

Figura VII.9: Representación esquemática de las vías de fotosíntesis en la que se indican cuáles son los genes reprimidos por HAHB4. En la figura se encuentran representados la cadena de transporte de electrones, el complejo ATP-sintasa y el ciclo de Calvin. En rojo se señala el código de identificación de cada gen reprimido en las plantas transgénicas que expresan en forma constitutiva *HAHB4*.

La figura VII.9 y la tabla VII.1 muestran los niveles transcripcionales de un grupo considerable de genes relacionados con el proceso de fotosíntesis. Estos genes se encuentran reprimidos por la acción de *HAHB4*. Estos resultados, que fueron obtenidos en el ensayo de microarreglos, fueron corroborados cuantificando los transcritos de los mismos genes por RT-PCR en líneas transgénicas independientes.

ID	Descripción	S/H4	p-Val
At5g01530	Proteína de unión a clorofila A-B (LHCB4)	-3,3311	--
At2g34420	Proteína de unión a clorofila A-B (LHB1B2)	-2,3669	4,40E-08
At3g08940	Proteína de unión a clorofila A-B (LHCB4.2)	-2,15696	7,70E-06
At2g34430	Proteína de unión a clorofila A-B (LHB1B1)	-2,69821	--
At3g54890	Proteína de unión a clorofila A-B (CAB)	-4,66216	--
At1g61520	Proteína de unión a clorofila A-B (LHCA3.1)	-4,90414	--

At3g61470	Proteína de unión a clorofila A-B (LHCA2)	-3,48945	--
At1g15820	Proteína de unión a clorofila A-B (LHCB6)	-1,91587	0,003
At2g06520	Proteína del fotosistema II (PSBX)	-3,64268	--
At1g67740	Proteína del fotosistema II (PSBY)	-6,60244	--
At4g28660	Proteína del fotosistema II (PSBW)	-3,04196	1,00E-07
AtCg00720	Citocromo b6	-2,88186	4,20E-10
At1g76100	Plastocianina	-3,26708	--
At4g09650	Cadena delta de la ATP-sintasa (OSCP)	-2,16145	6,90E-06
At4g04640	Cadena gama 1 de la ATP-sintasa (ATPC1)	-3,43664	--
At4g02770	Proteína del fotosistema I (PSAD1)	-2,4657	3,80E-09
At2g20260	Proteína del fotosistema I (PSAE2)	-1,97931	5,70E-04
At1g55670	Proteína del fotosistema I (PSAG)	-2,71321	5,50E-11
At4g12800	Proteína del fotosistema I (PSI-L)	-2,17498	5,00E-06
At1g52230	Proteína del fotosistema I (PSAH2)	-2,22839	1,30E-06
AtCg00340	Proteína del fotosistema I apoproteína A2	-2,41831	3,80E-06
At1g31330	Proteína del fotosistema I subunidad III	-18,2396	--
At1g20020	Ferredoxina-NADP(+) reductasa	-2,65001	3,80E-11
At1g32060	Fosforibuloquinasa (PRK)	-2,75299	5,50E-12
At1g67090	Ribulosa bisfosfato carboxilasa / subunidad menor RuBisCO 1A (RBCS-1A) (ATS1A)	-2,41496	1,30E-08
At5g38410	Ribulosa bisfosfato carboxilasa / subunidad menor RuBisCO 3B (RBCS-3B) (ATS3B)	-2,6703	2,20E-11
At2g39730	Ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa activasa / RuBisCO activasa	-3,5603	--
At1g42970	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa B (GAPB)	-2,86394	--
At2g24270	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP	-2,27995	3,80E-07
At4g26530	Fructosa-bisfosfato aldolasa	-4,44752	--
At4g38970	Fructosa-bisfosfato aldolasa	-2,08493	4,40E-05
At2g45290	Transquetolasa	-3,36359	--
At5g61410	Ribulosa-fosfato 3-epimerasa	-3,07801	--
At5g36790	Fosfoglicolato fosfatasa (PhG-P)	-2,03073	1,70E-04
At5g26030	Ferroquelatasa I	-1,82513	2,10E-02
At4g30210	NADPH-citocromo p450 reductasa	-1,8025	3,50E-02
At4g25080	Protoporfirina metiltransferasa IX – Biosíntesis de Clorofila	-1,69349	4,00E-02
At1g08520	Quelatasa de Magnesio – Biosíntesis de Clorofila	-1,98481	4,90E-04
At3g56460	Biosíntesis de Clorofila	-3,46055	6,20E-04
At1g74470	Geranilgeranil reductasa - Biosíntesis de Clorofila	-2,37841	5,80E-04
At1g23740	Biosíntesis de Clorofila	-2,65737	2,70E-10
At5g43940	Formaldehído deshidrogenasa (glutation) - Biosíntesis de Clorofila	-2,44528	5,10E-09

