

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

Factores de transcripción vegetales de la familia HD-Zip:
hacia la comprensión de las diferencias funcionales entre
los distintos miembros a través de un análisis molecular.
Estudio particular del gen *AtHB1* de *Arabidopsis thaliana*

Lic. Matías Capella

Directora de Tesis: Dra. Raquel Lía Chan

Laboratorio de Biotecnología Vegetal

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

(CONICET/UNL)

2015

Agradecimientos:

Quiero agradecer primero a las Instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

A la *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas* de la *Universidad Nacional del Litoral* y a todas sus autoridades por abrirme las puertas de esta Casa de Estudios y permitirme realizar mi carrera de grado y posgrado.

Al *Instituto de Agrobiotecnología del Litoral* (CONICET/UNL)

A los organismos que financian el trabajo que se desarrolla en nuestro laboratorio:

Al *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas* (CONICET) por otorgarme las becas de posgrado que me permitieron dedicarme a esta tarea.

A la *Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica* (ANPCyT) por los subsidios otorgados a los proyectos que incluyen el presente trabajo de Tesis.

A todos los que hicieron posible esta Tesis Doctoral...

A mi Directora, Dra. Raquel L. Chan, no sólo por otorgarme la posibilidad de realizar esta Tesis en su laboratorio y por todas las enseñanzas que me brindó a lo largo de tanto tiempo, sino también por toda la confianza que depositó en mí. Por hacerme crecer como profesional y como persona...

Al Dr. Pablo Manavella, Pablete, por sus consejos, por las discusiones científicas y por su ayuda incondicional.

A Delfi, con quien hicimos tantos experimentos juntos, por hacer que nuestro trabajo de laboratorio sea mucho más llevadero. Por bancarme en todas, escucharme siempre, ayudarme y sobre todo por su cálida compañía.

A Toto, mi compañero de mesada durante tanto tiempo, por todas nuestras charlas, los litros de mates compartidos, por su excelente buen humor.

A Agus, por todos los buenos momentos que pasamos juntos, por toda la ayuda que me brindo y por su buena predisposición a discutir científicamente todos los resultados que obtuve.

A Jesi, por su constante buena onda, por ser mi cable a tierra en muchísimas oportunidades, por todas las rizas que compartimos juntos y por estar siempre que uno la necesita.

A Pame, por todas nuestras discusiones científicas, por sus brillantes ideas, por escucharme y ayudarme día a día con cualquier cosa, a pesar de estar haciendo mil cosas a la vez.

A Juli, por su constante alegría, por su compañerismo y sus constructivas charlas de almuerzo.

A Kari, por su ayuda incondicional y por estar siempre dispuesta a discutir temas de lo más diversos.

A Javi, que a pesar de mis incansables “llamados de atención”, nunca perdió la predisposición a ayudarme y aconsejarme.

A Guille, por nuestras charlas y esa buena onda que contagia.

A Cele y Vero, por su constante alegría y por todo lo compartido.

A Aquiles, Carlos, Florencia y Virginia, por su buena onda y su buena predisposición.

En fin, a mis compañeros y amigos del laboratorio, por hacer que el trabajo en el laboratorio sea increíble y que de gusto trabajar en un lugar así.

A mi familia...

A mi madre, Norma, que sin ella esto no hubiera sido posible. Por apoyarme en todo lo que emprendo, por estar siempre a mi lado sin importar lo que pase y por ayudarme siempre con una sonrisa en la cara. Porque sin ella no sería la persona que soy hoy...

A mis hermanos, Lucas y Leticia, por todas las alegrías y tristezas que vivimos juntos, por estar siempre a mi lado y por ser incondicionales conmigo.

A mi hermanita, Agustina, por la alegría que trajo a la familia.

A mi padre, Miguel, por su apoyo incondicional en todas mis locuras y por estar siempre que lo necesito.

A mi abuelo, Oscar, y mi abuela del corazón, Clara, por todas las sonrisas y los buenos momentos que vivimos juntos. Porque sin ellos, mi vida no sería lo mismo sin ellos.

A Darío, Marcela, Luciana, Julián y Mariana, por todas las alegrías que vivimos juntos que atesoraré siempre, por estar conmigo en todo momento y por su apoyo incondicional.

A todos ellos, por nunca dejar de creer en mí...

A todos los que me acompañaron a lo largo de la carrera...

A Agus, Fla, Harmito, Mauri, Nacho, Twe y Vicky, no sólo por haber disfrutado de su compañía durante toda mi carrera de grado, sino que también por vivir conmigo tantos momentos inolvidables.

A Andrés, Cesar, Pablo, Toto, Leandro, Gaucho, Daniel y Javi, por todas las cervezas, comidas, charlas y excelentes momentos compartidos. Por su amistad y por hacer que el jueves sea uno de los mejores días de la semana.

A Gustavo, Germán, Roberto, por las cenas y charlas compartidas, y por enseñarme distintas formas de ver el mundo.

A Fran y Nadu, por su alegría, por nuestras eternas discusiones hasta altas horas de la noche, por el amor que se tienen que es tan contagioso y por su hermosa amistad.

A Nicolás y Esteban, por todas las cosas compartidas y por brindarme su amistad aun hoy.

Al Ema y Lucho, por todas las risas compartidas, por los excelentes momentos que vivimos juntos. Por demostrarme día a día que amigos como ellos no se encuentran fácilmente.

A Eduardo, Facundo y Liliana, por su amor incondicional y por permitirme ser parte de su hermosa familia.

Y en especial a Pri, mi alma gemela, por creer en mí, por robarme una sonrisa con sólo mirarme, por seguirme a cualquier lado, por darme todo y no esperar nada a cambio, y por darme las fuerzas necesarias para superar cada obstáculo de mi vida. Por haber traído felicidad a mi vida... Te amo!

A todos, muchísimas gracias...

A Lucas, Leticia, Agustina y a Priscila...

ÍNDICE,
ANTECEDENTES
Y ABREVIATURAS

Índice

Índice de Tablas.....	7
Índice de Figuras.....	7
Antecedentes.....	9
Abreviaturas.....	12
Resumen.....	15
Abstract.....	18
Introducción General.....	21
1. La luz en el desarrollo vegetal.....	22
2. Las plantas y la disponibilidad de agua.....	23
3. La regulación de la expresión génica.....	24
4. Los factores de transcripción.....	25
5. Los factores de transcripción <i>Phytochrome-Interacting Factors</i> de tipo bHLH.....	27
6. Funciones biológicas de <i>Phytochrome-Interacting Factor 1</i>	32
7. Factores de transcripción con homeodominio.....	35
8. Homeodominios en plantas.....	36
9. La superfamilia de factores de transcripción con homeodominios en plantas.....	36
10. La familia homeodominio-cierre de leucinas.....	37
11. La subfamilia homeodominio-cierre de leucinas I.....	40
11.1. Aspectos funcionales y estructurales de los homeodominio-cierre de leucinas I.....	41
11.2. Características funcionales de los homeodominio-cierre de leucinas I pertenecientes al grupo III.....	44
12. La región carboxilo terminal de los factores de transcripción homeodominio-cierre de leucinas I se encuentra conservada entre distintas especies.....	45
Hipótesis y Objetivos del Trabajo.....	48
1. Hipótesis.....	49
2. Objetivos Generales.....	49
3. Objetivos Particulares.....	50
Materiales y Métodos.....	52
1. Material utilizado.....	53

1.1. Cepas bacterianas y de levaduras.....	53
1.2. Especies vegetales.....	54
1.3. Medios de cultivo.....	54
1.4. Vectores utilizados.....	56
1.5. Mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	58
1.6. Oligonucleótidos.....	58
2. Construcciones genéticas para levaduras.....	62
2.1. Construcciones de fusión al dominio de unión a ADN de GAL4.....	62
2.2. Construcciones de fusión al dominio de activación de GAL4.....	63
3. Construcciones genéticas para plantas.....	63
3.1. Construcciones para la expresión constitutiva.....	63
3.2. Construcciones para expresar un gen reportero bajo el control de un promotor específico.....	64
4. Construcciones genéticas para la expresión de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i> BL21 Codon Plus.....	66
5. Transformación de bacterias y de levaduras.....	68
5.1. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> y de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> por electroporación.....	68
5.2. Obtención de células competentes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
5.3. Transformación y selección de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
6. Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos.....	69
6.1. Minipreparación de ADN plasmídico.....	69
6.2. Minipreparación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
6.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	70
6.4. Extracción y purificación de ARN total.....	71
6.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	71
7. Reacciones enzimáticas.....	72
7.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	72
7.2. Ligación de moléculas de ADN.....	72
7.3. Reacción de recombinación GATEWAY®.....	72
7.4. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	72

8. Análisis de ácidos nucleicos.....	73
8.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	73
8.2. Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes.....	74
8.3. Transcripción reversa de ARN total.....	74
8.4. Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real.....	74
8.5. Análisis del transcriptoma por RNA-Seq.....	75
8.6. Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.....	76
8.7. Análisis de las secuencias.....	76
8.8. Identificación de los motivos AHA en las regiones carboxilo terminal.....	76
9. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	77
9.1. Cultivo de plantas.....	77
9.2. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
9.3. Selección de transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
9.4. Identificación de las líneas transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
9.5. Obtención de líneas homocigotas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
9.6. Transformación transitoria de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
9.7. Transformación transitoria de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	80
10. Análisis de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
10.1. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa.....	81
10.2. Tratamiento osmótico de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
10.3. Tratamiento con cicloheximida de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
10.4. Medición de la longitud de los hipocotilos en plántulas.....	82
10.5. Tratamiento con etileno de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
11. Células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	83
11.1. Ensayo para la inhibición del crecimiento de levaduras transformadas que expresan HIS3.....	83
11.2. Ensayos con filtros de la actividad β -galactosidasa.....	83
11.3. Ensayos de cuantificación de la actividad β -galactosidasa.....	83
11.4. Extracción de proteínas totales para ensayos de <i>western-blot</i>	84
11.5. Preparación de extractos proteicos.....	85
12. Análisis de proteínas.....	85
12.1. Cuantificación de proteínas.....	85

12.2. Extracción de proteínas de plantas y ensayo fluorométrico de actividad β -glucuronidasa.....	86
12.3. Electroforesis de proteínas.....	86
12.4. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF (<i>western-blot</i>).....	87
12.5. Expresión de las proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	87
12.6. Ensayos de <i>pull-down</i>	88
13. Soluciones utilizadas (ordenadas alfabéticamente).....	89
Resultados.....	91
Capítulo 1: Los factores de transcripción HD-Zip I presentan diferentes motivos AHA funcionales que interaccionan selectivamente con TBP y/o TFIIB.....	92
C1. Introducción.....	93
El extremo carboxilo terminal de los factores de transcripción HD-Zip I está conservado en distintas especies.....	93
Los motivos AHA presentes en los factores de transcripción.....	93
C1. Resultados.....	95
La región carboxilo terminal de AtHB1 actúa como un dominio de activación en levaduras	95
Los factores de transcripción AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 actúan como activadores en levaduras.....	96
Los motivos de tipo AHA son necesarios y suficientes para la actividad transcripcional de AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 en levaduras.....	97
Los motivos AHAs presentes en los HD-Zip I son funcionales en plantas.....	102
Los aminoácidos triptófanos desempeñan un papel importante dentro de los motivos AHAs de los HD-Zip I.....	102
AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 interaccionan diferencialmente con componentes de la maquinaria transcripcional basal.....	105
C1. Discusión.....	108
Capítulo 2: AtHB1, un factor de transcripción HD-Zip I de <i>Arabidopsis thaliana</i>, es regulado por <i>Phytochrome-Interacting Factor 1</i> para promover la elongación del hipocotilo.....	112
C2. Introducción.....	113
La regulación de la elongación del hipocotilo.....	113

Los factores de transcripción HD-Zip I: el caso particular del gen <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Homeobox 1 (AtHB1)</i>	115
C2. Resultados.....	116
<i>AtHB1</i> se expresa principalmente en hipocotilo y tejido radicular.....	116
<i>AtHB1</i> juega un rol en la elongación del hipocotilo.....	119
PIF1 actúa corriente arriba de <i>AtHB1</i> y regula positivamente su expresión.....	121
<i>AtHB1</i> regula el crecimiento del hipocotilo mediante la regulación de genes involucrados en la elongación celular.....	128
C2. Discusión.....	132
Capítulo 3: La expresión de <i>AtHB1</i>, un HD-Zip I que cumple un papel negativo en la respuesta al etileno, es regulada a través de la región 5' no codificante, que presenta un pequeño marco de lectura abierto conservado.....	137
C3. Introducción.....	138
La fitohormona etileno.....	138
La región 5' no codificante de <i>AtHB1</i> presenta un marco de lectura abierto que codifica un péptido conservado.....	140
C3. Resultados.....	142
CPuORF33 se encuentra conservado en plantas evolutivamente distantes.....	142
La eliminación del 5'UTR en <i>AtHB1</i> expande su patrón de expresión e induce su transcripción y traducción.....	143
El 5'UTR inhibe la inducción por etileno de <i>AtHB1</i>	147
La sobre-expresión de <i>AtHB1</i> reprime la respuesta a etileno.....	148
En plántulas, la expresión de <i>AtHB1</i> no se regula por el mecanismo NMD, <i>nonsense- mediated mRNA decay</i>	150
C3. Discusión.....	153
Conclusiones Generales.....	157
Referencias Bibliográficas.....	160
Anexos.....	186
Anexo I.....	187
Anexo II.....	189
Anexo III.....	190

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas.....	53
Tabla 2. Medios de cultivo.....	54
Tabla 3. Líneas mutantes utilizadas.....	58
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para los clonados.....	59
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para las determinaciones por RT-PCR.....	61
Tabla C2-1. Lista de genes de expresión inducida en las plántulas mutantes <i>athb1-1</i>	130
Tabla C2-2. Lista de genes de expresión reprimida en las plántulas mutantes <i>athb1-1</i>	131

Índice de Figuras

Figura I-1. Esquema de la red de regulación transcripcional.....	25
Figura I-2. Familias de factores de transcripción en <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
Figura I-3. Proceso de fotomorfogénesis.....	28
Figura I-4. Los factores de transcripción <i>Phytochrome-Interacting Factors</i> de tipo bHLH.....	30
Figura I-5. Esquema de la función de PIFs en la vía de señalización de los fitocromos.....	32
Figura I-6. Control hormonal mediado por PIF1/PIL5 en la germinación regulada por la luz.....	34
Figura I-7. Representación esquemática de la estructura de los miembros representativos de cada subfamilia de factores de transcripción con homeodominio.....	38
Figura I-8. Árbol filogenético de las proteínas HD-Zip de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Oryza sativa</i>	39
Figura I-9. Motivos conservados en los CTRs de los miembros del clado III.....	44
Figura MyM-1. Representación esquemática (no a escala) de los vectores utilizados.....	67
Figura C1-1. El CTR de AtHB1 actúa como un dominio de activación levaduras.....	96
Figura C1-2. AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 actúan como activadores en el sistema de simple híbrido en levaduras.....	97
Figura C1-3. AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 presentan diferentes motivos de tipo AHA en sus CTRs.....	99
Figura C1-4. Los motivos AHA putativos son necesarios y suficientes para la capacidad de transactivación de los HD-Zip I en levaduras.....	101

Figura C1-5. Los motivos AHA de AtHB1, AtHB12 y AtHB13 son funcionales en plantas.....	103
Figura C1-6. Los residuos triptófanos en los motivos AHA juegan diferentes papeles en los HD-Zip I analizados.....	104
Figura C1-7. AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 interaccionan en forma diferencial con los factores de transcripción basales AtTBP2 y AtTFIIB.....	106
Figura C1-8. Los residuos triptófanos en los motivos AHA de AtHB1 son esenciales para su interacción con AtTBP2.....	107
Figura C2-1. El hipocotilo de <i>Arabidopsis thaliana</i> en condiciones de luz u oscuridad.....	114
Figura C2-2. <i>AtHB1</i> se expresa en hipocotilos, vasculatura y el ápice de la raíz, y su expresión se induce en condiciones de día corto.....	118
Figura C2-3. <i>AtHB1</i> regula positivamente la elongación del hipocotilo en condiciones de día corto..	120
Figura C2-4. <i>AtHB1</i> no afecta la elongación del hipocotilo en escotomorfogénesis.....	122
Figura C2-5. PIF1 regula positivamente la expresión de <i>AtHB1</i>	124
Figura C2-6. La longitud del hipocotilo se encuentra afectada en algunas mutantes <i>pif</i>	125
Figura C2-7. <i>AtHB1</i> actúa corriente abajo de PIF1 en la regulación de la longitud del hipocotilo.....	126
Figura C2-8. Análisis genotípico de plantas dobles mutantes <i>athb1-2/pif1-2</i>	128
Figura C2-9. <i>AtHB1</i> promueve la elongación del hipocotilo regulando genes involucrados en elongación celular.....	129
Figura C2-10. Modelo propuesto para el rol de <i>AtHB1</i> en la regulación de la longitud del hipocotilo	136
Figura C3-1. Síntesis, percepción y transducción de señales de la fitohormona etileno.....	139
Figura C3-2. Los CPuORF de diferentes especies vegetales presentan una elevada homología de secuencia con CPuORF33.....	144
Figura C3-3. <i>AtHB1</i> se expresa en hipocotilos, raíces y cotiledones de plántulas <i>PromAtHB1-5'UTR::GUS</i>	146
Figura C3-4. El 5'UTR de <i>AtHB1</i> inhibe la transcripción y la traducción del reportero <i>GUS</i>	147
Figura C3-5. El 5'UTR no afecta la regulación de <i>AtHB1</i> en condiciones de día corto y regula negativamente su inducción por etileno.....	149
Figura C3-6. La sobre-expresión de <i>AtHB1</i> inhibe la elongación del hipocotilo en respuesta al etileno.....	150
Figura C3-7. El 5'UTR de <i>AtHB1</i> no media el <i>nonsense-mediated decay</i> del ARNm en plántulas.....	152
Figura C3-8. Modelo propuesto para <i>AtHB1</i> en la inducción de la longitud del hipocotilo regulada por etileno.....	156

Antecedentes

El trabajo de investigación que se describe con este manuscrito de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL).

Los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis fueron dados a conocer parcialmente en los siguientes artículos, capítulos y presentaciones en congresos:

Artículos publicados en Revistas Científicas

- **Capella, M.**; Ré, D.A.; Arce, A.L. and Chan, R.L. (2014). *Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB*. Plant Cell Rep. 33: 955-967.
- Arce, A.L.; Raineri, J.; **Capella, M.**; Cabello, J.V. and Chan, R.L. (2011). *Uncharacterized conserved motifs outside the HD-Zip domain in HD-Zip subfamily I transcription factors; a potential source of functional diversity*. BMC Plant Biol. 11: 42.
- **Capella, M.**; Ribone, P.A.; Arce, A.L. and Chan, R.L. (2014). *AtHB1, an Arabidopsis thaliana HD-Zip I Transcription Factor, is regulated by Phytochrome-Interacting Factor 1 to promote hypocotyl elongation*. New Phytol. En prensa.

Capítulos de libro en revisión

- **Capella, M.**; Ribone, P.A.; Arce, A.L. and Chan, R.L. (2014). *Homeodomain-Leucine Zipper transcription factors: Structural features of these proteins, unique to plants*. In: Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects. Edited by: Daniel H. Gonzalez. En revisión.
- Ribone, P.A.; **Capella, M.**; Arce, A.L. and Chan, R.L. (2014). *What we know about Homeodomain-Leucine Zipper I transcription factors? Functional and biotechnological considerations*. In: Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects. Edited by: Daniel H. Gonzalez. En revisión.

Publicaciones relacionadas con el trabajo de Tesis

- Ré, D.A.; **Capella, M.**; Bonaventure, G. and Chan, R.L (2014). *AtHB12 and AtHB7 regulate each other by positive and negative feedback loops during Arabidopsis development and limiting water conditions*. BMC Plant Biol. 14: 150.
- Ribone, P.A.; **Capella, M.** and Chan, R.L. (2014). *The HD-Zip I transcription factor AtHB13 is essential for the correct germination of pollen grains but it can be replaced by its paralogue AtHB23*. En revisión.

Presentaciones en Congresos y Disertaciones

- **Capella, M.**; Ribone, P.A.; Chan, R.L. “*AtHB1, an Arabidopsis HD-Zip I Transcription Factor, is involved in hypocotyl elongation*”. XLX Reunión Anual SAIB, Rosario, Argentina, 11-14 de Noviembre, 2014. Comunicación oral.
- **Capella, M.**; Ré D.A.; Ribone, P.; Arce, A.L.; Cabello, J.V.; Giacomelli, J.I.; Mora, M.C.; Moreno, J.E.; Chan, R.L. “*Secrets of the plant family of transcription factors homeodomain-leucine zipper I*”. XLIX Reunión Anual SAIB, Buenos Aires, Argentina, 6-7 de Noviembre, 2013. Comunicación oral.
- Ré, D.A.; **Capella, M.**; Chan, R.L. “*AtHB12 y AtHB7 regulan finamente el desarrollo de Arabidopsis frente al estrés*”. VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología-RedBio. Mar del Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina, 6-7 de Noviembre, 2013.
- Arce, A.L.; **Capella, M.**; Ré, D.A.; Chan, R.L.; Chernomoretz, A. “*Reverse engineering HD-Zip transcriptional regulatory networks (Ft. Information Theory)*”. 3° Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional, Oro Verde, Provincia de Entre Ríos, 26-28 de Septiembre, 2012.
- Arce, A.L.; Raineri, J.; **Capella, M.**; Cabello, J.V.; Chan, R.L. “*Functional diversity in plant HD-Zip subfamily I transcription factors. Using phylogenetic and motif discovery approaches to look beyond conserved domains*”. 2° Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional, Córdoba, Provincia de Córdoba, 11-13 de Mayo, 2011.
- Arce, A.L.; Cabello, J.V.; Ré, D.A.; Raineri, J.; **Capella, M.**; Chan, R.L. “*Mecanismos moleculares puestos en juego en la adaptación de las plantas al medioambiente. El caso particular de los factores de transcripción de tipo HD-ZIP*”. XXVIII Reunión Argentina de Fisiología

Vegetal, La Plata, Prov. de Buenos Aires, Argentina, 26-29 de Septiembre, 2010. Raquel Chan, conferencia plenaria.

- **Capella, M.;** Ariel, F.D.; Dezar, C.A.; Chan, R.L. “*Functional Characterization of the Medicago HD-Zip transcription factor MTHB1 in the aerial organs*”. XLV Reunión Anual SAIB, San Miguel de Tucumán, Provincia de Tucumán, Argentina, 10-13 de Noviembre, 2009.

Abreviaturas

35S	promotor del gen 35S del virus del mosaico del coliflor
5'UTR	región 5' no codificante, del inglés <i>5' untranslated region</i>
ABA	ácido abscísico
ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATHB	<i>Arabidopsis thaliana homeobox</i>
CHX	cicloheximida
col.	colaboradores
CPuORF	del inglés, <i>Conserved Peptide upstream Open Reading Frame</i>
CTR	región carboxilo terminal
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
FTs	factores de transcripción
GA	ácido giberelico (giberelinas)
GFP	proteína de fluorescencia verde (del inglés, <i>green fluorescence protein</i>)
GUS	β -glucuronidasa
HD	homeodominio
HD-Zip	homeodominio asociado a un motivo cierre de leucinas
His	histidina
kDa	kiloDalton
kV	kilovoltio
LB	medio Luria Bertami
Leu	leucina
LZ	cierre de leucinas

M	Molar
min	minutos
Mpb	mega pares de bases
MS	medio Murashige & Skoog
NMD	decaimiento mediado por ARNm sin sentido, del inglés <i>nonsense-mediated decay</i>
pb	pares de bases
p/v	peso en volumen
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	solución Tris-acético-EDTA
TE	solución Tris-EDTA
TFs	del inglés <i>transcription factors</i>
Tris	N-Tris-(hidroximetil) aminoetano
Trp	triptófano
uORF	del inglés <i>upstream Open Reading Frame</i>
UV	luz ultravioleta
V	voltios
v/v	volumen en volumen
x g	fuerza centrífuga relativa

RESUMEN
Y
ABSTRACT

Resumen

Las plantas son organismos sésiles que necesitan adaptarse a los continuos cambios ambientales, principalmente a las variaciones en las condiciones lumínicas y en la disponibilidad de agua. La integración entre las señales ambientales y el desarrollo de las plantas está regulada principalmente a nivel transcripcional por los factores de transcripción (FTs). Entre los FTs estudiados, los que contienen un homeodominio (HD) constituyen un grupo relevante. El HD está codificado por una secuencia de ADN conservada de 180 pb, llamada caja homeótica, presente en FTs involucrados en procesos de desarrollo en organismos eucariotas. Dentro de los FTs que contienen HD se encuentra, entre otras, la familia HD-Zip, que es única de plantas, y se caracteriza por la combinación singular de un HD asociado a un cierre de leucinas (LZ), que actúa como un dominio de dimerización, un requisito para la unión al ADN. Los FTs del tipo HD-Zip fueron clasificados en cuatro subfamilias (I a IV), y los miembros de la subfamilia I estudiados participan de respuestas al estrés abiótico. Los FTs HD-Zip I presentan patrones de expresión similares y unen la misma secuencia blanco de ADN; sin embargo, el estudio con plantas mutantes o sobre-expresantes indicó que participan en diferentes vías de transducción de señales. Recientemente, un análisis bioinformático reveló que existen motivos conservados por fuera del dominio HD-Zip, algunos de los cuales son semejantes a los motivos de transactivación conocidos como AHAs (péptidos pequeños y esenciales que exhiben un patrón característico de residuos aromáticos e hidrofóbicos embebidos en un contexto ácido). En base a estos conocimientos previos, nos planteamos corroborar o refutar la hipótesis de que los motivos conservados externos al HD-Zip en los miembros de la subfamilia I eran los responsables de la diversidad funcional.

Con este objetivo, elegimos cuatro miembros de la familia HD-Zip I de *Arabidopsis* (AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13), pertenecientes a diferentes clados, para estudiar sus regiones carboxilo terminales con mayor profundidad. Realizamos construcciones genéticas para transformar levaduras o plantas, que expresan estos FTs y diferentes versiones mutantes como fusiones al dominio de unión a ADN de GAL4. En primer lugar, pudimos ver que estos FTs exhiben la capacidad de activar la transcripción tanto en plantas como en levaduras, pero con diferentes grados. El segmento proteico necesario para tal capacidad fue diferente entre estos cuatro FTs, así como también el papel

de los residuos triptófano que poseen. Cuando evaluamos la interacción con componentes de la maquinaria transcripcional basal mediante ensayos de doble híbrido en levaduras y ensayos de *pull-down*, AtHB1 fue capaz de interactuar con TBP, AtHB12 interactuó con TFIIB, AtHB7 interactuó tanto con TBP como con TFIIB, mientras que AtHB13 mostró una interacción débil con ambos. La transformación transitoria de plántulas de Arabidopsis confirmó la capacidad y la especificidad de activación de estos motivos AHA presentes en los HD-Zip I, y mostró algunas diferencias con los resultados obtenidos en levaduras.

