realizaron utilizando el Kit RNAeasy

kit de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **6.2.1.12. Cuantificación de ácidos nucleicos.**

La cantidad de DNA o de RNA presente en una muestra se midió en el espectrofotómetro, leyendo la D.O. a una  $\lambda$  de 260 nm. Un valor 1 de D.O. a 260 nm corresponde aproximadamente a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de DNA bicatenario y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNA. La pureza de las muestras de ácidos nucleicos se determinó calculando las relaciones entre las absorbancias a 260nm, 280 nm y 230 nm. La relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm indica la presencia de proteínas si da fuera del rango de 1,7-2. La relación entre la absorbancia a 260 nm y 230 nm proporciona información sobre la presencia de polifenoles en la muestra.

#### **6.2.1.13. Análisis de RNA por *RNA-blot*.**

##### **6.2.1.13.1. Preparación de las muestras.**

Las muestras se prepararon agregando 16  $\mu\text{L}$  del tampón de carga para RNA a 10  $\mu\text{g}$  de RNA total en un volumen de 10  $\mu\text{L}$ . Las muestras se desnaturalizaron por 15 min a 65°C y luego se mantuvieron en hielo hasta el momento de cargarlas.

##### **- Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (p/v).**

El gel se preparó poniendo 1,8 g de agarosa en 105 mL de agua y 15 mL de MEN 10x. Tras llevar la mezcla a ebullición en el microondas, Se dejó enfriar hasta aproximadamente 65°C y se agregó 30 mL de formaldehído 37,5%. Se mezcló bien, se

puso en el portageles y se dejó enfriar. El tampón de electroforesis fue MEN 1x, que se agregó hasta el nivel del gel sin cubrirlo en la parte superior. Se cargaron las muestras y se acabó de cubrir los pocillos con tampón MEN 1x. Se corrió el gel a 100 V durante 1 h en campana de gases.

#### - **Transferencia a membrana de nylon.**

Después de la electroforesis el gel de RNA se lavó con agua durante 10 min para eliminar el exceso de formaldehído, y se procedió a transferir el RNA a una membrana de nylon *Amersham Hybond-N* por capilaridad en presencia de un tampón de elevada fuerza iónica (SSC 10x).

Procedimiento:

1. Colocar el gel invertido sobre un papel Whatman 3MM previamente humedecido con el tampón, que hace de puente para la absorción por capilaridad del tampón de transferencia SSC 10x. Las burbujas que pueden quedar entre el gel y el papel se eliminan con la ayuda de una pipeta de vidrio.
2. Humedecer la membrana de nylon de la medida del gel en agua y colocarla sobre el gel, eliminando las burbujas de la manera descrita anteriormente.
3. Humedecer un papel Whatman 3MM de la medida del gel, colocarlo sobre la membrana de nylon y eliminar las burbujas.
4. Agregar unos cuantos papeles Whatman 3MM secos y una pila de papeles absorbentes.
5. Colocar un vidrio encima como un peso para hacer presión sobre el gel. Dejar transferir O/N a TA.
6. Retirar la membrana de nylon y fijar el RNA a la membrana con un *stratalinker* (Stratagene) que une covalentemente el RNA a la membrana mediante radiación UV.

Soluciones empleadas:

- **Tampón de carga para RNA:** formamida desionizada, formaldehído 37,5% y tampón MEN 10x (30:9:7, v:v:v).
- **Tampón SSC 20x:** NaCl 3 M, Citrato sódico 0,3 M

- **Tampón MEN 10x:** MOPS 200 mM, CH<sub>3</sub>COONa 50 mM, EDTA 10 mM.

- **Tinción de la membrana para comprobar la transferencia del RNA.**

Se visualizó el RNA en la membrana para comprobar la eficiencia de la transferencia y la calidad del RNA transferido incubando el gel con una solución de azul de metileno (Wilkinson et al., 1991).

Procedimiento:

1. Cubrir la membrana de nylon después de la transferencia y fijación del RNA con la cantidad suficiente de solución de azul de metileno. Agitación durante unos minutos
2. Cuando la membrana se vea teñida, retirar la solución de azul de metileno y hacer unos cuantos lavados con agua destilada, hasta que se elimine el exceso de solución.
3. Si se desea guardar un registro de la tinción, se puede escanear la membrana o simplemente hacer una fotocopia.
4. Lavar la membrana con solución de lavado hasta que desaparezca totalmente la tinción.

Soluciones empleadas:

- **Solución de azul de metileno:** azul de metileno 0,03% (p/v), NaAc 0,3 M, en agua.
- **Solución de lavado:** SSC 1% (v/v), SDS 1% (v/v).

**6.2.1.13.2. Obtención de sondas de DNA y marcaje radioactivo.**

- **Generación de sondas de DNA.**

En algunos casos se disponía de plásmidos que contenían el fragmento de DNA a marcar para las hibridaciones de *northern-blot*. Cuando no era el caso, los fragmentos de DNA se generaron amplificando por PCR DNA genómico (Col-0) con oligonucleóticos específicos para cada gen. Los productos de PCR se subclonaron en el vector pCRII-TOPO. La identidad de los insertos se confirmó por secuenciación y posteriormente se aislaron por digestión con enzimas de restricción o por PCR con

oligonucleótidos específicos. Estos productos son los que se marcaron radiactivamente y utilizaron como sondas para las hibridaciones.

#### **- Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA.**

El marcaje se realizó basándose empleando la Taq polimerasa no comercial en una PCR. Se preparó una reacción de PCR agregando tampón PCR 10x, dNTPs-CTP, oligonucleótido reverso, Taq polimerasa, agua y el fragmento de DNA en un volumen final de 48  $\mu$ L. A esta reacción se le agregó en el Hot Lab 2  $\mu$ L de  $\alpha$ 32P-dCTP y se puso en marcha el programa de PCR. Finalizado esto la sonda se purificó en una microcolumna de Sephadex G-50 (ProbeQuant G-50, Amersham Biosciences).

#### **6.2.1.13.3. Hibridación de membranas *RNA-blot* con sondas de DNA.**

##### Procedimiento:

1. Prehibridar la membrana durante >30 min en un volumen de 10 mL de tampón Church dentro de un cilindro de hibridación a 65°C.
2. Desnaturalizar la sonda radioactiva durante 3 min a 100°C justo antes de utilizarla. Ponerla inmediatamente en hielo.
3. Agregar la sonda radioactiva al tampón Church.
4. Hibridar la membrana a 65°C un mínimo de 5 h (es recomendable dejarla O/N).
5. Hacer 3 lavados de 20 min con tampón de lavado a 65°C.
6. Sellar la membrana dentro de una bolsa plástico y exponer sobre una pantalla de marca *PhosphorImage*.

El marcaje se visualiza utilizando el densitómetro *Molecular Imager FX* (Biorad), y las intensidades de banda se cuantifican utilizando el software *Quantity One* (BioRad).

Soluciones empleadas:

- **Tampón Church de hibridación y prehibridación:** SDS 7% (p/v), EDTA 1 mM, tampón fosfato 0,125 M pH 7,2.
- **Tampón de lavado:** SDS 2% (p/v), EDTA 2 mM, tampón fosfato 40 mM pH 7,2.

## 6.2.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR DE PROTEÍNAS.

### 6.2.2.1. Producción y purificación de proteínas.

Para la producción de proteínas se emplearon dos estrategias, una como proteína recombinante en *E.coli*, y otro *in vitro* usando el kit de TnT de Promega.

#### 6.2.2.1.1. Producción de proteínas recombinantes en cultivos de *E.coli*.

Algunos de los vectores indicados en la **Tabla 9** fueron usados para producir proteínas de nuestro interés fusionados a diferentes tag, como GST, HIS, MBP, entre otros.

##### Procedimiento:

1. Tomar 3 colonias aisladas y crecerlas en un precultivo líquido O/N en 3 mL LB más los antibióticos correspondientes.
2. En un Erlenmeyer 200 ml de LB mas los antibióticos correspondientes inocular 1 mL del precultivo (dilución 1:200). Luego de aproximadamente 4 h medir la DO<sub>600</sub>, y cuando esté entre 0.5-0.7 seguir con el siguiente paso.
3. Tomar 1 ml del cultivo, ponerlo en un Eppendorf y guardar en hielo (**T0**).
4. Al resto de cultivo agregar IPTG en una concentración final de 1 mM.
5. Incubar el cultivo por 4 h en el shaker a 28°C
6. Cumplidas las 4 h, tomar 1 ml del cultivo, ponerlo en un Eppendorf y guardar en hielo (**T4**). Centrifugar las muestras T0h y T4h por 3 min a velocidad máxima. Resuspender el pellet resultante en 50 µL de agua y 50 µL de TM/Bmercaptoetanol 2x (1:10).
7. El cultivo grande se centrifugará durante 10 min a 7500 rpm.
8. Preparar el tampón de lisis y agregar los respectivos inhibidores de proteasas. **Tabla 12**

Inhibidores de Proteasas	Stock	Concetración de trabajo
Leupeptina	21 mM	105 uM
Pepstatina	1,46 mM	1,46 mM
Aprotinina	10 mg/mL	10 ug/mL
E-64	1 mg/mL	1 ug/mL
PMSF	100 mM	100 uM

Tabla 12. Inhibidores de Proteasas.

9. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 20 mL de tampón de lisis.
10. Guardar el contenido a -80°C.
11. Sonicar por 30 seg (3 veces) la muestra (mantener siempre la muestra en hielo).
12. Centrifugar por 15 min a 10000xg a 4°C. Luego de la centrifugación guardar 1 mL de ambas fases y tratarlas como las muestras en el punto 6.
13. Al resto de fase soluble agregar 200 µL de resina 50% *slurry* y resuspender por agitación orbital durante 90 min.
14. Centrifugar por 5 min a 500xg, luego de lo cual eliminar el sobrenadante (almacenar 1 mL).
15. Lavar la resina con 5 mL de tampón binding por cada mL de *slurry* usado, y mezclar por inversión.
16. Centrifugar por 5 min a 500xg, luego de lo cual eliminar el sobrenadante (almacenar 1 mL).
17. Repetir el paso 15 y 16 dos veces más.
18. Eluir la proteína con 500 µL de tampón de elusión por mL de *slurry* usado. Incubar por 10 min con agitación constante.
19. Centrifugar por 5 min a 500xg, y rescatar el sobrenadante.
20. Repetir el paso 18 y 19 dos veces más para tener un total de 3 eluidos a analizar.

#### **6.2.2.1.2. Producción de proteínas a través de kit.**

Se usó el Kit TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega), que permite la transcripción y traducción in vitro de una proteína a partir de un plásmido o fragmento de DNA inicial que contengan los promotores para SP6, T3 o T7 RNA polimerasa.

##### Procedimiento:

1. Previamente se disponía de los genes a traducir clonados en vectores pGEX o pCambia (ver **sección 1.4**). Ninguno de estos vectores dispone de las secuencias de los promotores para SP6, T3 o T7 RNA polimerasa.

2. Utilizando estos vectores como molde, se amplificaron mediante dos PCR secuenciales los genes de interés utilizando oligonucleótidos del plásmido y otros dos que agregaron al producto de amplificación final el extremo 5' del promotor T7 (1ª PCR) y una cola poli T (2ª PCR) para tener la estructura básica que se necesita para la transcripción.
3. Los productos amplificados se purificaron y cuantificaron.
4. Con los productos cuantificados (entre 100 ng y 1 µg es lo óptimo) se realizó los cálculos para llevar a cabo una reacción fría (sin metionina radioactiva) y caliente (con metionina radioactiva):
5. Las reacciones se incubaron a 37°C por 90 min. .
6. Finalizada la reacción, las producciones de proteínas sin radioactividad se les agregó 15% de glicerol y se almacenaron a -80°.
7. Las proteínas de la reacción caliente fueron usadas para electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, para visualizar si hubo síntesis de proteína.
8. Después de la electroforesis, el gel fue secado en un secador durante 90 min.
9. El gel seco se expuso sobre una pantalla de marca *PhosphorImage*. El marcaje se visualizó utilizando el densitómetro *Molecular Imager FX* (Biorad), y las intensidades de banda se cuantificaron utilizando el software *Quantity One* (BioRad).
10. La síntesis radioactiva luego fue descartada y se analizó la síntesis proteica mediante ensayos de western-blot de las reacciones frías.

#### **6.2.2.2. Cuantificación de proteínas.**

Las muestras obtenidas a partir de proteínas fueron cuantificadas utilizando el método de Bradford. Las absorbancias fueron detectadas a 595nm en un espectrofotómetro e interpoladas en una curva de calibración hecha a partir de las longitudes de onda de muestra de BSA de concentración conocida.

#### **6.2.2.3. Separación electroforética de proteínas.**

Todos los análisis electroforéticos de este trabajo fueron hechos en geles de poliacrilamida desnaturalizantes SDS-12% PAGE.

- Se armó la estructura para preparar el gel, que consistió en poner los vidrios donde polimerizaría el gel, en el soporte de vidrios del *miniprotean*.
- Una vez armada la estructura se preparó el gel separador (al 12%, **Tabla 13**) y se agregaron 7 mL de ésta entre los vidrios. Sobre la solución se agregó 1 mL de agua para ayudar a la polimerización.
- Polimerizada la fase separadora, se absorbió retiro el agua que la cubría y se agregaron 3 mL del gel concentrador (al 4%, **Tabla 13**) y se puso el peine el cual dejaría los posillos para luego cargar las muestras.

<b>Stock</b>	<b>Gel Separador</b>	<b>Gel Concentrador</b>
Acilamida 40%	2,4 mL	300 uL
Tampón Lower 4x	2,0 mL	-
Tampón Upper 4x	-	750 uL
Agua	3,6 mL	1,95 mL
APS 10x	50 uL	20 uL
TEMED	5,5 uL	5 uL

**Tabla 13. Composición del gel separador y concentrador.**

- Una vez polimerizada la fase concentradora, la estructura de vidrio contenedora del gel, fue sacada del soporte, se retiro el peine y se lavaron los posillos con agua.
- La estructura limpia fue colocada dentro de la cubeta de electroforesis.
- Preparación de muestras: los extractos proteicos y purificados fueron preparados 1:1 con el buffer TM/Bmercaptoetanol 2x. La mezcla fue hervida por 3 min a 95°C luego de lo cual se centrifugó a máxima velocidad por 2 min El sobrenadante de la mezcla fue cargado en el gel.
- Electroforesis: Los geles fueron corridos a 20 mA por gel a un voltaje de 150 V por 2 h.

#### **6.2.2.4. Detección de proteínas por tinción de Coomassie.**

- Luego de electroforesis, la parte separadora del gel se incubó en Coomassie por 30 min en agitación.

- Se lavó el gel dos veces durante 10 min con una solución de metanol:ácido acético:agua (30:10:60, v:v:v) en agitación.
- Se lavó el gel por con agua por toda la noche.

### **6.2.2.5. Detección proteica por Western Blot.**

A partir del obtenido en la sección 2.2.1 se realizó el siguiente procedimiento para analizar las proteínas por Western blot.