Tabla VII.1: Genes involucrados en la fotosíntesis y reprimidos por la acción de HAHB4 detectados en plantas transgénicas de Arabidopsis en el ensayo de

microarreglos. Los genes resaltados en rojo son aquellos cuyos valores transcripcionales fueron validados por RT-PCR en tiempo real. ID: Anotación del gen en las bases de datos de Arabidopsis; S/H4: veces de cambio de un gen en particular entre plantas salvajes y transgénicas que expresan constitutivamente el gen *HAHB4*; p-Val: es el valor p estadístico correspondiente a cada relación de expresión. En los casos que el p-Val se indica como "--" significa que los valores p fueron inferiores a $1,00 \text{ E}^{-12}$.

Este análisis de los datos obtenidos en el microarreglo pone en evidencia que *HAHB4* reprime la transcripción de muchos genes que codifican proteínas que intervienen en las distintas etapas de la fotosíntesis. Entre ellas, proteínas de los fotosistemas I y II, la mayoría de las proteínas que unen clorofila (LHC I y II del inglés *light harvesting complex*) y un considerable grupo relacionado con la síntesis de clorofilas. Esta represión masiva debería estar afectando la capacidad fotosintética de la planta por lo que *HAHB4* tendría que estar cumpliendo un papel en este sentido. Investigar este punto en girasol, nos pareció de mucha importancia.

VII.2.6 – Los genes de girasol, homólogos a los identificados en Arabidopsis como reprimidos por HAHB4, presentan un comportamiento similar

Analizando las bases de datos disponibles, obtuvimos la información necesaria para diseñar oligonucleótidos específicos para genes de girasol, homólogos a algunos de los genes listados en la tabla VII.1. Medimos los niveles transcripcionales de estos genes en plantas de girasol mantenidas en condiciones normales o en condiciones en las cuales la expresión de *HAHB4* está aumentada, utilizando etileno u oscuridad como agentes inductores. Los resultados se muestran en la figura VII.10.

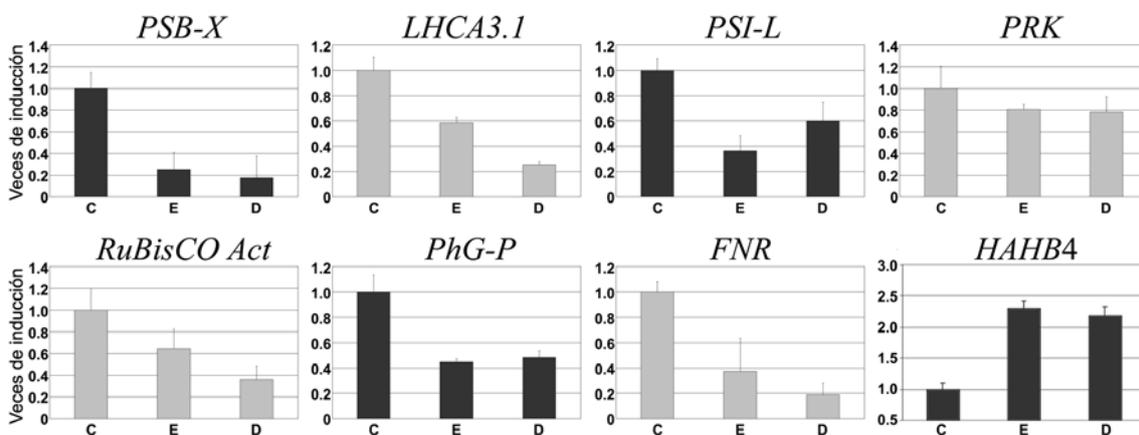


Figura VII.10: Los genes de girasol, homólogos a los identificados en Arabidopsis como reprimidos por la acción de *HAHB4*, se comportan de forma similar. Niveles de transcritos correspondientes a los genes que codifican las siguientes proteínas: proteína

del fotosistema II-X (PSB-X), proteína de unión a clorofila A-B (LHCA3.1), subunidad V del fotosistema I (PSI-L), fosforribulosa-quinasa (PRK), RuBisCO-activasa (RuBisCO act), fosfoglicolato-fosfatasa (PhG-P), ferredoxina-NADP reductasa (FNR) y de *Helianthus annuus* homeobox 4 (*HAHB4*) en plantas crecidas en condiciones normales (C), tratadas con etileno (E) o incubadas en oscuridad (D).