En segundo término nos preguntamos cuál era la función de *AtHB1* y decidimos hacer un estudio detallado de este miembro de la familia. En estudios previos se había informado que este FT era un activador transcripcional y que su sobre-expresión en plantas de tabaco generaba un fenotipo de-etilolado constitutivo. Fuera de este conocimiento no se contaba con información adicional. En primer lugar, aislamos la región promotora de este gen y obtuvimos plantas transgénicas en las que esta región promotora estaba fusionada a un gen reportero. El análisis de estas plantas indicó que *AtHB1* se expresa principalmente en los hipocotilos y las raíces, y su expresión se induce en plántulas crecidas en un régimen de día corto. Además, obtuvimos plantas homocigotas mutantes *knock-down* y sobre-expresantes de *AtHB1*. Las primeras presentaron hipocotilos más cortos y las segundas, más largos que sus pares salvajes, especialmente en condiciones de día corto. Dado que la bibliografía indicaba que AtHB1 podía ser un blanco de *Phytochrome-Interacting Factor 1 (PIF1)*, evaluamos los niveles de transcripto de *AtHB1* en plántulas mutantes en este gen. Estos niveles fueron más bajos que en las plantas de genotipo salvaje en hipocotilos, sugiriendo que PIF1 estaría regulando a AtHB1 y este último modulando la elongación de los hipocotilos. Para corroborar estas hipótesis, se hicieron co-transformaciones en hojas de tabaco. La actividad GUS en hojas de tabaco co-transformadas con las construcciones *PromAtHB1::GUS* y *35S::PIF1* mostró que PIF1 regula positivamente a *AtHB1*. La medición del largo de los hipocotilos en plántulas crecidas en condiciones de día corto o día largo de los genotipos mutantes *athb1*, *pif1*, *athb1/pif1* y sobre-expresantes de *PIF1* o *AtHB1* en un fondo genético salvaje, *athb1* o *pif1*, nos permitió corroborar que AtHB1 es un componente que actúa corriente abajo de PIF1. Finalmente, realizamos un análisis transcriptómico comparativo entre mutantes *athb1* y controles salvajes, el cual reveló que AtHB1 regula varios genes involucrados en la composición y la elongación de la pared celular.

Con el objeto de adquirir un mejor conocimiento en los mecanismos que regulan la expresión de *AtHB1*, analizamos el efecto que tiene su región 5' no codificante (5'UTR, por sus siglas en inglés) en plántulas de *Arabidopsis*. La región 5'UTR de este gen contiene un uORF (del inglés, *upstream Open Reading Frame*) conservado, que para otros genes había sido implicado en la regulación de la expresión. Para ello, generamos una construcción con la región promotora de este gen fusionada a un gen reportero en la que se eliminó el 5'UTR que contiene un uORF. El análisis histoquímico y fluorométrico de las plantas de *Arabidopsis* transformadas indicó que la expresión tanto a nivel transcripcional como traduccional es más alta en las plantas transformadas con la construcción en la que se eliminó el 5'UTR. Además, el tratamiento de plántulas con etileno exógeno reveló que el 5'UTR inhibe la traducción de los transcritos de *AtHB1* inducida por la hormona. La expresión ectópica y constitutiva de este FT generó insensibilidad al etileno en las plantas crecidas en luz. Finalmente, los niveles de transcritos de *AtHB1* no se vieron modificados en las plantas mutantes *upf1* y *upf3*, proteínas involucradas en el mecanismo del decaimiento mediado por ARNm sin sentido (NMD). A su vez, no se detectaron diferencias en la expresión del reportero entre las plántulas *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* cuando se las trató con cicloheximida, un inhibidor de la traducción que bloquea el NMD. Estos últimos resultados sugirieron que el 5'UTR regula la expresión de *AtHB1* mediante un mecanismo independiente al NMD.

En base a lo expuesto, pudimos concluir que la capacidad de activación diferencial de *AtHB1*, *AtHB7*, *AtHB12* y *AtHB13* brinda un importante nivel de divergencia funcional a estas proteínas. Además, junto con su patrón de expresión, estas diferencias podrían explicar, al menos en parte, su divergencia funcional. Por otro lado, *AtHB1* actuaría corriente abajo de PIF1 para regular la expresión de proteínas relacionadas al crecimiento, promoviendo de esta forma la elongación celular en el hipocotilo, especialmente en respuesta a condiciones de crecimiento de día corto. Finalmente, el 5'UTR regula negativamente la expresión de *AtHB1* e inhibe la inducción traduccional mediada por el etileno de este FT, el cual cumple un papel negativo en el crecimiento del hipocotilo promovido por esta fitohormona en luz.

Abstract

Plants are sessile organisms that need to adapt themselves to continuous environmental changes, especially to the fluctuations in water availability and illumination conditions. The integration of such signals with plant development is finely regulated at the transcriptional level by transcription factors (TFs). Among plant TFs, there is a family which members have a homeodomain (HD) encoded by a 180 bp conserved DNA sequence, the homeobox. One of the HD subfamilies, the HD-Zip is unique to plants. Its members exhibit a singular combination of a HD associated to a leucine zipper (LZ), acting as a dimerization domain as a pre-requisite for DNA binding. HD-Zip proteins have been classified into four subfamilies (named I to IV), and subfamily I members have been mainly associated to abiotic stress responses. The expression pattern of these TFs are similar and all they bind the same DNA target sequence. However; the studies performed with mutant and overexpressors indicated that they take part in different signal transduction pathways. A recent bioinformatic analysis has revealed the existence of conserved motifs outside the HD-Zip domain, including putative transactivation AHA motifs. Based on these observations, we planned to corroborate whether these conserved motifs outside the HD-Zip domain are responsible for the functional diversity.

For this purpose, we chose four Arabidopsis HD-Zip I members (AtHB1, AtHB7, AtHB12 and AtHB13), belonging to different clades, to deeply study their carboxy-terminal regions. Genetic constructs were prepared in which the coding regions of each of the four proteins and mutated versions were fused to the GAL4-binding domain. Yeast and seedlings were transformed with these constructs. The results showed that these TFs exhibited activation activity in yeast and in plants but at different degrees. On the other hand, the protein segment necessary for such activation was different for these four TFs as well as the role of the tryptophans present in the putative AHAs. When the interaction with components of the basal transcription machinery was tested by yeast two-hybrid or *pull-down* assays, AtHB1 was able to interact with TBP, AtHB12 interacted with TFIIB, AtHB7 interacted with both, TBP and TFIIB while AtHB13 showed weak interactions with any of them. Transient transformation of Arabidopsis seedlings confirmed the

activation capacity and specificity of these HD-Zip I AHA motifs and showed some differences with the results obtained in yeast.

Aiming at unraveling *AtHB1* function, previously described as a transcriptional activator, we isolated its promoter region. This promoter region has been fused to the *GFP-GUS* reporter genes and used to transform Arabidopsis plants which were analyzed by histochemistry. GUS histochemical analyses indicated that *AtHB1* is mainly expressed in hypocotyls and roots, and up-regulated in seedlings grown under a short-day photoperiod regime. Homozygous *AtHB1 knock-down* mutants and overexpressors were obtained showing shorter and longer hypocotyls than WT, respectively, especially in short-day conditions. *AtHB1* transcript levels were evaluated in *Phytochrome-Interacting Factor 1 (PIF1)* mutants suggesting that this gene is regulating *AtHB1* expression in hypocotyls. Moreover, GUS activity in tobacco leaves co-transformed with *PromAtHB1::GUS* and *35S::PIF1* showed that PIF1 positively regulates *AtHB1* expression. Hypocotyls length measurement in seedlings grown in short- or long-day conditions of *athb1*, *pif1*, double *athb1/pif1* mutants and *PIF1* or *AtHB1* overexpressors in WT, *athb1* or *pif1* backgrounds, allowed us to determine that AtHB1 is a PIF1 downstream component, regulated in order to promote hypocotyl elongation. Finally, a comparative transcriptome analysis performed with *athb1* mutants revealed that AtHB1 regulates several genes involved in cell wall composition and elongation.

The 5' untranslated region (5'UTR) of *AtHB1* exhibits a conserved uORF encoding a CPuORF of unknown function. To gain further insights into the mechanisms that regulate *AtHB1* expression, the promoter region lacking its 5'-leader sequence was fused to the *GFP-GUS* reporter genes and used to transform Arabidopsis plants. Analyses of these plants compared with those in which the construct contained the untranslated region indicated that *AtHB1* expression is up-regulated in *PromAtHB1-5'UTR::GUS* seedlings, both at a transcriptional and translational level. Furthermore, when the seedlings were treated with exogenous ethylene, the 5'UTR inhibited *AtHB1* hormone-induced expression. *AtHB1* overexpressors were less sensitive to ethylene when the seedlings grow in light, compared with the WT control. Finally, *AtHB1* transcript levels were almost unaltered in mutants of the nonsense-mediated decay (NMD) factors UPF3 and UPF1. Moreover, no differences in *GUS* transcripts upon treatment with cycloheximide were detected.

Since cycloheximide inhibits translation and blocks NMD, the results indicated that the 5'UTR regulation of *AtHB1* occurs via a NMD-independent mechanism.

We can conclude that the differential activation ability of AtHB1, AtHB7, AtHB12 and AtHB13 significantly contributes to the functional divergence presented by these proteins, and together with their expression patterns, these differences could explain, at least in part, such functional divergence. On the other hand, AtHB1 would act downstream of PIF1 to regulate growth-related proteins expression, thus promoting hypocotyl cell elongation, especially in response to short-day photoperiods. Finally, the 5'UTR negatively regulates *AtHB1* expression and inhibits ethylene-translation induction of this TF, which in place would be playing a negative role in ethylene-promoted hypocotyl growth in light.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción

Los organismos vivos se encuentran expuestos a condiciones ambientales adversas que fluctúan constantemente. La mayoría de los animales, al percibir estos entornos desfavorables, tienen la posibilidad de desplazarse hacia ambientes que presenten mejores posibilidades de supervivencia. Las plantas requieren para su supervivencia disponibilidad de agua, aire y luz, además de algunos minerales. Los minerales y el agua los incorporan del suelo utilizando su complejo sistema radicular. Al ser organismos sésiles que no evolucionaron el movimiento como medio de escape, probablemente debido a que la energía la obtienen de la ubicua luz solar, han desarrollado otras estrategias para afrontar situaciones hostiles (Hiltbrunner y col., 2007). Como parte de estas estrategias, las plantas tienen una enorme variedad de mecanismos para percibir las señales medioambientales junto con un extraordinario grado de plasticidad que les permite modular su crecimiento y desarrollo en respuesta a estas señales externas.

De todas las señales externas a las que se enfrentan las plantas, la luz y la disponibilidad de agua se consideran las más importantes.

1. La luz en el desarrollo vegetal

La luz actúa no sólo como una fuente primaria de energía a través de la fotosíntesis, sino como una señal que afecta el desarrollo de las plantas. A lo largo de la evolución, las diferentes especies vegetales desarrollaron complejos métodos para percibir múltiples parámetros de la luz, como la calidad, intensidad, dirección y duración de la misma, pudiendo interpretar estas señales para producir la respuesta fisiológica apropiada (Möller y col., 2002; Montgomery y Lagarias, 2002). Para poder percibir el ambiente lumínico en el que se encuentran, las plantas poseen una serie de proteínas fotorreceptoras, que se caracterizan por la longitud de onda que pueden distinguir. Por ejemplo, la luz roja/roja lejana (600 – 750 nm) es percibida por los fitocromos, la luz azul/UVA (320 – 500 nm) por los criptocromos y las fototropinas, y la luz UVB (282 – 320 nm) por UVR8 (del inglés, *UV Resistant Locus 8*; Briggs y Huala, 1999; Smith, 2000; Briggs y Christie, 2002; Rizzini y col., 2011). Los eventos del desarrollo de las plantas que involucran la luz incluyen la germinación, la fotomorfogénesis, el fototropismo, el gravitropismo, el movimiento de los

cloroplastos, la evasión al sombreado, el ritmo circadiano y la inducción de la floración (Jiao y col., 2007).

La transducción de señales inducida por la luz comienza con la percepción de las diferentes longitudes de onda por estos fotorreceptores especializados. Tras su activación, promueven la regulación de la expresión de aproximadamente 2500 genes en *Arabidopsis thaliana*, lo que les permite a las plantas responder a nivel fisiológico a estos cambios en la iluminación (Gyula y col., 2003).

2. Las plantas y la disponibilidad de agua

Podría decirse que el agua es el constituyente más importante de todos los seres vivos. En las plantas representa entre el 80 y el 95 % del peso húmedo de la mayoría de las especies herbáceas. Por ejemplo, los vegetales comunes como las zanahorias y las lechugas contienen entre un 85 % y un 95 % de agua (Taiz y Zeiger, 2002). El agua es un solvente con propiedades biofísicas únicas, tales como la vaporización a altas temperaturas, una constante eléctrica y una tensión superficial con valores elevados. Estas características permiten que el agua se mantenga en estado líquido en un amplio rango de temperaturas, particularmente en las que los seres vivos son viables, y que pueda disolver una gran cantidad de iones, minerales y otras moléculas. Además de ser un solvente, el agua actúa como un reactivo en varias reacciones bioquímicas críticas dentro de la célula, incluyendo ser el dador de electrones en la fotosíntesis. Además, es un componente clave para mantener la turgencia celular (Kramer y Boyer, 1995).

Dado que el agua es el recurso esencial para las plantas, éstas han desarrollado un sistema complejo de captación y distribución de la misma, y continuamente la absorben y la pierden. Las plantas terrestres absorben una gran cantidad a través de sus raíces, pero sólo el 1 % es retenida mientras que el resto se pierde por transpiración. Esta ineficiencia en el uso del agua es un efecto colateral inevitable de la fotosíntesis (Lambers y col., 2008).

La percepción del estrés causado por la falta de agua y la transducción de la señal para que comiencen las respuestas adaptativas son pasos fundamentales en la tolerancia de la planta al estrés hídrico. Como resultado, entre los distintos genotipos y para un mismo genotipo en diferentes estadios presentan diferencias en su tolerancia al estrés y éstas podrían deberse a los diversos mecanismos de percepción y transducción de señales (Chinnusamy y col., 2004). Dado que las

respuestas son controladas principalmente a nivel transcripcional, los esfuerzos por comprenderlas se centraron en estudios moleculares. En este sentido, en estas respuestas están involucrados genes variados con funciones en la señalización y la regulación que alteran su expresión cuando las plantas se encuentran en condiciones de escasez de agua (Bray, 2004).

3. La regulación de la expresión génica

Al igual que otros organismos pluricelulares, las plantas al percibir determinadas señales producen una cascada de fosforilaciones de diversas proteínas que amplifican esas señales iniciales y culminan en una respuesta global (Xiong y col., 2002). Esta respuesta es generada por la activación de proteínas reguladoras previamente inactivas, que inducen la transcripción de genes de respuesta, modificando de esta forma el transcriptoma, o por la traducción preferencial de ARN mensajeros (ARNm) preexistentes. En conjunto esto lleva a que, transcurrido un determinado tiempo, las plantas puedan modificar su patrón de desarrollo a través de eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares, para adaptarse a las condiciones a las que se ven sometidas (Cheong y col., 2002; Aarts y Fiers, 2003).

Si bien la regulación de los genes de respuesta al estrés ocurre principalmente a nivel transcripcional, existen también otros niveles de regulación. Algunos ejemplos son el procesamiento del ARNm, su transporte al citoplasma, su traducción y los cambios post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas codificadas (Taiz y Zeiger, 2002). La regulación transcripcional requiere de elementos en *cis*, que son secuencias cortas presentes en las regiones reguladoras de los genes blanco y de elementos en *trans*, que son proteínas reguladoras codificadas en otra región del genoma. Estas moléculas, que reconocen específicamente los elementos en *cis*, se unen a ellos y regulan la expresión de un determinado gen, son conocidas como factores de transcripción (figura I-1; Taiz y Zeiger, 2002; Riechmann, 2006).

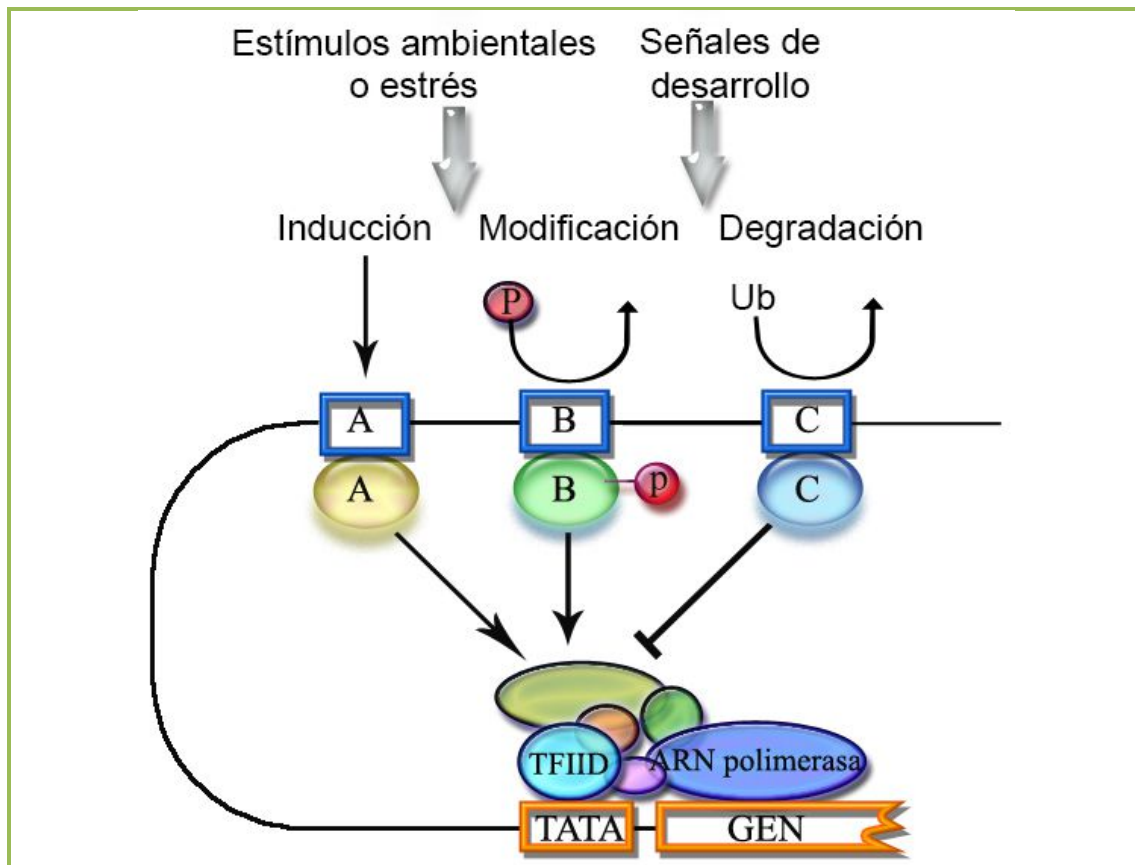


Figura I-1. Esquema de la red de regulación transcripcional

Las cajas coloreadas rectangulares A, B y C representan los elementos que actúan en *cis*, y las cajas coloreadas elípticas A, B y C, los factores de transcripción que las reconocen. La P significa fosforilación. Las flechas indican inducción mientras que las líneas cortadas perpendiculares, represión. Adaptado de Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005.

4. Los factores de transcripción

Los factores de transcripción (FTs) son numerosas proteínas modulares de diferentes clases (Riechmann, 2006), que activan o reprimen genes específicos al reconocer y unir en ellos los elementos en *cis* de las regiones reguladoras. De esta forma, pueden modificar el transcriptoma de la planta, dirigiendo eventos fisiológicos complejos tales como el crecimiento o la diferenciación de órganos.

Los FTs poseen un dominio conservado de reconocimiento del ADN. Además, otros residuos del FT incrementan la fuerza de unión del mismo al entrar en contacto con el ADN en forma no específica a través de la interacción con fosfatos o desoxirribosas. Además del dominio de unión, los FTs presentan un dominio de transactivación que les permite establecer interacciones del tipo proteína - proteína (Bornberg-Bauera y col., 2005). Estos dominios han sido mucho menos estudiados que los de unión a ADN.

Varios tipos de FTs de plantas son capaces de formar homo o hetero-oligómeros, lo que diversifica la especificidad de unión al ADN, la afinidad por los elementos de un promotor y en la localización nuclear (Liu y col., 1999). A su vez, se demostró que múltiples FTs presentan diversos motivos de fosforilación, sumoilación o ubiquitilación (Singh y col., 2002; Miura y Hasegawa, 2010), y estas modificaciones post-traduccionales pueden alterar la actividad de estas proteínas. Por ejemplo, se demostró que la sumoilación de ICE1, un FT de tipo MYC, activa y/o estabiliza la proteína, facilitando la inducción de *CBF3/DREB1A* y la represión de *MYB15*, lo que conduce a las plantas a tolerar bajas temperaturas (Miura y col., 2007).

Los FTs son especialmente abundantes en plantas, representando aproximadamente el 6 % de los genomas de *Arabidopsis* y arroz (Riechmann y col., 2000; Xiong y col., 2005; Mitsuda y Ohme-Takagi, 2009). Se han caracterizado una gran variedad de dominios de unión a ADN que, junto a la presencia de otros dominios conservados y a diferentes características estructurales, permiten clasificar los FTs de plantas en familias y subfamilias (Riechmann, 2002), como se muestra en la figura I-2.

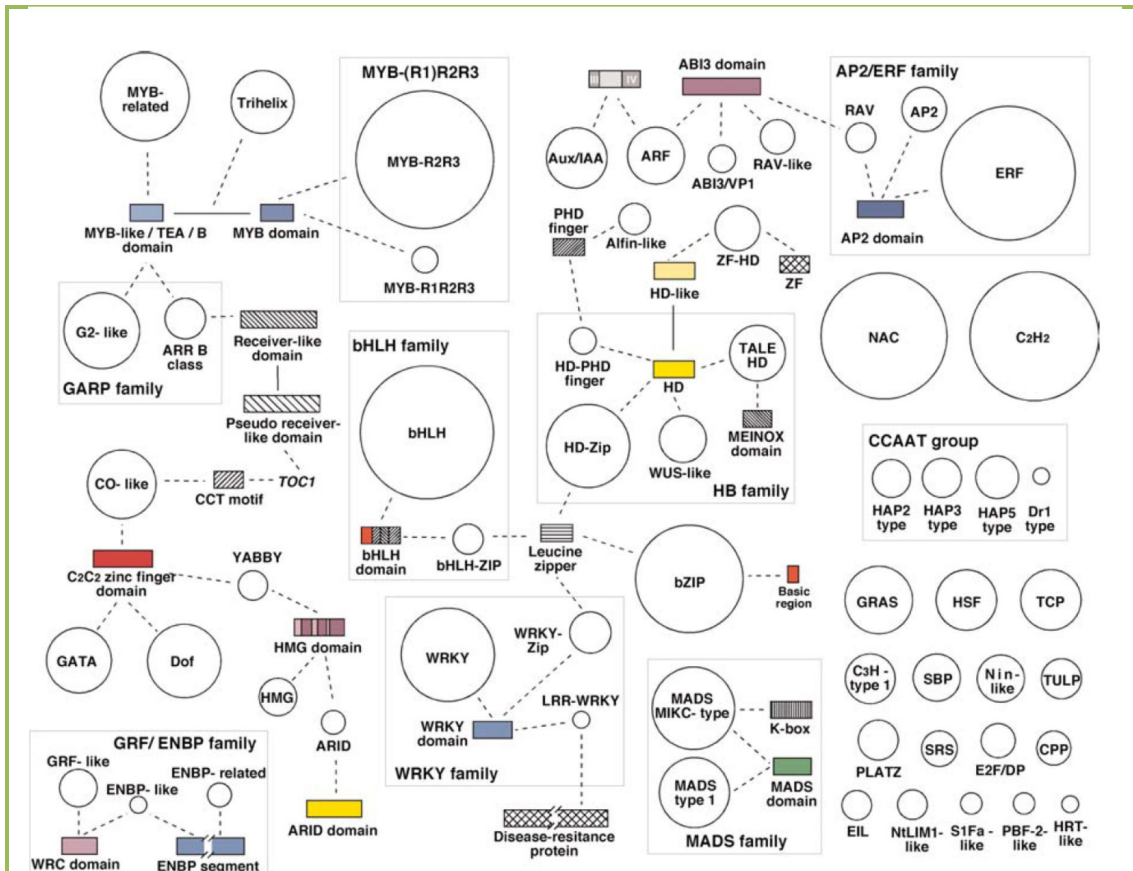


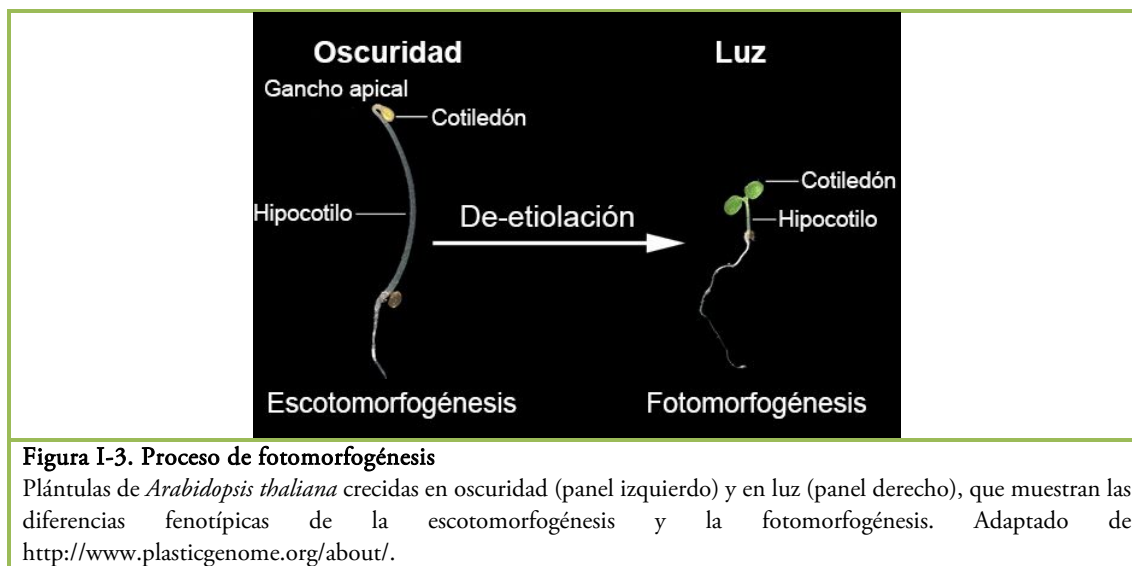
Figura I-2. Familias de factores de transcripción en *Arabidopsis thaliana*

Las familias están representadas en círculos, de tamaño proporcional al número de miembros de cada una. En rectángulos se indican los dominios que se repiten en las diferentes familias, en forma proporcional al tamaño del mismo. La asociación entre los distintos dominios se encuentra marcada por una línea de puntos. Los dominios de unión a ADN se encuentran coloreados, los demás con líneas negras. Adaptado de Riechmann, 2002.

5. Los factores de transcripción *Phytochrome-Interacting Factors* de tipo bHLH

Luego de la germinación, la plántula continúa su desarrollo en luz o en oscuridad, siguiendo los procesos llamados fotomorfogénesis (o de-etiolación) y escotomorfogénesis (o etiolación), respectivamente (figura I-3). En un ambiente natural, el cambio entre el desarrollo de etiolación o de-etiolación le permite a la plántula emerger a través del suelo, alcanzar la luz, y modificar su patrón de desarrollo a uno óptimo para realizar fotosíntesis (Fankhauser y Chory, 1997). Estos procesos mediados por la luz son regulados por proteínas fotorreceptoras, como los fitocromos (phy, del inglés *phytochromes*), que absorben luz roja o roja lejana. En *Arabidopsis*, existen cinco genes *PHY* (denominados A a E), los cuales codifican proteínas de 125 kDa que dimerizan entre sí. Estas proteínas absorben la luz y cambian su conformación tridimensional, gracias a la presencia en cada monómero del cromóforo llamado fitocromobilina. Los phys se sintetizan en su forma inactiva Pr

(que al ojo humano es azul), la cual se convierte a la forma biológicamente activa Pfr (verde-azul) por absorción de luz roja (660 nm). La forma Pfr puede volver a convertirse al estado Pr por acción de la luz roja lejana (720 nm) o de la oscuridad. Esta cualidad, llamada foto-reversibilidad, es la más distintiva de los fitocromos (Smith, 2000). Estas propiedades le permiten a los phy percibir los cambios lumínicos del ambiente y regular de esta forma la fotomorfogénesis (Franklin y Quail, 2010).