#### Procedimiento:

1. Las proteínas contenidas en el gel SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa según el método húmedo descrito por Towbin et al\_79. La transferencia se realizó en un Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de BioRad, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se utilizó 750 mL de tampón de transferencia y las condiciones del proceso fueron 1 h a 4°C, con un voltaje de 140 V.
2. Luego de la transferencia la membrana fue bloqueada con 25 mL de tampón de bloqueo (TBST 1x + leche desnatada en polvo 5% p/v) durante 30 min a temperatura ambiental (TA)
3. Se eliminó la solución de bloqueo y se incubó la membrana con el anticuerpo primario en 12 mL de TBST 1x + leche desnatada 0,5% p/v, O/N a 4°C.
4. La membrana fue lavada 3 veces por 10 min con 20 mL de TBST 1x a TA.
5. La membrana fue incubada con el anticuerpo secundario por 45 min a TA en 12 mL de TBST 1x + leche desnatada 5% p/v.
6. La membrana fue lavada 3 veces por 10 min con solución 20 mL TBST 1x a TA.
7. Se agregó el reactivo quimiolumincente ECL Plus, y la membrana fue revelada en el equipo LAS4000.

Soluciones empleadas:

- **Tampón de Transferencia:** 75 mL de tampón Towbin 10x, 75 mL de metanol y 600 mL de Agua.
- **Tampón Towbin:** 30 g Tris-base, 144 g glicina, 100 mL SDS 10% (p/v).
- **Tampón TBST 10x:** 200 mL Tris pH 7,5 1M, 300 mL NaCl 5M, 10 mL Tween 20 y 490 mL de agua.

### 6.2.3. Técnicas de biología molecular de interacciones.

#### 6.2.3.1. Y2H.

Transformar la cepa pJ694 $\alpha$  con el plásmido con la proteína fusionada al BD (BD-X) y plaquear en medio SD-T. Transformar la cepa YM4271a con el plásmido con la proteína fusionada al AD (AD-Y) y plaquear en medio SD-LT.

#### Procedimiento:

1. Inocular dos cultivos de 2 mL de medio YPAD con colonias frescas: uno expresa BD-X (tubo 1) y el otro AD-Y (tubo 2). Realizar este proceso por cada interacción que se quiera analizar. Crecer a 28°C durante 24 h con agitación.
2. Preparación de *mating*. Añadir en un tubo de 10 mL (tubo 3) 500  $\mu$ L de cultivo del tubo 1 (BD-X) y 500  $\mu$ L del cultivo del tubo 2 (AD-Y). Mezclar e incubar durante 48 h a 28°C sin agitación.
3. Preparación de *enriquecimiento para las células diploides*. Inocular 2 mL de SD-LT (tubo 4) con 200  $\mu$ L del tubo 3 e incubar a 28°C con agitación (48 h).
4. Preparar 3 diluciones del cultivo del tubo 4: sin diluir,  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .
5. Plaquear en forma de gota 5 o 10  $\mu$ L de las diluciones en medio de agar SD-LT (comprobación de mating) y SD-HLT (comprobación de la interacción de las proteínas).

Soluciones empleadas:

- **Medio YPAD (500 mL):** 10 g Peptona, 5 g Yeast extract, 10 g D-glucosa, 10 g Agar (Difco o BD). Ajustar el pH a 5,8 en un volumen de 500  $\mu$ L. Autoclavar el medio

durante 15 minutos. Cuando se enfría a 55°C, añadir 7,5 ml de la solución de Adenina hemisulfato 0,2% (p/v).

**-Medio SD-: (450 mL):** 3,35 g de Yeast Nitrogen Base (without amino acids), 10 g D-glucosa, 10 gr Agar (Difco o BD). Ajustar el pH a 5,8 en un volumen de 450 mL. Autoclavar el medio durante 15 min. Cuando se enfría a 55 °C, añadir 50 mL de la solución DO 10x apropiada.

**- DO-LT 10x (200 mL):** 1,28 g DO-LT en 200 mL de agua. Autoclavar 15 minutos.

**-DO-HLT 10x (200 mL):** 1,20 g DO-Ade-His-Leu-Met-Trp + 40 g L-adenina hemisulfato + 40 mg de L-metionina en 200 mL de agua. Autoclavar 15 min.

### **6.2.3.2. BiFC.**

Para estudiar la interacción entre PAR1 y los BEE, se va han realizar experimentos de complementación bimolecular de la YFP bombardeando células de cebollas, con una pistola génica.

#### **Preparación de microproyectiles.**

Todo el procedimiento debe realizarse en campana de flujo laminar

1. Lavar 60 mg de partículas de oro con 1 mL de etanol absoluto (HPLC)
2. Agitar con vórtex durante 10 min.
3. Centrifugar durante 1 min a 10000 rpm y eliminar el sobrenadante,
4. Lavar con 1 mL de glicerol estéril 50%. Mezclar con vórtex por 30 seg.
5. Centrifugar 1 min a 10000 rpm y eliminar el sobrenadante.
6. Repetir el lavado con glicerol dos vecesn más.
7. Alicuotar en Eppendorf 40 µL de la mezcla que serán usados para la biobalística.

#### **Preparación del tejido Vegetal.**

Todo el procedimiento debe realizarse en campana de flujo laminar

1. Cortar la cebolla en cuartos.

2. Mediante el uso de pinzas estériles separar las capas mas jóvenes de la cebollas que se encuentran en el interior y cortar pequeños cuadrado que serán colocados en placas con medio MS1.
3. Dejar las placas reposar con el tejido vegetal por 4 h.

#### **Precipitación del DNA (protocolo de Klein et al., 1998 modificado).**

1. En el tubo Eppendorf que contiene los 40  $\mu\text{L}$  de partículas de oro, agregar secuencialmente lo siguiente seguido de un vórtex de 5 min después de cada paso:
  - a) 10  $\mu\text{l}$  de DNA (4  $\mu\text{g}$  de cada plásmido a usar y el resto de agua).
  - b) 100  $\mu\text{L}$  de agua estéril.
  - c) 150  $\mu\text{L}$  de una solución  $\text{CaCl}_2$ /espermidina (125  $\mu\text{l}$   $\text{Ca}_2\text{Cl}$  2.5 M + 25 $\mu\text{l}$  espermidina 0.1 M)
2. Sedimentar las particular en hielo durante 15 min.
3. Centrifugar por 30 seg y descartar el sobrenadante.
4. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (HPLC) y mezclar por 20 seg.
5. Repetir los pasos 2-4.
6. Resuspender en 15  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (HPLC) y dejar en hielo.
7. Sonicar por 10 seg y mezclar con vórtex por 10 seg. Hacer esto 2 veces seguidas.
8. Dejar las muestras en hielo hasta el momento del bombardeo.

#### **Preparación de la bomba PDS1000/He.**

1. Encender la cabina de flujo laminar. Esterilizar todos los materiales a usar (disco de rupturas, rejillas, membranas, etc) con etanol absoluto.
2. Encender la bomba de vacío. Abrir la bomba de helio. Ajustar la presión de trabajo.

#### **Bombardeo con el sistema PDS-1000/He.**

1. Poner 8  $\mu\text{L}$  sobre la membrana portadora y dejar secar unos 5 min.
2. Armar el soporte disparador con la membrana incluida.
3. Poner las placas MS1 con la muestra vegetal bajo el disparador.
4. Accionar la bomba de vacío hasta 0,1 atm, dejándola fija.

5. Accionar el botón de disparo hasta sentir el disparo, luego de lo cual se suelta. Quitar el vacío y sacar la placa bombardeada.
6. Guardar la placa en condiciones de oscuridad a 22°C por 24 horas.

### **Visualización de interacción.**

La fluorescencia de la recomposición de la YFP se va a analizar en un microscopio confocal Leica TCS SP, utilizando la línea de excitación de Argón a 488nm.

Soluciones empleadas:

- **Etanol 100**
- **Glicerol 50%:** 125 mL de glicerol y 125 mL de agua.
- **Espermidina 0.1M “free base”:** FR26; FW:145.2 g/mol. Se alicuota en 14 µL en Eppendorf de 1,5mL.
- **CaCl<sub>2</sub> 2.5M:** S42; FW: 147.02 g/mol

### **6.2.3.3. EMSA.**

#### **Síntesis y Marcaje de Sonda.**

##### Procedimiento:

1. Sondas mostradas en sección 4 de resultados si sintetizaron mezclando 1 nmol de 2 oligos complementarios en un volumen final de 100 µL. La mezcla fue precipitada para luego disolverla en 100 µL de NaCl 50 mM.
2. Luego de esto, el Eppendorf se incubó en agua hirviendo por 30 min para promover el alineamiento.
3. El producto de la reacción fue diluido 1:10 en agua para tener una concentración de trabajo de la sonda de 1 µM.
4. Con la sonda preparada se procedió a realizar la reacción de marcaje. En un tubo Eppendorf se agregaron 5 µL de la sonda generada previmante (1µM), 5 µL tampón H, 2 µl dCTP Alpha 32P, 73 µL de Agua y 1 µl de la enzima Klenow.
5. Se Incubó la reacción por 15 min a 37°C.
6. Luego se agregó 2 µl de dCTP 0,5 M e incubó por 15 min a 37°C.

7. Terminada la reacción, se purificó la sonda en una microcolumna de Sephadex G-25 (ProbeQuant G-25, Amersham Biosciences).

8. Se cuantificó las cuentas por minuto (CPM) de la sonda usando un Contador de Centelleo en 1  $\mu$ L de tres diluciones de la sonda purificada (1, 1:2 y 1:4). Luego de esto se sacó un promedio de las CPM y se calculó el volumen para preparar la sonda a 20000 CPM.

## **Electroforesis.**

### Procedimiento:

1. Se preparó un gel de acrilamida al 4% (40 mL de agua, 5 mL de acrilamida 40%, 5 mL de TBE 5x, 300  $\mu$ L APS 10% y 50  $\mu$ L de TEMED).

2. Se prepararon las muestras para correr en el gel. Cada muestra de volumen final 10  $\mu$ L se compuso en su mayoría de las veces de 1  $\mu$ L de proteína o tampón de carga, 1  $\mu$ L de tampón BBN 10x, 1  $\mu$ L de glicerol, 1  $\mu$ L de polydidC, 2  $\mu$ L de la sonda marcada y 4  $\mu$ L de agua.

3. Las reacciones fueron incubadas en hielo por 4 h.

4. 9  $\mu$ L de cada muestra fuer cargada en el gel preparado previamente y se migro en el modelo de electroforesis Hoffer durante 90 min a 140 V con máximo A.

5. Luego de los 90 min el gel fue secado en un secador de genes por 90 min, después de lo cual se expuso sobre una pantalla de marca *PhosphorImage*.

6. El marcaje se visualizó utilizando el densitómetro *Molecular Imager FX* (Biorad), y las intensidades de banda se cuantificaron utilizando el software Quantity One (BioRad).

## **6.2.4. Métodos de plantas.**

### **6.2.4.1. Esterilización y siembra de semillas.**

#### Procedimiento:

1. Embeber las semillas en 1 mL de Tween-20 0,1% (v/v) durante 20 min.

2. Eliminar la solución de Tween-20 y agregar 1 mL de hipoclorito sódico 10% (v/v), Tween-20 0,1% (v/v). Agitar y dejar actuar durante 10 min Este paso

es crítico y si se excede el tiempo de tratamiento la viabilidad de las semillas se reduce.

3. Lavar las semillas con 1 mL de agua estéril 5 veces consecutivas.
4. Finalmente, sembrar las semillas en placas que contengan medio GM-0,5x suplementado o no con antibióticos y/o hormonas.

Dependiendo del tipo de experimento que se hace, las semillas se siembran de la siguiente manera:

#### **a) Siembra de semillas en grupo sobre medio de cultivo.**

Cuando se trata de la selección de semillas de generación T1 procedentes de plantas transformadas con *Agrobacterium*, entre 1000-2000 semillas se siembran en grupo sobre el medio de cultivo de selección.

##### Procedimiento:

1. Retirar el agua de último lavado de la esterilización.
2. Resuspender las semillas en 2,5 mL de solución estéril de agarosa 0,1% (p/v).
3. Volcar la solución de agarosa con semillas sobre el medio sólido GM-0,5x que contiene el antibiótico de selección correspondiente y el antibiótico cefotaxima. Este último antibiótico inhibe la proliferación de los posibles restos de *Agrobacterium* sin afectar el crecimiento de la planta. Distribuir las semillas por toda la superficie de la placa y dejar secar en la campana con las placas abierta. Este sistema permite que las semillas se distribuyan homogéneamente por la superficie del medio sin que se aglomeren.

#### **b) Siembra de semillas individualmente sobre medio de cultivo.**

Cuando se trata de facilitar el recuento de plántulas (por ejemplo, en estudios de segregación de un transgen) o para los experimentos fisiológicos, las semillas se siembran una a una directamente sobre el medio de cultivo en una densidad aproximada de 100 semillas por placas (9,5 cm de diámetro).

##### Procedimiento:

1. Resuspender las semillas en el agua del último lavado de esterilización.

2. Pipetear unas 15-20 semillas con una pipeta P1000 y dejarlas caer una a una sobre el medio sólido correspondiente tocando la punta de la pipeta con el medio.

### **c) Siembra de semillas en grupo sobre papel filtro.**

Cuando se van a hacer análisis de RNA, o bien para realizar algún tratamiento que implique transferir las plántulas a una determinada solución, las semillas se siembran en grupo sobre papel filtro Whatman 3 MM depositado sobre el medio GM-0,5x. La germinación de las semillas sobre el papel de filtro permite que éstas absorban todos los nutrientes del medio a la vez que hace posible la cosecha rápida del material biológico sin restos de medio de cultivo, facilitando la posterior extracción de RNA. Asimismo, se facilita la transferencia de plántulas de una placa a otra.

#### Procedimiento:

1. Resuspender las semillas en el agua del último lavado de la esterilización mediante pipeteo.
2. Volcar las semillas sobre el papel filtro depositado sobre el medio de cultivo de las placas.

Independiente del sistema utilizado, una vez sembrada las semillas las placas se sellan con cinta porosa microporo y se envuelven en papel de aluminio para someterlas a estratificación.

### **6.2.4.2. Obtención de dobles mutantes por cruzamiento.**

El cruzamiento entre una línea 1 y línea 2 se realizó entre los ovarios de flores emasculadas (flores a las que se les elimina los estambres) de la línea 1 con polen de la línea 2. Con el fin de asegurar que los ovarios a cruzar fuesen receptivos a la fecundación pero que no estuviesen autopolinizados con anterioridad, se escogieron 2-3 flores jóvenes inmediatamente antes de la antesis (cuando los pétalos se abren) de una inflorescencia. Previamente a la emasculación se eliminó el resto de capullos florales, flores en antesis o estadios posteriores de desarrollo y frutos (silicuas) presente en la inflorescencia de las flores seleccionadas. Este paso aseguraba que los cruzamientos

recibiesen suficiente aporte de nutrientes para la formación de semillas y facilitaba la identificación de la silicua resultante del cruzamiento. Si la fecundación con el polen de la línea 2 se produjese con éxito, se desarrolla una silicua que se deja madurar y secar durante 18-20 días para recoger sus semillas (generación F1 del cruzamiento). La autofecundación de las plantas F1 da lugar a las semillas de la generación F2 y la autofecundación de individuos F2 a las semillas de la generación F3.