La expresión de los genes *PSBx*, *LHCA*, *PSI-1*, *PRK*, *RubisCO act*, *PhGP* y *FNR* está claramente reprimida en las dos condiciones en las que *HAHB4* se encuentra inducido. A pesar de que estos datos parecen indicar que el aumento de *HAHB4* reprime estos genes, la evidencia es indirecta ya que los estímulos utilizados, el etileno y la oscuridad, *per se* podrían estar modulando directamente la respuesta de estos genes. Por este motivo nos resultó crítico confirmar que la represión de estos genes en este sistema fuera de responsabilidad exclusiva de *HAHB4*, independizándonos de los efectores externos. Con este objetivo volvimos a hacer uso de la transformación transitoria de hojas de girasol utilizando la construcción que sobre-expresa el gen *HAHB4* (*35S:HAHB4*) y la que silencia la expresión endógena (*HAHB4* ARNi). Los controles fueron realizados usando hojas transitoriamente transformadas con un vector vacío o con MgCl₂. Se extrajeron los ARNs de las hojas transformadas previamente incubadas en completa oscuridad o en luz normal. Los resultados, muy similares a los observados en el experimento anterior, están presentados en la figura VII.11.

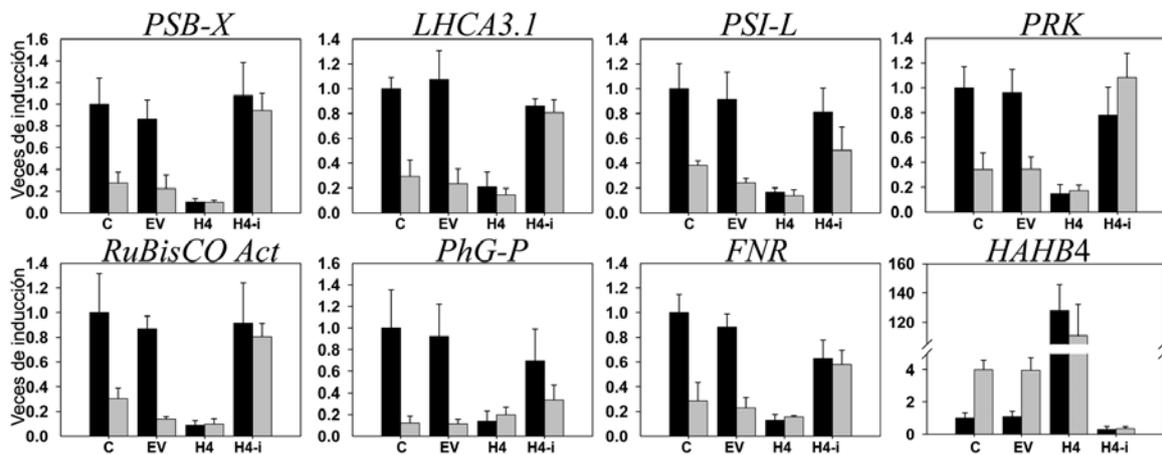


Figura VII.11: Niveles de los transcritos correspondientes a los mismos genes que se midieron y mostraron en la figura VII.10, obtenidos de hojas de girasol transitoriamente transformadas e incubadas en completa oscuridad (barras grises) o en condiciones óptimas de iluminación (barras negras). Para todos los genes ensayados, C representa los ARNs de hojas no transformadas; EV, los que provienen de hojas transformadas con el vector pART27 vacío; H4, transformadas con *35S:HAHB4* y H4i, cuando los ARNs fueron extraídos de hojas transformadas con el casete de silenciamiento de *HAHB4*.