Una de las vías de señalización de los fitocromos se inicia con la interacción directa de su forma biológicamente activa con un grupo de la superfamilia de factores de transcripción del tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH); los miembros de este subgrupo se llaman *Phytochrome-Interacting Factors* (PIFs). El primer miembro identificado de la familia PIF fue PIF3, aislado a partir de un ensayo de doble híbrido en levaduras utilizando como carnada el dominio carboxilo terminal de phyB (Ni y col., 1998). Posteriormente, se demostró que PIF3 también es capaz de interactuar con el extremo carboxilo terminal de phyA y que interacciona selectivamente con la forma biológicamente activa Pfr, tanto de phyA como de phyB (Ni, y col., 1999; Zhu y col., 2000; Shimizu-Sato y col., 2002). Es más, PIF3 mostró mayor afinidad por la forma Pfr del dominio amino terminal que del dominio carboxilo terminal no fotoactivo de phyB (Ni, y col., 1999; Zhu y col., 2000).

El segundo miembro identificado de esta familia, PIF4, fue aislado gracias a la convergencia de ensayos genéticos y de genética reversa (Huq y Quail, 2002). El análisis de las secuencias de los

genomas de diversos organismos permitió identificar por homología varias proteínas PIFs; éstas fueron PIF1, PIF5 y PIF6 (Huq y col., 2004; Khanna y col., 2004). Debido a la similitud de secuencia con PIF3, estos factores fueron llamados inicialmente *PIF3-like factors* (PILs); por ejemplo, a PIF1, PIF5 y PIF6 también se los conoce como PIL5, PIL6 y PIL2, respectivamente (Yamashino y col., 2003). Hasta ahora, todos los PIFs identificados son miembros de la subfamilia 15 de FTs bHLH en *Arabidopsis thaliana* (Toledo-Ortiz y col., 2003; Duek y Fankhauser, 2005). Es de hacer notar que no todos los bHLH en la subfamilia 15 interaccionan con los fitocromos y, por lo tanto, no son PIFs (Castillon y col., 2007).

Las proteínas PIFs poseen un dominio bHLH que consiste en dos regiones. Una es una región básica de aproximadamente 15 aminoácidos responsable de la unión al ADN (Castillon y col., 2007). La mayoría de los bHLH reconocen el elemento *in cis* llamado E-box (5'-CANNTG-3'), y los PIFs se unen específicamente al subtipo de E-box llamado G-box (5'-CACGTG-3'), actuando posteriormente como activadores o represores de la transcripción (Martínez-García y col., 2000; Huq y Quail, 2002; Huq y col., 2004). El segundo motivo conservado es una región HLH de aproximadamente 60 aminoácidos responsable de la dimerización, lo que les permite formar homo- o heterodímeros (Castillon y col., 2007). Algunos PIFs pueden formar heterodímeros como por ejemplo, PIF3 que puede homodimerizar, pero también puede formar heterodímeros con PIF4; ambos dímeros (homo y hetero) reconocen secuencias G-box (Toledo-Ortiz y col., 2003). A su vez, los PIFs pueden heterodimerizar con proteínas de otras familias. Por ejemplo, PIF4 heterodimeriza con BRZ1, un FT involucrado en la señalización de brasinosteroides, para permitir la co-regulación del crecimiento de la planta por señales ambientales y de fitohormonas esteroides (Oh y col., 2012). Finalmente, como se muestra en la figura I-4, PIF1, PIF3, PIF4, PIF5, PIF6 y PIF7 contienen un dominio de interacción con el fitocromo phyB en la región amino terminal, denominado APB (del inglés, *active phyB binding*; Khanna y col., 2004). Además de interaccionar con phyB, PIF1 y PIF3 también pueden unirse a phyA en su forma Pfr a través de un dominio menos conservado conocido como APA (del inglés, *active phyA binding*; Ni y col., 1999; Shimizu-Sato y col., 2002; Huq y col., 2004).

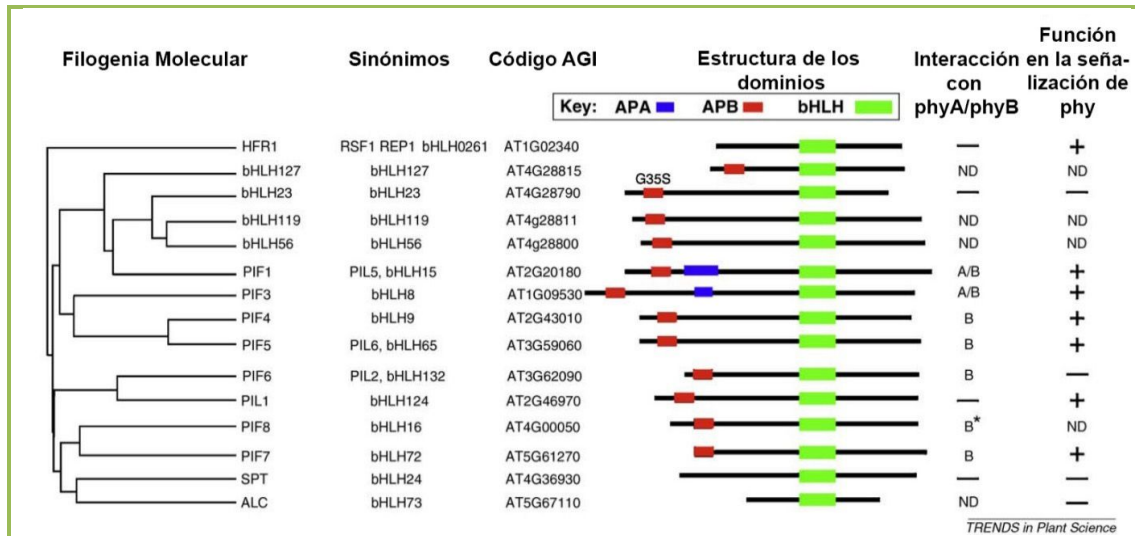


Figura I-4. Los factores de transcripción *Phytochrome-Interacting Factors* de tipo bHLH
 Subfamilia 15 de la familia bHLH de Arabidopsis. Se muestra la filogenia, la nomenclatura, la estructura de sus dominios, la interacción con los fitocromos y la funcionalidad *in vivo* de las proteínas PIFs. La interacción específica con la forma Pfr de phyA y/o phyB se indica como A y/o B, y la carencia de interacción mediante (-). El asterisco indica que existe evidencia de la unión entre PIF8 y phyB. La evidencia de funcionalidad en la vía de señalización de los fitocromos se indica como (+), y la falta de tal evidencia como (-). ND denota no determinado. Adaptado de Leivar y Quail, 2011.

Luego de la activación por luz, la acumulación de los phys en el núcleo contrarresta el papel negativo de la mayoría de las proteínas PIFs a través de tres vías diferentes. Por un lado, los phys promueven la fosforilación, ubiquitilación y degradación de las PIFs (PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5) a través del proteosoma 26S (Park y col., 2004; Shen y col., 2005; Al-Sady y col., 2006; Oh y col., 2006; Lorrain y col., 2008; Nozue y col., 2007). Por otro lado, los phys pueden interactuar con PIF1, PIF3 y PIF7 e inhibir su capacidad de reconocer y unir las secuencias de ADN en las regiones promotoras de sus genes blanco (Matsushita y col., 2003; Oka y col., 2004; Li y col., 2012; Park y col., 2012). Por último, los phys inhiben indirectamente la capacidad de unir el ADN de las proteínas PIFs mediante la estabilización de otras proteínas, tales como HFR1 y DELLAs, que son reguladores transcripcionales responsables de la represión de las respuestas de GA (giberelinas; de Lucas y col., 2008; Feng y col., 2008; Hornitschek y col., 2009). De esta forma, los fitocromos liberan la represión de la fotomorfogénesis impuesta por las PIFs. Mientras que tanto phyA como phyB dominan la degradación rápida inducida por luz de las PIFs (Bauer y col., 2004; Al-Sady y col., 2006; Shen y col., 2007; Shen y col., 2008), sólo phyB parece tener una prominente función en condiciones lumínicas prolongadas (Leivar y col., 2012a; Soy y col., 2012). No es claro qué

quinasa es responsable de la fosforilación de las PIFs; aunque se sugirió que PIF1 es fosforilada por CK2 y posiblemente otras quinanas aún no identificadas (Bu y col., 2011).

La evidencia experimental con la que se cuenta hasta la fecha ha permitido establecer que PIF1, PIF3, PIF4, PIF5 y PIF7 actúan con distintos grados de redundancia para reprimir la fotomorfogénesis de la plántula impuesta por los fitocromos durante la de-etiolación, en condiciones de crecimiento diurno, y en respuesta al sombreado. En plántulas etioladas, la cuádruple mutante *pif1/pif3/pif4/pif5* (o *pifq*) muestra un fenotipo parcial de fotomorfogénesis constitutiva (Leivar y col., 2008b). Es decir, estas plantas mutantes se asemejan a las plántulas salvajes crecidas en luz, incluyendo hipocotilos cortos y agravitrópicos, y cotiledones expandidos que contienen cloroplastos desarrollados (Leivar y col., 2009; Shin y col., 2009; Kim y col., 2011). Esta observación estableció que estos PIFs tienen la capacidad intrínseca de promover la escotomorfogénesis mediante la represión de la fotomorfogénesis en ausencia de la fotoactivación de los fitocromos. Además, esto sugiere que en la remoción de estos PIFs (por degradación inducida por fitocromos o genéticamente en *pifq*) subyace la respuesta de de-etiolación de las plántulas (Leivar y Monte, 2014). Apoyando esta hipótesis, el fenotipo hiposensible a la luz roja de *phyB* se encuentra suprimido en la mutante doble *phyB/pifq* (Leivar y col., 2012a). Cabe destacar que, mientras las mutantes simples *pif1*, *pif3*, *pif4* y *pif5* presentan un fenotipo menor o directamente ausente de fotomorfogénesis constitutiva en oscuridad, se pueden observar efectos aditivos, y hasta sinérgicos, en mutantes combinadas de mayor orden que culminan en el prominente fenotipo de la mutante *pifq* (Leivar y col., 2008b; Shin y col., 2009; Stephenson y col., 2009; Leivar y col., 2012b).

De toda la información existente en la bibliografía se ha propuesto un modelo de acción de las PIFs (figura I-5): en oscuridad, PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5 se acumulan y colectivamente promueven el crecimiento etiolado de las plántulas, actuando de manera parcialmente redundante; mientras que después de la exposición a la luz, los fitocromos foto-activados revierten esta actividad de los PIFs mediante su fosforilación, reduciendo de su capacidad de unir ADN y provocando la degradación proteolítica por parte del proteosoma 26S. De esta forma, se inicia el proceso de de-etiolación (Castillon y col., 2007).

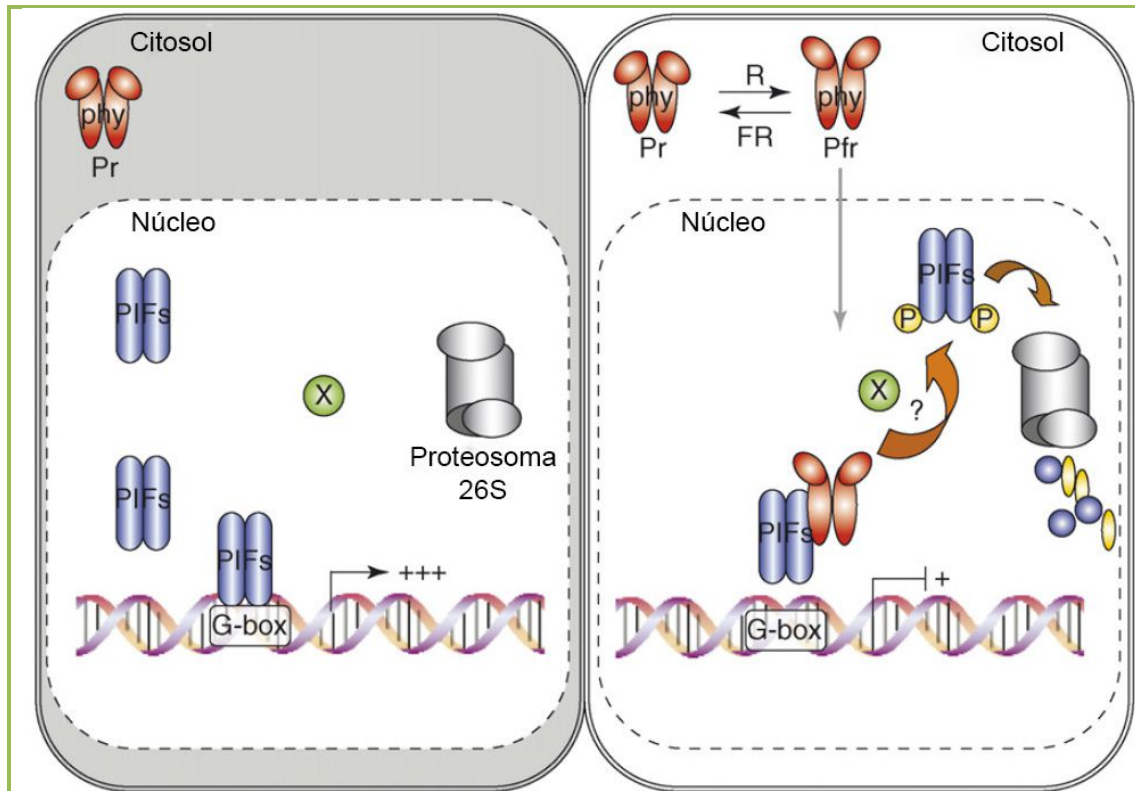


Figura I-5. Esquema de la función de PIFs en la vía de señalización de los fitocromos

En oscuridad, las proteínas PIFs se encuentran en el núcleo y promueven la escotomorfogénesis a través de la regulación de la expresión génica de diversos genes de respuesta. En luz, los fitocromos activados son importados al núcleo, donde impiden la actividad de PIFs, mediante su fosforilación, reducción de su capacidad de unir ADN y degradación proteolítica. Esto lleva a que las plantas comiencen el proceso de fotomorfogénesis. Adaptado de Castillon y col., 2007.

6. Funciones biológicas de *Phytochrome-Interacting Factor 1*

Aunque las proteínas PIFs presentan una elevada conservación en su secuencia y en la estructura de sus motivos, cada una de las mutantes simples *pif* muestra un fenotipo morfológico único en respuesta a la luz, aunque alguno de estos fenotipos son compartidos (Castillon y col., 2007). Esto sugiere que, como es el caso de otras familias génicas, los distintos miembros poseen funciones biológicas superpuestas y también distintas, actuando en algunos procesos con cierto grado de redundancia (Huq y Quail, 2002; Kim y col., 2003; Fujimori y col., 2004; Huq y col., 2004; Monte y col., 2004; Oh y col., 2004). PIF1 participa de una variedad de procesos biológicos entre los que se pueden citar la inhibición de la elongación del hipocotilo en condiciones alternantes de luz roja lejana y oscuridad, el gravitropismo negativo del hipocotilo en oscuridad, la acumulación de clorofila en luz y la acumulación de carotenoides en oscuridad (Huq y col., 2004; Oh y col., 2004; Toledo-Ortiz y col., 2010).

Además, PIF1 (o PIL5) es un nodo molecular que conecta la percepción de la luz con las vías hormonales que regulan la germinación de la semilla (figura I-6). La luz, específicamente la roja, es un factor externo crucial que detectan los fitocromos e induce la germinación (Shinomura y col., 1994). Por otro lado, las fitohormonas GA y ABA (ácido abscísico) son señales internas que cumplen papeles importantes, pero antagónicos, en la germinación; GA la promueve, mientras que ABA la reprime (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). En oscuridad, PIF1 induce en forma directa dos genes *DELLA*, *GA-INSENSITIVE (GAI)* y *REPRESSOR OF ga1-3 (RGA)*, que son represores de la señalización de GA (Oh y col., 2007); también induce en forma directa la expresión de *SOMNUS (SOM)*, una proteína nuclear de tipo dedos de zinc del grupo CCCH, y al FT de tipo Dof, denominado *DOF AFFECTING GERMINATION 1 (DAG1)*. SOM inhibe la germinación induciendo los niveles de ABA y reduciendo los de GA, mientras que DAG1 inhibe directamente la expresión de un gen anabólico de GA, *GA₃OXI* (Kim y col., 2008; Gabriele y col., 2010). Por último, PIF1 regula directamente genes que codifican reguladores transcripcionales relacionados a la señalización hormonal, y reprime en forma directa varios genes que codifican expansinas (*EXP8* y *EXP10*) y un gen homólogo de *XILOGLUCAN ENDOTRANSGLICOSILASA (XTH28)*, los cuales se encuentran involucrados en el ablandamiento de la pared celular (Oh y col., 2009). Así, PIF1 (o PIL5) reprime la germinación disminuyendo los niveles de GA, aumentando los niveles de ABA y controlando varias vías de señalización de hormonas y las propiedades de la pared celular (Lau y Deng, 2010).

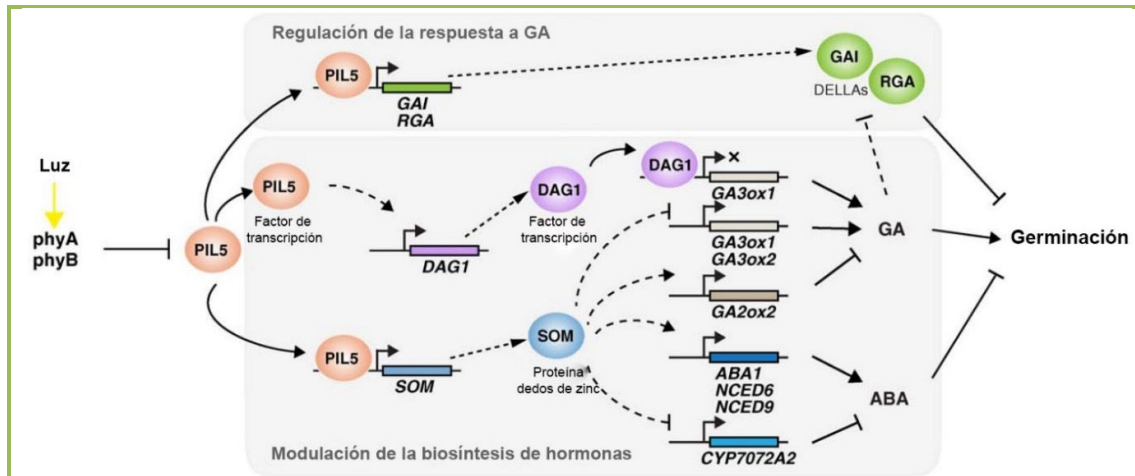


Figura I-6. Control hormonal mediado por PIF1/PIL5 en la germinación regulada por la luz

En la oscuridad, PIF1, también conocido como PIL5, reprime la germinación inhibiendo genes de respuesta a GA y regulando los niveles de GA y ABA. En el panel superior se muestra que PIL5 activa directamente la transcripción de dos genes DELLA, GAI y RGA, que son reguladores negativos de la señalización de GA. En el panel inferior se muestra que los bajos niveles de GA y elevados de ABA se logran a través de la regulación de dos proteínas, SOM y DAG1, que controlan la expresión de genes metabólicos de GA y ABA. PIL5 activa SOM y DAG1, en forma directa e indirecta. Por otro lado, los fitocromos activados por la luz interactúan directamente con PIL5, promoviendo su degradación y regulando negativamente sus efectos represores. Adaptado de Lau y Deng, 2010.

En estudios recientes se informó que PIF1 reprime la fotomorfogénesis en *Arabidopsis*. Este FT interactúa y forma complejos con COP1, HY5 y SPA1 (del inglés, *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1*, *ELONGATED HYPOCOTYL 5* y *SUPPRESSOR OF PHYA-105 1*, respectivamente) y aumenta el reclutamiento de sustratos por parte de COP1, así como también su actividad de auto- y trans-ubiquitilación (Xu y col., 2014). Por otra parte, PIF1 interactúa con el co-regulador transcripcional VQ MOTIF-CONTAINING PROTEIN29 (VQ29) para regular positivamente la elongación del hipocotilo mediada por la luz. (Li y col., 2014). Esto cursa en parte a través de la regulación directa de la expresión del gen *XTR7* (del inglés, *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE7*), que se encuentra relacionado con la elongación celular (Li y col., 2014). En condiciones de día corto existe una fuerte correlación entre los niveles proteicos de las diferentes PIFs, los niveles de expresión de genes marcadores y el crecimiento del hipocotilo. En estas condiciones, PIF1 promueve la elongación del hipocotilo (Soy y col., 2014) aunque las vías de señalización puestas en juego en este papel de PIF1 no se conocen en detalle.

7. Factores de transcripción con homeodominio

La caja homeótica (en inglés, *homeobox* o HB) codifica uno de los dominios de unión al ADN más extendido y mejor caracterizado en todos los organismos eucariotas: el homeodominio (HD). Los genes con HB fueron llamados homeóticos ya que su expresión ectópica y mutaciones puntuales en los mismos generaban efectos homeóticos: cambios de un segmento corporal por otro. Los HDs se identificaron originalmente en proteínas codificadas por genes involucrados en el desarrollo de *Drosophila melanogaster* (Gehring, 1987). Las mutaciones dominantes en el gen *Antennapedia*, por ejemplo, provocan la sustitución de las antenas por patas en la cabeza de la mosca (Garber y col., 1983). Otro ejemplo se encuentra en las mutantes *bithorax*, en las que los pequeños cabestros, que son utilizados por la mosca para lograr balancearse durante el vuelo, se transforman en un segundo par de alas (Bender y col., 1983). Años más tarde, este tipo de dominio se encontró en FTs de organismos evolutivamente distantes, incluyendo animales, hongos y plantas (Chan y col., 1998).

Las estructuras tridimensionales de complejos proteína-ADN, los ensayos de mutagénesis dirigida y los análisis bioquímicos permitieron conocer los mecanismos de unión de los HDs al ADN (Ades y Sauer, 1995; Gehring y col., 1994; Wolberger, 1991). Actualmente se sabe que el HD consiste en un motivo conservado de 60 aminoácidos que posee una estructura terciaria formada por 3 hélices α , llamadas I, II y III, que están conectadas entre sí por dos vueltas y un rulo. Las hélices I y II se alinean en forma paralela entre sí mientras que la III se acomoda en forma perpendicular a las dos primeras; dentro de los 60 aminoácidos, los residuos 10 a 22, 28 a 38, y 42 a 59 son los que forman parte de estas tres hélices (Branden y Tooze, 1999). El HD es capaz de unir al ADN como monómero con elevada afinidad a través de las interacciones establecidas por la hélice III (denominada hélice de reconocimiento) con el surco mayor del ADN blanco, mientras que el brazo desordenado amino terminal, localizado corriente arriba de la primera hélice, y la vuelta que une las hélices I y II interaccionan con el surco menor (Gehring y col., 1994). La elevada conservación de este tipo de dominio en proteínas de diferentes reinos indica que la estructura descrita es crucial para mantener su funcionalidad y que el papel que juegan los HD es esencial (Moens y Selleri, 2006).

8. Homeodominios en plantas

En plantas, el primer gen con una caja homeótica identificado fue *KNOTTED1*; éste fue aislado de una mutante de maíz (*kn*) que exhibía hojas anudadas (Vollbrecht y col., 1991). Desde ese momento, varios genes que contienen HB han sido identificados y aislados a partir de una amplia variedad de especies vegetales, que incluyen tanto mono- como dicotiledóneas. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en animales, ninguno de los genes con HB de plantas genera un efecto homeótico canónico cuando es mutado o expresado ectópicamente; por lo tanto, el legado del nombre de la familia (*homeobox*) no es del todo apropiado (Ariel y col., 2007).

9. La superfamilia de factores de transcripción con homeodominios en plantas

Los miembros de la superfamilia HD de plantas caracterizados hasta el momento participan en una amplia variedad de procesos de desarrollo, tales como identificación y mantenimiento de las células meristemáticas, embriogénesis, maduración del polen, regulación del desarrollo floral y respuesta a condiciones ambientales. La descripción de los genomas completos de varias especies vegetales, tales como arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*), *Arabidopsis thaliana* y álamo (*Populus trichocarpa*), entre otros, incrementó el conocimiento sobre los genes HB de plantas y permitió la clasificación de las proteínas que contienen HD en varias familias. Esta clasificación se hizo de acuerdo a la similitud de las secuencias del HD, al tamaño de la proteína, a la posición del HD dentro del FT, la asociación con otros dominios o motivos conservados, y también a la estructura génica que incluye la posición de los intrones dentro de los genes de *Arabidopsis* (Ariel et al., 2007; Mukherjee y col., 2009). Según Mukherjee y col. (2009), estas familias son: PHD finger (HD de plantas asociado a un dominio *finger*), ZF-HD (motivos conservados semejantes a dedos de zinc asociados a un HD), WOX (HB relacionadas a Wuschel), la superclase TALE [que incluye a las familias BELL (con un dominio Bell distintivo) y KNOX (HB relacionadas a Knotted)], DTT (denominado por la presencia de un dominio DTT corriente abajo del HD), NDX (Nodulin), LD (Luminidependends), PINTOX, SAWADEE (HD asociado a un dominio *sawadee*), y HD-Zip (compuesta por 4 subfamilias llamadas I, II, III y IV). El análisis de las secuencias de los HD de organismos diferentes y no relacionados de distintos reinos sugirió que algunos de los FTs con HD de plantas se relacionan más a los de animales y hongos que a otros HDs de plantas pertenecientes a diferentes familias. Por lo tanto, los HDs parecen haber divergido antes de la separación de las

ramas que dieron origen a las plantas, animales y hongos (Ariel y col., 2007). La figura I-7 muestra un árbol filogenético de todos los FTs con HD de Arabidopsis y una representación esquemática de la estructura de los miembros representativos de cada subfamilia.

10. La familia homeodominio-cierre de leucinas

Los miembros pertenecientes a esta familia están caracterizados por la presencia de un dominio de cierre de leucinas (LZ, del inglés *leucine zipper*), denominado el HALZ (por *Homeodomain Associated Leucine Zipper*), inmediatamente corriente abajo del HD. El LZ se pliega en una hélice α que tiene un residuo de lisina en cada séptima posición sobre el mismo lado de la hélice. Esta estructura tridimensional permite la formación de homo- o heterodímeros mediante interacciones hidrofóbicas entre ambos péptidos (Landschulz y col., 1988; Sessa y col., 1993). Los dominios HDs y LZs pueden ser encontrados en FTs de otros reinos eucariotas, pero su combinación en una sola proteína es única de plantas (Ruberti y col., 1991; Schena y Davis, 1992). El dominio HD-Zip se encuentra altamente conservado en proteínas de *Physcomitrella patens*, mono- y dicotiledóneas. En estos FTs, el HD es el responsable del reconocimiento y la unión específica al ADN, mientras que el LZ actúa como un motivo de dimerización. Esta dimerización es un evento indispensable para el reconocimiento y unión del ADN por parte del HD. Al unir como dímeros, los HD-Zip unen secuencias palindrómicas o pseudo-palindrómicas y la orientación relativa de los monómeros, dirigida por el LZ, es crucial para un reconocimiento eficiente del ADN (Tron y col., 2004).

Con respecto a la exclusividad de los HD-Zip por parte de las plantas, se informó la existencia de un FT de vertebrados atípico que contiene un dominio HD-Zip, conocido como HOMEZ (del inglés, *homeodomain leucine zipper encoding gene*; Bayarsaihan y col., 2003). Sin embargo, la comparación de secuencia entre esta proteína y los HD-Zip de plantas, así como también con otras proteínas con LZ, reveló que la estructura del LZ en HOMEZ difiere significativamente de un dominio LZ canónico (Ariel y col., 2007).