### **6.2.4.3. Tratamiento de plántas.**

#### **6.2.4.3.1. Tratamiento de sombra simulada.**

Tras sembrar semillas de las líneas de interés en placa y después de 3-5 días de estratificación, se pasaron las placas en luz blanca (W) ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  de PAR; razón R:FR de 3.2–4.5) a 22°C en la cámara de crecimiento Percival. Al segundo día, un grupo de plantas se mantuvieron en luz W mientras que sus replicas fueron puestas en luz W+FR. Cinco días después, es decir en día 7 (7d) de edad de las plántulas, se hizo imágenes de las plántulas para analizar su fenotipo.

La luz monocromática FR se generó con una lámpara LED (QBEAm 2200, longitudinal de onda de 727 nm). La sombra simulada se generó enriqueciendo la luz blanca con la luz FR, la cual produce una razón R:FR de 0,07.

#### **6.2.4.3.2. Tratamiento con dexametasona.**

Para analizar fenotipos dependientes de DEX, las plántulas se germinaron en W por 7 días en placas con y sin  $5 \mu\text{M}$  de DEX. Luego de los 7 días se observó el fenotipo.

#### **6.2.4.3.3. Tratamiento hormonales.**

Para analizar la respuesta a giberelinas, las plántulas se germinaron en W por 7 días en placas con 0, 5 y  $10 \mu\text{M}$  de GA3. Luego de los 7 días se hizo medición de hipocotilos.

Para los análisis moleculares de expresión de genes inducidos por auxinas, las plántulas fueron germinadas en W por 7 días en papel filtro sobre placas con medio GM-0,5x.

Luego del séptimo día las plántulas fueron trasferidas a placas con 50  $\mu$ M de la auxina sintética 2,4D y se incubaron por el tiempo requerido para la inducción de genes.

#### **6.2.4.4. Medida de fenotipos fisiológicos.**

Las medidas de la longitud de los hipocotilos de las plántulas se realizaron sobre imágenes digitales utilizando el programa ImageJ (National Institute of Health Image J software. Bethesda, MD, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Para ello los hipocotilos de las plántulas se colocaron planos sobre la placa de agar antes de tomar las imágenes. Se analizó un mínimo de 15 plántulas por tratamiento, y cada tratamiento se repitió 3 veces. En este tipo de análisis se presentó la media de las medidas con las barra de error que indica el error estándar.

#### **6.2.4.5. Obtención de plantas transgénicas.**

##### **6.2.4.5.1. Transformación de plantas de Arabidopsis.**

Plantas de Arabidopsis (ecotipo Col-0) se transformaron por infiltración floral según el método descrito por (Clough et al., 1999), con un cultivo de *A. tumefaciens* portador de la construcción que en cada caso se va a introducir en la planta.

##### Procedimiento:

3. Preparar tiestos de 11,5 cm de diámetro con la superficie de sustrato cubierta por una rejilla de plástico. Sembrar las semillas equidistantes para obtener 6-7 plantas por tiesto.
4. Cuando las plantas han desarrollado inflorescencias de 5-7 cm de longitud (aproximadamente 6 semanas después de la siembra), cortar las inflorescencias a ras de la roseta. Después de 9-10 días las inflorescencias secundarias estarán en un estadio óptimo para la transformación (conteniendo muchas flores y unas pocas silículas).
5. Dos días antes de la transformación, inocular 2 mL de medio YEB con los antibióticos adecuados y la muestra de Agrobacterium portadora de la

construcción a transformar (precultivo). Incubar O/N a 28°C en agitación (200 rpm).

6. Inocular un cultivo de 1 L de medio YEB con los antibióticos adecuados con 1 mL de precultivo. Incubar O/N a 28°C en agitación (200 rpm).

7. Centrifugar el cultivo durante 10 min a 4000xg . Descartar el sobrenadante.

8. Resuspender las células en 300 mL de sacarosa 5% (p/v).

9. Justo antes de transformar las plantas agregar Silwet 0,02% (v/v) al cultivo de *Agrobacterium*.

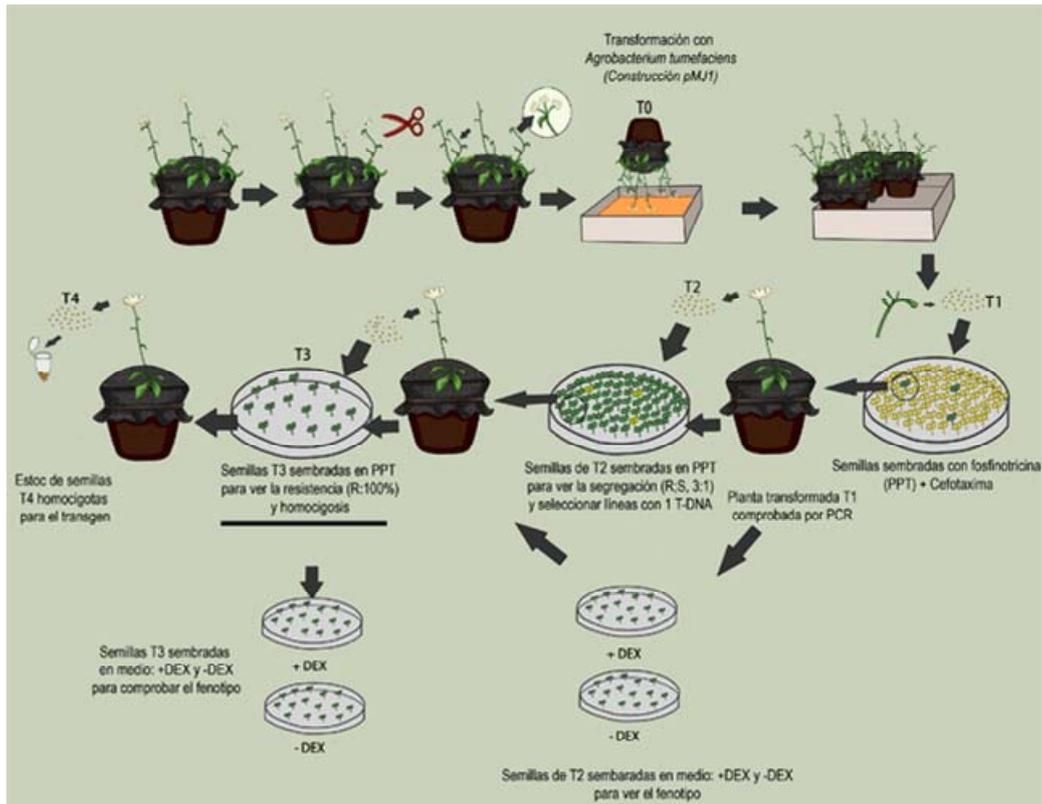
10. Trasvasar el cultivo a un recipiente adecuado y sumergir las inflorescencias de las plantas durante 5 min colocando el tiesto boca abajo. Conviene regar las plantas antes de la transformación, porque el agua saturará el sustrato y en caso que este entre en contacto con la solución de *Agrobacterium* no lo absorberá, impidiendo futuras contaminaciones de las plantas. La reja puesta sobre los tiestos impide que el sustrato y las plantas caigan en la solución de *Agrobacterium*.

11. Depositar los tiestos en posición horizontal en una bandeja sobre papel filtro, que absorbe el exceso de solución de *Agrobacterium*, y cubrirla con un plástico.

12. Mantener la bandeja durante 2-4 días en fitotrón con baja iluminación.

13. Retirar el plástico que cubre la bandeja y el papel filtro. Poner las plantas en posición vertical para ser cultivadas normalmente en el invernadero.

La **Figura 57** esquematiza las diferentes generaciones de plantas transformantes y su selección mediante el uso de antibióticos.



**Figura 57.** Esquema de la transformación de plantas *Arabidopsis* y selección de las diferentes generaciones de transformantes

## 6.2.4.6. Análisis molecular de las plantas mutantes.

### 6.2.4.6.1. Extracción rápida de DNA genómico de planta para su genotipado.

Para la extracción de DNA genómico de las plantas se siguió el protocolo descrito por (Edwards et al., 1991).

#### Procedimiento:

1. Macerar el tejido vegetal joven en un tubo Eppendorf durante no más de 15 seg con un émbolo de plástico (pellet pestle polypropylene, SIGMA-Aldrich).
2. Agregar 400  $\mu$ L de tampón de extracción, y acabar de macerar el tejido. Mezclar con vórtex.
3. Centrifugar 1 min a 13000 rpm.

4. Descartar el sedimento. Mezclar el sobrenadante con 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Incubar a TA durante 2 min.
5. Centrifugar 5 min a 13000 rpm.
6. Descartar el sobrenadante. Lavar el pellet con 700  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v).
7. Centrifugar durante 5 min a 13000 rpm.
8. Descartar el sobrenadante. Resuspender el pellet en 50  $\mu\text{L}$  de tampón TE 1x. Guardar a 4°C.

Soluciones empleadas:

**Tampón de extracción:** Tris-HCl 200 mM pH7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0,5% (p/v).

#### **6.2.4.6.2. Comprobación de genotipo por PCR.**

Para detectar rápidamente la presencia de un transgen introducido a la planta se utilizó la técnica de la PCR. Esta técnica también se usó para genotipar las plantas mutantes procedentes de colecciones de inserción de un T-DNA (SALK), utilizando oligos de los elementos de inserción de cada línea y de la región genómica flanqueante de su inserción.

## **7. REFERENCIAS.**

---



## **Referencias.**

- Achard, P., and Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of experimental botany* *60*, 1085-1092.
- Achard, P., Liao, L., Jiang, C., Desnos, T., Bartlett, J., Fu, X., and Harberd, N.P. (2007). DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* *143*, 1163-1172.
- Ahmad, M., and Cashmore, A.R. (1996). The *pef* mutants of *Arabidopsis thaliana* define lesions early in the phytochrome signaling pathway. *Plant J* *10*, 1103-1110.
- Al-Sady, B., Kikis, E.A., Monte, E., and Quail, P.H. (2008). Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 2232-2237.
- Alon, U. (2003). Biological networks: the tinkerer as an engineer. *Science* *301*, 1866-1867.
- Aoyama, T., and Chua, N.H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* *11*, 605-612.
- Aoyama, T., Dong, C.H., Wu, Y., Carabelli, M., Sessa, G., Ruberti, I., Morelli, G., and Chua, N.H. (1995). Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator *Athb-1* alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell* *7*, 1773-1785.
- Ariel, F.D., Manavella, P.A., Dezar, C.A., and Chan, R.L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* *12*, 419-426.
- Atchley, W.R., and Fitch, W.M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5172-5176.
- Ausubel, F. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. In (Brooklyn, NY: Greene Publishing Association).
- Bae, G., and Choi, G. (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual review of plant biology* *59*, 281-311.
- 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*. *Nature cell biology* *14*, 810-817.
- Bailey, P.C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P.H., Huq, E., Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., and Weisshaar, B. (2003). Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *15*, 2497-2502.
- Bartel, P., Chien, C.T., Sternglanz, R., and Fields, S. (1993). *Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions* (Oxford: Oxford University Press).

Bhalerao, R.P., Eklof, J., Ljung, K., Marchant, A., Bennett, M., and Sandberg, G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 29, 325-332.

Boccalandro, H., Casal, J., and Serna, L. (2007). Secret message at the plant surface. *Plant signaling & behavior* 2, 373-375.

Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218, 683-692.

Botto, J.F., Sanchez, R.A., Whitelam, G.C., and Casal, J.J. (1996). Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 110, 439-444.

Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., and Martinez-Garcia, J.F. (2008). Light signaling: back to space. *Trends Plant Sci* 13, 108-114.

Bou-Torrent, J., Salla-Martret, M., Brandt, R., Musielak, T., Palauqui, J.C., Martinez-Garcia, J.F., and Wenkel, S. (2012). ATHB4 and HAT3, two class II HD-ZIP transcription factors, control leaf development in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior* 7.

Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S., and Ohad, N. (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* 40, 419-427.

Brandt, R., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Musielak, T., Stahl, M., Lanz, C., Ott, F., Schmid, M., Greb, T., Schwarz, M., *et al.* (2012). Genome-wide binding-site analysis of REVOLUTA reveals a link between leaf patterning and light-mediated growth responses. *Plant J*.

Briggs, W.R., and Christie, J.M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in plant science* 7, 204-210.

Carabelli, M., Morelli, G., Whitelam, G., and Ruberti, I. (1996). Twilight-zone and canopy shade induction of the *Athb-2* homeobox gene in green plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 3530-3535.

Carabelli, M., Possenti, M., Sessa, G., Ciolfi, A., Sassi, M., Morelli, G., and Ruberti, I. (2007). Canopy shade causes a rapid and transient arrest in leaf development through auxin-induced cytokinin oxidase activity. *Genes & development* 21, 1863-1868.

Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martinez-Garcia, J.F., Bilbao-Castro, J.R., and Robertson, D.L. (2010). Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol* 153, 1398-1412.

Ciarbelli, A.R., Ciolfi, A., Salvucci, S., Ruzza, V., Possenti, M., Carabelli, M., Fruscalzo, A., Sessa, G., Morelli, G., and Ruberti, I. (2008). The *Arabidopsis*

homeodomain-leucine zipper II gene family: diversity and redundancy. *Plant Mol Biol* *68*, 465-478.

Clack, T., Shokry, A., Moffet, M., Liu, P., Faul, M., and Sharrock, R.A. (2009). Obligate heterodimerization of Arabidopsis phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* *21*, 786-799.

Clough, R.C., Jordan-Beebe, E.T., Lohman, K.N., Marita, J.M., Walker, J.M., Gatz, C., and Vierstra, R.D. (1999). Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for PFR ubiquitination and degradation. *Plant J* *17*, 155-167.

Colon-Carmona, A., Chen, D.L., Yeh, K.C., and Abel, S. (2000). Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiol* *124*, 1728-1738.

Crocco, C.D., Holm, M., Yanovsky, M.J., and Botto, J.F. (2010). AtBBX21 and COP1 genetically interact in the regulation of shade avoidance. *Plant J* *64*, 551-562.

Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., and Vachon, G. (2004). AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis. *Plant Physiol* *136*, 3660-3669.

Chandler, J.W., Cole, M., Flier, A., and Werr, W. (2009). BIM1, a bHLH protein involved in brassinosteroid signalling, controls Arabidopsis embryonic patterning via interaction with DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE. *Plant Mol Biol* *69*, 57-68.

Chapman, E.J., Greenham, K., Castillejo, C., Sartor, R., Bialy, A., Sun, T.P., and Estelle, M. (2012). Hypocotyl transcriptome reveals auxin regulation of growth-promoting genes through GA-dependent and -independent pathways. *PloS one* *7*, e36210.