En todos los casos, cuando la expresión de *HAHB4* aumenta ya sea por efectores externos o por la transformación transitoria, los transcritos de los genes analizados decrecen. En las hojas que no pueden expresar *HAHB4* (H4i) estos mismos genes no se reprimen en oscuridad, sino que sus niveles permanecen similares a los que presentan en plantas crecidas en luz. Los ensayos para evaluar la eficiencia de silenciamiento en las hojas de girasol transformadas transitoriamente con el casete de ARNi fueron presentados en el capítulo anterior y sirven a los efectos de confirmar la validez de los presentados en este capítulo (sección **VI.2.3**, figura VI.8).

Estos resultados indican conjuntamente que *HAHB4* al activarse en oscuridad actúa como un represor de la biosíntesis de muchos genes involucrados en fotosíntesis.

VII.2.7 – Consecuencias fisiológicas de la represión de la biogénesis de componentes fotosintéticos mediada por HAHB4.

Las observaciones moleculares descritas hasta este momento, nos condujeron a querer verificar si se traducían o no en cambios fisiológicos. Dicho de otra forma, quisimos saber si la represión de la biogénesis de genes involucrados en la fotosíntesis causaba una disminución concomitante en la eficiencia de este vital proceso. Para hacer estas medidas fisiológicas tomamos plantas transgénicas de expresión constitutiva, plantas transgénicas de expresión inducible y plantas salvajes.

Debido a que existe una masiva represión de genes que codifican proteínas de unión a clorofila y enzimas encargadas de la síntesis de estos pigmentos, el primer parámetro cuantificado fue el contenido de clorofilas A, B y carotenos en los tres genotipos. El análisis realizado indicó una disminución general en el contenido de pigmentos en las plantas transgénicas, especialmente en clorofila A y se muestra en la figura VII.12B). Como cabía la posibilidad de que esta disminución en la concentración de los pigmentos fuera una consecuencia de la disminución en el número de cloroplastos, o de su tamaño hicimos un análisis con microscopía confocal de las hojas provenientes de los distintos genotipos (Figura VII.12A). Las observaciones realizadas indicaron que no existe ninguna diferencia apreciable en el tamaño o en el número de estas organelas, lo que apoyaría la hipótesis de que la disminución en el contenido de pigmentos es una consecuencia directa de la represión de los genes antes mencionados.