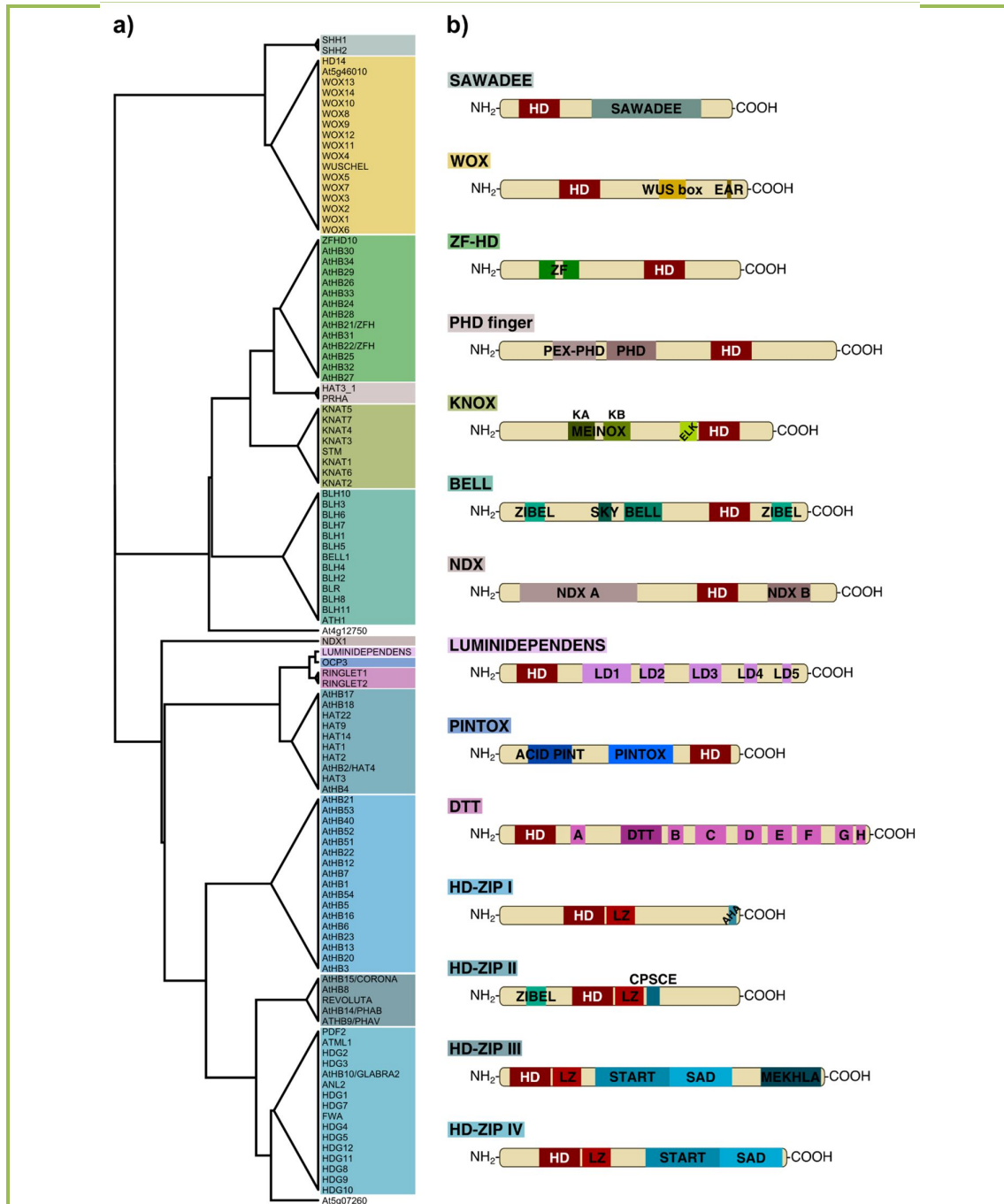


Figura I-7. Representación esquemática de la estructura de los miembros representativos de cada subfamilia de factores de transcripción con homeodominio

a) Árbol filogenético de todos los FTs con homeodominio de Arabidopsis basado en el alineamiento de las secuencias proteicas completas. b) Representación esquemática de los distintos motivos que presenta cada miembro de los genes que contienen un homeodominio. Abreviaturas: AHA, residuos aromáticos e hidrofóbicos inmersos en un contexto ácido; EAR, motivo de represión anfífilico; ELK, motivo llamado de esta manera a partir de los tres aminoácidos conservados que presenta, Glu, Leu y Lis; HD, homeodominio; LD, dominio *LUMINODEPENDENS*; MEINOX, derivado de la asociación de los dominios MEIS y KNOX; MEKHLA, dominio llamado por la elevada conservación de los aminoácidos Met, Glu, Lis, His, Leu y Ala; LZ, cierre de leucinas; PEX-PHD, motivo rico en residuos cargados; PHD, homeodominio de plantas; SAD, dominio adyacente a START; START, dominio de transferencia de lípidos relacionado a las proteínas reguladoras de la esteroidogénesis aguda; ZF, dedos de zinc.

La familia HD-Zip se clasifica en cuatro subfamilias (I a IV) en base a los siguientes parámetros: a) la conservación de la secuencia del dominio HD-Zip que determina la especificidad de unión al ADN; b) los patrones intrón/exón en los genes que las codifican; c) los motivos conservados adicionales por fuera del dominio HD-Zip; y d) las vías de señalización en las que participan. En la Figura I-7b se muestra una representación esquemática de la estructura de las proteínas que pertenecen a las distintas subfamilias HD-Zip. A su vez, la figura I-8 presenta un árbol filogenético que resuelve las proteínas HD-Zip de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*.

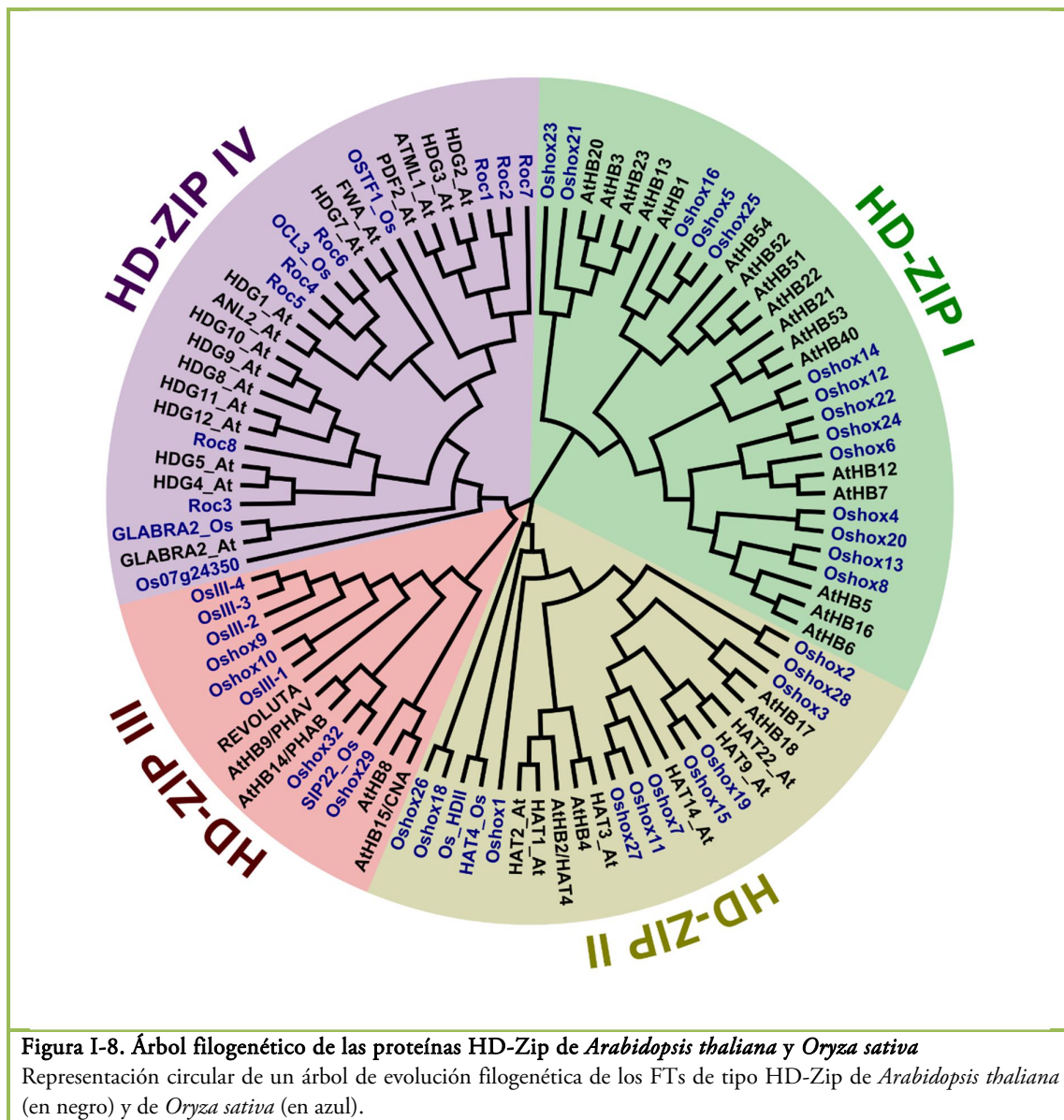


Figura I-8. Árbol filogenético de las proteínas HD-Zip de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. Representación circular de un árbol de evolución filogenética de los FTs de tipo HD-Zip de *Arabidopsis thaliana* (en negro) y de *Oryza sativa* (en azul).

11. La subfamilia homeodominio-cierre de leucinas I

Esta subfamilia está compuesta por 17 miembros en *Arabidopsis thaliana* (*AtHB1/HAT5*, *AtHB3/HAT7*, *AtHB5-AtHB7*, *AtHB12*, *AtHB13*, *AtHB16*, *AtHB20-AtHB23*, *AtHB40*, *AtHB51-AtHB54*) y por 14 en *Oryza sativa* (Ariel y col., 2007; Agalou y col., 2008). Las proteínas codificadas poseen un tamaño de aproximadamente 35 kDa y están involucradas principalmente en procesos de desarrollo asociados al estrés abiótico; exhiben una elevada conservación de secuencia en el HD y un LZ menos conservado (Chan y col., 1998; Ariel y col., 2007; Ribichich y col., 2014). Los genes que codifican a los miembros de esta subfamilia I presentan intrones en la región correspondiente a la hélice I y al LZ. Además, se pueden encontrar cuatro patrones intrón/exón diferentes en los miembros de *Arabidopsis thaliana*: a) *AtHB52* y *AtHB54* carecen de intrones; b) *AtHB21*, *AtHB40*, *AtHB53*, *AtHB22*, y *AtHB51* tienen sólo un intrón corriente abajo del codón que codifica el cuarto residuo de leucina en el dominio LZ; c) *AtHB3*, *AtHB20*, *AtHB13*, *AtHB23*, *AtHB5*, *AtHB6*, *AtHB16*, *AtHB1*, *AtHB7*, y *AtHB12* tienen un único intrón localizado luego del codón para la quinta leucina del LZ; y d) *AtHB1* posee un intrón adicional dentro de la región correspondiente a la hélice I (Henriksson y col., 2005).

Los 17 miembros de *Arabidopsis* fueron clasificados en seis grupos (llamados α a ϕ) de acuerdo a su relación filogenética y a la estructura de los genes codificantes, tomando en cuenta particularmente el número y la posición de los intrones (Henriksson y col., 2005). Recientemente, en nuestro laboratorio se realizó una nueva reconstrucción filogenética teniendo en cuenta proteínas HD-Zip I de diferentes especies que resolvió a estos FTs en otros seis grupos (denominados I a VI). Para la construcción de este último árbol, se consideró la presencia y la distribución de motivos conservados no caracterizados presentes en la región carboxilo terminal (CTR, del inglés *Carboxy-Terminal Region*; Arce y col., 2011).

Los miembros HD-Zip I son capaces de homo- o heterodimerizar a través del dominio LZ; sin embargo, la interacción es selectiva. Por ejemplo, ensayos *in vitro* demostraron que *AtHB5* es capaz de formar heterodímeros con *AtHB6*, *AtHB7* y *AtHB12*, pero interacciona débilmente con *AtHB16* y no forma heterodímeros con *AtHB1* (Johannesson y col., 2001).

Los estudios de selección de sitios de unión asistida por PCR y los ensayos de *footprinting* demostraron que las proteínas que pertenecen a la subfamilia I reconocen *in vitro* la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG formando hetero- o homodímeros (Sessa y col., 1993;

Chan y col., 1998; Palena y col., 1999; Johannesson y col., 2001; Palena y col., 2001). El único miembro que es aparentemente incapaz de unir ADN *in vitro* es *AtHB7* (Johannesson y col., 2001). Por otro lado, el reconocimiento *in vivo* de esta secuencia fue demostrada para *MtHB1* de *Medicago truncatula* que regula la formación de raíces laterales (Ariel y col., 2010a), y para *Oshox4*, un FT con una función negativa en las respuestas a GA en arroz (Dai y col., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que varios miembros de *Arabidopsis* (*AtHB5*, *AtHB7*, *AtHB12*, *AtHB21* y *AtHB40*) y uno de *Rosa hybrida* (*RhHB1*) unen elementos en *cis* en las regiones promotoras de sus genes blanco que difieren de la secuencia pseudopalindrómica encontrada *in vitro* (Comelli y col., 2012; Valdés y col., 2012; De Smet y col., 2013; Lü y col., 2014). Sin embargo, todas las regiones regulatorias unidas poseen al menos el núcleo central de la secuencia pseudopalindrómica.

HaHB4 es un miembro de girasol de esta subfamilia. Los análisis bioquímicos *in vitro* realizados con esta proteína mostraron que los residuos cargados positivamente en el brazo flexible amino terminal tienen un papel esencial en la determinación de la afinidad de la interacción proteína-ADN, pero no así en la especificidad (Palena y col., 2001). Por otro lado, la composición aminoacídica de la vuelta localizada entre las hélices I y II debe ser considerada como uno de los segmentos responsables de la incapacidad de estos HD-Zip de unir al ADN en su forma monomérica (Tron y col., 2004).

11.1. Aspectos funcionales y estructurales de los homeodominio-cierre de leucinas I

Los HD-Zip I más estudiados son los pertenecientes al clado I (Arce y col., 2011), que participan en las respuestas al estrés abiótico, particularmente aquellas mediadas por ABA (como desecación, y estrés salino u osmótico). La expresión de los genes parálogos de *Arabidopsis* *AtHB7* y *AtHB12* se induce por ABA y estrés hídrico (Söderman y col., 1996; Hjellström y col., 2003; Olsson y col., 2004). Estos dos FTs exhiben un patrón de expresión claramente diferente: *AtHB12* se expresa durante etapas tempranas del desarrollo de la plántula, mientras que los transcritos de *AtHB7* se detectan en las últimas etapas de desarrollo de la planta. Recientemente y a partir de un trabajo hecho en nuestro laboratorio, hemos informado que existe un mecanismo complejo por el cual la expresión de cualquiera de estos genes afecta los niveles de transcritos del otro (Ré y col., 2014). Cuando se los sobre-expresa en *Arabidopsis*, ambos confieren un fenotipo caracterizado por una respuesta hipersensible a ABA en ensayos de elongación de raíz, un retraso en la elongación del

tallos de inflorescencia, hojas de la roseta con una forma más redondeada, pecíolos más cortos y un aumento en el número de ramificaciones del tallo (Hjellström y col., 2003; Olsson y col., 2004). Por otra parte, *AtHB12* está involucrado en las respuestas mediadas por GA, debido a que plantas mutantes *athb12* en un fondo genético Wassilewskija (WS) presentan tallos de inflorescencia más largos y mayores niveles de *GA₂₀OX2* que los controles salvajes (Son y col., 2010).

MtHB1 y *NaHD20*, de *Medicago truncatula* y *Nicotiana attenuata*, respectivamente, son otros dos genes que codifican proteínas HD-Zip I del clado I con una elevada homología de secuencia a *AtHB7* y *AtHB12*. *MtHB1* se expresa en los meristemas de la raíz y actúa como un represor de *MtLBD1* frente a condiciones ambientales causantes de estrés, lo que lleva a la inhibición de la iniciación de las raíces laterales (Ariel y col., 2010a; Ariel y col., 2010b). *NaHD20* participa de la vía de señalización mediada por ABA en respuesta a estrés hídrico y cumple un papel crucial en la emisión de acetona de bencilo a partir de las flores de tabaco (Ré y col., 2011; Ré y col. 2012).

En el laboratorio donde se realizó esta Tesis se ha investigado en profundidad la estructura y la función del FT de girasol *HaHB4* (*Helianthus annuus homeobox 4*). El mismo comparte un 60 y 53 % de identidad aminoacídica en la región del HD con *AtHB7* y *AtHB12*, respectivamente y éstas son las proteínas HD-Zip de Arabidopsis con las que presenta mayor similitud (Gago y col., 2002). Sin embargo, *HaHB4* posee un dominio C-terminal de un tamaño inferior al del de sus homólogos en Arabidopsis (69 aminoácidos desde que termina el LZ comparados con los 127 de *AtHB7* y los 106 de *AtHB12*).

En girasol, *HaHB4* se expresa en muy bajos niveles en condiciones normales. Sin embargo, cuando las plantas se tratan con ABA, manitol, NaCl y especialmente cuando se someten a estrés hídrico, la expresión de este gen aumenta notoriamente en raíces, tallos y hojas (Gago y col., 2002; Dezar y col., 2005a).

Las plantas transgénicas de Arabidopsis que expresan en forma ectópica y constitutiva el ADNc de *HaHB4* presentan un retraso en el desarrollo dependiente del nivel de expresión, poseen hojas más redondas, pecíolos más cortos, inflorescencias más compactas y tallos e internodos de menor longitud (Dezar y col., 2005a). A su vez, sometidas a condiciones de déficit hídrico y deshidratación presentan una marcada tolerancia, comparadas con sus pares salvajes (Dezar y col., 2005b). Por otro lado, cuando las plantas son transformadas con el mismo gen bajo el control de un promotor inducible, en lugar de ser expresado constitutiva y ectópicamente, estas características fenotípicas

desaparecen pero persiste la característica diferencial de tolerancia a sequía. Cuando se utilizó dentro de la construcción genética una secuencia amplificadora que aumenta la respuesta de la región promotora se obtuvieron plantas sin morfología diferencial pero con una tolerancia al estrés similar a la de las plantas de expresión constitutiva (Cabello y col., 2007).

El análisis de microarreglos comparando los genotipos salvaje y transgénico indicó una represión considerable en la expresión de un elevado número de genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis y la vía de transducción de señales del etileno. Sin embargo, el etileno induce la transcripción de *HaHB4* (Manavella y col., 2006). Además de la vía de síntesis y percepción de etileno, este FT participa en la respuesta a estrés de origen biótico, esencialmente induciendo la síntesis de ácido jasmónico y la represión de la del ácido salicílico. Como consecuencia de estos cambios, las plantas transgénicas presentan una mayor tolerancia al ataque de herbívoros y sensibilidad a patógenos biotróficos (Manavella y col., 2008).

AtHB13 y *AtHB23* son genes parálogos de *Arabidopsis* pertenecientes al clado V y comparten un 78 % de identidad en el dominio HD-Zip. Poseen un patrón de expresión similar, expresándose en la región del meristema del tallo, en la unión de las hojas, en la región basal de los pétalos, sépalos y estambres, y dentro del estigma (Hanson y col., 2002; Kim y col., 2007). A pesar de esta elevada homología de secuencia, ambos FTs parecen cumplir funciones diferentes. El análisis de plantas que sobre-expresan *AtHB13* mostró que este FT regula el desarrollo de los cotiledones y de las hojas en respuesta a la disponibilidad de azúcares en estadios tempranos de desarrollo (Hanson y col., 2002). Además, recientemente se demostró que *AtHB13*, junto con su homólogo de girasol *HaHB1*, se encuentra implicado en la respuesta a estrés abiótico; su sobre-expresión en *Arabidopsis* indujo la expresión de proteínas que estabilizan las membranas celulares, causando un aumento en la tolerancia a la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas (Cabello y Chan, 2012; Cabello y col., 2012). Por otro lado, *AtHB23* interacciona con el fitocromo B en el núcleo, y se encuentra involucrado en la vía de señalización de la luz mediada por phyB a través de un mecanismo desconocido (Choi y col., 2013).

La mayoría de los HD-Zip I se encuentran principalmente involucrados en eventos relacionados al desarrollo y al crecimiento en respuesta a condiciones de estrés; sin embargo, de acuerdo a los estudios fenotípicos y transcripcionales mencionados, estos FTs estarían ejerciendo funciones diferentes en las plantas.

11.2. Características funcionales de los homeodominio-cierre de leucinas I pertenecientes al grupo III

El clado III posee sólo un miembro en *Arabidopsis thaliana*, *AtHB1/HAT5*, y tres en arroz, *OsHox5*, *OsHox16* y *OsHox25*, cuyas funciones son mayormente desconocidas hasta el momento. La figura I-9 esquematiza los motivos compartidos en sus CTRs por los miembros pertenecientes a este clado.

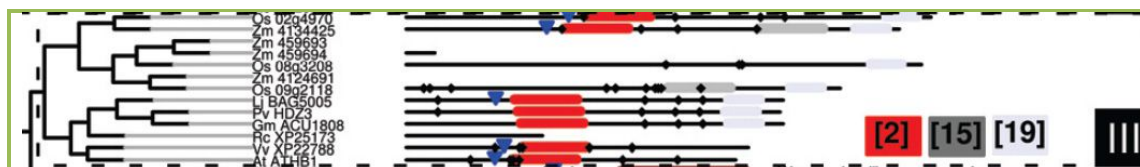


Figura I-9. Motivos conservados en los CTRs de los miembros del clado III
Árbol filogenético en el que se observan *AtHB1*, *PvHDZ3*, *OsHOX16*, entre otros, con motivos similares pero no iguales. Los rombos negros simbolizan los sitios putativos de fosforilación, los triángulos azules los sitios putativos de sumoilación, y los rectángulos de diferentes colores representan los motivos putativos conservados (rojo, motivo 2; gris oscuro, motivo 15; gris claro, motivo 19). Adaptado de Arce y col., 2011

Con respecto al patrón de expresión, se sabe que *AtHB1* se encuentra ubicuamente en todos los órganos de la planta, y que sus niveles de transcritos se ven reducidos en presencia de NaCl y bajas temperaturas mientras que en oscuridad, aumentan (Henriksson y col., 2005). Por otro lado, se demostró que *CPHB-5*, un HD-Zip I de *Craterostigma plantagineum* que presenta una elevada homología de secuencia a *AtHB1*, es reprimido en condiciones de deshidratación tanto en hojas como en raíces (Deng y col., 2002). *GhHB3*, un miembro del clado III de algodón (*Gossypium hirsutum*), se expresa preferencialmente en hipocotilos y cotiledones, es inducido por el agregado exógeno de giberelina activa (GA_3) y reprimido en cotiledones por el agregado del precursor de auxinas ácido indol acético (IAA, por sus siglas en inglés; Qin y col., 2010). *HDZ-M48* de *Lotus japonicus*, también de este grupo, se induce tres horas después de la infección con *Mesorhizobium loti* promoviendo la formación de nódulos, y su expresión se reduce en estadios tardíos de la nodulación (Asamizu y col., 2008).

LeHB-1 de tomate codifica un HD-Zip I que pertenece a este clado, y ha sido asociado a la morfogénesis del fruto. Este FT es un activador de *LeACO1*, un gen que codifica una ACC oxidasa involucrada en la síntesis de la fitohormona etileno, que en última instancia permite la maduración de los frutos del tomate. La expresión ectópica de *LeHB-1* en tomate altera la morfología del órgano

floral mientras que la reducción en sus niveles de transcripto inhibe la maduración del fruto, indicando que cumple un rol crucial en este proceso (Lin y col., 2008).

Se sugirió que *AtHBI* se encuentra involucrado en el desarrollo de las hojas, dado que su expresión ectópica y constitutiva en tabaco afecta el desarrollo del parénquima en empalizada. Además, estas mismas plantas de tabaco muestran un fenotipo de-etiolado (fotomorfogénesis constitutiva) cuando crecen en oscuridad total (Aoyama y col., 1995). Por lo tanto, se propuso que *AtHBI* es una proteína fundamental en el mecanismo de percepción de la luz que favorece la de-etiolación de las plántulas (Aoyama y col., 1995).

Finalmente, se identificó en la región 5' no codificante de *AtHBI* un marco de lectura abierto que codifica un péptido de 28 aminoácidos de secuencia conservada, denominado *CPuORF33* (del inglés, *Conserved Peptide upstream Open Read Frame*; Hayden y Jorgensen, 2007). Se demostró que estos uORFs pueden mediar la regulación traduccional del ORF mayor. En algunos casos, se propuso la hipótesis de que el péptido conservado detiene la progresión del ribosoma, bloqueando a nuevos ribosomas para que comiencen la traducción del mensajero o suprimiendo la reiniciación (Hanfrey y col., 2002; Rahmani y col., 2009). En otros casos, los uORF podrían ejercer su función luego de ser traducidos, desestabilizando el mensajero o inhibiendo la traducción (Chang y col., 2000; Combier y col., 2008). Sin embargo, la función del uORF en *AtHBI* es absolutamente desconocida.

12. La región carboxilo terminal de los factores de transcripción homeodominio-cierre de leucinas I se encuentra conservada entre distintas especies

El dominio HD-Zip se encuentra altamente conservado en proteínas provenientes de diferentes organismos, desde *Physcomitrella patens*, hasta mono- y dicotiledóneas y dentro de las mismas especies, lo cual explica la universalidad de la secuencia unida por estas proteínas. Sin embargo, las diferencias funcionales son difíciles de explicar por esta misma razón. En este sentido, en el laboratorio en donde se llevó a cabo esta Tesis, se logró identificar la existencia de motivos muy conservados por fuera del dominio HD-Zip (Arce y col., 2011). Estos motivos no caracterizados se encuentran presentes en proteínas pertenecientes a distintas especies vegetales pero no dentro de las pertenecientes a la misma especie y sobre todo, en los miembros de las especies tomadas como modelos, arroz y *Arabidopsis*. Esto es lo que probablemente retardó mucho su identificación debido

a la falta de información sobre especies de genoma no secuenciado. Estos motivos conservados entre especies están ubicados mayoritariamente en los CTRs y en menor medida en la región amino terminal (NTR, del inglés *Amino-terminal regions*).

Antes de que se identificaran los motivos funcionales putativos dentro de los CTRs y NTRs existían evidencias experimentales informadas respecto a su importancia. Por ejemplo, en ensayos de simple híbrido en levaduras se observó que el CTR de AtHB12 posee la capacidad de activar la expresión de un gen reportero, funcionando como un dominio de transactivación al ser fusionado al dominio de unión a ADN de GAL4 (Lee y col., 2001). Además, diferentes construcciones génicas permitieron reconocer que la actividad transcripcional se restringe a los aminoácidos 180 a 235 de la porción final del CTR (Lee y col., 2001). Posteriormente se demostró que sólo la construcción que posee el CTR completo de AtHB12 es capaz de complementar funcionalmente levaduras mutantes sensibles a NaCl por deficiencia de calcineurina (Shin y col., 2004).

A su vez, algunos trabajos previos también demostraron la importancia funcional de los CTRs de los HD-Zip I *in planta*. Por ejemplo, Sakuma y col. (2010) identificaron el gen de cebada *HvHox2*, un parálogo putativo de *VRS1*. En la variedad salvaje se aborta el desarrollo de las espiguillas laterales dando un fenotipo llamado “de dos hileras”, pero la planta mutante recesiva *vsr1* desarrolla las tres espiguillas generando el fenotipo de “seis hileras” (Komatsuda y col., 2007). Ambos genes, *HvHox2* y *VRS1*, codifican proteínas de tipo HD-Zip I, que difieren sólo en su CTR: *HvHox2* presenta 14 aminoácidos adicionales, comparada con *VRS1*. Se propuso que esta región podría ser la responsable de la interacción de *HvHOX2* con alguna proteína co-activadora, y que la falta de estos aminoácidos en *VRS1* impediría dicha interacción. Esto generaría una proteína que interfiere con la actividad de *HvHOX2* en los primordios de las espiguillas laterales, interrumpiendo así su desarrollo. Por otro lado, se mostró que plantas mutantes de arveja (*Pisum sativum*) que no expresan el gen HD-Zip I *Tendril less (TL)* desarrollan hojas en lugar de zarcillos. El mismo fenotipo se observa en plantas de arveja que expresan una versión trunca del producto del gen *TL* que carece de los últimos 12 aminoácidos del CTR (Hofer y col., 2009).