Chen, F., Shi, X., Chen, L., Dai, M., Zhou, Z., Shen, Y., Li, J., Li, G., Wei, N., and Deng, X.W. (2012). Phosphorylation of FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 is a key mechanism defining signaling dynamics of phytochrome A under red and far-red light in Arabidopsis. *Plant Cell* *24*, 1907-1920.

Chen, M., Chory, J., and Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annual review of genetics* *38*, 87-117.

Davies, P.J. (2004). *Plant hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).

de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* *451*, 480-484.

- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2003). A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *133*, 1617-1629.
- Djakovic-Petrovic, T., de Wit, M., Voesenek, L.A., and Pierik, R. (2007a). DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J* *51*, 117-126.
- Djakovic-Petrovic, T., Wit, M.D., Voesenek, L.A., and Pierik, R. (2007b). DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J*.
- Dowson-Day, M.J., and Millar, A.J. (1999). Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *Plant J* *17*, 63-71.
- Duek, P.D., and Fankhauser, C. (2003). HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J* *34*, 827-836.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* *19*, 1349.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A., and Quail, P.H. (2000). HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes & development* *14*, 2377-2391.
- Fankhauser, C., and Staiger, D. (2002). Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* *216*, 1-16.
- 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* *284*, 1539-1541.
- Favory, J.J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravecz, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G.I., Oakeley, E.J., *et al.* (2009). Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *Embo J* *28*, 591-601.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., *et al.* (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* *451*, 475-479.
- Fernandez-Calvino, L., Goytia, E., Lopez-Abella, D., Giner, A., Urizarna, M., Vilaplana, L., and Lopez-Moya, J.J. (2010). The helper-component protease transmission factor of tobacco etch potyvirus binds specifically to an aphid ribosomal protein homologous to the laminin receptor precursor. *The Journal of general virology* *91*, 2862-2873.
- Finlayson, S.A., Lee, I.J., Mullet, J.E., and Morgan, P.W. (1999). The mechanism of rhythmic ethylene production in sorghum. The role of phytochrome B and simulated shading. *Plant Physiol* *119*, 1083-1089.

Franklin, K.A., Lee, S.H., Patel, D., Kumar, S.V., Spartz, A.K., Gu, C., Ye, S., Yu, P., Breen, G., Cohen, J.D., *et al.* (2011). Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20231-20235.

Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J., and Whitelam, G.C. (2003). Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *131*, 1340-1346.

Franklin, K.A., and Quail, P.H. (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of experimental botany* *61*, 11-24.

Franklin, K.A., and Whitelam, G.C. (2007). Light-quality regulation of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* *39*, 1410-1413.

Friedrichsen, D.M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J.N., Alonso, J., Ecker, J.R., Furuya, M., and Chory, J. (2002). Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* *162*, 1445-1456.

Frigerio, M., Alabadi, D., Perez-Gomez, J., Garcia-Carcel, L., Phillips, A.L., Hedden, P., and Blazquez, M.A. (2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *142*, 553-563.

Galstyan, A. (2011). Identification and characterization of shade avoidance components in *Arabidopsis thaliana*. In Department of Genetics (University of Barcelona).

Galstyan, A., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., and Martinez-Garcia, J.F. (2012). A dual mechanism controls nuclear localization in the atypical basic-helix-loop-helix protein PAR1 of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant* *5*, 669-677.

Galstyan, A., Cifuentes-Esquivel, N., Bou-Torrent, J., and Martinez-Garcia, J.F. (2011). The shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*: a fundamental role for atypical basic helix-loop-helix proteins as transcriptional cofactors. *Plant J*.

Galstyan, A., and Martinez-Garcia, J.F. (2010). Light Signalling in Plant Developmental Regulation. In *Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives*, E.C.P.a.M.R. Davey, ed. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010), pp. 255-275.

Gallego-Bartolome, J., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2011). DELLA-induced early transcriptional changes during etiolated development in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS one* *6*, e23918.

Gallego-Bartolome, J., Minguet, E.G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S.G., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 13446-13451.

Garcia-Martinez, J.L., Keith, B., Bonner, B.A., Stafford, A.E., and Rappaport, L. (1987). Phytochrome Regulation of the Response to Exogenous Gibberellins by Epicotyls of *Vigna sinensis*. *Plant Physiol* *85*, 212-216.

- Gray, W.M., Ostin, A., Sandberg, G., Romano, C.P., and Estelle, M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 7197-7202.
- Groszmann, M., Paicu, T., and Smyth, D.R. (2008). Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Plant J* *55*, 40-52.
- Halliday, K.J., and Fankhauser, C. (2003). Phytochrome-hormonal signaling networks. *New Phytologist*, 449-463.
- Halliday, K.J., Salter, M.G., Thingnaes, E., and Whitelam, G.C. (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *Plant J* *33*, 875-885.
- Hao, Y., Oh, E., Choi, G., Liang, Z., and Wang, Z.Y. (2012). Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. *Molecular plant* *5*, 688-697.
- Harmer, S.L. (2009). The circadian system in higher plants. *Annual review of plant biology* *60*, 357-377.
- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., and Murray, A.W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature* *402*, C47-52.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., and Bailey, P.C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular biology and evolution* *20*, 735-747.
- Hiltbrunner, A., Tscheuschler, A., Viczian, A., Kunkel, T., Kircher, S., and Schafer, E. (2006). FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol* *47*, 1023-1034.
- Hisamatsu, T., King, R.W., Helliwell, C.A., and Koshioka, M. (2005). The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochrome-regulated petiole elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *138*, 1106-1116.
- Hornitschek, P., Kohnen, M.V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., Lopez-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., *et al.* (2012). Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant J* *71*, 699-711.
- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., and Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *Embo J* *28*, 3893-3902.

- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K., and Quail, P.H. (2004). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 305, 1937-1941.
- Huq, E., Al-Sady, B., and Quail, P.H. (2003). Nuclear translocation of the photoreceptor phytochrome B is necessary for its biological function in seedling photomorphogenesis. *Plant J* 35, 660-664.
- Huq, E., and Quail, P.H. (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *Embo J* 21, 2441-2450.
- Jackson, R.J., and Standart, N. (1990). Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 62, 15-24.
- Jenkins, G.I. (2009). Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual review of plant biology* 60, 407-431.
- Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature reviews* 8, 217-230.
- Josse, E.M., Foreman, J., and Halliday, K.J. (2008). Paths through the phytochrome network. *Plant, cell & environment* 31, 667-678.
- Kang, B., Grancher, N., Koyffmann, V., Lardemer, D., Burney, S., and Ahmad, M. (2008). Multiple interactions between cryptochrome and phototropin blue-light signalling pathways in Arabidopsis thaliana. *Planta* 227, 1091-1099.
- Keuskamp, D.H., Sasidharan, R., and Pierik, R. (2010). Physiological regulation and functional significance of shade avoidance responses to neighbors. *Plant signaling & behavior* 5, 655-662.
- Kevei, E., Schafer, E., and Nagy, F. (2007). Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *Journal of experimental botany* 58, 3113-3124.
- Kim, J.I., Shen, Y., Han, Y.J., Park, J.E., Kirchenbauer, D., Soh, M.S., Nagy, F., Schafer, E., and Song, P.S. (2004). Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* 16, 2629-2640.
- Kleine, T., Lockhart, P., and Batschauer, A. (2003). An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J* 35, 93-103.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitlam, G.C., and Franklin, K.A. (2009). High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr Biol* 19, 408-413.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Quail, P.H. (2008). The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* 20, 337-352.

Leivar, P., Monte, E., Cohn, M.M., and Quail, P.H. (2012a). Phytochrome signaling in green *Arabidopsis* seedlings: impact assessment of a mutually negative phyB-PIF feedback loop. *Molecular plant* 5, 734-749.

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., Cohn, M.M., Monte, E., Al-Sady, B., Erickson, E., and Quail, P.H. (2012b). Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1398-1419.

Li, J., and Chory, J. (1999). Brassinosteroid action in plants. *Journal of experimental botany* 50, 275-282.

Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R.J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B.J., Ivans, L.J., Pedmale, U.V., Jung, H.S., *et al.* (2012). Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev* 26, 785-790.

Li, Q.H., and Yang, H.Q. (2007). Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and photobiology* 83, 94-101.

Lin, C., and Shalitin, D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual review of plant biology* 54, 469-496.

Liu, B., Zuo, Z., Liu, H., Liu, X., and Lin, C. (2011). *Arabidopsis* cryptochrome 1 interacts with SPA1 to suppress COP1 activity in response to blue light. *Genes Dev* 25, 1029-1034.

Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C., and Fankhauser, C. (2008). Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J* 53, 312-323.

Lorrain, S., Trevisan, M., Pradervand, S., and Fankhauser, C. (2009). Phytochrome interacting factors 4 and 5 redundantly limit seedling de-etiolation in continuous far-red light. *Plant J* 60, 449-461.

Luccioni, L.G., Oliverio, K.A., Yanovsky, M.J., Boccalandro, H.E., and Casal, J.J. (2002). Brassinosteroid mutants uncover fine tuning of phytochrome signaling. *Plant Physiol* 128, 173-181.

Ma, L., Zhao, H., and Deng, X.W. (2003). Analysis of the mutational effects of the COP/DET/FUS loci on genome expression profiles reveals their overlapping yet not identical roles in regulating *Arabidopsis* seedling development. *Development* 130, 969-981.

Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B.M., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., and Browse, J. (2006). Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J* 46, 984-1008.

- Martinez-Garcia, J.F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N., Gallemí, M., and Bou-Torrent, J. (2010). Regulatory components of shade avoidance syndrome. *Advances in Botanical Research* 53, 65-116.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., and Quail, P.H. (2000a). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288, 859-863.
- Martinez-Garcia, J.F., Santes, C.M., and Garcia-Martinez, J.L. (2000b). The end-of-day far-red irradiation increases gibberellin A1 content in cowpea (*Vigna sinensis* L.) by reducing its inactivation. *Physiologia plantarum* 108, 426-434.
- Martinez-Garcia, J.F., Virgos-Soler, A., and Prat, S. (2002). Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the Arabidopsis flowering-time gene CONSTANS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15211-15216.
- Mas, P. (2008). Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends in cell biology* 18, 273-281.
- Matsushita, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A. (2003). Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* 424, 571-574.
- Monte, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-Phillips, S., and Quail, P.H. (2003). Isolation and characterization of phyC mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell* 15, 1962-1980.
- Montgomery, B.L. (2008). Right place, right time: Spatiotemporal light regulation of plant growth and development. *Plant signaling & behavior* 3, 1053-1060.
- Montgomery, B.L., and Lagarias, J.C. (2002). Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* 7, 357-366.
- Morelli, G., and Ruberti, I. (2002). Light and shade in the photocontrol of *Arabidopsis* growth. *Trends in plant science* 7, 399-404.
- Nagy, F., and Schafer, E. (2002). Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual review of plant biology* 53, 329-355.
- Neff, M.M., and Chory, J. (1998). Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol* 118, 27-35.
- Neff, M.M., Nguyen, S.M., Malancharuvil, E.J., Fujioka, S., Noguchi, T., Seto, H., Tsubuki, M., Honda, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., *et al.* (1999). BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15316-15323.

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.

Norton, J.D. (2000). ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *Journal of cell science* 113 ( Pt 22), 3897-3905.

Nozue, K., Covington, M.F., Duek, P.D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S.L., and Maloof, J.N. (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448, 358-361.

Nozue, K., Harmer, S.L., and Maloof, J.N. (2011). Genomic analysis of circadian clock-, light-, and growth-correlated genes reveals PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR5 as a modulator of auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 156, 357-372.

Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I., and Aoyama, T. (2001). Negative autoregulation of the Arabidopsis homeobox gene ATHB-2. *Plant J* 25, 389-398.

Park, E., Park, J., Kim, J., Nagatani, A., Lagarias, J.C., and Choi, G. (2012). Phytochrome B inhibits binding of Phytochrome-Interacting Factors to their target promoters. *Plant J*.

Parks, B.M., and Quail, P.H. (1993). hy8, a new class of arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* 5, 39-48.

Pedmale, U.V., and Liscum, E. (2007). Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *The Journal of biological chemistry* 282, 19992-20001.

Peng, J., and Harberd, N.P. (1993). Derivative Alleles of the Arabidopsis Gibberellin-Insensitive (gai) Mutation Confer a Wild-Type Phenotype. *Plant Cell* 5, 351-360.

Peng, J., and Harberd, N.P. (1997). Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol* 113, 1051-1058.

Pierik, R., Cuppens, M.L., Voesenek, L.A., and Visser, E.J. (2004). Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco. *Plant Physiol* 136, 2928-2936.

Pierik, R., Djakovic-Petrovic, T., de Wit, M., and Voesenek, L.A. (2007). Struggling for light: della regulation during plant-plant interactions. *Plant signaling & behavior* 2, 512-513.

Pierik, R., Djakovic-Petrovic, T., Keuskamp, D.H., de Wit, M., and Voesenek, L.A. (2009). Auxin and ethylene regulate elongation responses to neighbor proximity signals independent of gibberellin and della proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 149, 1701-1712.

Poppenberger, B., Rozhon, W., Khan, M., Husar, S., Adam, G., Luschnig, C., Fujioka, S., and Sieberer, T. (2011). CESTA, a positive regulator of brassinosteroid biosynthesis. *Embo J* 30, 1149-1161.

Quail, P.H. (2002a). Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr Opin Cell Biol* 14, 180-188.

Quail, P.H. (2002b). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 85-93.

Reed, J.W., Foster, K.R., Morgan, P.W., and Chory, J. (1996). Phytochrome B affects responsiveness to gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 112, 337-342.

Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M., and Chory, J. (1994). Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. *Plant Physiol* 104, 1139-1149.

Reymond, M.C., Brunoud, G., Chauvet, A., Martinez-Garcia, J.F., Martin-Magniette, M.L., Moneger, F., and Scutt, C.P. (2012). A Light-Regulated Genetic Module Was Recruited to Carpel Development in Arabidopsis following a Structural Change to SPATULA. *Plant Cell* 24, 2812-2825.

Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schafer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., *et al.* (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 332, 103-106.

Rockwell, N.C., Su, Y.S., and Lagarias, J.C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual review of plant biology* 57, 837-858.

Roig-Villanova, I. (2007). Control Molecular i Fisiològic de la Síndrome de Fugida de l'Ombra en *Arabidopsis thaliana*. In Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Universidad de Barcelona).

Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portoles, S., Rodriguez-Concepcion, M., and Martinez-Garcia, J.F. (2007). Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *The EMBO journal* 26, 4756-4767.

Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P.F., and Martinez-Garcia, J.F. (2006). Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 141, 85-96.

Ruzinova, M.B., and Benezra, R. (2003). Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends in cell biology* 13, 410-418.

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., *et al.* (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99, 463-472.

Sablowski, R.W., and Meyerowitz, E.M. (1998). A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* 92, 93-103.

Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., and Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.

Saijo, Y., Zhu, D., Li, J., Rubio, V., Zhou, Z., Shen, Y., Hoecker, U., Wang, H., and Deng, X.W. (2008). Arabidopsis COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling. *Mol Cell* 31, 607-613.