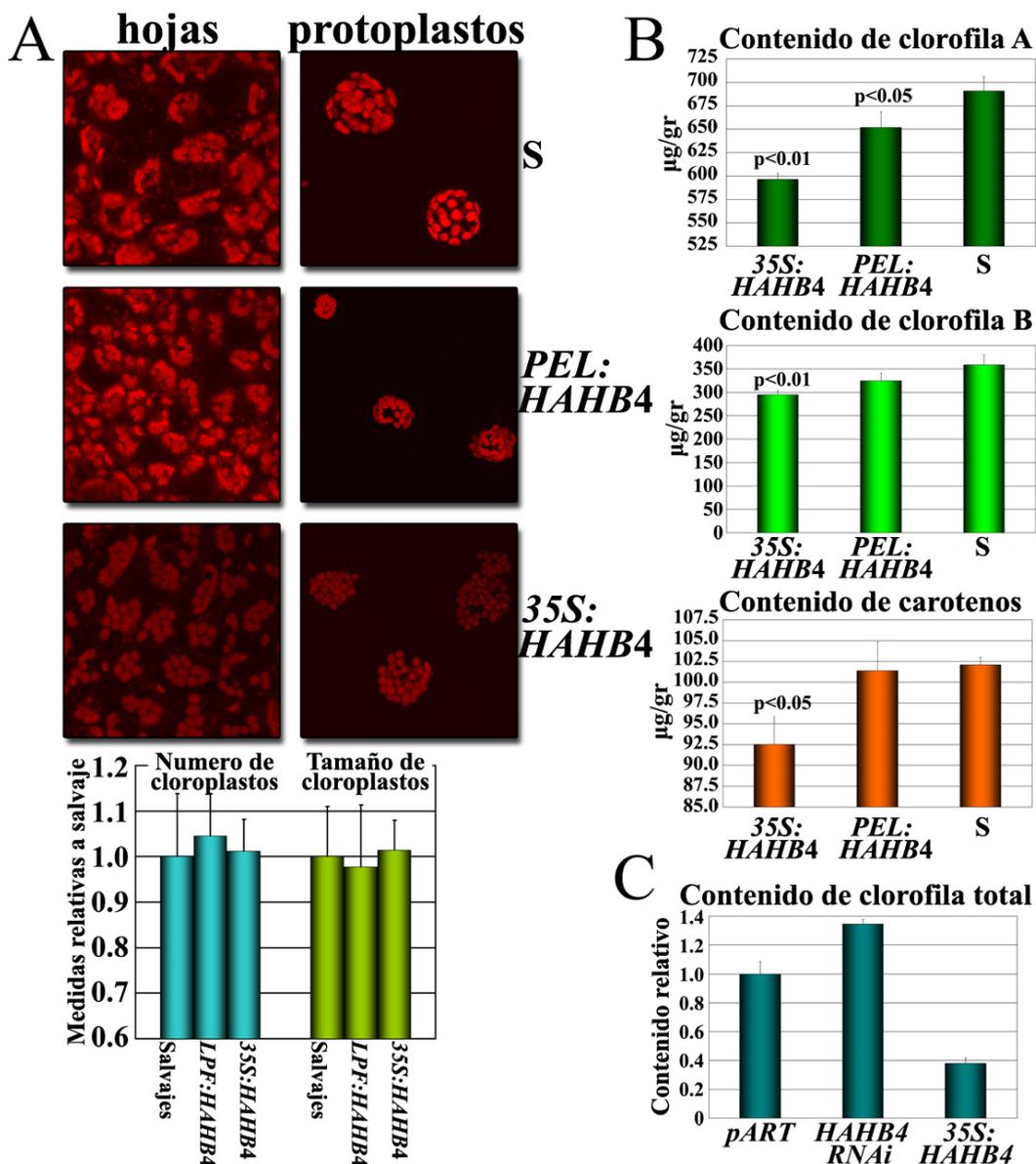


Figura VII.12: El contenido de pigmentos está reducido en los cloroplastos de las plantas transgénicas. **A:** microscopia confocal de hojas y protoplastos provenientes de plantas salvajes (S) o transgénicas (*35S:HAHB4* y *LPF:HAHB4*). En la parte inferior se grafican las mediciones de los tamaños y números de cloroplastos en los tres genotipos. **B:** concentración de clorofila A, B y carotenos en hojas de plantas salvajes, *35S:HAHB4* y *PEL:HAHB4*. **C:** contenido de clorofila total en hojas de girasol transformadas transitoriamente con un vector vacío (*pART*), con el casete de silenciamiento (*HAHB4 RNAi*) o con el casete de sobre-expresión *HAHB4* (*35S:HAHB4*).

Con el objeto de complementar estos resultados, medimos el contenido total de clorofilas en las hojas de girasol transformadas transitoriamente. Como se indica en la figura VII.12C las mediciones en este sistema se correlacionan bien con las obtenidas en Arabidopsis. Las plantas que sobre-expresan *HAHB4* muestran un menor contenido de

pigmentos y las plantas que tienen este gen silenciado presentan niveles de pigmentos similares a los de las plantas sin transformar.

En segundo término se evaluaron las tasas de fijación de CO₂ en plantas de *Arabidopsis* transformadas con *35S:HAHB4* (H4) o con el vector vacío (EV). Los resultados obtenidos indican que ambos genotipos intercambian gases con tasas similares (EV: 25.89 ± 1.58 μmol/m²s; H4: 29.05 ± 2.34 μmol/ m²s). Estas medidas se hicieron por unidad de superficie. Si la asimilación de CO₂ se calcula para la totalidad de la planta, o sea si se calcula cuántos gases intercambia una planta completa, las tasas serían las siguientes: EV: 25.61 ± 1.32 nmol/s; H4: 14.48 ± 2.31 nmol/s p-Val>0,01. A pesar de que con esta última interpretación se observa una menor asimilación de CO₂ en las plantas transgénicas, esto parece más una consecuencia de las diferencias de tamaño entre los genotipos (las plantas transgénicas son más chicas) que a una eficiencia de fotosíntesis menor.

En conjunto, las observaciones moleculares y fisiológicas indican que *HAHB4* participa como un represor del intrincado programa de regulación de la biogénesis de la maquinaria fotosintética.

VII.1 – Discusión.