Además, en nuestro laboratorio se mostró que el CTR de otro miembro de la familia HD-Zip I de girasol, *HaHB1*, estaría determinando ciertas funciones de ese FT. Esto se fundamenta en la observación de que la fusión entre el CTR de *HaHB1* y el dominio HD-Zip codificado por *HaHB4* es capaz de “alterar la función” de este último, confiriéndole las características de *HaHB1* (Arce y

col., 2011). En conjunto, todas estas manifestaciones fenotípicas apoyan la suposición de una funcionalidad del dominio carboxilo terminal en los factores de transcripción de la familia HD-Zip I.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Hipótesis y Objetivos

1. Hipótesis:

La primera hipótesis de este trabajo de Tesis Doctoral plantea que los motivos identificados con herramientas informáticas en las regiones carboxilo-terminales de los FTs HD-Zip I, cumplirían papeles funcionales específicos, ya sea interaccionando con otras proteínas o al sufrir modificaciones post-traduccionales. Proponemos que estas regiones conservadas entre especies serían responsables de las diferencias funcionales que existen entre los distintos miembros de esta subfamilia de FTs. La segunda hipótesis de trabajo plantea que AtHB1, uno de los miembros de la familia HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*, cumpliría una función de importancia en el proceso de desarrollo de los hipocotilos actuando corriente debajo de PIF1, un FT de tipo bHLH, y que esta función estaría relacionada con las condiciones de iluminación y con genes que participan de la elongación celular. La tercera hipótesis plantea que CPuORF33, un péptido conservado presente en la región 5' no codificante de *AtHB1*, cumpliría un papel importante en la regulación de la expresión de este FT.

2. Objetivos generales:

El primer objetivo general de esta Tesis Doctoral es dilucidar cuál es la función que cumplen los motivos conservados presentes en las regiones carboxilo-terminales de los FTs HD-Zip I. Nos interesa particularmente comprender las causas de la diversidad funcional de estos FTs y el porqué de la conservación interespecífica de los motivos proteicos en los CTRs.

El segundo objetivo general planteado es el de aislar y caracterizar funcionalmente a AtHB1. Para alcanzar este objetivo, planteamos sobre-expresarlo y anularlo en plantas transgénicas/mutantes y analizar los fenotipos de estas plantas. El análisis funcional de este FT nos ayudará a comprender la relación estructura-función.

El tercer objetivo general es analizar la función putativa de la región conservada en el extremo 5' no codificante de *AtHB1*. Para alcanzar este objetivo, planteamos estudiar la expresión de un reportero en plantas transformadas con construcciones que contengan el promotor de este FT con y sin el 5'UTR. Posteriormente, analizar los fenotipos de plantas mutantes y sobre-expresantes de *AtHB1* en las condiciones donde se haya observado una expresión diferencial del reportero.

3. Objetivos particulares:

- Analizar los motivos conservados presentes en las regiones carboxilo terminales de AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 utilizando herramientas bioinformáticas.
- Clonar los cuatro ADNc correspondientes a estos FTs en vectores adecuados para transformar levaduras y plantas.
- Realizar mutaciones en los motivos encontrados para poder estudiar su función.
- Realizar ensayos de simple híbrido en levaduras con construcciones que expresen todas las versiones salvajes y mutantes de estas proteínas fusionadas al dominio de unión de GAL4, con el objeto de analizar la influencia de las mutaciones en la capacidad de activación transcripcional.
- Corroborar funcionalmente los resultados obtenidos en levaduras mediante ensayos de simple híbrido en plantas.
- Realizar ensayos de doble híbrido con construcciones hechas en vectores de expresión en levaduras y corroborar los resultados positivos de interacción entre los dominios en estudio y las proteínas identificadas, mediante interacciones *in vitro*.
- Analizar el patrón de expresión de *AtHB1* en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en condiciones normales, a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Para ello se obtendrán plantas transformadas con la región promotora y el 5' no codificante de este FT fusionados a un gen informador como *GUS* o *GFP*.
- Obtener plantas de *Arabidopsis* mutantes y sobre-expresantes de *AtHB1*, y evaluar en detalle la fisiología de estas plantas en condiciones óptimas de crecimiento.
- Analizar las plantas mutantes y sobre-expresantes en condiciones variables de iluminación.
- Analizar las plantas mutantes simples y la mutante cuádruple de *pif5*, en las condiciones que hayan influido en el fenotipo de las mutantes y sobre-expresantes de *AtHB1*.
- Obtener plantas de *Arabidopsis* mutantes *athb1/pif* y sobre-expresantes de *PIF* o *AtHB1* en un fondo genético salvaje, *athb1* o *pif*, para determinar si *AtHB1* actúa corriente abajo de dichos FTs a través de la evaluación fenotípica de dichas plantas.
- Comparar el transcriptoma de las plantas transgénicas que no expresen *AtHB1* en condiciones controladas con el de plantas salvajes utilizando la técnica de RNA-Seq.

- Validar los datos obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa.
- Identificar las vías involucradas en el desarrollo de los fenotipos particulares del gen en estudio.
- Analizar la conservación inter-especie del CPuORF33 presente en *AtHB1* utilizando herramientas bioinformáticas.
- Obtener plantas de *Arabidopsis* transformadas con una construcción que contenga el promotor de *AtHB1* sin el 5' no codificante, y analizar su patrón de expresión en estas plantas crecidas en condiciones normales, a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta.
- Comparar los niveles de expresión, tanto a nivel proteico como de transcripto, en las plantas transformadas con el promotor de *AtHB1* con y sin la región 5' no codificante, en distintas condiciones de crecimiento.
- Evaluar la fisiología de las plantas mutantes y sobre-expresantes de *AtHB1* en aquellas condiciones de crecimiento en donde se haya observado una expresión diferencial del reportero.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

Materiales y Métodos

1. Material utilizado

1.1. Cepas bacterianas y de levaduras

En la tabla 1 se detallan los genotipos de las cepas de *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, y *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Microorganismo	Cepa	Genotipo Relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3) Codon Plus	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nim5])	
<i>Escherichia coli</i>	DH10b	F ⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara-leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC) λ ⁻	Casadaban y col., 1980
<i>Escherichia coli</i>	Top10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Casadaban y col., 1980
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	Posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomomicina, que se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiAch5 de la cepa salvaje Ach5 por el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina	Ooms y col., 1982
<i>Saccharomyces</i>	AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> ,	James y col.,

<i>cerevisiae</i>		<i>his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	1996
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901.leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1</i>	Harper y col., 1993

1.2. Especies vegetales

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) para los experimentos de transformación estable por *floral dip* y transformación transitoria. Además, se usaron plantas de *Nicotiana benthamiana* para los ensayos de transformación transitoria de hojas.

1.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias, levaduras y plantas son los que se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivo

Medio de Cultivo	Organismo que se cultiva	Composición	Referencia
Luria Bertani (LB)	<i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l; pH 7 Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar	Sambrook y col., 1989
2 x TY	<i>Escherichia coli</i>	Peptona de carne 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l; pH 7	Sambrook y col., 1989
YEB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 1 g/l, MgCl ₂ 0,5 g/l, sacarosa 5 g/l	Li y col., 2009

YPD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Peptona de carne 20 g/l, .extracto de levadura 10 g/l, glucosa 20 g/l	Sherman, 1991
YPDA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Peptona de carne 20 g/l, .extracto de levadura 10 g/l, glucosa 20 g/l, 10 ml de adenina hemisulfato dihidrato 4,39 mg/ml Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar	Sherman, 1991
SD –His	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Base nitrogenada de levaduras (Sigma) 6,8 g/l, glucosa 20 g/l, suplemento DO –His 0,77 g/l. Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar	Sherman, 1991
SD –Leu	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Base nitrogenada de levaduras (Sigma) 6,8 g/l, glucosa 20 g/l, suplemento DO –Leu 0,69 g/l. Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar	Sherman, 1991
SD –Leu – Trp	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Base nitrogenada de levaduras (Sigma) 6,8 g/l, glucosa 20 g/l, suplemento DO –Leu 0,69 g/l, suplemento DO –Trp 0,74 g/l. Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar	Sherman, 1991
SD –Trp	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Base nitrogenada de levaduras (Sigma) 6,8 g/l, glucosa 20 g/l, suplemento DO –Trp 0,74 g/l. Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar	Sherman, 1991
Murashige & Skoog	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Murashige and Skoog Basal Medium with Gamborg's Vitamins (Sigma-Aldrich) KNO ₃ 1,9 g/l; NH ₄ NO ₃ 1,65 g/l; CaCl ₂ .2H ₂ O 0,44 g/l; MgSO ₄ .7H ₂ O 0,37 g/l; KH ₂ PO ₄ 0,17 g/l; Na ₂ EDTA 37,3 mg/l; FeSO ₄ .7H ₂ O 27,8	Murashige y Skoog, 1962

		mg/l; MnSO ₄ ·4H ₂ O 22,3 mg/l; H ₃ BO ₃ 6,2 mg/l; ZnSO ₄ ·4H ₂ O 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 0,25 mg/l; CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,025 mg/l; CoCl ₂ ·6H ₂ O 0,025 mg/l; pH 5,8. Para medios sólidos, se añadieron 9 g/l de agar.	
--	--	--	--

El medio MS se utilizó con un suplemento de vitaminas de Gamborg 1 µl/ml (Gamborg y col., 1968).

Vitaminas de Gamborg: m-inositol 100 mg/l, tiamina-HCl 10 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina-HCl 1 mg/l.

1.4. Vectores utilizados

El plásmido *pBI121* (Jefferson y col., 1987) deriva del vector binario *pBIN19*. Este plásmido contiene el gen que codifica la enzima β-glucuronidasa de *E. coli* (*GUS*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*NOS*), clonado tras un fragmento de 800 pb que contiene el promotor duplicado 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV). Dentro de las regiones de movilización de ADN, necesarias para la transformación de plantas, se encuentra el gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Otras secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *RK2*. El plásmido *pBI101.3* es un plásmido semejante al anterior, siendo la ausencia del promotor 35SCaMV la diferencia más importante. Este plásmido permite los estudios funcionales de una región promotora, mediante su inserción corriente arriba del gen reportero *GUS*.

Los plásmidos *pCAMBIA1302* y *pCAMBIA1380* derivan del vector *pPZP* (Hajdukiewicz y col., 1994). Estos plásmidos contienen un sitio de múltiple clonado proveniente del *pUC18* y del *pUC8*, respectivamente. Dentro de las regiones de movilización de ADN, necesarias para la transformación de plantas, se encuentra el gen *HPTII*, que confiere resistencia a higromicina en plantas, bajo el control del promotor 35SCaMV y la señal de poliadenilación del virus del mosaico de la coliflor (35S-Term); el vector *pCAMBIA1302*, a su vez, contiene el gen reportero mGFP5 fusionado a una cola de histidinas, clonado tras un fragmento de 500 pb que contiene el

promotor 35SCaMV. Otras secuencias relevantes dentro de estos vectores incluyen el gen de resistencia a kanamicina en bacterias, el replicón *pVS1* para estabilidad en *Agrobacterium* y un origen de replicación bacteriano *pBR22*.

El plásmido *pKGWFS7* (Karimi y col., 2002) es un derivado del vector binario *pPZP200*. Este plásmido fue diseñado para clonados utilizando la tecnología GATEWAY®, particularmente para el análisis de secuencias promotoras. El promotor clonado permite controlar la expresión de la proteína de fusión GFP (proteína fluorescente verde; del inglés, *Green Fluorescence Protein*) – GUS (β -glucuronidasa). Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Otras secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *ColE1*.

El vector fagémido *pGADT7* contiene un sitio de múltiple clonado con el terminador *ADHI* de levaduras, clonado tras una región que contiene el promotor de *ADHI*, el dominio de activación de GAL4 fusionado a la señal de localización nuclear de SV40 y el epítipo hemoaglutinina (HA). Además, este plásmido tiene el marcador de selección *LEU2*, que permite a las levaduras crecer en un medio carente de leucina, y el origen de replicación en levaduras 2 μ . Otras secuencias relevantes dentro del vector son el gen de resistencia a ampicilina en bacterias, el origen de replicación bacteriano *pUC* y el origen de replicación de ADN simple hebra F1.

El vector fagémido *pGBKT7* contiene un sitio de múltiple clonado con los terminadores T7 y *ADHI* de levaduras, clonado tras una región que contiene un fragmento del promotor de *ADHI*, el dominio de unión a ADN de GAL4 y el epítipo c-Myc. Además, este plásmido tiene el marcador de selección *TRP1*, que permite a las levaduras crecer en un medio carente de triptófano, y el origen de replicación en levaduras 2 μ . Otras secuencias relevantes dentro del vector son el gen de resistencia a kanamicina en bacterias, el origen de replicación bacteriano *pUC* y el origen de replicación de ADN simple hebra F1.

Los plásmidos *pGEX* permiten la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* como fusiones a la proteína Glutación S-transferasa de *Schistosoma japonicum* (*GST*). Esto facilita la purificación de las proteínas de fusión mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de glutación-Sepharose. La expresión se encuentra regulada por el promotor *tac*, que es inducido por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), un análogo de la lactosa. Además,

estos vectores presentan el gen *lacI^q*, que expresa una proteína represora que reconoce una región del promotor *tac*, lo que impide la expresión de la proteína recombinante hasta la inducción con IPTG. Otras secuencias relevantes dentro del vector son el gen de resistencia a ampicilina en bacterias y el origen de replicación bacteriano *pBR322*.

1.5. Mutantes de *Arabidopsis thaliana*

En la tabla 3 se muestran las diferentes mutantes insercionales de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en esta Tesis Doctoral. En la misma se indican el nombre del genotipo mutante con el gen interrumpido, el ID del germoplasma, el ID del locus interrumpido y la referencia (en los casos en los que existe).

Tabla 3. Líneas mutantes utilizadas

Nombre	ID del germoplasma	ID del locus interrumpido	Locus	Referencia
<i>athb1-1</i>	SALK_123216	At3g01470	AtHB1	
<i>athb1-2</i>	SALK_207381	At3g01470	AtHB1	
<i>pif1-2</i> o <i>pil5-1</i>	SALK_072677	At2g20180	PIF1	Huq y col., 2004
<i>pil5-2</i>	SALK_131872	At2g20180	PIF1	Penfield y col., 2005
<i>pif3-7</i>	CS66042	At1g09530	PIF3	
<i>pif4-2</i>	CS66043	At2g43010	PIF4	Leivar y col., 2008a
<i>pif5-3</i> o <i>pil6-1</i>	CS66044	At3g59060	PIF5/PIL6	Fujimori y col., 2004
<i>pifq</i>	CS66049		PIF1/PIF3/ PIF4/PIF5	Leivar y col., 2008b
<i>athb1-2/pif1-2</i>			AtHB1/PIF1	
<i>upf1-5</i>	SALK_112922	At5g47010	UPF1	Arciga-Reyes y col., 2006
<i>upf3-1</i>	SALK_025175	At1g33980	UPF3	Arciga-Reyes y col., 2006

1.6. Oligonucleótidos

Las siguientes tablas 4 y 5 indican el nombre, la secuencia y los sitios de restricción (cuando los hay) de los oligonucleótidos utilizados en esta Tesis. Los oligonucleótidos utilizados para los clonados se detallan en la tabla 4 mientras que aquellos utilizados para las determinaciones por RT-PCR se describen en la tabla 5.

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para clonado

Los sitios de restricción se encuentran subrayados, mientras que en negrita se resaltan los nucleótidos solapados.

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de Restricción	Construcción
AtHB1 F	5'-gCgg <u>AATTCAT</u> ggAATCCAATTCgTTTTTC-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB1
AtHB1 R	5'-gCgggATCCTAAggCCATCCCCAgAAAg-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB1
AtHB1 ΔCTR R	5'-gCgg <u>TCgACTACTCTTgTTTgCCCTgAAgC</u> -3'	<i>Sall</i>	Clonado de AtHB1 ΔCTR
AtHB1 CTR F	5'-gCgg <u>AATTC</u> CAAgAgACAgCTAATgAACCA-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB1 CTR
AtHB1 Δ259-272 R	5'-gCgggATCCTACgACgTgAAgTggTgggC-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB1 Δ259-272
AtHB1 Δ239-272 R	5'-gCgggATCCTAACTggCgTTgCTgTTgTCT-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB1 Δ239-272
AtHB1 Δ224-272 R	5'-gCgggATCCTAAgAgTCACAgCTgTCTAgT-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB1 Δ224-272
AtHB1 Δ239-253 F	5'- CAACgCCA gTACCACCTCACCGTCgCACgA-3'		Clonado de AtHB1 Δ239-253
AtHB1 Δ239-253 R	5'- gTgAAgTggT ACTggCgTTgCTgTTgTCTT-3'		Clonado de AtHB1 Δ239-253
AtHB1 Δ216-227 F	5'- CgACgCAC CTATCgTACCCATCCAAgACAA-3'		Clonado de AtHB1 Δ216-227
AtHB1 Δ216-227 R	5'- TgggTACgAT aggTgCgTCgTCgTCTAgTA-3'		Clonado de AtHB1 Δ216-227
AtHB1 259-272 F	5'- <u>AATTC</u> CACgATCATCACggTgAATCATTggCTTTCTggggATggCCTTAg-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB1 259-272
AtHB1 259-272 R	5'-g <u>ATCCT</u> AAggCCATCCCCAgAAAgCCAATgATTCACCGTgATgATCgTgg-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB1 259-272
athb1 W269A R	5'-CCCggATCCCTAAggCCATCCCCgCgAAAgCCAAT-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de athb1 W269A
athb1 W271A R	5'-gCCggATCCCTAAggCgCTCCCCAgAAAgC-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de athb1 W271A
athb1 W269A-W271A R	5'-CCCggATCCCTAAggCgCTCCCCgCgAAAgCCAAT-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de athb1 W269A-W271A
athb1 G270A R	5'-gCgggATCCTAAggCCATgCCCgAAAg 3'	<i>BamHI</i>	Clonado de athb1 G270A
athb1 F268A R	5'-gCgggATCCTAAggCCATCCCCAggCAgCCAA-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de athb1 F268A
athb1 E264A F	5'- gATCATCAC ggTgCATCATTggCTT-3'		Clonado de athb1 E264A
athb1 E264A R	5'- AAgCCAATgATgCAC CgTgATgATC-3'		Clonado de athb1 E264A
AtHB7 F	5'-gAATTCgAgATgACAgAAggTggAg-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB7
AtHB7 R	5'-ggATCCTTTCATgACCAAAAAATCCCgC-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB7
AtHB7 ΔCTR R	5'-gCgggATCCTACTgTgTCTTCTTTTgCgTCg-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB7 ΔCTR
AtHB7 Δ230-258 R	5'-ggATCCTATgATgTCAAACAATATCAgC-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB7 Δ230-258
AtHB7 230-258 F	5'-gCggAATTCCTCTgATgATTggAgAggTTTC-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB7 230-258
AtHB12 F	5'-gggAATTCgTgAAAACCATggAAgAAg-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB12
AtHB12 R	5'-gCCggATCCgCTTTTATgACCAAAACTCC-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB12
AtHB12 ΔCTR R	5'-gCCggATCCTTAgTAATCACCATCATTACA-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB12 ΔCTR
AtHB12 Δ227-235 R	5'-ggATCCTAgCTgCTAgATTggTCTAAgA-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB12 Δ227-235
AtHB12 Δ208-235 R	5'-gCgggATCCTAAgATgTCAAACAATATCATC-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB12 Δ208-235

AtHB12 208-235 F	5'-gCggAATTCTCTgAgAATTgggggAggTTTC-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB12 208-235
AtHB13 F	5'-ggCgAATTCATgTCTTgTAATAATggAATgTC-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB13
AtHB13 R	5'-gCCggATCCATTTCAATTgTACTgTTgCTgATC-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB13
AtHB13 ΔCTR R	5'-gCgggATCCTCATgATTCTgTTTgTTCTCTg-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB13 ΔCTR
AtHB13 Δ275-294 R	5'-gCgggATCCTTACATgTTACTgATACTATTCTC-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtHB13 Δ275-294
AtHB13 275-294 F	5'-ggCgAATTCgAAgAgAATAgTATCAgTAAC-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de AtHB13 275-294
athb13 W285A-W287A R	5'-gCggATCCTCAATTgTACTgTTgCTgATCAAgCgCTggCgCAAAACCAgA-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de athb13 W285A-W287A
athb13 D289A R	5'-gCgggATCCTCAATTgTACTgTTgCTgAgCAAgCCA-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de athb13 D289A
athb13 S282P-F284A F	5'-CCATCCTggTgCTTggCCATggC-3'		Clonado de athb13 S282P-F284A
athb13 S282P-F284A R	5'-gCCATggCAAgCACCAggATgg-3'		Clonado de athb13 S282P-F284A
AtTBP2 F	5'-CCgggATCCgAATggCTgATCAAaggAACgg-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtTBP2
AtTBP2 R	5'-gCCgTCgACTTATTgCTggACCTTCCTgAA-3'	<i>SalI</i>	Clonado de AtTBP2
AtTFIIB F	5'-gCgggATCCTCATgTCggATgCgTATTgTA-3'	<i>BamHI</i>	Clonado de AtTFIIB
AtTFIIB R	5'-gCgCTCgAgTCAAgAAACgACTTCAAaggAC-3'	<i>XhoI</i>	Clonado de AtTFIIB
GAL4BD F	5'-gCgTCTAgAgCTTgAAgCAAgCCTCCTgAA-3'	<i>XbaI</i>	Clonado de GAL4 BD-AtHBx
GAL4BD R	5'-gCgTTCgTTTTAAAAACCTAAgAgTCAC-3'		Clonado de GAL4 BD-AtHBx
prGAL1 F	5'-gCgAAgCTTAgAgCCCCATTATCTTAgCCT-3'	<i>HindIII</i>	Clonado de pMC-GAL1:GFP-GUS
prGAL1 R	5'-gCgCTgCagAAggTTTgTggggCCAggTTA-3'	<i>PstI</i>	Clonado de pMC-GAL1:GFP-GUS
35Smin F	5'-TgACgCACAAATCCCCTATC-3'		Clonado de pMC-GAL1:GFP-GUS
GUSNH2 R	5'-TTggggTTTCTACaggAC-3'		Clonado de pMC-GAL1:GFP-GUS
pQE32His F	5'-gCgTCTAgACATTTAAAgAggAgAAATTAAC-3'	<i>XbaI</i>	Clonado de pBI122
pQE32His R	5'-gCgCTCgAgTTAgCTgCaggTCgACCCg-3'	<i>XhoI</i>	Clonado de pBI122
NOS121 F	5'gCgCTCgAggAATTTCCCCgATCgTTCAAA-3'	<i>XhoI</i>	Clonado de pBI122
NOS121 R	5'-gCgCgAATTCCCgATCTAgTAACATA-3'	<i>EcoRI</i>	Clonado de pBI122
promAtHB1 F	5'-gCggTCgACgAAAATAgCTgAATgTgTAAg-3'	<i>SalI</i>	Clonado del promotor de AtHB1
promAtHB1 R	5'-gCgTCTAgAgATCAACAgAAATAAAACAAC-3'	<i>XbaI</i>	Clonado del promotor de AtHB1
del5prAtHB1 F	5'-CgCTCTAgAAgCTAAACTCATTTTCCTTCAAC-3'	<i>XbaI</i>	Clonado del promotor de AtHB1 sin el 5'UTR
AtPIF1 cDNA F	5'-gCgTCTAgAACCATgCATCATTTTTgTCCCTgAC-3'	<i>XbaI</i>	Clonado de AtPIF1
AtPIF1 cDNA R	5'-gCggTCgACTTAACTgTTgTgTgTTTCC-3'	<i>SalI</i>	Clonado de AtPIF1
Salk LBb1.3	5'-ATTTTTgCCgATTTTCggAAC-3'		Genotipado de mutantes SALK
AtHB1 genom F	5'-ggACCCCAgAgAgCTCAgAA-3'		Genotipado de mutantes de <i>AtHB1</i>
AtHB1 genom R	5'-CATgACgATggAgTCgTAGTTA-3'		Genotipado de mutantes de <i>AtHB1</i>
PIF1 genom F	5'-gggTgAAgATgATgATCTTATgg-3'		Genotipado de mutantes de <i>PIF1</i>
PIF1 genom R	5'-AgATCgTCgAAgACCTTgTTg-3'		Genotipado de mutantes de <i>PIF1</i>

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para las determinaciones por RT-PCR

Nombre del Oligonucleótido	Secuencia	Construcción
Actin qF	5'-ggTAACATTgTgCTCAGTggTgg-3'	RT-qPCR para <i>Actinas</i>
Actin qR	5'-AACgACCTTAATCTTCATgCTgC-3'	RT-qPCR para <i>Actinas</i>
GUS qF	5'-TgCggACTTACgTggCAAaggAT-3'	RT-qPCR para <i>GUS</i>
GUS qR	5'-AAgCCgACAgCAgTTTCATCA-3'	RT-qPCR para <i>GUS</i>
GAL4 qF	5'-CgAACAAgCATgCgATATTTgCCgA-3'	RT-qPCR para <i>GAL4 BD</i>
GAL4 qR	5'-TgTgCCCTAgTCAgCggAgACC-3'	RT-qPCR para <i>GAL4 BD</i>
AtHB1 qF	5'-TgCCAAgAAgCTTggTCTAC-3'	RT-qPCR para <i>AtHB1</i>
AtHB1 qR	5'-CATgACgATggAgTCgTAgTTA-3'	RT-qPCR para <i>AtHB1</i>
AtPLP4 qF	5'-gCATCgAAATggggATTgATgTg-3'	RT-qPCR para <i>AtPLP4</i>
AtPLP4 qR	5'-TCggAACgAAgAgCTTgAAAAC-3'	RT-qPCR para <i>AtPLP4</i>
AtXTH26 qF	5'-TCCgAAgTTgTgTggTTCgTCg-3'	RT-qPCR para <i>AtXTH26</i>
AtXTH26 qR	5'-gTTgCCCAGTCTTCTgCgTTCC-3'	RT-qPCR para <i>AtXTH26</i>
AtCYP97B3 qF	5'-TggTCAAaggTCCACCCACTTATg-3'	RT-qPCR para <i>AtCYP97B3</i>
AtCYP97B3 qR	5'-TCCCCTTTgTgTCCTCCgggT-3'	RT-qPCR para <i>AtCYP97B3</i>
AtIRT1 qF	5'-AgTTCACTCggTggTCATTggA-3'	RT-qPCR para <i>AtIRT1</i>
AtIRT1 qR	5'-ACTCAgCCTggAggATACAACCg-3'	RT-qPCR para <i>AtIRT1</i>
AtMRD1 qF	5'-ACAAACCTTAgAAATTCCggCggC-3'	RT-qPCR para <i>AtMRD1</i>
AtMRD1 qR	5'-CTgCTgCCgTCgTCgAgAgT-3'	RT-qPCR para <i>AtMRD1</i>
AtGA4H qF	5'-CgCAgCCCATACAgACTCgACC-3'	RT-qPCR para <i>AtGA4H</i>
AtGA4H qR	5'-ggACCCCACAggTAAgCCATTg-3'	RT-qPCR para <i>AtGA4H</i>
AtERF2 qF	5'-gTTTgAgACggCggAAgATg-3'	RT-qPCR para <i>AtERF2</i>
AtERF2 qR	5'-CgACgACgACgACgAAgAAgAT-3'	RT-qPCR para <i>AtERF2</i>

2. Construcciones genéticas para levaduras

2.1. Construcciones de fusión al dominio de unión a ADN de GAL4

BD-AtHB1: El ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN obtenido de las plántulas descritas en el punto 10.3 fue utilizado como molde para amplificar la secuencia codificante completa de *AtHB1*, utilizando los oligonucleótidos *AtHB1 F* y *AtHB1 R* (tabla 4). El producto de la amplificación fue purificado y posteriormente clonado en los sitios *EcoRI/BamHI*, para obtener la construcción deseada.