Salisbury, F.J., Hall, A., Grierson, C.S., and Halliday, K.J. (2007). Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. *Plant J* 50, 429-438.

Salter, M.G., Franklin, K.A., and Whitelam, G.C. (2003). Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature* 426, 680-683.

Salla-Martret, M. (2012). Control hormonal i genètic de la síndrome de fugida de l'ombra en *Arabidopsis thaliana*. In Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (Universidad de Barcelona).

Sambrook, J. (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual ( CSHL Press).

Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S., and Koshiba, T. (2002). The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in Arabidopsis. *Plant J* 32, 1011-1022.

Schena, M., Lloyd, A.M., and Davis, R.W. (1991). A steroid-inducible gene expression system for plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10421-10425.

Schena, M., Lloyd, A.M., and Davis, R.W. (1993). The HAT4 gene of Arabidopsis encodes a developmental regulator. *Genes & development* 7, 367-379.

Schwechheimer, C., and Deng, X.W. (2000). The COP/DET/FUS proteins-regulators of eukaryotic growth and development. *Seminars in cell & developmental biology* 11, 495-503.

Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G., and Ruberti, I. (2005). A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes & development* 19, 2811-2815.

Sharrock, R.A., and Clack, T. (2004). Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11500-11505.

- Shen, F., Triezenberg, S.J., Hensley, P., Porter, D., and Knutson, J.R. (1996). Transcriptional activation domain of the herpesvirus protein VP16 becomes conformationally constrained upon interaction with basal transcription factors. *The Journal of biological chemistry* *271*, 4827-4837.
- Shin, J., Park, E., and Choi, G. (2007). PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *Plant J* *49*, 981-994.
- Smith, H. (1982a). Light quality, photoperception, and plant strategy. *Annual review of plant physiology* *33*, 481-518.
- Smith, H. (1982b). Light quality, photoreception, and plant strategy. *Annual review of plant physiology* *33*, 481-518.
- Smith, H., and Whitelam, G. (1997). The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment* *20*, 840-844.
- Sorin, C., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., and Martinez-Garcia, J.F. (2009). ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* *59*, 266-277.
- Stavang, J.A., Gallego-Bartolome, J., Gomez, M.D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J.E., Garcia-Martinez, J.L., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2009). Hormonal regulation of temperature-induced growth in *Arabidopsis*. *Plant J*.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G., and Ruberti, I. (1999). Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development (Cambridge, England)* *126*, 4235-4245.
- Strasser, B., Sanchez-Lamas, M., Yanovsky, M.J., Casal, J.J., and Cerdan, P.D. (2010). *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 4776-4781.
- Suesslin, C., and Frohnmeyer, H. (2003). An *Arabidopsis* mutant defective in UV-B light-mediated responses. *Plant J* *33*, 591-601.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., and Li, C. (2012). PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *arabidopsis* hypocotyl growth. *PLoS genetics* *8*, e1002594.
- Sun, T.P., and Gubler, F. (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual review of plant biology* *55*, 197-223.
- Swain, S.M., and Singh, D.P. (2005). Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. *Trends in plant science* *10*, 123-129.

- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J.A., Li, L., Moreno, J.E., Bowman, M.E., Ivans, L.J., *et al.* (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* *133*, 164-176.
- Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* *15*, 533-543.
- Tokutomi, S., Matsuoka, D., and Zikihara, K. (2008). Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochim Biophys Acta* *1784*, 133-142.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P.H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* *15*, 1749-1770.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Rodriguez-Concepcion, M. (2010). Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 11626-11631.
- Wang, Z.Y., Bai, M.Y., Oh, E., and Zhu, J.Y. (2012). Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. *Annual review of genetics*.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S., and Harberd, N.P. (1993). Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* *5*, 757-768.
- Wilkinson, M., Doskow, J., and Lindsey, S. (1991). RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. *Nucleic acids research* *19*, 679.
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V., and Romano, L.A. (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Molecular biology and evolution* *20*, 1377-1419.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual review of plant biology* *59*, 225-251.
- Yang, C.J., Zhang, C., Lu, Y.N., Jin, J.Q., and Wang, X.L. (2011). The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development. *Molecular plant* *4*, 588-600.
- Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2003). Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 265-275.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* *120*, 249-259.

## **8. ANEXO.**

---



# The shade avoidance syndrome in Arabidopsis: a fundamental role for atypical basic helix–loop–helix proteins as transcriptional cofactors

Anahit Galstyan<sup>1</sup>, Nicolás Cifuentes-Esquivel<sup>1,†</sup>, Jordi Bou-Torrent<sup>1,†</sup> and Jaime F. Martinez-Garcia<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), CSIC-IRTA-UAB, 08034-Barcelona, Spain, and

<sup>2</sup>Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, 08010-Barcelona, Spain

Received 26 August 2010; revised 21 December 2010; accepted 30 December 2010.

\*For correspondence (fax +34 932 045 904; e-mail jmgmg@cid.csic.es).

†These authors contributed equally to this work.

## SUMMARY

The shade avoidance syndrome (SAS) refers to a set of plant responses aimed at anticipating eventual shading by potential competitors. The SAS is initiated after perception of nearby vegetation as a reduction in the red to far-red ratio (R:FR) of the incoming light. Low R:FR light is perceived by the phytochromes, triggering dramatic changes in gene expression that, in seedlings, eventually result in an increased hypocotyl elongation to overgrow competitors. This response is inhibited by genes such as *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED 1* (*PAR1*), *PAR2* and *LONG HYPOCOTYL IN FR 1* (*HFR1*), which are transcriptionally induced by low R:FR. Although *PAR1/PAR2* and *HFR1* proteins belong to different groups of basic helix–loop–helix (bHLH) transcriptional regulators, they all lack a typical basic domain required for binding to E-box and G-box motifs in the promoter of target genes. By overexpressing derivatives of *PAR1* and *HFR1* we show that these proteins are actually transcriptional cofactors that do not need to bind DNA to directly regulate transcription. We conclude that protein–protein interactions involving the HLH domain of *PAR1* and *HFR1* are a fundamental aspect of the mechanism by which these proteins regulate gene expression, most likely through interaction with true transcription factors that do bind to the target genes and eventually unleash the observed SAS responses.

**Keywords:** shade avoidance syndrome, bHLH proteins, DNA-binding, HLH domain, transcriptional cofactors, Arabidopsis.

## INTRODUCTION

In light-grown plants, the proximity of neighboring plants can result in competition for limited resources, such as light itself. Therefore, sensing the environment and adapting the plant's growth and development to potential competing neighbors is a key to survival. The shade avoidance syndrome (SAS) refers to a set of responses aimed to adapt plant growth and development to environments with high plant density, found in both natural and agricultural communities. The presence of nearby plants results in a reduction in the red (R) to far-red (FR) ratio (R:FR) caused by a specific enrichment in FR light reflected from neighboring leaves. For shade-intolerant plants, such as *Arabidopsis thaliana*, the perception of plant proximity evokes SAS responses that allow the plant to anticipate shading, avoiding it by overgrowing neighboring plants or by flowering to ensure seed production. Indeed, shade-responding plants

grow away from neighbors well before those putative competitors diminish their actual acquisition of light (Franklin, 2008; Keuskamp *et al.*, 2010; Martinez-Garcia *et al.*, 2010). These responses can hence be detrimental for crop species because they take place at the expense of harvestable organs (Kebrom and Brutnell, 2007).

The R:FR changes associated with plant proximity are detected by the phytochrome photoreceptors. These photoreceptors detect mainly the R and FR wavelengths of the light spectrum and have a major role in controlling many other adaptive light responses. In Arabidopsis a small gene family of five members encodes phytochromes (*PHYA-PHYE*) (Chen *et al.*, 2004; Bae and Choi, 2008). Genetic and physiological analyses have shown that although phyB is the major phytochrome controlling SAS, other phytochromes act redundantly with phyB in the control of some

aspects of SAS-driven development, like hypocotyl elongation (phyA), flowering time (phyD, phyE), petiole elongation (phyD, phyE) and internode elongation between rosette leaves (phyE) (Johnson *et al.*, 1994; Devlin *et al.*, 1998, 1999). Phytochromes exist in two photoconvertible forms, an inactive R-absorbing Pr form and an active FR-absorbing Pfr form. In etiolated seedlings phytochromes are in the inactive Pr form located in the cytosol. Following light exposure they are rapidly converted into Pfr forms and migrate to the nucleus, where they orchestrate a transcriptional network in part by interacting with PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), transcription factors of the basic helix–loop–helix (bHLH) family (Martinez-Garcia *et al.*, 2000; Quail, 2002).

In fully de-etiolated plants, Pr and Pfr forms are present in a light-dependent balance: under a high R:FR ratio, the photo-equilibrium is displaced towards the active Pfr forms, and SAS is suppressed. Under a low R:FR ratio, the photo-equilibrium is displaced towards the inactive Pr forms, and SAS is induced. This induction involves rapid changes in gene expression (Devlin *et al.*, 2003; Salter *et al.*, 2003). *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED (PAR)* genes have been hypothesized as instrumental for implementing the morphological and physiological SAS responses (Roig-Villanova *et al.*, 2006). Indeed, the five members of the homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP) class-II subfamily of transcription factors shown to be *PAR* genes (*ATHB2*, *ATHB4*, *HAT1*, *HAT2* and *HAT3*) have a role in SAS, as deduced from knock-out and/or gain-of-function mutants (Steindler *et al.*, 1999; Sorin *et al.*, 2009). Other *PAR* genes such as *LONG HYPOCOTYL IN FR 1 (HFR1)*, *PAR1*, *PAR2* and *PIF3-LIKE 1 (PIL1)*, encode members of the bHLH family with a negative role in SAS, as deduced from the elongation response of mutant hypocotyls to simulated or canopy shade (Sessa *et al.*, 2005; Roig-Villanova *et al.*, 2006, 2007). The members of the PIF subfamily PIF4 and PIF5 were identified as SAS positive players that regulate the expression of *PAR* genes, such as *ATHB2*, *HFR1* or *PIL1* (Lorrain *et al.*, 2008). Genetic analyses have also implicated growth-repressing *DELLAs* and *CONSTITUTIVE SHADE AVOIDANCE 1 (CSA1)* in the regulation of SAS responses (Faigon-Soverna *et al.*, 2006; Djakovic-Petrovic *et al.*, 2007). The low R:FR-regulated transcriptional networks intersect with those regulating cell division and expansion, such as the ones controlled by plants hormones. For instance, in the case of auxins, phytochromes have been demonstrated to control auxin biosynthesis, transport and the response to auxin within individual cells (Nemhauser, 2008; Tao *et al.*, 2008; Halliday *et al.*, 2009). Overall, these components are organized to modulate a complex web of transcriptional events instrumental in the establishment of the SAS response that take place in the multicellular and organ-structured context of a plant (Bou-Torrent *et al.*, 2008a,b; Josse *et al.*, 2008).

Typical bHLH proteins contain a conserved HLH region required for protein–protein interaction (dimerization) and a basic domain involved in their binding to E-box or G-box motifs found in the promoters of target genes (Atchley and Fitch, 1997). Unlike them, HFR1 shows an atypical basic domain that might not be functional for binding to these motifs in its target gene promoters (Fairchild *et al.*, 2000; Heim *et al.*, 2003; Carretero-Paulet *et al.*, 2010). In fact, a mechanism by which HFR1 regulates gene expression involves its binding to the canonical bHLH factors PIF4 and PIF5 by forming heterodimers that are unable to bind the G-box motifs of their target promoters (Hornitschek *et al.*, 2009). This implies that HFR1 function does not necessarily require binding of this protein to DNA. *PAR1* and its paralog *PAR2* also encode atypical proteins of the bHLH family. In this case, they both lack a basic domain. However, *PAR1* was found to directly repress two auxin-responsive genes, *SAUR15* and *SAUR68*, whose expression is also rapidly but mildly and transiently induced by simulated shade. This led to the suggestion that *PAR1* and *PAR2* might act as transcriptional cofactors (Roig-Villanova *et al.*, 2007), similar to that described for HFR1 over PIF4 and PIF5 target genes. These results, however, do not exclude that HFR1, *PAR1* and *PAR2* might actually bind to DNA motifs different from those typically bound by canonical bHLH and/or might regulate gene expression by accessing gene promoters via protein–protein interactions with true transcription factors. Here we address these possibilities by overexpressing in *A. thaliana* truncated, transactivating domain fusions and/or mutated forms of *PAR1* and *HFR1*.

## RESULTS

### Only the HLH and the adjacent C-terminal domain of *PAR1* are required for biological activity

*PAR1* and *PAR2* were classified as atypical bHLH proteins because they show homology to this family of transcription factors only within the HLH (here referred to as H) region (Roig-Villanova *et al.*, 2007). In particular they lack the H/K9-E13-R17 motif characterized as critical for proper DNA binding to the G-box sequence (Figure S1a). Because the amino acid sequence corresponding to the basic region in *PAR1* and *PAR2* was clearly acidic in both proteins, this region was referred to as the acidic (A) domain (Figure S1b). No conserved motifs were found in the N-terminal (N) or C-terminal (C) regions (Roig-Villanova *et al.*, 2007). To address the relevance of the different domains for the biological function of *PAR1*, deletion constructs fused to the *GFP* reporter gene (N-G, NA-G, AHC-G, HC-G, NAH-G and AH-G) were expressed in transgenic plants under the control of the constitutive 35S promoter (Figure 1a). As controls, transgenic lines overexpressing *GFP* alone (P35S:G) and a *GFP*-tagged version of *PAR1* (P35S:PAR1-G) were used. At least two independent transgenic lines showing levels of

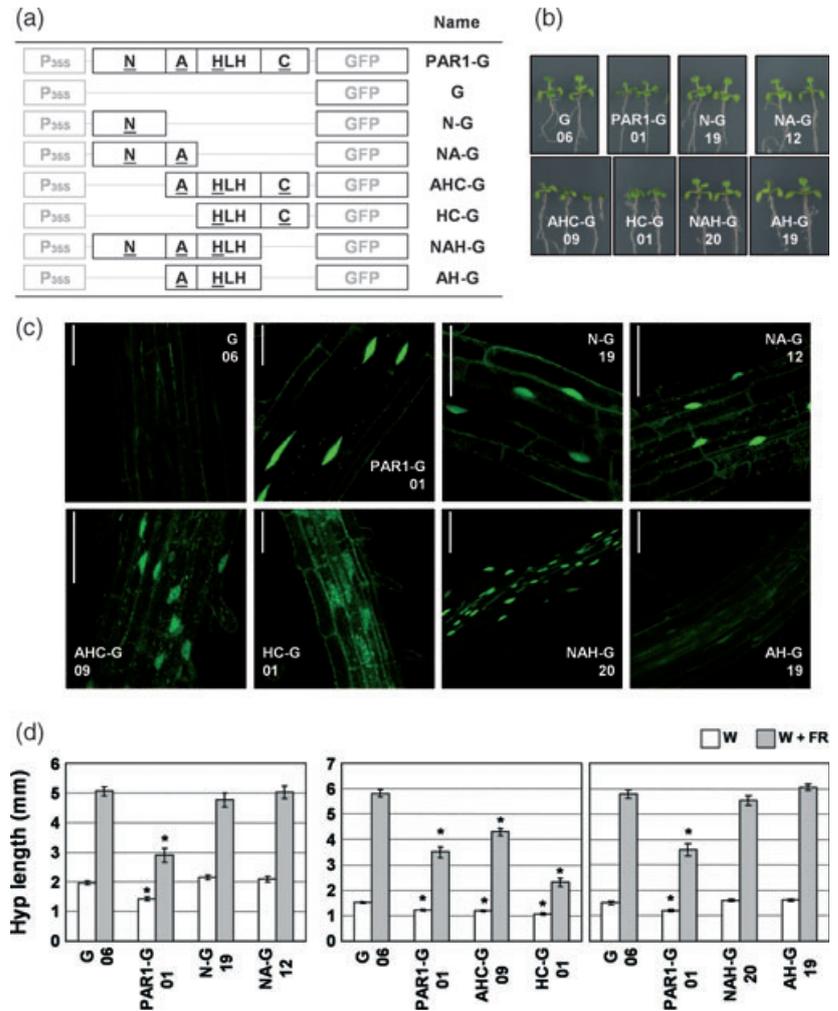
**Figure 1.** Physiological phenotype of plants overexpressing truncated versions of *PAR1*.