La luz es esencial para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas, no sólo como una fuente de energía sino también como un estímulo que les permite regular numerosos procesos metabólicos. Las respuestas de las plantas a la luz son muchas, variadas, complejas y extremadamente dependientes de la calidad y cantidad de luz disponible. Uno de los cambios importantes que se producen por la luz es la activación de la transcripción de ciertos genes. De estos, los más estudiados son los que codifican la subunidad menor de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) y las proteínas de unión a clorofila a/b (Tobin y Silverthorne, 1985; Manzara y Gruissem, 1988; Dean y col., 1989; Humbeck y Krupinska, 2003). En muchas especies se observó un incremento marcado en los niveles transcripcionales de estos genes cuando se expusieron a la luz plántulas etioladas o plantas incubadas en oscuridad. Este tipo de inducción es dependiente de los fotorreceptores específicos que son las proteínas capaces de “medir” las características de la luz y activar/reprimir determinados genes en consecuencia (Figura VII.2 y Gallagher y Ellis, 1982; Silverthorne y Tobin, 1984; Berry-Lowe y Meagher, 1985; Adamska, 1995; Carter y col., 2000; Kuno y col., 2000; Escobar y col., 2004). Esta regulación transcripcional está coordinada por factores de

transcripción y elementos en *cis* presentes en los promotores de los genes que resultan blancos de la regulación. Muchos de estos factores de transcripción y sus secuencias de unión han sido identificados por su actividad en oscuridad reprimiendo genes que codifican proteínas que participan en alguna de las etapas de la fotosíntesis (Gilmartin y col., 1990; Lee y Hahn, 2002; McClung, 2006).

La participación de *HAHB4* en estos procesos de regulación transcripcional parece clara después de analizar las evidencias experimentales presentadas en este capítulo de la Tesis. Sus niveles transcriptionales aumentan en oscuridad y disminuyen en luz reversiblemente.

Esta no es la primera vez que se informa que una proteína de la familia HD-Zip aumenta su expresión en oscuridad. Henriksson y col. (2005), informaron que varios miembros de la subfamilia I se inducían en estas condiciones. Uno de esos genes, *ATHB7*, codifica la proteína de Arabidopsis con el más alto grado de homología con *HAHB4*, si bien el estudio citado es más bien parcial y no ahonda en detalles.

En el presente trabajo se pudo localizar una caja funcional de respuesta a luz/oscuridad ubicada entre los nucleótidos -416 y -301 y asignarle la responsabilidad en la respuesta a oscuridad observada. Los análisis *in silico* detectaron en esta región dos cajas GT putativas. Este tipo de cajas ha sido ampliamente caracterizado en promotores de genes que responden a cambios lumínicos (Green *et al.* 1988). Por otro lado, no se encontró en esta porción del promotor de *HAHB4* ninguna otra secuencia descrita como de respuesta a luz/oscuridad (DE1, PIF1 o PIF2, Inaba y col., 2000; Nagano y col., 2001; Lee y Hahn, 2002). Las cajas GT no siempre son funcionales aún las que se encuentran en promotores que responden a la calidad de luz (Zhou, 1999). En nuestro caso, o el de *HAHB4*, una resultó serlo (posición -320/-315) mientras que la otra no. Los ensayos con mutantes nos permitieron concluir que este gen no sólo se activa con la intervención de este elemento en *cis* en oscuridad sino que también es reprimido cuando se encuentra en condiciones lumínicas óptimas. Este comportamiento del promotor sería explicable de tres formas alternativas: 1- una sola proteína podría ser la que se esté uniendo a este elemento y exhiba actividad opuesta dependiendo de las condiciones lumínicas; 2- dos factores de transcripción (un activador y un represor) se unen a este elemento en forma específica en oscuridad y luz respectivamente; o 3- existirían co-factores específicos para cada condición, luz y oscuridad, que interaccionan con una sola proteína que es la que se une al sitio independientemente de la condición de iluminación. Considerando lo informado por otros autores en los que se

describe la funcionalidad de los elementos GT y de los factores de transcripción que a ellos se unen, el último mecanismo sería el más probable. A modo de ejemplo, el factor de transcripción GT1, que une elementos GT tanto en luz como en oscuridad, necesita interaccionar con otros co-factores (aún desconocidos) para actuar como regulador (Gilmartin y Chua, 1990). Para concluir esto, los autores se basaron en el hecho de que estas proteínas regulaban diferencialmente sus blancos en luz u oscuridad pero su expresión y capacidad de unión era idéntica en ambas condiciones. Por otro lado, también se demostró que, dependiendo del contexto que rodea a este sitio en el promotor, el mismo elemento GT podía producir una activación por luz/represión en oscuridad o una represión en luz/activación en oscuridad (Zhou 1999). En general las opiniones de otros autores coinciden en que estos elementos son críticos para la regulación por luz/oscuridad, pero la unión de un solo factor de transcripción a este sitio no es suficiente para modular la respuesta específica. Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones, hechas por otros investigadores.