BD-AtHB7*, *BD-AtHB12* y *BD-AtHB13: Estas construcciones se generaron amplificando el ADNc completo correspondiente a cada uno de los genes *AtHB7*, *AtHB12* y *AtHB13* a partir de clones previamente obtenidos por la Dra. Delfina A. Ré y el Dr. Agustín L. Arce, usando los pares de oligonucleótidos *AtHB7 F/AtHB7 R*, *AtHB12 F/AtHB12 R* y *AtHB13 F/AtHB13 R*, respectivamente (tabla 4). Luego de purificar los productos deseados, los mismos fueron clonados en los sitios *EcoRI* y *BamHI* del vector *pGBKT7*.

***BD-AtHBx* mutantes**: Las construcciones mutantes *athb1ΔCt*, *BD-AtHB1 Ct*, *BD-athb7ΔCt*, *BD-athb12ΔCt*, *BD-athb13ΔCt*, *BD-athb1Δ259-272*, *BD-athb1Δ239-272*, *BD-athb1Δ224-272*, *BD-AtHB1 259-272*, *BD-athb7Δ229-258*, *BD-AtHB7 229-258*, *BD-athb12Δ227-235*, *BD-athb12Δ208-235*, *BD-AtHB12 208-235*, *BD-athb13Δ275-294*, *BD-AtHB13 275-294*, *BD-athb1 W269A*, *BD-athb1 W271A*, *BD-athb1 W269A-W271A*, *BD-athb1 G270A*, *BD-athb1 F268A*, *BD-athb13 W285A-W287A* y *BD-athb13 D289A* fueron producidas mediante amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos (tabla 4) y las construcciones de cada HD-Zip fusionado al BD de GAL4 como molde. Luego, los productos amplificados fueron clonados en los sitios *EcoRI/SalI* o *EcoRI/BamHI* del vector *pGBKT7*. Para las construcciones *BD-athb1Δ239-253*, *BD-athb1Δ216-227*, *BD-athb1 E264A* y *BD-athb13 S282P-F284A* fueron producidas haciendo uso de la técnica descrita por Higuchi y col. (1988). Básicamente, se amplificaron por PCR dos regiones del ADNc de *AtHB1* y de *AtHB13* cercanas a la región a mutar o a fusionar usando cuatro oligonucleótidos (tabla 4): los dos de los extremos con sitios de restricción que permiten el clonado de la construcción mientras que los centrales (específicos de la zona de fusión o de mutación) con 20 b específicas para el fragmento a amplificar, más 10 b complementarias al fragmento a fusionar, quedando ambos oligonucleótidos solapados por 20 pb. Luego de una primera amplificación, se procedió a la purificación de los fragmentos como se describe en el

punto 6.3. Posteriormente, se realizó una segunda PCR usando como molde 2 µl de ambos productos obtenidos anteriormente y los oligonucleótidos que se hibridan los extremos de la construcción. El producto del tamaño esperado se purificó y finalmente se clonó en los sitios *EcoRI/BamHI* del vector *pGBKT7*.

2.2. Construcciones de fusión al dominio de activación de GAL4

***AD-HA-AtTBP2* y *AD-HA-AtTFIIB*:** Para generar estas construcciones, los ADNc correspondientes a *AtTBP2* (At1g55520) y *AtTFIIB* (At2g41630) fueron amplificados mediante RT-PCR a partir de ARN total de hojas de Arabidopsis, utilizando los pares de oligonucleótidos *AtTBP2 F/AtTBP2 R* y *AtTFIIB F/AtTFIIB R*, respectivamente (tabla 4). Posteriormente, los productos obtenidos fueron purificados y clonados en los sitios *BamHI* y *XhoI* del vector *pGADT7*.

***AD-HA-AtHB1*:** Para generar esta construcción, la secuencia codificante correspondiente fue clonada en los sitios *EcoRI/BamHI* del vector *pGADT7*, a partir del clon *BD-AtHB1*.

3. Construcciones genéticas para plantas

3.1. Construcciones para la expresión constitutiva

***pBI122*:** Con el objeto de expresar en plantas distintas proteínas con una etiqueta de histidinas reconocibles por un anticuerpo específico, se introdujo el His-tag y el sitio de múltiple clonado del vector *pQE32* en el vector *pBI121*, generándose el plásmido denominado *pBI122*. Para ello, se amplificó por PCR el His-tag y el sitio de múltiple clonado a partir del vector *pQE32*, y el terminador *nos* a partir del vector *pBI121*, utilizando los oligonucleótidos *pQE32His F* y *pQE32His R*, y *NOS121 F* y *NOS121 R*, respectivamente (tabla 4). El producto His-tag fue subclonado en los sitios *XbaI/XhoI* del vector *pET15b*, generándose el vector *pET-His*. Dicho plásmido fue posteriormente utilizado para subclonar el terminador *nos* en los sitios *XhoI/EcoRI*, y así generar el vector *pET-His:NOS*. Finalmente, el vector *pBI122* fue construido al digerir el vector *pET-His:NOS* con las enzimas de restricción *XbaI/EcoRI*, y clonar el inserto purificado en el plásmido *pBI121*.

***35S::His-AtHB1*:** Para generar esta construcción, la secuencia codificante correspondiente fue clonada en los sitios *EcoRI/SalI* del vector *pGEX4T3*, a partir del clon *BD-AtHB1*.

Posteriormente, el ADNc de *AtHB1* fue clonado en el sitio *Bam*HI del vector *pBI122*. El sentido de la inserción fue determinado por PCR y por reacciones con enzimas de restricción.

35S::HA-*AtHB1*: La construcción fue generada digiriendo el clon *AD-HA-AtHB1* con las enzimas de restricción *Bgl*II/*Xho*I. El fragmento purificado fue subclonado en los sitios *Bam*HI/*Xho*I del vector *pBluescript SK(-)*, para posteriormente clonar el ADNc en los sitios *Xba*I/*Xho*I del plásmido *pBI122*.

35S::BD-*AtHBx*: Las construcciones *35S::BD-AtHB1*, *35S::BD-AtHB12*, *35S::BD-AtHB13* y sus distintas versiones mutantes fueron generadas amplificando por PCR la secuencia codificante BD-AtHB salvaje o mutante, empleando los oligonucleótidos GAL4BD F y GAL4BD R (tabla 4) y el clon BD-AtHB correspondiente como molde. Los productos obtenidos fueron purificados y clonados en los sitios *Xba*I/*Xho*I (para *AtHB1*) o *Xba*I/*Bam*HI (para *AtHB12* y *AtHB13*) del vector *pBI122*.

pCAMBIA-HisTag: Con el objeto de seleccionar plantas transgénicas utilizando la resistencia a higromicina, se clonó el promotor 35SCaMV, la etiqueta de histidinas y la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa en los sitios *Hind*III/*Eco*RI del vector *pCAMBIA1380*, generándose el plásmido denominado *pCAMBIA-HisTag*. Este último fue utilizado para poder expresar en forma ectópica y constitutiva a *AtPIF1* y *AtHB1*. Para obtener la construcción *35S::AtPIF1*, el ADNc correspondiente a dicho gen fue amplificado mediante RT-PCR a partir de ARN total de semillas de *Arabidopsis* hidratadas durante seis h, utilizando los oligonucleótidos *AtPIF1* cDNA F y *AtPIF1* cDNA R (tabla 4). El producto de amplificación fue purificado y clonado en el vector *pGEM-T Easy* (Promega) para facilitar la determinación de su secuencia, y posteriormente en el vector *pCAMBIA-HisTag* en los sitios *Xba*I/*Sal*I. Por último, la construcción *35S::HA-AtHB1* se generó digiriendo el clon *HA-AtHB1* en *pBluescript SK(-)* con las enzimas de restricción *Xba*I/*Xho*I, y clonando el fragmento purificado en el plásmido *pCAMBIA-HisTag*.

3.2. Construcciones para expresar un gen reportero bajo el control de un promotor específico

PromAtHB1::GUS: Para poder analizar el patrón de expresión de *AtHB1*, se realizó la construcción *PromAtHB1::GUS*. Para ello, se realizó una extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* como se detalla en el punto 6.2. Utilizando como molde el ADN obtenido, se amplificó la región promotora junto con la región 5' no codificante de *AtHB1* usando los

oligonucleótidos promAtHB1 F y promAtHB1 R (tabla 4) y el producto fue clonado en el vector *pGEM-T Easy*, generando el clon *pGEM-prAT1*. Posteriormente, el promotor fue clonado en los sitios *SalI/XbaI* del vector *pENTR3C*, que se utilizó para realizar la recombinación GATEWAY® (como se detalla en el punto 7.3) con el vector de destino *pKGWFS7*. Además, se generó una construcción que sólo contuviera el promotor de *AtHB1* (sin la región 5' no codificante), denominada *PromAtHB1::GFP::GUS*, amplificando dicha secuencia promotora con los oligonucleótidos promAtHB1 F y del5prAtHB1 R (tabla 4) y utilizando como molde el clon *pGEM-prAT1*. El producto de amplificación se purificó y fue clonado en los sitios *SalI/XbaI* del vector *pENTR3C*, y el plásmido obtenido fue utilizado para realizar la recombinación GATEWAY® con el vector de destino *pKGWFS7*.

PromAtHB1-5'UTR::GUS: Además, se generó una construcción que solo contuviera el promotor de *AtHB1* (sin la región 5' no codificante), denominada *PromAtHB1-5'UTR::GUS*, amplificando la secuencia promotora con los oligonucleótidos promAtHB1 F y del5prAtHB1 R (tabla 4) y utilizando como molde el clon *pGEM-prAT1*. El producto de amplificación se purificó y fue clonado en los sitios *SalI/XbaI* del vector *pENTR3C*, y el plásmido obtenido fue utilizado para realizar la recombinación GATEWAY® con el vector de destino *pKGWFS7*.

pMC::GAL1:GFP::GUS: Para poder expresar un gen reportero bajo el control de un promotor con secuencias reguladoras reconocidas por el dominio de unión a ADN de GAL4, se construyó el plásmido denominado *pMC::GAL1:GFP::GUS*. Para ello, un fragmento del promotor de *GAL1* que posee elementos en *cis* reconocidos por GAL4 fue amplificado a partir de ADN genómico de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* AH109), utilizando los oligonucleótidos prGAL1 F y prGAL1 R (tabla 4). El producto purificado se clonó en los sitios *HindIII/PstI* del vector *pBluescript SK(-)*, generándose el plásmido *pBS-prGAL1*. Por otro lado, la caja TATA del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor fue amplificada por PCR a partir del vector *pBI121*, utilizando los oligonucleótidos 35Smin F y GUSNH2 R (tabla 4), y el producto fue clonado en el vector *pGEM-T Easy*. Posteriormente, la caja TATA fue subclonada en los sitios *PstI/XbaI* del vector *pBS-prGAL1* obtenido previamente. Finalmente, la región promotora artificial generada fue clonada en el vector *pENTR3C*, y el plásmido obtenido fue utilizado para realizar la recombinación GATEWAY® con el vector de destino *pKGWFS7*.

4. Construcciones genéticas para la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* BL21 Codon Plus

GST-AtHB7 y *GST-AtHB13*: Para generar los clones *GST-AtHB7* y *GST-AtHB13*, las secuencias codificantes completas de los ADNc correspondientes fueron clonadas en los sitios *EcoRI* y *XhoI* del vector *pGEX4T1* (Amersham Bioscience), a partir de los clones *BD-AtHB7* y *BD-AtHB13*, respectivamente.

GST-AtHB1: Esta construcción se generó a partir del clon *BD-AtHB1*. El ADNc completo fue subclonado en los sitios *EcoRI* y *SalI* del vector *pGEX4T3*, para luego ser digerido con *BamHI* y clonado en el mismo sitio del vector *pGEX3X*. El sentido de la inserción fue determinado por PCR y por reacciones con enzimas de restricción.

La figura MyM-1 muestra un esquema resumido de los vectores usados en esta Tesis doctoral.



Figura MyM-1. Representación esquemática (no a escala) de los vectores utilizados

CaMV 35S, 35S del virus del mosaico de la coliflor; AD GAL4, dominio de activación de GAL4; ADH, alcohol deshidrogenasa; Amp^R, resistencia a ampicilina; attR, sitio de recombinación R; *ccdB*, gen letal; c-Myc Epitope Tag, etiqueta de c-Myc; GAL4 BD, dominio de unión al ADN de GAL4; GFP, proteína fluorescente verde; GUS, β -glucuronidasa; HA Epitope Tag, etiqueta de hemoaglutinina; His tag, etiqueta de polihistidina; HPTII, resistencia a higromicina en plantas; Kana^R, resistencia a kanamicina; LB, borde izquierdo T; LEU2, auxotrofia a leucina; MCS, sitio de múltiple clonado; NLS, señal de localización nuclear; NOS, nopalina sintetasa; *nptII*, resistencia a kanamicina en plantas; ORI, origen de replicación; RB, borde derecho T; Sm/St^R, resistencia a estreptomycin/espectinomycin; TRP1, auxotrofia a triptófano.

5. Transformación de bacterias y de levaduras

5.1. Transformación de células de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación

La preparación de células competentes de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, y las condiciones de electroporación utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante del equipo (*Gene Pulser™*, Bio-Rad Laboratorios Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) aplicando una diferencia de potencial de 2,5 kV. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubó la suspensión durante 1 h a 37 °C para *E. coli* y 1 h 30 min a 28 °C para *A. tumefaciens*. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 200 μ l de medio y se sembró sobre LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes en placas de Petri. Estas placas se incubaron a 37 °C o a 28 °C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 16 y 48 h para *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente).

5.2. Obtención de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*

La preparación de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* fue realizada siguiendo las instrucciones brindadas por el fabricante (Clontech®). Para ello, se realizó un estriado de las cepas Y187 y/o AH109 en placas de Petri con YPDA sólido, y se las incubó por 72 h a 28 – 30 °C. Se inoculó una colonia (de un diámetro de 2 – 3 cm) en 3 ml de YPDA, y se dejó crecer durante 8 h a 28 – 30 °C con una agitación de 230 – 250 rpm. Luego, 5 μ l de dicho cultivo fueron transferidos a un Erlenmeyer conteniendo 50 ml de YPDA, y las células se incubaron durante 16 – 20 h a 28 – 30 °C con agitación. Cuando se alcanzó una $DO_{600} = 0,15 - 0,3$, se centrifugó el cultivo a 700 x g durante 5 min a temperatura ambiente, resuspendiendo las levaduras en 100 ml de YPDA. Transcurridas 3 – 5 h de incubación ($DO_{600} = 0,4 - 0,5$), el cultivo se centrifugó a 700

x g durante 5 min a temperatura ambiente, y las células se resuspendieron en 60 ml de agua desionizada estéril. Este paso se repitió y las células fueron resuspendidas finalmente en 3 ml de solución TE/LiAc 1.1 x, para posteriormente alicuotar el volumen en dos tubos Eppendorf de 1,5 ml. La suspensión celular se centrifugó a 13000 rpm durante 15 s, y las células competentes fueron resuspendidas en 600 µl de solución TE/LiAc 1.1 x.

5.3. Transformación y selección de *Saccharomyces cerevisiae*

La transformación de levaduras fue llevada a cabo utilizando la modificación del método de acetato de litio (Gietz y col., 1992).

En un tubo Eppendorf se pusieron 0,5 µl del vector *pGBKT7* o *pGADT7* con una concentración de 500 µg/ml, 50 µl de células competentes de la cepa correspondiente, 500 µl de solución PEG/LiAc y 5 µl de ADN de esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/ml). La mezcla se incubó a 28 - 30 °C durante 30 min, mezclando por *vortex* cada 10 min. Transcurrido este tiempo, se agregaron 20 µl de DMSO, se mezcló y el tubo se dispuso en un baño de agua a 42 °C por 15 min, mezclando cada 5 min. Luego de una centrifugación a 13000 rpm durante 15 s, las células se resuspendieron en 1 ml de YPDA, y se incubaron por 90 min a 28 – 30 °C. El cultivo se centrifugó a 13000 rpm por 15 s, y las células se resuspendieron en 1 ml de solución de NaCl 0,9 %. Posteriormente, se esparcieron 150 µl de esta suspensión en una placa con el medio selectivo correspondiente, y se las incubó a 28 – 30 °C hasta la aparición de colonias (entre 3 – 5 días).

6. Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos

6.1. Minipreparación de ADN plasmídico

Para la preparación de ADN plasmídico a partir de células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó el método de lisis alcalina, descrito por Bimboin y Doly (1979). Las células transformadas de *E. coli* se cultivaron a 37 °C con agitación y hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente; mientras que las células transformadas de *A. tumefaciens* se cultivaron a 28 °C, con agitación hasta saturación en medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/ml, estreptomycin 50 µg/ml y rifampicina 50 µg/ml. Luego se tomaron 1,5 ml de cada cultivo y se centrifugaron durante 5 min a 5000 rpm. Cada sedimento celular se resuspendió en 100 µl de Solución I y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregaron

200 µl de Solución II, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min en hielo. Se prosiguió con la preparación, agregando 150 µl de Solución III y la mezcla se incubó nuevamente 5 min en hielo, antes de ser centrifugada durante 15 min a 12000 rpm y 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se le practicó una extracción fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y se centrifugó 10 min a 8000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN plasmídico mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó 60 min a -20 °C y se centrifugó 15 min a 12000 rpm y a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol 70 % (v/v) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN plasmídico fue resuspendido en 30-50 µl de agua destilada estéril.

6.2. Minipreparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*

Para analizar la presencia de los transgenes en las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas, se realizaron preparaciones de ADN genómico empleando un método rápido descrito por Li y Chory (1998) con algunas modificaciones. Se cortó una hoja joven y se colocó en un tubo, para ser macerada durante 15 s. Luego se agregaron 700 µl de solución de extracción de ADN genómico, se agitó vigorosamente durante 15 s, se dejó reposar en hielo, y se realizó una extracción con 700 µl de la mezcla fenol:cloroformo 1:1 (v/v). Luego de centrifugar 10 min a 12000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se hizo otra extracción sólo con cloroformo (1 volumen). Posteriormente, se centrifugó 10 min a 12000 rpm, y se precipitó el ADN agregando al sobrenadante 1 volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2), para luego incubar 1 h a -20 °C. La mezcla alcohólica se centrifugó 20 min a 12000 rpm, el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 % (v/v) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente el ADN genómico se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.

6.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de fragmentos de ADN se realizó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (Promega), empleándose solución TAE 1 x tanto para la preparación del gel como para la solución de corrida. Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos esperados se escindieron utilizando un bisturí estéril y se incubaron con 2 volúmenes de agua milliQ en un baño de agua a 65 °C hasta observar la completa disolución de la agarosa. Posteriormente, se llevaron a cabo 2 extracciones sucesivas con

1 volumen de fenol y a continuación una extracción con cloroformo, todas seguidas de una centrifugación de 10 min a 10.000 rpm a temperatura ambiente, a fin de separar las fases. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1/10 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2) y 1 volumen de isopropanol. Para facilitar la precipitación de fragmentos de muy bajo peso molecular o que se encontraban en baja cantidad, se adicionaron 2,5 µg de ARNt (Sigma) a la solución alcohólica. Tras la precipitación y su posterior lavado con etanol 70 %, el fragmento purificado fue solubilizado en 12 µl de H₂O milliQ estéril.

En los casos en los que fue preciso obtener ADN de alta calidad a partir de geles de agarosa, se empleó el equipo comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

La purificación de los vectores binarios y de clonado, después del corte con enzimas de restricción, fue realizada directamente por precipitación etanólica para evitar el daño mecánico.

6.4. Extracción y purificación de ARN total

Las extracciones de ARN fueron realizadas con un reactivo simil Trizol (Invitrogen™) preparado en el laboratorio, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para estas extracciones, se pulverizaron 50 – 100 µg de tejido vegetal con N₂ líquido en un mortero estéril, y luego se transfirió el polvo fino a un tubo de tipo Eppendorf en el cual se agregó 1 ml del reactivo de extracción. Tras mezclar varias veces por inversión, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min antes de agregar 200 µl de cloroformo y centrifugar por 15 min a 12000 rpm a 4 °C. La fase acuosa se precipitó posteriormente con 1 volumen de isopropanol, incubando 30 min a -20 °C. Tras un lavado con etanol 70 % v/v y secado, el precipitado se resuspendió en 30 µl de agua milliQ estéril. La integridad del ARN extraído se corroboró por electroforesis en condiciones desnaturalizantes, como se detalla en el punto 8.2.

6.5. Cuantificación de ácidos nucleicos

La calidad y cantidad del ADN y del ARN fueron evaluadas con el equipo Nanodrop NanoPhotometer™ (IMPLEN) midiendo la absorbancia a 260 nm (Sambrook y col., 1989), en el que un valor de A₂₆₀ de 1 corresponde, aproximadamente, a 40 mg/ml de ARN, a 50 mg/ml de ADN doble hebra o a 37 mg/ml de ADN simple hebra. Para cada medición se utilizó un

volumen de 3 µl por muestra. La posible contaminación por proteínas fue determinada mediante el cociente A_{260}/A_{280} , y la de carbohidratos y compuestos fenólicos mediante el cociente A_{260}/A_{230} . El valor para dichas relaciones cuando las muestras presentan una calidad aceptable debe estar comprendido entre 1,8 y 2.

7. Reacciones enzimáticas

7.1. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

Las digestiones de fragmentos de ADN se realizaron con las enzimas de restricción y las soluciones reguladoras correspondientes, según las condiciones recomendadas por los fabricantes. En todos los casos fueron utilizadas de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

7.2. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10 µl empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera 5:1. La incubación se realizó durante toda una noche a 4 °C.

7.3. Reacción de recombinación GATEWAY®

La recombinación *in vitro* de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 µl de GATEWAY® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen™), 1 µl del vector Destination (150 ng/µl), 1 µl de buffer TE pH 8, y 2 µl del vector Entry (150 ng/µl). La incubación se realizó durante tres h a temperatura ambiente, y los 5 µl fueron utilizados para transformar células competentes.

7.4. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las reacciones de análisis utilizando como molde ADN plasmídico o ADN genómico vegetal los volúmenes de reacción fueron de 25 µl. En todos los casos se utilizó la solución reguladora de pH provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes

reactivos: $MgCl_2$ 2 mM; dNTP 0,2 mM de cada uno y dos oligonucleótidos específicos (0,4 μ M cada uno). Posteriormente, a esta mezcla de reacción se le añadieron entre 6 y 10 ng de ADN molde y la enzima *Taq* ADN polimerasa o *Pfu* ADN polimerasa (PB-L, Universidad de Quilmes, Bs. As.), en una concentración de 1,5 U de enzima por reacción. Finalmente se procedió a la reacción de amplificación.

Estas reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *PTC-100° Peltier Thermal Cycler* (MJ Research), y en general se utilizó el siguiente programa, en el que la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo: $T_a = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5^\circ C$.

Programa: (1 minutos a 94 °C, 1 minuto a T_a , 1-2 minutos a 72 °C*) 30 ciclos + 10 minutos a 72 °C.

* El tiempo de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. En el caso de *Taq* ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 min por cada 1000 pb a amplificar. Cuando la polimerasa utilizada fue *Pfu* (presenta un mecanismo de prueba de error) el tiempo fue de 1 min por cada 600 pb.

Cuando se trabajó con ADN genómico como molde, se realizó una desnaturalización previa a 94 °C durante 5 min.

8. Análisis de ácidos nucleicos

8.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para el análisis de fragmentos de ADN en geles de agarosa se utilizó el sistema de tipo submarino (Ausubel y col., 1987). La concentración de agarosa varió entre 1,5 y 0,7 % (P/V), dependiendo del tamaño del fragmento analizado. Los geles fueron preparados en solución TAE 1 x con una concentración de bromuro de etidio 0,3 μ g/ml y la muestra, antes de ser sembrada, fue mezclada con solución de siembra en una relación 1/10 (v/v).

La separación electroforética se realizó en solución TAE 1 x, a voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. La visualización del ADN en el gel se llevó a cabo mediante un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA.

En todos los casos en los que fue necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados electroforéticamente, se empleó como marcador una muestra de ADN del bacteriofago

λ , digerido previamente con la enzima *Hind* III. Esta digestión genera fragmentos de ADN de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

8.2. Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes

La separación electroforética de moléculas de ARN se realizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. La concentración de agarosa utilizada fue de 1 % (p/v) y los geles fueron preparados en solución HEPES 1 x y formaldehído 6 %. Antes de la corrida electroforética, a cada muestra (entre 5 y 10 μ g de ARN total) se le agregaron 3 volúmenes de solución de desnaturalización y la mezcla se incubó 5 min a 65 °C. Después del calentamiento, se agregó 1/10 volúmenes de solución de siembra y 0,5 μ l de bromuro de etidio 10 mg/ml. La separación electroforética se llevó a cabo en solución HEPES 1 x, empleando un voltaje constante de 3 V por cm de gel. La visualización del ARN se realizó en un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA.

8.3. Transcripción reversa de ARN total

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo cursando el siguiente protocolo en dos etapas: 1. En un volumen final de 10 μ l, se colocó 1 μ g de ARN con oligonucleótidos poli-dTV 0,1 μ M (poli-dTV consiste en 1 nucleótido variable, ubicado en el extremo 5', seguido de 24 nucleótidos de timina). Esta mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C, para luego ser colocada inmediatamente en hielo (este tratamiento permite desarmar las estructuras secundarias del ARN). Terminado este proceso, se le adicionaron a la mezcla 6 μ l de solución amortiguadora de la enzima, 2 μ l de dNTP (20 mM), 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y se completó el volumen hasta 30 μ l con agua milliQ estéril. Dicha mezcla se incubó 1,5 h a 42 °C y luego se procedió a inactivar la enzima calentando la reacción 5 min a 80 °C más 30 s adicionales a 94 °C.

8.4. Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real fue llevada a cabo usando un termociclador PTC-200™ (MJ Research, Inc.) que tiene acoplado un detector de fluorescencia Cromos 4 (MJ Research, Inc.). Las reacciones se realizaron en volúmenes finales de 20 μ l que contenían: 2,5 μ l SyBr green

1 x; 0,1 µl dNTP (20 mM); 0,4 µl de cada oligonucleótido específico (20 pmol/µl); 3 mM MgCl₂; 10 µl de una dilución 1/50 del producto de la transcripción reversa previamente descrita; y 0,05 µl Taq Platinum (Invitrogen™). La fluorescencia emitida se registró en forma continua durante 40 ciclos. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la tabla 5.

Los niveles de expresión de los genes *ACTINA2* y *ACTINA8* de *Arabidopsis thaliana* se utilizaron para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés ya que han sido evaluados previamente como genes normalizadores (Charrier y col., 2002), de acuerdo al método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001). Todas las cuantificaciones fueron realizadas con triplicados biológicos y repetidas al menos tres veces. Las diferencias obtenidas se consideraron significativas para un valor *p* inferior a 0,05 (Prueba *t* de Student). Los valores de cuantificación se expresaron en forma relativa a un control al cual le fue asignado arbitrariamente el valor uno (1).

8.5. Análisis del transcriptoma por RNA-Seq

Se realizaron extracciones de ARN total a partir de plántulas salvajes y mutantes *athb1-1* crecidas en condiciones de día corto durante cuatro días utilizando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), como sugiere el fabricante. Diez µg por muestra fueron enviados a la plataforma de Genome Technology Access Center en la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington, donde los ARN mensajeros fueron purificados utilizando Dynal mRNA Direct kit (Lifetechnology). Posteriormente, estos ARN fueron fragmentados y sometidos a transcripción reversa para obtener ADNc doble hebra, para lo cual se utilizaron oligonucleótidos aleatorios. Luego, se les adicionaron los adaptadores y los ADNc fueron secuenciados en un equipo HiSeq 2500. Los archivos fastQ fueron alineados con el último ensamblaje del genoma de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 (TAIR10; liberado en junio de 2009) mediante TopHat versión 2.0.8, usando Bowtie2 versión 2.1.0.