(a) Scheme showing the truncated *PAR1* derivatives overexpressed. G refers to GFP.

(b) Aspect of 10-day-old seedlings of the lines shown in (a). Panels are shown to the same scale.

(c) The GFP fluorescence in roots from 10-day-old W-grown seedlings overexpressing the indicated GFP-derived proteins. Bar = 50  $\mu$ m.

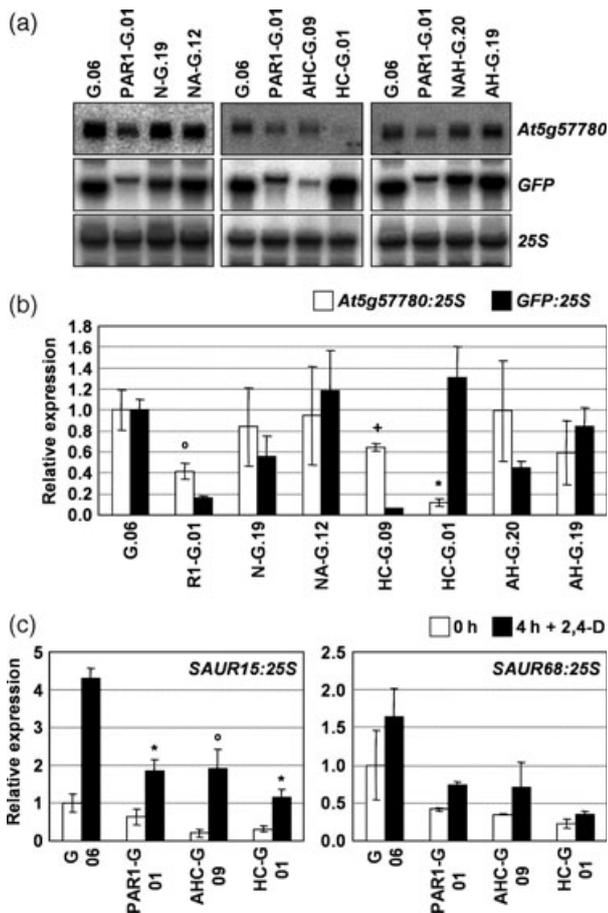
(d) Hypocotyl response to simulated shade of lines shown in (a). Seedlings were germinated and grown for 2 days under W and then either kept in W or transferred to W + FR for five more days. Columns represent the mean  $\pm$  SE. Symbols indicate significant differences ( $*P < 0.01$ ) relative to the control (G.06) growing under the same conditions.



transgene expression higher than those of the P35S:PAR1-G line were selected for each construct. The only exception was construct P35S:AHC-G, for which all seed-producing lines had low levels of transgene expression. However, several P35S:AHC-G individuals were identified in the T<sub>1</sub> population with a very strong dwarf and dark-green phenotype and an inability to set seeds (Figure S2). Amongst the different lines generated, only plants from lines P35S:AHC-G and P35S:HC-G displayed the dwarf dark-green phenotype characteristic of *PAR1* overexpression lines (Figure 1b), even though GFP fluorescence was detected in all lines analyzed, indicating that all *PAR1* derivatives are translated in the plant. All variants containing the N-terminal region of *PAR1* (N-G, NA-G and NAH-G) were mainly localized in the nuclei, suggesting that this region contains a nuclear localization signal (NLS) (Figure 1c). P35S:AHC-G and P35S:HC-G seedlings displayed GFP fluorescence in nuclei and other structures of unknown nature, whereas P35S:AH-G seedlings showed mostly cytoplasmic GFP fluorescence (Figure 1c). As an additional estimate of the

biological activity of these truncated proteins, we evaluated the response of transgenic seedlings to white (W)+FR. Again, only P35S:AHC-G and P35S:HC-G seedlings (as well as P35S:PAR1-G) displayed significantly short hypocotyls when grown under W and a reduced response to W + FR compared with the control line (P35S:G). By contrast, overexpression of N-G, NA-G, NAH-G and AH-G had no biological activity based on these visual phenotypes (Figure 1b,d). Two-way ANOVA tests confirmed that only P35S:AHC-G, P35S:HC-G and P35S:PAR1-G seedlings displayed a significantly attenuated hypocotyl response to simulated shade (Table S1).

We also analyzed the molecular phenotypes of the generated lines. Based on previous transcriptomic analyses (Roig-Villanova *et al.*, 2007), we selected *At5g57780* as a molecular marker of *PAR1* or *PAR2* overexpression (*At5g57780* expression was reduced in plants with increased *PAR1* activity). As shown in Figure 2(a,b), the expression of this gene was down-regulated only in P35S:AHC-G and P35S:HC-G seedlings, as well as in the P35S:PAR1-G control



**Figure 2.** Molecular phenotype of plants overexpressing truncated versions of *PAR1*.

(a) *GFP* and *At5g57780* expression in the indicated transgenic lines. RNA extracted from 7-day-old W-grown seedlings was used for RNA blot analysis of *At5g57780* and transgenic *GFP* expression levels. Each RNA sample was extracted from a pool of homozygous seedlings. *25S* rRNA levels are shown as a loading control.

(b) Normalized expression of the genes shown in (a) are presented relative to the expression levels in the control line (G.06).

(c) Effect of truncated *PAR1* (AHC, HC) overexpression on auxin-induced *SAUR15* and *SAUR68* expression. Seven-day-old W-grown seedlings were treated with 50  $\mu$ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) for 0 or 4 h. Normalized expression of the genes analyzed is presented relative to the expression of untreated control seedlings (G.06, 0 h). In panels (b) and (c) values are means  $\pm$  SE of three independent samples. Symbols indicate significant differences (\* $P < 0.01$ ,  $^{\circ}P < 0.05$ , + $P = 0.126$ ) relative to the controls growing under the same conditions.

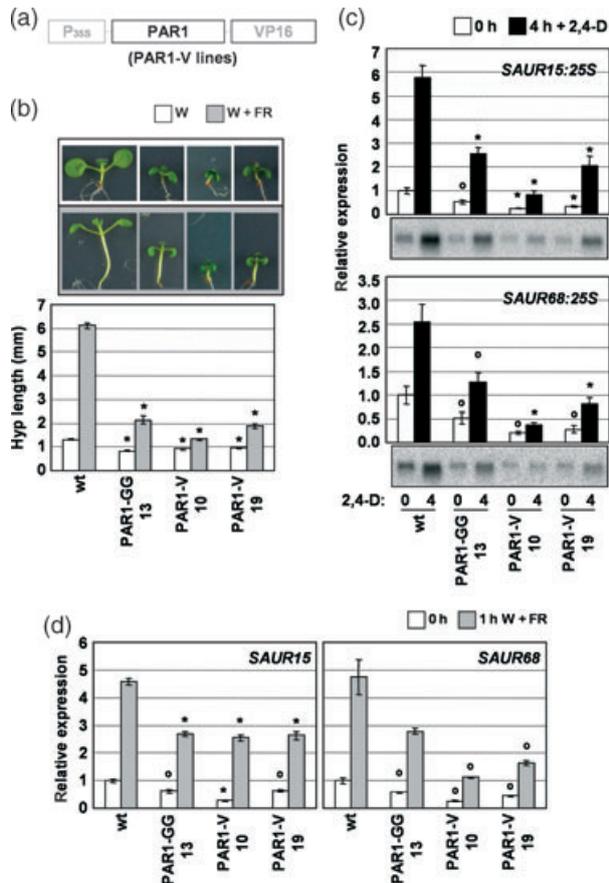
line. Overexpression of *PAR1-G* or truncated *AHC-G* and *HC-G* also had very similar effects on the auxin-induced levels of transcripts encoding *SAUR15* and *SAUR68* (Figure 2c), two genes shown to be direct targets of *PAR1* action (Roig-Villanova *et al.*, 2007). Altogether, these results confirm that among all the truncated *PAR1* versions tested only those containing the HLH domain (required for protein–protein interactions) and the adjacent C-terminal region have biological activity in the regulation of the SAS responses. By contrast, the N-terminal and acidic domains are not required

for full (wild-type) *PAR1* function *in vivo*, although the N-terminal region provides a functional NLS.

#### **PAR1 protein still acts as a transcriptional repressor when fused to the VP16 transcriptional activator**

The results shown above suggested that *PAR1* function requires protein–protein interaction but not direct DNA binding to regulate gene expression. However, it is still possible that *PAR1* binds to the promoter of its target genes indirectly by interacting with DNA-binding transcription factors. To test these hypotheses, we investigated whether *PAR1* could be converted into a transcriptional activator by fusing it to the transactivating domain of the herpes viral protein VP16 (VP16-AD). Despite the non-plant origin of this protein, fusions of VP16-AD to plant DNA-binding transcription factors have been successfully used to convert transcriptional repressors into activators (Steindler *et al.*, 1999; Parcy *et al.*, 2002; Sawa *et al.*, 2002). In the absence of direct or indirect access to DNA regulatory sequences, overexpression of *PAR1* fused to *VP16-AD* (P35S:*PAR1-V* lines, Figure 3a) was expected to result in a phenotype virtually identical to that observed by overexpressing a wild-type version of *PAR1*. In agreement, P35S:*PAR1-V* lines displayed a phenotype typical of *PAR1* overexpression in terms of dwarfism, dark-green pigmentation, reduced response to W + FR and repression of auxin- and simulated shade-induced *SAUR15* and *SAUR68* gene expression (Figure 3).

To discard that this phenotype was due to the activity of truncated *PAR1-V* protein forms, plants constitutively overexpressing a triple translational fusion between *PAR1-V* and the glucocorticoid receptor (*GR*) domain (P35S:*PAR1-VG* lines) were generated (Figure 4a). The *GR* domain is capable of retaining a nuclear protein to which it is attached in the cytoplasm of plant cells. Upon addition of the glucocorticoid dexamethasone (DEX), the fusion protein translocates to the nucleus. In the absence of DEX, the phenotypes of wild-type and transgenic P35S:*PAR1-VG* seedlings were similar. By contrast, DEX treatment induced a dwarf dark-green phenotype only in P35S:*PAR1-VG* seedlings, which was similar to that observed in DEX-treated P35S:*PAR1-GR* seedlings (Figure 4b) (Roig-Villanova *et al.*, 2007). Although the DEX-induced phenotype was not observed in all seedlings of all lines (perhaps because the *PAR1-VG* transgene or the corresponding fusion protein were unstable), the dwarf phenotype was DEX-dependent in all cases, which indicates that it was not produced by truncated versions of the *PAR1-VG* protein. These data confirm that the phenotypes associated with the overexpression of a functional *PAR1* protein are not due to the expression of truncated versions of *PAR1-VG*. Furthermore, they show that the addition of a transcriptional activation domain to *PAR1* does not impair its biological function, particularly its ability to repress gene expression (Figures 3c–d). Together, our results indicate that *PAR1* does not bind to the promoter of its target genes

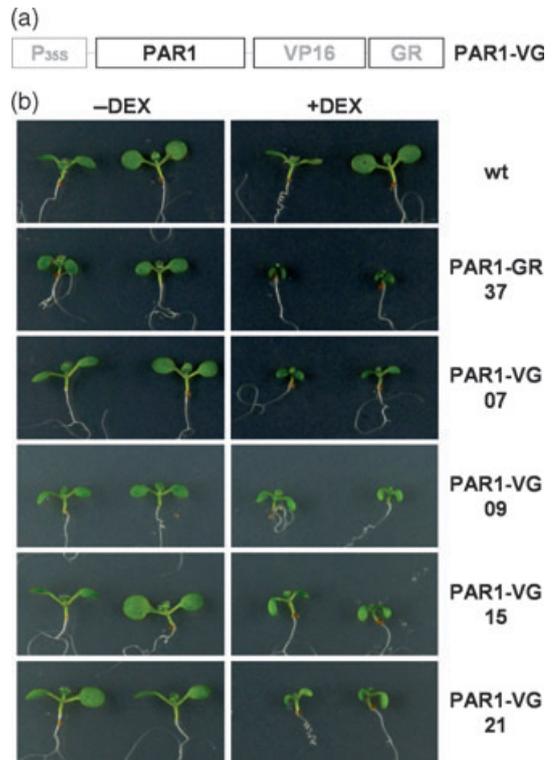


**Figure 3.** Phenotype of plants overexpressing *PAR1-V*. (a) Scheme showing the *PAR1-V* derivative overexpressed. (b) Hypocotyl response to simulated shade of *PAR1-V*-overexpressing seedlings. Columns represent the mean  $\pm$  SE. Seedlings were grown as indicated in Figure 1(d). *PAR1-GG* refers to plants overexpressing *PAR1* fused to the double reporter *GUS-GFP* (Roig-Villanova *et al.*, 2007). Aspect of representative 7-day-old seedlings of the lines analyzed (top of the graph). Panels are shown to the same scale. (c) Effect of *PAR1-V* overexpression on auxin-induced *SAUR15* and *SAUR68* expression. Seedlings were grown as indicated in Figure 2(c). An RNA blot analysis is shown at the bottom of each graph. Values are means  $\pm$  SE of three independent samples. (d) Effect of *PAR1-V* overexpression on simulated shade-induced *SAUR15* and *SAUR68* expression. W-grown 7-day-old wild type (wt) and lines shown in (b) were treated for 0 (W) and 1 h with W + FR. Values are means  $\pm$  SE of three independent quantitative PCR replicates normalized to *UBQ10*. In (c) and (d), normalized gene expression is presented relative to the expression of untreated (0 h) wt seedlings. Symbols indicate significant differences ( $^{\circ}P < 0.05$ ,  $^*P < 0.01$ ) relative to the controls growing under the same conditions.

either directly or indirectly (by association with other transcription factors). Instead, PAR1 might regulate gene expression by dimerizing with other bHLH proteins.