El análisis transcriptómico en conjunto con las transformaciones transitorias nos permitieron inferir la función de *HAHB4* relacionada con el proceso de fotosíntesis. En este sentido un grupo de genes que codifican proteínas que participan directa o indirectamente de este metabolismo está reprimido en las plantas que expresan *HAHB4* en forma constitutiva. .

El impacto fisiológico de estas respuestas moleculares fue medido como una reducción en el contenido de clorofila de los cloroplastos, no así en su número o tamaño. Esta disminución en la concentración de clorofila se podría adjudicar a dos factores alternativos o aditivos. Uno podría ser la reducción en la tasa de biosíntesis de los pigmentos y el otro, la abundancia de proteínas encargadas de fijarlos. Si analizamos la capacidad de las plantas transgénicas de fijar CO₂, pareciera no existir ninguna diferencia apreciable entre plantas salvajes y transgénicas. En una primera instancia, estos resultados parecieran contradecir las conclusiones sacadas de los ensayos moleculares. Sin embargo, no existe tal contradicción ya que, otros autores han presentado evidencias que indican que una reducción de la expresión de genes que codifican proteínas de la maquinaria fotosintética raramente resulta en una reducción en la eficiencia de este proceso. Es más, se ha visto que en plantas mutantes en algunos de estos genes en las que los niveles de los ARNm respectivos se ven disminuidos hasta en un 90%, no presentaron alteraciones fenotípicas ni variaciones en las concentraciones de las proteínas codificadas por ellos (Quick y col., 1991; Price y col., 1994; Price y col.,

1995; Furbank y Taylor, 1995; Harrison y col., 2001). La explicación más plausible sería que estos genes se transcriben en exceso y sólo una pequeña proporción de los transcriptos se traduce. La lógica de este aparente malgasto energético en la transcripción de genes que no se traducirán, sólo es justificable por la enorme necesidad de la planta de esta maquinaria para vivir, por lo cual “elige” tener transcriptos en exceso que no tenerlos en el momento adecuado.

En conclusión, la acción del transgén causa en las plantas de *Arabidopsis* una reducción de la biogénesis de la maquinaria fotosintética y una pérdida del contenido de clorofila por célula que no se traduce en una eficiencia menor. La participación de otros factores de transcripción y de *HAHB4* pareciera necesaria para lograr una regulación fina de esta biogénesis. La maquinaria fotosintética nunca está completamente inactiva. Incluso durante la noche, cuando no hay luz disponible para ser convertida en energía, el aparato fotosintético se encuentra reducido pero listo para obtener energía tan pronto haya disponibilidad de luz.

Un trabajo reciente describe la acción de un factor de transcripción de *Arabidopsis*, del tipo *AP2/DREB*, que comparte muchas similitudes funcionales con *HAHB4*. Este factor, llamado RAP2.4, también se activa fuertemente en oscuridad y en respuesta a sequía modulando posteriormente las respuestas mediadas por etileno y varios procesos regulados por luz. Entre las concordancias más interesantes entre ese trabajo y el aquí presentado está la tolerancia a sequía conferida por esta proteína cuando es sobre-expresada en *Arabidopsis* (Lin y col., 2008). Identificar la proteína ortóloga a RAP2.4 en girasol nos sería extremadamente útil para establecer si existe una posible interacción entre estos dos factores de transcripción en la regulación de todos estos procesos.

Por último y para concluir, los resultados descritos en este capítulo concuerdan con los previamente obtenidos en el laboratorio describiendo la acción de *HAHB4*. No es sorprendente encontrar que situaciones fisiológicas en las cuales la planta de girasol presenta altos niveles de *HAHB4* como la sequía y la senescencia (Gago y col., 2002; Dezar y col., 2005; Manavella y col., 2006) también produzcan una marcada inhibición de la biogénesis de la maquinaria fotosintética (Kura-Hotta y col., 1987; Bate y col., 1991; Flexas y Medrano, 2002; Flexas y col., 2006). Esta inhibición mediada por *HAHB4* le significa a la planta un ahorro de energía y una buena posibilidad de aminorar el daño foto-oxidativo generado por la cadena de transporte de electrones durante períodos de sequía.