Una vez cuantificados los transcriptos totales para cada réplica de los dos genotipos analizados, las lecturas fueron sometidas a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para identificar aquellos genes regulados diferencialmente. De aquellos que presentaron un valor *p* inferior a 0,05 sólo se continuó el estudio con los que se encontraban inducidos o reprimidos dos

veces o más en la mutante *athb1-1* con respecto a su par salvaje. Finalmente, de estos últimos genes obtenidos se analizaron los que presentaron en promedio más de 10 lecturas.

8.6. Determinación de la secuencia de moléculas de ADN

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio de MacroGen Sequencing System en Seúl, Corea. Para usar este servicio se enviaron 10 µl de cada plásmido 100 ng/µl y 10 µl de un oligonucleótido específico (5 µM), esto último cuando la construcción no permitía la realización de la secuencia con oligonucleótidos universales. Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas nos fueron enviados en forma electrónica.

8.7. Análisis de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas, se analizaron con programas informáticos. Para las búsquedas de homología, se consultaron las bases de datos del EMBL, Gene Bank y SWISS PROT, utilizando el programa BLAST (Altschul y col., 1997) a través del servidor *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El alineamiento de las secuencias proteicas se realizó utilizando la versión *on-line* del programa MAFFT mediante el algoritmo L-INS-i (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>; Katoh y Toh, 2008) o PRALINE con los parámetros predeterminados (Simossis y Heringa, 2005). Las reconstrucciones filogenéticas se armaron empleando el programa PhyML 3.0 que utiliza un algoritmo basado en máxima verosimilitud o *maximun likelihood* (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>; Guindon y Gascuel, 2003), utilizando como modelo de sustitución al JTT. Por último, los distintos dominios presentes en los FTs fueron encontrados por homología con los descriptos para otras proteínas, mediante la base de datos del Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>; Finn y col., 2008).

8.8. Identificación de los motivos AHA en las regiones carboxilo terminal

Para poder definir los motivos AHA presentes en AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13, se realizó una comparación entre las secuencias proteicas de factores de transcripción HD-Zip I provenientes de diferentes especies vegetales que presentaran un CTR similar. Estas secuencias fueron obtenidas mediante un análisis básico de alineamiento de secuencias proteicas (blastp)

utilizando la secuencia completa de AtHB12, AtHB1 y AtHB13 (representantes de los grupos I, III y V, respectivamente; Arce y col., 2011) contra la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; se utilizaron los parámetros predefinidos, el 30 de junio de 2013; Altschul y col., 1990). Cada conjunto de secuencias obtenidas fue alineado utilizando el programa MAFFT (materiales y métodos punto 8.7), y los alineamientos se inspeccionaron manualmente para descartar secuencias con CTR cortos o claramente divergentes. Luego de este filtro, se analizaron un total de 37 secuencias para AtHB12 y AtHB7, 35 para AtHB1, y 95 para AtHB13.

Los *sequence logos* que se muestran fueron generados con el programa Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>; Crooks y col., 2004), utilizando los alineamientos previamente obtenidos. Además, se utilizó el programa MEME para identificar motivos putativos dentro de las regiones carboxilo-terminales de las proteínas (<http://meme.ncbr.net/>; Bailey y col., 2009).

9. Material vegetal y condiciones de cultivo

9.1. Cultivo de plantas

El cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana benthamiana* se realizó en una cámara de cultivo, con iluminación y temperatura controladas (16 h de luz a 24 °C y 8 h de oscuridad a 21 °C). Las condiciones de iluminación requeridas (120 $\mu\text{E}/\text{m}^2$) fueron obtenidas en forma artificial manteniendo las plantas bajo 6 tubos fluorescentes, intercalando tubos de luz blanca y tubos GroLux (Sylvania) ubicados en forma adyacente.

Para los ensayos de plántulas en placa, las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron desinfectadas y sembradas en placas de Petri con medio de cultivo MS agar. Luego de la ruptura de la dormancia durante 3 días en oscuridad a 4 °C, las placas se colocaron en la cámara de cultivo y se las cultivo durante el tiempo necesario en condiciones de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad) u oscuridad total.

9.2. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

El método que se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* fue el de inmersión (*Floral Dip*), descrito por Clough y Bent (1998).

Se prepararon 8 macetas de 10 cm de diámetro con vermiculita:perlita:turba (1:1:1 v/v), y una capa superior de tierra. Se sembraron entre 5 y 10 semillas por maceta, se colocaron en una bandeja con solución Hoagland 0.5 x y se cubrieron con papel de nylon transparente. Las plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo, con condiciones de luz y temperatura controladas. Luego de una semana, cuando se observó la aparición del primer par de hojas, se retiró el papel de nylon.

Las plantas se cultivaron, aproximadamente cuatro semanas, hasta la floración y cuando los pedúnculos florales estaban emergiendo, se cortaron las inflorescencias sin dañar las hojas caulinares. Dos o tres días después del corte, surgieron nuevas inflorescencias de las yemas laterales; las cuales volvieron a cortarse. Esta operación se repitió dos o tres veces más, hasta que en todas las inflorescencias existieran al menos cuatro flores no abiertas. La transformación se realizó dos días después del último corte.

Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con la construcción adecuada en el vector pBI121, en 10 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml, estreptomicina 50 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml o espectinomicina 50 µg/ml; durante 24 h a 28 °C, con agitación. Este cultivo se utilizó para inocular 300 ml del mismo medio y se dejó crecer hasta que alcanzó la fase estacionaria, entre 12 y 16 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 4500 g durante 20 min y los sedimentos celulares se resuspendieron en 800 ml de solución de sacarosa al 5 % conteniendo 300 µl del detergente *Silwet L-77* (OSI Specialties, Inc.). Las plantas se sumergieron 60 s en esta solución, evitando que el líquido entrara en contacto con la tierra. Luego, las macetas se colocaron en posición horizontal dentro de una bandeja, se taparon con papel de nylon y se trasladaron a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se retiró el papel de nylon y las macetas se ubicaron en posición normal. Se regaron por sub-irrigación y las plantas se dejaron crecer hasta que las semillas estuvieran maduras, entre 4 y 5 semanas.

Finalmente, se recolectaron las semillas de cada maceta por separado, se limpiaron manualmente de los restos de vainas y tierra y se conservaron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

9.3. Selección de transformantes de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas recolectadas del experimento de transformación fueron esterilizadas mediante un lavado en etanol 70 % (v/v) durante 5 min, un lavado en lavandina 10 % durante 20 – 30 min y tres enjuagues con agua destilada estéril. Luego se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS suplementado con kanamicina 25 µg/ml o higromicina 25 µg/ml.

Para el caso de la selección con kanamicina, en los primeros días en la cámara de cultivo, la mayoría de las semillas germinaron (95 – 99 %). Aproximadamente a los 10 días, los cotiledones de las plantas sensibles se tornaron amarillos, mientras que los de las transformantes permanecieron verdes. Las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante siete días más, hasta observar que las plantas transformadas desarrollaban hojas verdaderas, mientras que las no transformadas perecían.

Para el caso de la selección con higromicina, se siguió el protocolo propuesto por Harrison y col. (2006). Luego de un período de estratificación de 72 h, las semillas fueron expuestas a la luz durante 6 h para favorecer la germinación, y, posteriormente, las placas se mantuvieron en oscuridad total en la cámara de cultivo durante tres días. Las plantas transformadas se pudieron distinguir de las sensibles al antibiótico debido a que las transformantes elongaron el hipocotilo. Las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante siete días más, hasta observar que los cotiledones se tornaron verdes.

Las plantas transformadas se pasaron a macetas con vermiculita:perlita:turba (1:1:1 v/v) con una capa superior de tierra regadas con solución Hoagland 0.5 x, y así se cultivaron hasta que las vainas estuvieron maduras. Luego se embolsó en sobres de papel cada planta en forma individual para recolectar las semillas y conservarlas a 4 °C, hasta el momento de su análisis.

9.4. Identificación de las líneas transformantes de *Arabidopsis thaliana*

A las plantas F1 de cada construcción que habían sido seleccionadas por su resistencia al antibiótico correspondiente, se les realizó una extracción de ADN genómico a partir de una hoja de la roseta. Con el producto de esta extracción se hizo una reacción de PCR, empleando los oligonucleótidos y las condiciones de reacción de acuerdo a la construcción correspondiente. Con las líneas que dieron resultados positivos, se procedió a obtener plantas homocigotas.

9.5. Obtención de líneas homocigotas de *Arabidopsis thaliana*

Para la obtención de plantas homocigotas, se partió de las plantas transformantes identificadas en el análisis por PCR descrito en el punto 7.4. En primer lugar, se cosecharon las semillas de cada planta F1 en forma independiente y se sembraron alrededor de 20 líneas en placas de Petri, para ser seleccionadas como se detalla en el punto 9.4. Cada una de las plantas provenientes de un evento de transformación independiente, hermanas entre sí, se transplantó nuevamente a tierra y se las cosechó.

La siembra en placas de Petri en medio selectivo, pasaje a tierra y cosecha de semillas se repitió sucesivamente, y aquellas sub-líneas en las que todas las plantas presentaron resistencia al antibiótico correspondiente fueron consideradas homocigotas. Así se obtuvieron al menos tres líneas de plantas homocigotas para cada construcción.

9.6. Transformación transitoria de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Se transformaron plántulas germinadas durante 5 días en medio MS 0.25 x suplementado con sacarosa 1 %, de acuerdo al método de transformación FAST descrito por Li y col. (2009). Las bacterias *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 previamente transformadas con las construcciones correspondientes se crecieron hasta saturación en medio LB con los antibióticos correspondientes, y se utilizó dicho cultivo para repicar en 10 ml de medio YEB. Una vez alcanzada una DO₆₀₀ de 1.5, los cultivos se centrifugaron a 2000 g durante 10 min, se lavaron con 10 ml de la solución de lavado FAST, para posteriormente resuspenderlos en la misma solución. El medio de transformación fue preparado con MS 0.25 x, sacarosa 1 %, acetosyringona 100 µM, *Silwet L-77* 0.0025 % y el cultivo bacteriano con una DO₆₀₀ final de 0.5. Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* fueron infectadas con la mezcla de transformación en oscuridad durante 40 h. Luego, las plántulas fueron lavadas una vez con lavandina al 1 %, tres veces con agua destilada y finalmente se las congeló utilizando nitrógeno líquido para la extracción de ARN posterior (como se detalla en el punto 6.4) y análisis.

9.7. Transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana*

Se utilizaron plantas de tabaco crecidas en macetas durante 25 días para transformar sus hojas. Se aplicó la técnica que utiliza *Agrobacterium tumefaciens* e infiltración con jeringa (adaptado de

de Felippes y Weigel, 2012). Las bacterias se crecieron con agitación constante en medio LB a 28 °C conteniendo el plásmido binario con la construcción genética correspondiente. Al llegar a saturación, las células se centrifugaron a 2000 g por 10 min y se resuspendieron en medio de infiltración de tabaco. Se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente durante 3 h, luego se les midió la DO₆₀₀ y se las diluyó en medio de infiltración de *Nicotiana* hasta llegar a una DO₆₀₀ de 0,4. En todos los casos se agregó al mismo tubo una suspensión de *A. tumefaciens* transformada con un vector que permite la expresión de la proteína p19 a una DO₆₀₀ final de 0.05. p19 es una proteína supresora del silenciamiento mediado por ARNs pequeños, ya que captura ARNs de 21-25 nucleótidos, inhibiendo su función (Canto y col., 2006; Westhof, 2004). Esta suspensión bacteriana se utilizó para transformar las hojas de *N. benthamiana* en la cara abaxial mediante la ayuda de una jeringa plástica de 5 ml. Luego de 48 h, se cortaron discos de las hojas infiltradas y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

10. Análisis de plantas de *Arabidopsis thaliana*

10.1. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa

Las plantas de *A. thaliana* transformadas con la construcción *PromAtHB1:GFP-GUS* que resultaron resistentes al antibiótico kanamicina en la selección del punto 9.5 y en las cuales se puso en evidencia la presencia del transgén correspondiente por PCR, se sometieron a pruebas histoquímicas de actividad β -glucuronidasa.

Para ello, las plántulas se transfirieron a una solución Na₂HPO₄ 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1 %, X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-inolil β -D-glucurónido) 2 mM, se sometieron a vacío durante 5 min y se incubaron a 37 °C en luz durante 3 h. Luego de la incubación se fijaron en una solución de formaldehído 10 % v/v, etanol 20 % v/v y ácido acético 5 % v/v durante 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador, se agregó etanol 70 % para decolorar los tejidos y se guardaron en solución etanólica a 4 °C hasta ser fotografiadas. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara Coolpix 995 digital Nikon sobre microscopio óptico y lupa.

El análisis histoquímico se realizó con plántulas de 4, 10 y 14 días, crecidas en placas de Petri con medio MS-agar y con plantas de 28 y 35 días germinadas en maceta.

10.2. Tratamiento osmótico de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Para poder aislar la región codificante de *AtHBI*, las plántulas fueron cultivadas en medio MS agar durante 14 días, como se detalla en el punto 9.1, y se las traspasó a MS líquido (5 ml en cubetas de 35 mm de diámetro) suplementado con manitol 300 mM durante 24 h. Luego, se aisló el ARN total como se detalla en el punto 6.4.

10.3. Tratamiento con cicloheximida de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Para poder inhibir la traducción, las plántulas fueron cultivadas en medio MS agar durante 14 días, como se detalla en el punto 9.1, y se las traspasó a MS líquido (5 ml en cubetas de 35 mm de diámetro) suplementado con cicloheximida 20 μ M, y se sometieron a vacío durante 5 min. Luego de una incubación de 5 h, se aisló el ARN total como se detalla en el punto 6.4.

10.4. Medición de la longitud de los hipocotilos en plántulas

La longitud de los hipocotilos de los distintos genotipos de *Arabidopsis thaliana* fue medida siguiendo las recomendaciones de Fankhauser y Casal (2004). Luego del tiempo de crecimiento indicado, al menos 25 plántulas por placa de cada genotipo fueron depositadas horizontalmente sobre una lámina de acetato, y escaneadas utilizando una resolución de 1200 puntos por pulgada. La longitud de los hipocotilos fue cuantificada haciendo uso del software ImageJ. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, y repetidos al menos tres veces con distintos conjuntos de semillas. La significancia estadística de las diferencias entre los valores medios obtenidos fue analizada utilizando el lenguaje estadístico R (R Development Core Team, 2011).

10.5. Tratamiento con etileno de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas fueron sembradas en placas de Petri con medio MS agar suplementado con el precursor de etileno ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) 1 y 10 μ M. Después de cinco días de cultivo, se midió la longitud de los hipocotilos, como se detalla en el punto 10.4, o se aisló el ARN total, como se detalla en el punto 6.4.

11. Células de *Saccharomyces cerevisiae*

11.1. Ensayo para la inhibición del crecimiento de levaduras transformadas que expresan HIS3

Las células de levaduras transformadas AH109 con el vector *pGBKT7* fueron repicadas en cubetas de 35 mm de diámetro, con 5 ml de medio SD –His sin suplementar o suplementado con 0,5 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM y 15 mM de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), concentraciones recomendadas por el proveedor (Clontech). Luego, se incubaron por tres días a 28 – 30 °C y se observó el crecimiento de colonias de levaduras.

11.2. Ensayos con filtros de la actividad β -galactosidasa

Se repicaron levaduras AH109 transformadas con el vector *pGBKT7* en medio SD –Trp sólido, y se las incubó durante 2 – 3 días a 28 – 30 °C. Transcurrido este tiempo, se dispuso un papel Whatman No. 5 seco sobre las levaduras para que las colonias se adhirieran al mismo. Cuando el papel se humedeció, se lo retiró cuidadosamente y se lo sumergió en nitrógeno líquido por 10 s (con las colonias hacia arriba). Mientras se esperaba que el filtro se descongele a temperatura ambiente, se apoyó otro papel Whatman No. 5 estéril sobre un placa de Petri que contenía 10 ml de solución Z/X-Gal. Posteriormente, este filtro remojado fue traspasado a otra placa vacía, y se le apoyó encima el papel descongelado (con las levaduras hacia arriba), intentando evitar la formación de burbujas. Por último, los filtros se incubaron a 28 – 30 °C y se controlaron periódicamente hasta la aparición de colonias azules.

11.3. Ensayos de cuantificación de la actividad β -galactosidasa

Se repicaron levaduras AH109 transformadas con las construcciones en el vector *pGBKT7* en medio SD –Trp sólido, o levaduras Y187 co-transformadas con las construcciones en los vectores *pGADT7* y *pGBKT7* en medio SD –Leu –Trp, y se las incubó durante 2 – 3 días a 28 – 30 °C. Transcurrido este tiempo, se tomó una colonia de cada construcción, se las repicó en 2 ml de medio selectivo líquido, se mezcló con *vortex* por 15 s para dispersar las células y se las incubó toda la noche a 30 °C con agitación de 230 rpm. Al día siguiente, se traspasaron entre 500 – 800 μ l de cada cultivo (de acuerdo a la saturación de los mismos) a 8 ml de medio YPD líquido, y se agregó la cantidad suficiente de medio selectivo para terminar con una relación 8:2 (YPD:SD). Se incubó el cultivo fresco a 30 °C por 3 – 5 h con agitación (230 – 250 rpm) hasta que las células se

encontraran en la mitad de la fase exponencial (DO_{600} de 1 ml = 0,5–1), y posteriormente se midió la DO_{600} exacta de cada cultivo. Se alicuotaron 1,5 ml del cultivo en tubos Eppendorf por triplicado, se centrifugaron durante 1 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células fueron lavadas con 1 ml de solución Z, se centrifugaron nuevamente, y se resuspendieron en 100 μ l de solución Z. Luego, los tubos fueron congelados en nitrógeno líquido y descongelados en un baño de agua a 37 °C durante 1 min; el ciclo de congelamiento/descongelamiento se repitió 2 veces más. Posteriormente, se les agregaron 700 μ l de solución Z con β -mercaptoetanol, y la reacción se inició con el agregado de 160 μ l de ONPG disueltos en solución Z (4 mg/ml, solución preparada 1 h antes de ser utilizada). Los tubos se incubaron a 30 °C hasta la aparición de una coloración amarilla, y la reacción se detuvo con 400 μ l de Na_2CO_3 1 M. Se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm para precipitar los desechos celulares, y se realizó la medición de la DO a 420 nm. Por último, se calcularon las unidades de β -galactosidasa utilizando la siguiente fórmula:

$$Unidad \ \beta\text{-galactosidasa} = \frac{1000 \times DO_{420}}{t \times V \times DO_{600}}$$

en la que:

- t = tiempo transcurrido de incubación en minutos.
- V = volumen de células (0,1 ml) \times factor de concentración (15 veces).
- DO_{600} = Absorbancia a 600 nm de 1 ml de cultivo.
- DO_{420} = Absorbancia a 420 nm de 1 ml de reacción.

Una unidad de β -galactosidasa está definida como la cantidad que hidroliza 1 μ mol de ONPG a o-nitrofenol y D-galactosa por minuto por célula (Miller, 1972; Miller, 1992).

11.4. Extracción de proteínas totales para ensayos de *western-blot*

Las proteínas totales de levaduras se extrajeron de acuerdo a Kushnirov (2000) con algunas modificaciones menores. Las células de *Saccharomyces cerevisiae* AH109, previamente transformadas con las diferentes construcciones, se crecieron en 3 ml de medio SD suplementado con todos los aminoácidos menos Trp, durante toda la noche a 30 °C con agitación. Luego, 1 ml se transfirió a 10 ml de medio fresco, se las incubó a 30 °C con agitación hasta que las células estuvieran en fase exponencial de crecimiento, y una $OD_{600} = 7,5$, momento en que se cosechó

por centrifugación a 13000 rpm. Las células se resuspendieron en 600 μ l de NaOH 0,1 M, y se las incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min, las levaduras se resuspendieron en 16 μ l de solución de siembra de levaduras y se las hirvió durante 10 min. Este extracto fue utilizado para la detección de las proteínas de fusión a GAL4-BD utilizando los anticuerpos anti-c-Myc hecho en ratón (GenScript) y anti-ratón HRP (del inglés, *Horseradish Peroxidase*) hecho en conejo (Invitrogen™).

11.5. Preparación de extractos proteicos

Se inocularon 2 ml de medio SD con los aminoácidos correspondientes, y se lo incubó a 30 °C con agitación hasta obtener un cultivo saturado. El medio fue trasvasado por completo a 10 ml de medio YPD, y se lo incubó a 30 °C con agitación hasta que las células se encontraran en fase exponencial tardía ($DO_{600} = 1 - 5$). Las células se cosecharon por centrifugación a 1500 x g durante 5 min a 4 °C en tubos Eppendorf pesados previamente. Se determinó el peso húmedo (en gramos) de levaduras por el aumento del peso de los tubos Eppendorf, valor que fue aproximadamente igual al volumen de células (en ml). Las células se resuspendieron en 2 a 4 volúmenes de agua helada, y se cosecharon inmediatamente por centrifugación a 1500 x g durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, se agregaron de dos a tres volúmenes de solución amortiguadora de disrupción junto con cuatro volúmenes de bolitas de vidrio. Luego, la suspensión se sometió a *vortex* a máxima velocidad durante 1 min y se dejó reposar el tubo en hielo por 2 min. El proceso se repitió de tres a cinco veces más. Por último, se dejaron decantar las bolitas de vidrio y se retiró el sobrenadante. Para extraer mayor cantidad de proteínas, las bolitas de vidrio se lavaron con dos volúmenes de la solución amortiguadora de disrupción, y nuevamente se recuperó el sobrenadante. Finalmente, para clarificar los extractos proteicos, se los centrifugó a 12000 x g durante 30 min a 4 °C. Los extractos crudos fueron utilizados en el día.

12. Análisis de proteínas

12.1. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método descrito por Sedmak y Grossberg (1977). Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica bovina para realizar una curva de calibrado. Las determinaciones se realizaron con 5 μ l de extracto proteico en 100 μ l

de agua destilada y 900 μl del reactivo de Azul Brillante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie G-250 10 mg en 100 ml de etanol absoluto 5 % v/v y ácido fosfórico 10 % v/v). La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro a 595 nm. Se utilizó la curva patrón para determinar el contenido proteico total de cada una de las muestras analizadas.

12.2. Extracción de proteínas de plantas y ensayo fluorométrico de actividad β -glucuronidasa

El procesamiento de las muestras en mortero se llevó a cabo agregando N_2 líquido hasta obtener un polvo fino que se transfirió a un tubo Eppendorf. Luego, se agregaron 200 μl de la solución amortiguadora de extracción y se mezcló con *vortex* por 30 s. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se mantuvo en baño de hielo.

La reacción fluorométrica se realizó siguiendo el método descrito por Welchen y González (2005). Se agregaron 5 o 10 μl de extracto proteico a 200 μl de una solución 1 mM de sustrato MUG (4-metilumbelliferil- β -D-glucurónido) disuelto en metanol 10 %. Los 200 μl de cada reacción se incubaron a 37 °C en baño de agua durante 20 min. La reacción enzimática se detuvo utilizando 800 μl de NaCO_3 0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en pmol de MU (4-metilumbelliferona) $\times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}$ de proteínas totales⁻¹ de acuerdo a una curva patrón de RFU (unidades de fluorescencia relativa) vs la concentración de producto 4-MU. A fin de eliminar la actividad enzimática endógena, a cada lectura de determinación enzimática se le restó el valor correspondiente al extracto proteico proveniente de plantas no transformadas.

12.3. Electroforesis de proteínas

La separación de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se llevó a cabo en geles verticales siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Se utilizó una relación de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8. El gel de separación se preparó con una concentración final de acrilamida de 12 % (p/v) y del 6 % (p/v) en los geles de concentración. La separación electroforética se realizó en solución amortiguadora de corrida 1 x, aplicando una corriente de intensidad constante a 25 mA. Las muestras a sembrar fueron previamente desnaturalizadas mediante el agregado de un volumen de solución de siembra SDS-PAGE e incubación de 3 min en baño a 100 °C.

Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron visualizadas en el gel por tinción con una solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 (Sigma) 1 % (p/v) en una mezcla de etanol:ácido acético:agua (50:10:40). El gel se incubó en un baño de esta solución durante algunas horas en una estufa a 65 °C. Una vez teñido, el gel fue retirado del baño para ser decolorado con una mezcla etanol:ácido acético:agua (25:10:65). Cuando el gel recobró la transparencia y sólo las bandas de proteínas conservaban el color azul del colorante se puso fin a su decoloración. Como marcador de masa molecular se usó un LMW Calibration Kit for SDS (Amersham Biosciences). Sembrando 3 µl del mismo, se observaron las siguientes bandas: 97 kDa (1,005 µg), 66 kDa (1, 245 µg), 45 kDa (2,2 µg), 30 kDa (1,245 µg), 20 kDa (1,2 µg) y 14,4 kDa (1, 74 µg).

12.4. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de PVDF (*western blot*)

Luego de la separación electroforética en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, las proteínas fueron electro-transferidas a filtros PVDF (fluoruro de polivinilideno; Thermo Scientific) en solución de transferencia a 4 °C, durante toda la noche a voltaje constante de 30 V, empleando una cuba de transferencia *Trans-BlotTM* (Bio-Rad). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon por incubación durante 1 h en solución PBS adicionada con leche descremada en polvo al 5 % (p/v). En esta misma solución se diluyó el anticuerpo primario (dilución 1:1000), y se lo dejó en contacto con la membrana durante 1 h a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo no unido a las proteínas se eliminó mediante cuatro lavados de 15 min con solución PBS/leche al 5 % (p/v). Se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con la enzima peroxidasa (InvitrogenTM), diluido 1:2000 en la misma solución. Después de incubar 1 h a temperatura ambiente, se realizaron cuatro lavados de 15 min con PBS/leche al 5 % y dos lavados de 5 min con Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). La detección de la peroxidasa se realizó según el protocolo de revelado recomendado por el fabricante usando reactivos quimio-luminiscentes.

12.5. Expresión de las proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

Para expresar en forma recombinante en bacterias, los HD-Zip I se clonaron en fase con la proteína de fusión GST, en diferentes vectores *pGEX* (Smith y Johnson, 1988). Las células de

Escherichia coli BL21 Codon Plus transformadas con la construcción deseada se hicieron crecer hasta saturación en 2 ml de medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, a 37 °C y con agitación. Una dilución 1:100 en el mismo medio se incubó a 37 °C con agitación, hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,7$. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó mediante la adición de IPTG 0,5 mM (concentración final). El cultivo fue incubado a 28 °C con agitación durante 5 h adicionales. Posteriormente, las células fueron cosechadas centrifugándolas a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C y se resuspendieron en 1/20 volúmenes de solución amortiguadora de columna, respecto del volumen de medio de cultivo procesado. A continuación se agregó el inhibidor de proteasas PMSF en una concentración final de 1 mM. Se rompieron las células aplicando de 5 a 7 pulsos de ultrasonido de 15 s cada uno, separados por intervalos de 1 min en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra-Cell™ VCX-600, Sonics & Materials). Los lisados celulares se clarificaron centrifugando a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C y las fracciones sobrenadante y precipitada fueron recolectadas y conservadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

12.6. Ensayos de *pull-down*

Una vez verificada la expresión de las proteínas recombinantes en forma soluble, se procedió a inmovilizarlas en una columna de glutatión-Sepharose. El sobrenadante resultante de la centrifugación de los lisados celulares bacterianos se diluyó 3-5 veces en solución amortiguadora de columna y se sembró en una columna glutatión-Sepharose (Amersham), previamente equilibrada en la misma solución. Se empleó aproximadamente 1 ml de matriz para un volumen de partida de medio de cultivo de 100 ml. El extracto proteico soluble se hizo interactuar con la columna mantenida a 4 °C por agitación durante 4 h, para lograr una eficiencia de unión máxima a la fase sólida. Posteriormente, se lavó cuatro veces la columna con 8 volúmenes de solución amortiguadora de columna. Luego, 500 µl de los extractos proteicos provenientes de levaduras se incubaron con las proteínas de fusión HD-Zip-GST, previamente inmovilizadas en la columna glutatión-Sepharose, durante 2 h a 4 °C en agitación. Luego de cuatro lavados con solución amortiguadora de columna, los extractos se centrifugaron a 6000 rpm durante 2 min a 4 °C, y se liberaron las proteínas de la matriz por ebullición de la columna con solución de siembra SDS-PAGE. Las proteínas obtenidas se sometieron a corrida electroforética en geles de poliacrilamida

al 12 %. Finalmente, la detección de las bandas se realizó por *western-blot* utilizando los anticuerpos anti-HA hecho en ratón (Invitrogen™) y anti-ratón HRP (del inglés, *Horseradish Peroxidase*) hecho en conejo (Invitrogen™).