#### Dimerization of PAR1 is required for biological activity

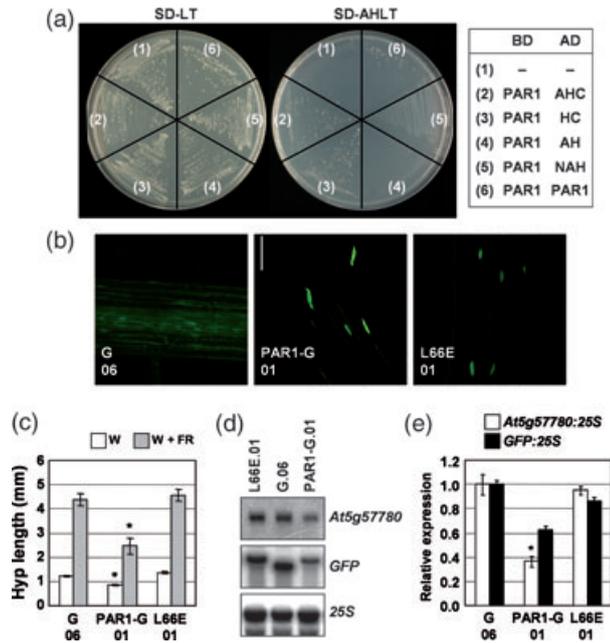
The HLH region of bHLH factors is required for homo- or heterodimerization (Heim *et al.*, 2003). In a yeast two-hybrid (Y2H) assay, PAR1 has been shown to be able to homodi-



**Figure 4.** Phenotype of plants overexpressing *PAR1-VG* derivative. (a) Scheme showing the *PAR1-VG* derivative gene overexpressed. (b) Phenotype of 7-day-old W-grown wild type (wt) and transgenic seedlings overexpressing *PAR1-GR* (line 37) or *PAR1-VG* (four independent transgenic lines, 07, 09, 15 and 21) germinated and grown on medium either supplemented (+) or not (-) with 5  $\mu$ M dexamethasone (DEX). Panels are shown to the same scale.

merize (Carretero-Paulet *et al.*, 2010) and heterodimerize (Figure S3). Therefore we used this technique to test the dimerization ability of truncated PAR1 versions that contain the HLH domain (AHC, HC, NAH and AH) (Figure 5a). The deletion fragments were fused to the GAL4 activation domain (AD) and tested for dimerization against full-length PAR1 fused to the GAL4 DNA-binding domain (BD-PAR1). Only yeast colonies co-expressing AD-PAR1, AD-AHC or AD-HC together with BD-PAR1 grew in SD-AHLT medium (Figure 5a). These results indicated that the interaction was taking place only when both HLH and C-terminal domains were present. Because precisely these two domains were also required for biological activity of PAR1 in transgenic plants (Figures 2 and 3), we conclude that dimerization might be a fundamental aspect of the mechanism by which PAR1 regulates SAS responses.

To rule out that other putative functions of the HLH and/or C-terminal domains of PAR1 could be important for its biological activity, we directly tested whether dimerization was an absolute requirement for the function of this protein *in vivo*. Previously it was shown that conserved residues in the HLH domain of PAR1 are required for homodimerization

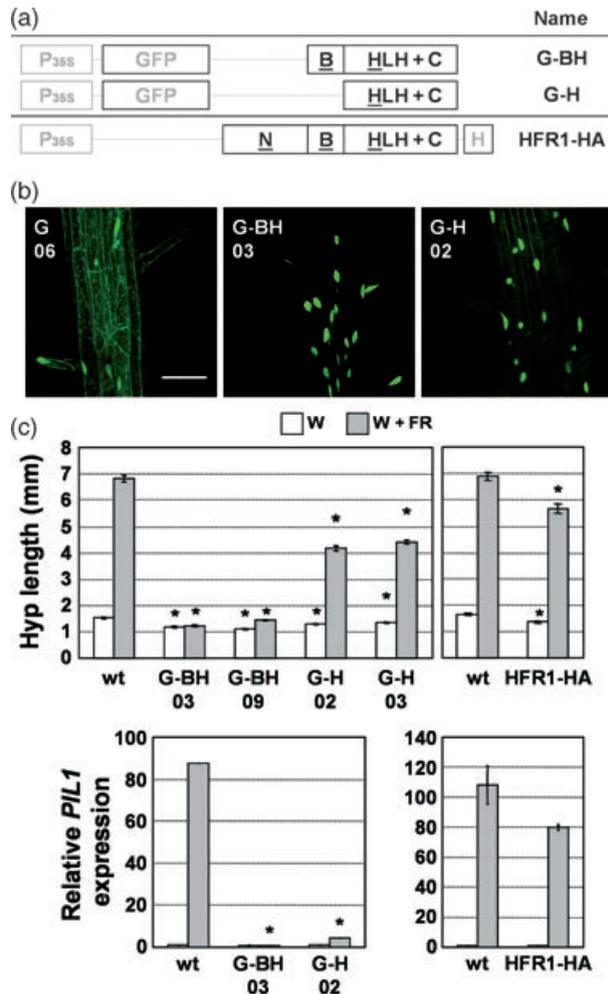


**Figure 5.** Dimerization and biological activities of PAR1 derivatives. (a) Yeast two-hybrid (Y2H) assay of PAR1-truncated derivative forms. SD-LT and SD-AHLT refer to the selective media indicative of transformed cells or protein-protein interaction, respectively. Numbers refer to the combinations of binding domain (BD) and activation domain (AD) constructs specified on the right panels. (b) The GFP fluorescence in roots from 10-day-old W-grown seedlings overexpressing the indicated GFP-derived proteins. Panels are to the same scale. Bar = 50  $\mu$ m. (c) Hypocotyl response to simulated shade of representative *PAR1<sub>L66E</sub>* overexpressing seedlings. Columns represent the mean  $\pm$  SE. Seedlings were grown as indicated in Figure 1(d). (d) *GFP* and *At5g57780* expression of the transgenic lines indicated in (b). Samples were processed as indicated in Figure 2(a). (e) Normalized expression of the genes shown in (c) is presented relative to the expression levels in the control line (G.06). Values are means  $\pm$  SE of three independent samples. Symbols indicate significant ( $*P < 0.01$ ) differences relative to the control plants growing under the same conditions.

in a Y2H assay. In particular, *PAR1<sub>L66E</sub>* (a derivative of PAR1 containing Leu66 mutated to Glu) (Figure S1b) displayed no interaction in the Y2H growth assay (Carretero-Paulet *et al.*, 2010). To study its biological activity, the mutated form fused to *GFP* was overexpressed in transgenic plants (P35S:*PAR1<sub>L66E</sub>*-G lines). At least two independent transgenic plants showing high levels of transgene expression were selected. The GFP fluorescence confirmed that the mutated *PAR1<sub>L66E</sub>*-G protein was produced and localized in the nucleus (Figure 5b). As shown in Figure 5(c,d), overexpression of *PAR1<sub>L66E</sub>*-G lacked any biological activity, based on the hypocotyl elongation in response to simulated shade and other morphological phenotypes, as well as on the expression of *At5g57780*, a marker gene of increased PAR1 activity (Figure 2). Altogether, these results confirm that dimerization via the HLH domain is essential for PAR1 activity in plant cells.

### The HLH and the adjacent C-terminal domain are also required for biological activity of HFR1

Like PAR1 and PAR2, HFR1 is an atypical bHLH protein involved in the regulation of SAS responses. Although the basic (B) domain of this protein might not be functional to bind E-boxes or G-boxes (Hornitschek *et al.*, 2009), HFR1 might use this domain to bind other DNA sequences. Alternatively, HFR1 activity might require dimerization via the HLH (H) domain but not DNA binding, as shown here for PAR1. To address this possibility, two truncated versions of *HFR1* fused to the *GFP* reporter gene (G-BH and G-H) were generated (Figure S4) and overexpressed in transgenic plants under the 35S promoter (P35S:G-BH and P35S:G-H lines) (Figure 6a). The *BH* fragment that we overexpressed in this work comprises the same HFR1 residues of the CT161 construct generated by other authors, whose truncated gene product is more stable than the full-length HFR1 protein in the dark (Yang *et al.*, 2005). The *H* fragment of the *HFR1* gene overexpressed was analogous to the PAR1 HC construct described in Figure 1(a), because it contains the HLH and the adjacent C-terminal region. The GFP fluorescence indicated that both truncated proteins were expressed and targeted to the nucleus of plant cells (Figure 6b). As controls, untransformed plants (wt) and a transgenic line overexpressing an epitope-tagged version of HFR1 (P35S:HFR1-HA) were used (Duek *et al.*, 2004). As an estimate of the biological activity of these HFR1 derivatives, we analyzed the response of hypocotyls to W + FR. Both P35S:G-BH and P35S:G-H seedlings displayed significantly short hypocotyls when grown under W and a significantly reduced response to W + FR compared with the untransformed wt control. The decreased hypocotyl elongation phenotype was stronger than in P35S:HFR1-HA lines (particularly in response to simulated shade) (Figure 6c). In all three cases, two-way ANOVA tests indicated a significant interaction ( $P < 0.01$ ) between the high levels of *HFR1* derivative expression and simulated shade treatments in the case of hypocotyl elongation (Table S2). We also analyzed the response of *PIL1*, a gene whose expression is directly repressed by HFR1, to 1 h of W + FR (Hornitschek *et al.*, 2009). The up-regulation of *PIL1* expression was attenuated in P35S:HFR1-HA seedlings, and strongly inhibited in both P35S:G-BH and P35S:G-H seedlings (Figure 6d). These results are consistent with published information about the negative role of HFR1 in the control of SAS responses (Sessa *et al.*, 2005; Roig-Villanova *et al.*, 2007; Hornitschek *et al.*, 2009) and also indicate that the truncated forms of HFR1 do not appear to acquire neomorphic functions. All together, our data demonstrate that the HLH domain and the adjacent C-terminal region are sufficient to confer nuclear localization and biological activity, and imply that DNA binding is not required for the biological activity of any of these proteins during the SAS.



**Figure 6.** Phenotype of plants overexpressing truncated versions of *HFR1*. (a) Scheme showing the truncated *HFR1* derivatives overexpressed. (b) The GFP fluorescence in roots from 7-day-old W-grown transgenic seedlings expressing the indicated GFP-tagged proteins. Panels are to the same scale. Bar = 50  $\mu$ m. (c) Hypocotyl response to simulated shade of lines shown in (a). Columns represent the mean  $\pm$  SE. Seedlings were grown as indicated in Figure 1(d). (d) Relative *PIL1* transcript abundance. W-grown 7-day-old wild-type (wt) and lines shown in (a) were treated for 0 and 1 h with W + FR (FR, far-red). Values are means  $\pm$  SE of three independent quantitative PCR replicates normalized to *UBQ10*. Transcript abundance is measured relative to wild-type (wt) 0 h values. Symbols indicate significant differences ( $*P < 0.01$ ) relative to the wt control plants growing under the same conditions.

## DISCUSSION

The regulation of the SAS responses in *Arabidopsis* after perception of plant proximity by phytochromes involves a rapid increase in the expression of several *PAR* genes, which eventually triggers SAS-associated morphological (hypocotyl length) and metabolic (photosynthetic pigment accumulation) changes (Salter *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2007; Lorrain *et al.*, 2008; Sorin *et al.*, 2009). Genetically and functionally characterized *PAR* genes that encode proteins

of the bHLH family of transcriptional regulators, such as *PAR1*, *PAR2*, *HFR1* and *PIL1*, are negative regulators of the SAS. *PAR1* and *PAR2* differ from the rest because of their small size (118 amino acids) and the substitution of the basic domain by an acidic domain (Figure S1). By contrast, *HFR1* protein is larger (292 amino acids) and it contains an atypical basic domain (Figure S1). Initial primary structure analyses led to the proposal that *PAR1*, *PAR2* and *HFR1* either do bind to DNA sequences other than canonical E-boxes or even do not to bind to DNA at all, hence acting fundamentally as transcriptional cofactors (Fairchild *et al.*, 2000; Wray *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2007). However, compelling experimental evidence has been missing until now.

Our structure–function analyses show that a truncated *PAR1* fragment containing only the HLH domain and the adjacent C-terminal region (P35S:HC-G plants) was functionally equivalent to the full-length *PAR1* factor as deduced by their effect on hypocotyl elongation and repression of gene expression when overexpressed in transgenic plants (Figures 1 and 2). Based on the GFP fluorescence of the recombinant proteins, all truncated *PAR1* derivatives are produced and, with the only exception of AH-G, mainly localized in nuclei (Figure 1c). Furthermore, a mutated *PAR1*<sub>L66E</sub> protein targeted to the nucleus but unable to dimerize (Carretero-Paulet *et al.*, 2010) has no biological activity when overexpressed in plants (Figure 5). These results together indicated that: (i) nuclear localization is not sufficient to confer biological activity and (ii) the derivative forms of *PAR1* overexpressed in plants owe their biological activity exclusively to the ability to interact with themselves or other proteins through their extended HLH domain. The fact that truncated regions of *PAR1* containing the HLH domain but not the C-terminal region (NAH and AH) lacked the ability to dimerize in Y2H assays (Figure 5a) and were not biologically active when overexpressed in plants (Figure 1) might suggest that dimerization requires not only the presence of the HLH domain but also of the adjacent C-terminal region. However, it is most likely that the minimal region that we selected as the HLH domain, based on some studies (Atchley and Fitch, 1997; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003), was actually incomplete. In fact, other reports (Heim *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2007) include in the HLH motif seven more residues that were part of the region that we selected as the C-terminal domain in this work (Figure S1).

In the case of *HFR1*, we used a similar strategy to demonstrate that this protein only required the extended HLH domain for biological function, similar to *PAR1*. Overexpression of truncated fragments lacking different portions of the N-terminal region of *HFR1* (residues 1–131; Figure S4) caused a much stronger de-etiolation phenotype than the full-length *HFR1* protein, suggesting the involvement of this domain in the stability of the protein (Yang *et al.*, 2003, 2005; Duek *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2005). In addition, this suggested that the bHLH domain and the adjacent

C-terminal region were sufficient to confer a biological activity, similar to that shown by the full-length HFR1 protein. Therefore, and based on these data, we did not include the N-terminal domain in our constructs. In agreement with the published results, overexpression of a truncated *HFR1* that lacked the whole 1–131 N-terminal region (P35S:G-BH plants) resulted in a much stronger SAS phenotype than that caused by the full-length HFR1 factor in terms of reduced hypocotyl elongation and decreased *PIL1* expression in response to simulated shade (Figure 6). More importantly, overexpression of only the HLH and the adjacent C-terminal domain of *HFR1* (P35S:G-H) also resulted in a reduced hypocotyl elongation phenotype and reduced *PIL1* expression in response to simulated shade (Figure 6), indicating that the basic domain is not required for full (wild-type) biological activity of HFR1. Furthermore, point mutations in the HLH domain result in HFR1 proteins unable to dimerize and that lack any obvious activity in plants (Hornitschek *et al.*, 2009). These results together indicate that HFR1, like PAR1, can only function when its dimerization properties are preserved.

A formal possibility that could explain how PAR1 and HFR1 can directly regulate gene expression using only the extended HLH domain was that these proteins could access and sit in the target promoters via HLH-mediated interaction with true transcription factors. However, evidence is now available that neither PAR1 nor HFR1 employ this mechanism in plant cells. Thus, overexpression studies show that chimeric *PAR1-VP16* and *PAR1-VP16-GR* versions have the same biological activity as PAR1, including the ability to repress direct target genes *SAUR15* and *SAUR68* (Figures 3 and 4). Similarly, overexpression in plants of a *VP16-AD* fusion to *HFR1* does not seem to alter the biological activity of HFR1 (C. Fankhauser, Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Switzerland, personal communication). Because the presence of a transcriptional activation domain such as VP16-AD in chimeric versions of PAR1 or HFR1 did not cause a distinctive phenotype, we concluded that these proteins generally regulate gene transcription without acceding directly or indirectly to DNA regulatory sequences. Instead, both HFR1 and PAR1 most likely function as transcriptional cofactors, similarly to animal HLH-containing ID (inhibitor of DNA binding) proteins, which modulate gene expression without binding to DNA regulatory motifs (Norton, 2000; Ruzinova and Benezra, 2003). Because PAR1 is able to heterodimerize (Figure S3), it might interact with canonical bHLH factors to prevent their binding to the promoter of the corresponding target genes, as already shown for HFR1 towards the expression of specific direct target genes such as *PIL1*, *XTR7* and *HFR1* (Hornitschek *et al.*, 2009). Interestingly, this fundamental mechanism would be important not only for short-term effects of the action of PAR1 and HFR1 (i.e. direct repression of target genes) but also for long-term effects (i.e. inhibition of

hypocotyl elongation in response to prolonged simulated shade treatments).

Similar to what is known for PAR1 and HFR1, PIF3 has a dual role in the regulation of light responses. Thus, during seedling de-etiolation PIF3 regulates early changes in gene expression immediately after exposure to light but also participates in later stages controlling hypocotyl elongation after long-term irradiation (Kim *et al.*, 2003; Roig-Villanova *et al.*, 2007; Al-Sady *et al.*, 2008; Hornitschek *et al.*, 2009). Overexpression of PIF3 mutated forms revealed that these dual activities are located in different parts of the protein: the phyB-interacting domain and the basic domain (DNA-binding) of the bHLH region. Whereas only its DNA-binding domain is required for the role of PIF3 as a transcriptional regulator in early signaling, only the phyB-interacting domain is required for inducing hypocotyl elongation after long-term irradiation (Al-Sady *et al.*, 2008). These results somehow contrast with our findings for PAR1 and HFR1, in which regulation of both early changes in gene expression (Figures 2c and 6d) and long-term changes in hypocotyl elongation and/or gene expression (Figures 1d, 2a–b and 6c) were located in the domain required for dimerization (HLH). Since the mutagenesis in PIF3 affected residues within the basic domain but maintained a HLH domain that is fully functional for interacting with other proteins (Al-Sady *et al.*, 2008), it is unknown whether its dimerization activity through the HLH domain might affect only one or both of PIF3's molecular activities.

The existence of dozens of potential SAS regulators is consistent with the concept that the SAS is a complex response implemented by the regulation of pre-existing transcriptional networks. Coherently, mutants deficient in a single component show, at best, only mild defects in the SAS response analyzed. Studying the organization of this complex network therefore requires learning about the potential activities of the individual components and the interactions amongst the different factors involved. Our structure–functional analyses of these atypical bHLH proteins indicate the fundamental importance of protein–protein interaction in the regulation of the SAS responses: PAR1 and HFR1 might act basically as dominant negative antagonists of bHLH transcription factors by heterodimerizing with them and preventing them from binding DNA or other transcription factors, therefore affecting the transcriptional network. In view of our results, we are currently investigating whether additional proteins that interact with these transcriptional cofactors (found in a Y2H screening) might act as networked regulatory components of SAS responses.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Plant material and growth conditions

*Arabidopsis* (*A. thaliana*) transgenic lines were generated in the Col-0 background. Lines overexpressing *PAR1* fused to *GFP*

(P35S:PAR1-G.01), to *GUS-GFP* double reporter (P35S:PAR1-GG.13) or to *GR* (P35S:PAR1-GR.37) were previously described (Roig-Villanova *et al.*, 2007). For seed production, plants were grown in the greenhouse under long day (LD 16 h light/8 h dark) conditions. Seeds were surface sterilized and sown on Petri dishes with solid growth medium without sucrose [GM<sup>-</sup>; 0.215% (w/v) MS salts plus vitamins, 0.025% (w/v) 2-(N-morpholine)-ethanesulfonic acid (MES) pH 5.8] (Roig-Villanova *et al.*, 2006). After stratification (3–6 days), plates were incubated in growth chambers at 22°C under W (80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  of photosynthetically active radiation; R:FR ratio of 3.2–4.5). Simulated shade was generated by enriching W with supplementary FR provided by QB1310CS-670-735 light-emitting diode (LED) hybrid lamps (Quantum Devices Inc., <http://www.quantumdev.com/>) (80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$  of photosynthetically active radiation; R:FR ratio of 0.05). Fluence rates were measured using an EPP2000 spectrometer (StellarNet, <http://www.stellarnet-inc.com/>) (Sorin *et al.*, 2009). For gene expression analyses, seeds were sown on filter paper on top of GM<sup>-</sup> medium.

### Construction of transgenic lines

Details of the generation of the described transgenic lines are given in the Appendix S1. Arabidopsis plants were transformed with the obtained binary vectors. Transgene presence in T<sub>1</sub> plants was verified by PCR analysis using specific primers on plant genomic DNA. Only lines with a single T-DNA insertion (as estimated from the segregation of the marker gene in T<sub>2</sub> populations) were eventually selected.

### Chemical treatments

To prepare stock solutions, DEX and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were dissolved in absolute ethanol at 5 and 250 mM, respectively. Stock solutions were kept at –20°C until use.

### Hypocotyl measurements

The National Institutes of Health ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/>) was used on digital images to measure the length of hypocotyls, as indicated elsewhere (Sorin *et al.*, 2009). At least 15 seedlings were used for each data point, experiments were repeated two to five times and a representative one is shown. Statistical analyses of the data (*t*-test and two-way ANOVA) were performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (<http://www.graphpad.com/>).

### RNA blot analysis and quantitative PCR

The RNA blot analyses and hybridization probes are described in the Appendix S1. Images were visualized by using a molecular Imager FX (Bio-Rad, <http://www.bio-rad.com/>), and band intensities were quantified by using QUANTITY ONE (Bio-Rad) software. Expression levels were normalized with the 25S rRNA signal. Reverse transcriptase and quantitative PCR (qPCR) analyses of gene expression were performed as indicated elsewhere (Sorin *et al.*, 2009). The *UBQ10* gene was used as a control. Three biological replicates for each sample were assayed. Primer sequences can be found in the Appendix S1.

### Yeast two-hybrid (Y2H) interaction assays

The Matchmaker two-hybrid system (Clontech, <http://www.clontech.com/>) was used to perform Y2H growth assays. Details of the constructs used and yeast transformation are provided in the Appendix S1. Yeast cells were co-transformed with the different pairs of BD/AD constructs. Independent transformants were selected on SD-Leu-Trp (SD-LT). Independent colonies were trans-

ferred to SD-Ade-His-Leu-Trp (SD-AHLT) to test for protein–protein interaction. Co-transformations were repeated at least twice with identical results.

### Subcellular localization analyses

Transgenic seedlings were mounted in water on glass slides. The GFP activity was inspected using a FV 1000 confocal microscope (Olympus, <http://www.olympus.com/>). After excitation by a Kr/Ar 488-nm laser line, GFP was visualized with a band-pass 500–545 nm filter. Images were processed with the Olympus FV software. At least two independent transgenic lines were examined for each construct.

### Accession numbers

Sequence data from this paper can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: *PAR1* (At2g42870), *PAR2* (At3g58850), *SAUR15* (At4g38850), *SAUR68* (At1g29510), *HFR1* (At1g02340) and *PIL1* (At2g46970).

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the greenhouse services; C. Fankhauser, A. M. Lloyd, F. Parcy and the European Arabidopsis Stock Centre (NASC) for kindly providing seed or plasmid stocks; and M. Rodríguez-Concepción for comments on the manuscript. Fellowships or contracts came from Ministerio de Educación (AG), Gobierno de Chile (NC-E) and CSIC (JB-T). Research in the lab is supported by grants from the Generalitat de Catalunya (Xarba, 2009-SGR697) and Ministerio de Ciencia e Innovación – FEDER funds (BIO2005-00154, CSD2007-00036, BIO2008-00169).

### SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Analyses of PAR1 domains.

**Figure S2.** Representative phenotypes of transgenic seedlings overexpressing *AHC-G*.

**Figure S3.** Heterodimerization between PAR1 and PAR2.

**Figure S4.** Analyses of HFR1 domains.

**Table S1.** ANOVA table for experiments shown in Figure 1(c).

**Table S2.** ANOVA table for experiments shown in Figure 6(b).

**Appendix S1.** Materials and methods.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

### REFERENCES

- Al-Sady, B., Kikis, E.A., Monte, E. and Quail, P.H. (2008) Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2232–2237.
- Atchley, W.R. and Fitch, W.M. (1997) A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5172–5176.
- Bae, G. and Choi, G. (2008) Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **59**, 281–311.
- Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., Galstyan, A. and Martinez-Garcia, J.F. (2008a) PAR1 and PAR2 integrate shade and hormone transcriptional networks. *Plant Signal Behav.* **3**, 453–454.
- Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I. and Martinez-Garcia, J.F. (2008b) Light signaling: back to space. *Trends Plant Sci.* **13**, 108–114.

- Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martinez-Garcia, J.F., Bilbao-Castro, J.R. and Robertson, D.L. (2010) Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol.* **153**, 1398–1412.
- Chen, M., Chory, J. and Fankhauser, C. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 87–117.
- Devlin, P.F., Patel, S.R. and Whitelam, G.C. (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell*, **10**, 1479–1487.
- Devlin, P.F., Robson, P.R., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A. and Whitelam, G.C. (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in Arabidopsis by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.* **119**, 909–915.
- Devlin, P.F., Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **133**, 1617–1629.
- Djakovic-Petrovic, T., de Wit, M., Voeseek, L.A. and Pierik, R. (2007) DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant J.* **51**, 117–126.
- Duek, P.D., Elmer, M.V., van Oosten, V.R. 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.
- Faigon-Soverna, A., Harmon, F.G., Storani, L., Karayekov, E., Staneloni, R.J., Gassmann, W., Mas, P., Casal, J.J., Kay, S.A. and Yanovsky, M.J. (2006) A constitutive shade-avoidance mutant implicates TIR-NBS-LRR proteins in Arabidopsis photomorphogenic development. *Plant Cell*, **18**, 2919–2928.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A. and Quail, P.H. (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* **14**, 2377–2391.
- Franklin, K.A. (2008) Shade avoidance. *New Phytol.* **179**, 930–944.
- Halliday, K.J., Martinez-Garcia, J.F. and Josse, E.M. (2009) Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a001586.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. and Bailey, P.C. (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 735–747.
- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O. and Fankhauser, C. (2009) Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *EMBO J.* **28**, 3893–3902.
- 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.
- Johnson, E., Bradley, M., Harberd, N.P. and Whitelam, G.C. (1994) Photoreponses of light-grown phyA mutants of Arabidopsis (Phytochrome A is required for the perception of daylength extensions). *Plant Physiol.* **105**, 141–149.
- Josse, E.M., Foreman, J. and Halliday, K.J. (2008) Paths through the phytochrome network. *Plant Cell Environ.* **31**, 667–678.
- Kebrom, T.H. and Brutnell, T.P. (2007) The molecular analysis of the shade avoidance syndrome in the grasses has begun. *J. Exp. Bot.* **58**, 3079–3089.
- Keuskamp, D.H., Sasidharan, R. and Pierik, R. (2010) Physiological regulation and functional significance of shade avoidance responses to neighbors. *Plant Signal Behav.* **5**, 655–662.
- Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P.S. and Choi, G. (2003) Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell*, **15**, 2399–2407.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P.D., Whitelam, G.C. and Fankhauser, C. (2008) Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant J.* **53**, 312–323.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E. and Quail, P.H. (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, **288**, 859–863.
- Martinez-Garcia, J.F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N., Gallemí, M. and Bou-Torrent, J. (2010) Regulatory components of shade avoidance syndrome. *Adv. Bot. Res.* **53**, 65–116.
- Nemhauser, J.L. (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 4–8.
- Norton, J.D. (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 22), 3897–3905.
- Parcy, F., Bomblies, K. and Weigel, D. (2002) Interaction of LEAFY, AGAMOUS and TERMINAL FLOWER1 in maintaining floral meristem identity in Arabidopsis. *Development*, **129**, 2519–2527.
- Quail, P.H. (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 85–93.
- Roig-Villanova, I., Bou, J., Sorin, C., Devlin, P.F. and Martinez-Garcia, J.F. (2006) Identification of primary target genes of phytochrome signaling. Early transcriptional control during shade avoidance responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **141**, 85–96.
- Roig-Villanova, I., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Carretero-Paulet, L., Portoles, S., Rodriguez-Concepcion, M. and Martinez-Garcia, J.F. (2007) Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO J.* **26**, 4756–4767.
- Ruzinova, M.B. and Benezra, R. (2003) Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol.* **13**, 410–418.
- Salter, M.G., Franklin, K.A. and Whitelam, G.C. (2003) Gating of the rapid shade-avoidance response by the circadian clock in plants. *Nature*, **426**, 680–683.
- Sawa, S., Ohgishi, M., Goda, H., Higuchi, K., Shimada, Y., Yoshida, S. and Koshiba, T. (2002) The HAT2 gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in Arabidopsis. *Plant J.* **32**, 1011–1022.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mittempergher, F., Becker, J., Morelli, G. and Ruberti, I. (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes Dev.* **19**, 2811–2815.
- Sorin, C., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I. and Martinez-Garcia, J.F. (2009) ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in Arabidopsis seedlings. *Plant J.* **59**, 266–277.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. and Ruberti, I. (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development*, **126**, 4235–4245.
- Tao, Y., Ferrer, J.L., Ljung, K. et al. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, **133**, 164–176.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Quail, P.H. (2003) The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell*, **15**, 1749–1770.
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V. and Romano, L.A. (2003) The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1377–1419.
- Yang, K.Y., Kim, Y.M., Lee, S., Song, P.S. and Soh, M.S. (2003) Overexpression of a mutant basic helix-loop-helix protein HFR1, HFR1-deltaN105, activates a branch pathway of light signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **133**, 1630–1642.
- Yang, J., Lin, R., Sullivan, J., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L., Deng, X.W. and Wang, H. (2005) Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 804–821.