13. Soluciones utilizadas (ordenadas alfabéticamente)

Medio de infiltración de *Nicotiana benthamiana*: MgCl₂ 10 mM; MES pH 5,2 10 mM; acetosiringona 150 μM.

Solución I de Minipreparación: Tris-HCl 25 mM (pH 8); glucosa 50 mM; EDTA 10 mM.

Solución II de Minipreparación: NaOH 0,2 N; SDS 1% (p/v).

Solución III de Minipreparación: KAc 5 M, pH 5,2.

Solución amortiguadora 10 x de corrida (Laemmlí): Tris 250 mM; glicina 2,5 M; SDS 1 % (p/v).

Solución amortiguadora de columna o de disrupción: Tris-HCl pH 8,0 20 mM; MgCl₂ 10 mM; EDTA 1 mM; glicerol 5 %; DTT 1 mM; sulfato de amonio 0,3 M.

Solución de Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*: Tris-HCl 200 mM (pH 8,0); NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5 % (p/v).

Solución de lavado de FAST: MgCl₂ 10 mM; acetosiringona 100 μM.

Solución de NaCl 0,9 %: NaCl 0,9 g/100 ml.

Solución de siembra de ADN: Azul de bromofenol 0,25 % (p/v); xilencianol FF 0,25 % (p/v); glicerol 30 % (v/v).

Solución de siembra de levaduras: Tris-HCl pH 7,0 100 mM; SDS 10 %; glicerol 5 %; β-mercaptoetanol 4 %; azul de bromofenol 0,0025 %.

Solución de siembra SDS-PAGE 2 x: Tris-HCl pH 7,0 100 mM; glicerol 20 % (v/v); SDS 4 % (p/v); β-mercaptoetanol 10 % (p/v); azul de bromofenol 0,01 % (p/v).

Solución de transferencia (*western-blot*): Tris 3,03 g/l; glicina 14,4 g/l.

Solución Hoagland 1 x: NH₄H₂PO₄ 115,04 mg/l; KNO₃ 606,6 mg/l; Ca(NO₃)₂ 656,4 mg/l; MgSO₄ 240,78 mg/l; Fe-EDTA 20 μM; H₃BO₃ 2,86 mg/l; MnCl₂ 4H₂O 1,81 mg/l; ZnSO₄ 7H₂O 0,22 mg/l; CuSO₄ 5H₂O 0,08 mg/l; H₂MoO₄ H₂O 0,02 mg/l.

Solución patrón de X-Gal: 20 mg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) en N,N-dimetilformamida.

Solución PBS 1 x: NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na₂HPO₄ 0,61 g/l; KH₂PO₄ 0,2 g/l.

Solución PEG/LiAc: PEG 3350 40 %; TE 1 x; LiAc 100 mM.

Solución TAE 1 x: Tris-Ac 20 mM (pH 8,5); EDTA 1 mM.

Solución TE/LiAc 1.1 x: TE 1,1 x; LiAc 110 mM.

Solución Z: Na₂HPO₄ 7 H₂O 16,1 g/l; NaH₂PO₄ H₂O 5,5 g/l; KCl 0,75 g/l; MgSO₄ 7 H₂O 0,246 g/l.

Solución Z con β -mercaptoetanol: 100 ml de solución Z; 0,27 ml de β -mercaptoetanol.

Solución Z/X-Gal: 100 ml de solución Z; 0,27 ml de β -mercaptoetanol; 1,67 ml de solución patrón de X-Gal.

Tris-HCl 8 x pH 8,9: Tris 36,6 % (p/v); HCl 3 M.

Tris-HCl 8 x pH 6,8: Tris 5,98 % (p/v); HCl 0,49 M.

Trizol preparado en el laboratorio:

Preparación del fenol ácido:

- Se fundió el fenol en un baño a 68 °C.
- Se adicionó 0,1 % de Hidroxiquinoleína (antioxidante, inhibidor de ARNasas).
- Se adicionó agua bidestilada para saturar.
- Se dejó descansar un día.
- Se extrajo el agua de la fase superior y se le adicionó agua nueva.
- Se repitieron los dos últimos pasos dos veces más.
- Se fraccionó en frascos, se rotuló y se guardó en heladera.
- De esta forma, el fenol es estable entre 8 a 10 meses.

Preparación de 100 ml de Trizol: fenol ácido 38 ml; tiocianato de guanidina (0,8 M) 9,453 g; tiocianato de amonio (0,4 M) 3,045 g; NaAc pH 5,0 (0,1) M 3,34 ml del stock 3 M; glicerol (5 %) 5,75 ml del stock 87 %; agua bidestilada hasta 100 ml.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1:

Los factores de transcripción HD-Zip I presentan diferentes motivos AHA funcionales que interaccionan selectivamente con TBP y/o TFIIIB

Introducción

El extremo carboxilo terminal de los factores de transcripción HD-Zip I está conservado en distintas especies

Todos los factores de transcripción de tipo HD-Zip de la subfamilia I analizados hasta el momento unen *in vitro* con máxima afinidad la misma secuencia de ADN (Johannesson y col., 2001; Palena y col., 1999). A su vez, estas proteínas en muchos casos presentan patrones de expresión similares y se regulan por los mismos efectores ambientales y hormonas. Sin embargo, los diferentes estudios hechos por nuestro grupo y por otros grupos de investigación indican claramente que estos FTs cumplen funciones diferentes en las plantas participando de variadas vías de señalización en respuesta a sequía, frío, patógenos, insectos y de desarrollo.

En este sentido, la identificación mediante herramientas informáticas de motivos conservados entre especies en las regiones carboxilo-terminales de los FTs HD-Zip I, nos llevó a postular que los mismos cumplirían papeles funcionales específicos en la planta. Entre estos motivos conservados, encontramos sitios putativos de fosforilación, sumoilación y motivos de transactivación que serían responsables, al menos en parte, de la determinación de la función diferencial de cada miembro de la subfamilia (Arce y col., 2011).

Utilizando las proteínas completas, se demostró experimentalmente la actividad transcripcional de varios miembros de la subfamilia HD-Zip I (Meijer y col., 2000; Wang y col., 2005); sin embargo el papel que cumplen los CTRs en esta actividad fue sólo corroborada para AtHB12 (Lee y col., 2001), y más recientemente para Oshox22, HvHox2 y Vrs1 (Sakuma y col., 2013; Zhang y col., 2012). Los análisis realizados en estos casos permitieron asignar a los CTRs capacidad de transactivación pero no establecieron los motivos específicos funcionales en estas regiones ni los aminoácidos responsables.

Los motivos AHA presentes en los factores de transcripción

Los motivos AHA fueron descritos por primera vez por Treuter y col. (1993), y se definieron como regiones involucradas en la activación transcripcional, presentes en FTs de la familia HSF (del inglés *Heat Stress Factors*) de tomate. Estos autores hicieron ensayos en protoplastos con los

FTs HSF24, HSF8 y HSF30, y describieron estos motivos como péptidos pequeños y esenciales que exhiben un patrón característico de residuos aromáticos e hidrofóbicos embebidos en un contexto ácido (AHA). Más tarde, Döring y col. (2000) analizaron estos motivos en los FTs HSFA1 y HSFA2 de tomate, y concluyeron que los mismos pueden activar la transcripción al contactar los componentes del complejo de transcripción basal. Además, determinaron que para establecer este contacto forman una hélice anfipática cargada negativamente.

Entre de los motivos conservados detectados informáticamente en los FTs de la familia HD-Zip I, se encontraron algunos que con alta similitud con los AHAs (Arce y col., 2011). Con la intención de dilucidar si estos motivos son realmente funcionales, se seleccionaron cuatro miembros de la subfamilia HD-Zip I, caracterizados en nuestro y en otros laboratorios (Aoyama y col., 1995; Söderman y col., 1996; Hanson y col., 2001; Olsson y col., 2004; Son y col., 2010; Cabello y col., 2012; Cabello y Chan, 2012; Valdés y col., 2012; Ré y col., 2014). Para realizar un análisis más profundo. AtHB7 y AtHB12 son proteínas parálogas pertenecientes al grupo I, mientras que AtHB1 y AtHB13 son miembros del grupo III y V, respectivamente (Arce y col., 2011). Esta elección no fue casual sino que se basó en que estos cuatro miembros de la familia contaban ya con una caracterización funcional parcial. Se sabe que la expresión de los genes que codifican para estos cuatro FTs es regulada por estrés abiótico (Henriksson y col., 2005). Los niveles de transcritos de AtHB7 y AtHB12 son inducidos por condiciones de déficit de agua, dependiendo del ABA y de la actividad de las fosfatasa ABI1 y ABI2 (Söderman y col., 1996; Lee y Chun, 1998). A su vez, estos cuatro HD-Zip I presentan funciones diferentes en la planta. AtHB7 y AtHB12 fueron descritos como reguladores negativos del desarrollo en condiciones de estrés abiótico y en respuesta al ABA (Söderman y col., 1996; Olsson y col., 2004; Ré y col., 2014); AtHB13 está involucrado en el metabolismo de respuesta a azúcares y en la respuesta a congelamiento, sequía y salinidad (Hanson y col., 2001; Cabello y col., 2012; Cabello y Chan, 2012); y AtHB1 se ha descrito como un gen que participa en el desarrollo foliar (Aoyama y col., 1995). Sin embargo, no se conocen las proteínas con las que interaccionan estos FTs que probablemente sean fundamentales para el ejercicio de su función.

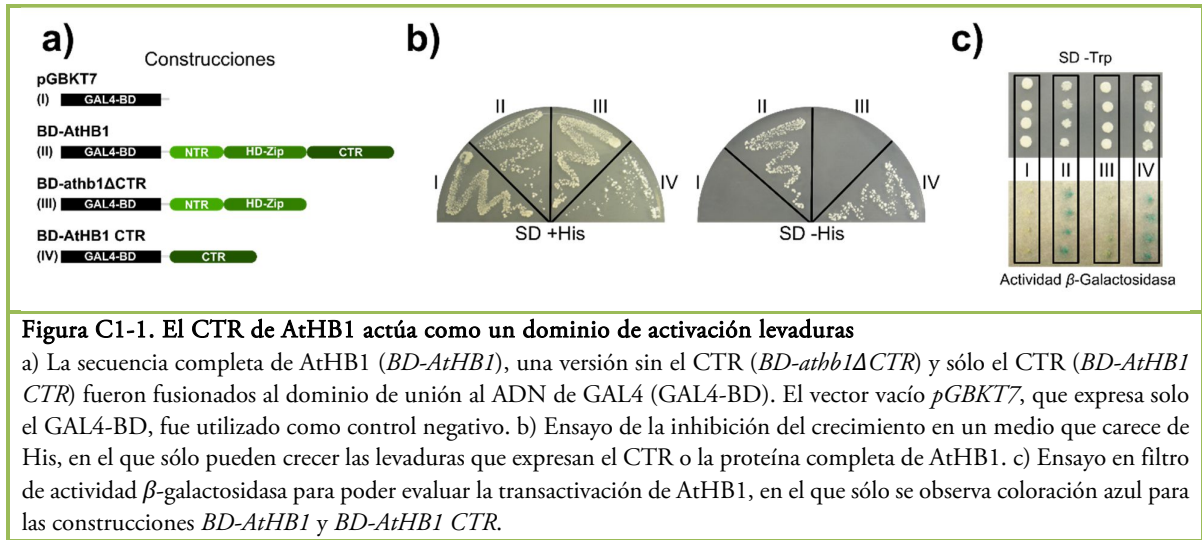
Resultados

La región carboxilo terminal de AtHB1 actúa como un dominio de activación en levaduras

En primer lugar, nos propusimos analizar la funcionalidad putativa de las regiones conservadas presentes en los CTRs de los FTs pertenecientes a la familia HD-Zip, subfamilia I. Para ello, inicialmente elegimos como modelo de estudio al gen *AtHB1* de *Arabidopsis thaliana*. La literatura indicaba que AtHB1 actúa como activador en protoplastos (Aoyama y col., 1995).

Se aisló el ADNc correspondiente a AtHB1 y se realizaron clonados en el vector *pGBKT7*, adecuado para transformar levaduras. Las construcciones genéticas realizadas permitirían expresar la proteína completa, sin el CTR y sólo el CTR, fusionados cada uno al dominio de unión a ADN de GAL4 (construcciones *BD-AtHB1*, *BD-athb1ΔCTR* y *BD-AtHB1 CTR* en la figura C1-1a). Estas construcciones fueron utilizadas para transformar células haploides de la cepa AH109. Esta cepa contiene los genes *HIS3*, *ADE2* y *LacZ* (que codifican una enzima de la síntesis de histidina, una enzima de la síntesis de adenina y la enzima β -galactosidasa, respectivamente) bajo el control de regiones promotoras reconocidas por GAL4, lo que permite realizar ensayos de doble híbrido o de simple híbrido con proteínas con actividad activadora intrínseca. Las levaduras, una vez transformadas y seleccionadas, fueron repicadas en un medio carente de histidinas, en el que sólo pueden crecer las células que contienen construcciones con capacidad activadora. Como se muestra en la figura C1-1b, se pudo observar crecimiento de las células con las construcciones *BD-AtHB1* y *BD-AtHB1 CTR*, mientras que las levaduras con el vector *pGBKT7* vacío (control negativo) o con la construcción *BD-athb1ΔCTR* no presentaron crecimiento. Además, se realizó un ensayo en filtro para detectar la actividad β -galactosidasa, y los resultados obtenidos corroboraron lo observado anteriormente (figura C1-1c).

Por lo expuesto, pudimos concluir que AtHB1 actúa como activador de la transcripción en levaduras, y que esta actividad es ejercida por el CTR de este FT ya que la construcción en la que el CTR fue eliminado, fue incapaz de activar.



Los factores de transcripción AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 actúan como activadores en levaduras

Lee y col. (2001) informaron que AtHB12 es un activador de la transcripción en levaduras, y que la región que ejerce dicha actividad se encuentra en el CTR, y en este trabajo de Tesis, hemos demostrado que lo mismo ocurre con AtHB1 (figura C1-1). Sin embargo, las capacidades de activación de los distintos miembros de la familia HD-Zip I no han sido comparadas aún, desconociéndose además, si estas capacidades influyen en las funciones distintivas de los miembros de la familia. Con el objeto de tener un panorama más amplio sobre la capacidad de activación de las proteínas HD-Zip I, se generaron construcciones en las cuales las regiones codificantes de AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 fueron fusionadas al dominio de unión a ADN de GAL4 (GAL4-BD, por sus siglas en inglés), como se detalla en el punto 2.1 de materiales y métodos. La representación esquemática de estas construcciones se muestra en la figura C1-2a. Estos plásmidos fueron utilizados para transformar levaduras de la cepa AH109 y, una vez seleccionadas las transformantes, se analizó la expresión del gen *HIS3* (síntesis de histidina) y se cuantificó la actividad β-galactosidasa.

La figura C1-2b muestra que AtHB13 presenta, comparativamente con los otros tres FTs, la mayor actividad transcripcional seguido por AtHB12, mientras que AtHB1 y AtHB7 presentaron actividades más bajas. Con el objeto de cuantificar con más precisión la relación entre las capacidades de activación de estos FTs, realizamos ensayos de *western-blot* para detectar las distintas

proteínas utilizando un anticuerpo anti-c-Myc. Sin embargo, las señales obtenidas fueron muy débiles o nulas, por lo que los niveles de actividad quedaron expresados sólo como unidades Miller (figura C1-2b).

Estos resultados indican que estos cuatro HD-Zip I tienen la capacidad de inducir la expresión en un sistema de simple híbrido en levaduras, y que presentan diferentes grados de actividad transcripcional en este sistema heterólogo.

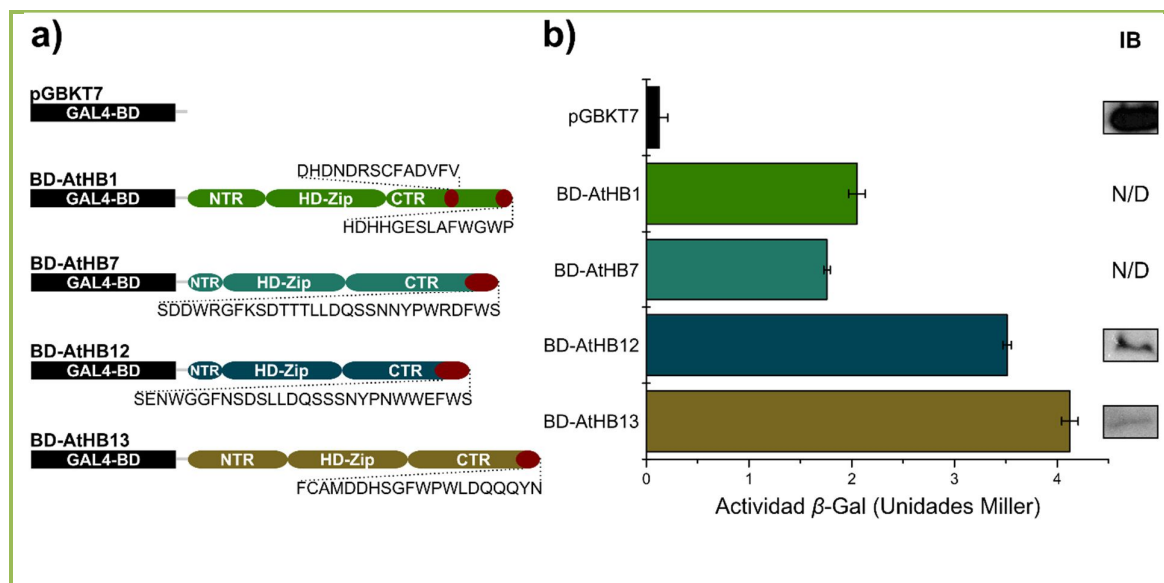


Figura C1-2. AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 actúan como activadores en el sistema de simple híbrido en levaduras

a) Representación esquemática de las construcciones genéticas utilizadas: las secuencias completas de las cuatro proteínas HD-Zip fueron fusionadas al dominio de unión al ADN de GAL4 (GAL4-BD). El vector que expresa sólo GAL4-BD, pGBKT7, fue utilizado como control negativo. b) Ensayo de actividad β -galactosidasa. La actividad fue cuantificada en unidades Miller, y las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos independientes. Panel derecho (IB): señal de *immunoblot* con anticuerpos anti-c-Myc luego de un SDS-PAGE. N/D, no detectado.

Los motivos de tipo AHA son necesarios y suficientes para la actividad transcripcional de AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 en levaduras

Haciendo uso de herramientas informáticas, se detectaron en los CTRs de las proteínas HD-Zip I de diferentes especies motivos con características estructurales semejantes a las que presentan los motivos AHA (Arce y col., 2011). Para poder definir los AHAs putativos en AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13, se realizó una comparación de las secuencias proteicas de varios HD-Zip de la subfamilia I de diferentes especies vegetales que presentaron un CTR similar. Del análisis de las

mismas se pudo observar que AtHB1, AtHB7 y AtHB12 presentan dos motivos AHAs putativos, mientras que AtHB13 sólo uno (figura C1-3). Estos motivos se encuentran localizados entre los aminoácidos 216-227 y 259-272 en el caso de AtHB1, 221-236 y 247-258 en el caso de AtHB7, 199-214 y 224-235 en el caso de AtHB12, y entre los aminoácidos 275-294 en el caso de AtHB13, todos ellos en los extremos de los CTRs respectivos y a distancias variables de los LZs (Figura C1-2a).

Dado que la capacidad de transactivación de estos FTs depende de cada proteína en particular, nos preguntamos si alguno de los motivos tipo AHA identificados era responsable de dicha actividad. Para ello, realizamos distintas construcciones para cada uno de los cuatro miembros HD-Zip I seleccionados (figura C1-4). En dichas construcciones, se fusionaron eliminaciones sucesivas o combinadas de los motivos AHA putativos o estos motivos completos y solos, al GAL4-BD; éstas fueron utilizadas para transformar levaduras. Posteriormente, las células seleccionadas fueron utilizadas para analizar la expresión del gen *HIS3* (síntesis de histidina) y cuantificar la actividad β -galactosidasa.

Como puede observarse en la figura C1-4a, para AtHB1 la remoción de los últimos 48 aminoácidos, que contienen los dos motivos AHAs, produjo un efecto similar a cuando se eliminó todo el CTR. Además, la eliminación de los últimos 12 aminoácidos, que contienen sólo uno de los dos motivos putativos, causó una pérdida significativa de la actividad, mientras que la eliminación de los últimos 33 residuos (que contienen uno de los AHAs y un segmento de separación entre los motivos) causó una disminución aún más severa de la actividad de AtHB1. Por otra parte, la construcción que carece del segundo motivo AHA (posiciones 216-227) no produjo un cambio considerable en la capacidad activadora de AtHB1, mientras que aquella sin la región intermedia que une los motivos AHAs produjo un elevado efecto negativo en la transactivación. Esto indica que este segmento de separación podría ser importante para brindar la distancia adecuada entre ambos motivos AHAs permitiendo su correcto posicionamiento y acción, o, alternativamente, debido a que contiene una secuencia relevante con capacidad activadora desconocida en otros TFs.

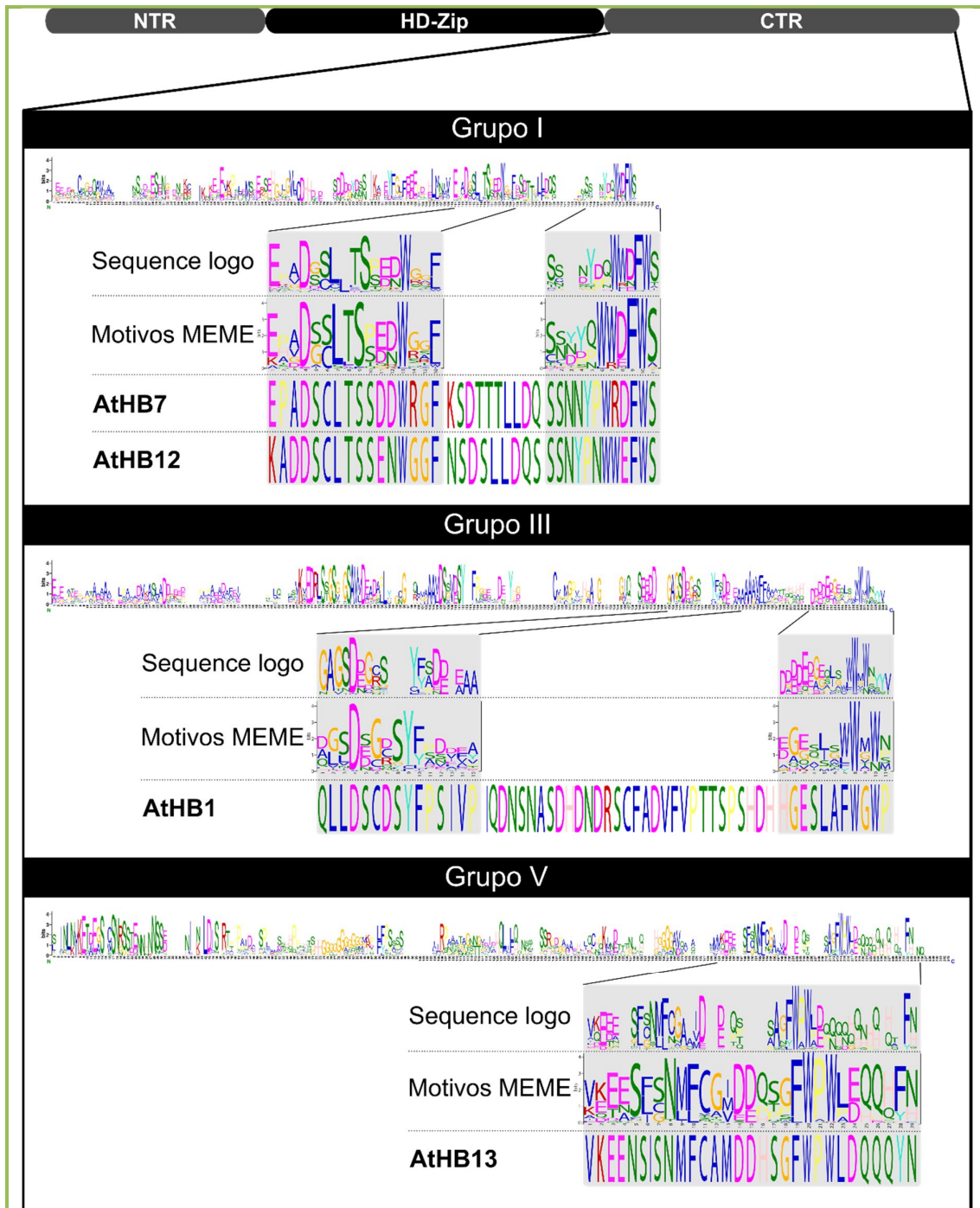


Figura C1-3. AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 presentan diferentes motivos de tipo AHA en sus CTRs
 En la parte superior de los tres paneles, se presenta un alineamiento múltiple de secuencias de los CTRs de HD-Zip I de diferentes especies vegetales, y se amplifican las regiones correspondientes a los motivos AHA putativos en cada uno de los grupos analizados (I, III y V). En la parte inferior, se muestran los motivos identificados mediante MEME y la secuencia de cada uno de los cuatro FTs analizados.

AtHB12 perdió significativamente su capacidad de activación cuando se eliminaron los últimos 8 aminoácidos, mientras que tanto al remover los últimos 27 residuos (que contienen un motivo AHA) como todo el CTR la actividad se perdió por completo (figura C1-4c). Un resultado similar, pero no idéntico, se obtuvo al analizar las construcciones de AtHB7. Para este FT, el motivo AHA localizado entre los aminoácidos 230-258 mostró un papel significativo en la actividad transcripcional (figura C1-4b). Estas similitudes entre AtHB7 y AtHB12 eran de esperarse, dado que estos FTs son considerados como duplicaciones de un único gen a pesar de que se detectaron algunas diferencias estructurales entre ambos (Arce y col., 2011).

Finalmente, en AtHB13 sólo se detectó un motivo AHA por análisis informático, y, consistentemente, su eliminación causó la pérdida de toda la capacidad de transactivación. El mismo resultado se obtuvo cuando se removió el CTR completo (figura C1-4d).

El análisis de las construcciones en las que se fusionaron al GAL4-BD péptidos conteniendo sólo los motivos AHAs putativos indicó que las cuatro construcciones fueron capaces de activar en un sistema de simple híbrido de levaduras (figura C1-4). Esto implica que estos motivos AHAs presentes en los HD-Zip I serían responsables de la capacidad de activación observada. El motivo AHA de AtHB1 y la proteína completa presentaron actividades similares, mientras que el AHA aislado de AtHB13 mostró la mitad del nivel de activación del FT salvaje. Sorprendentemente, los aminoácidos 230-258 de AtHB7 y 208-235 de AtHB12, que contienen los AHAs de estos FTs, presentaron una mayor actividad que las proteínas completas.

Por último, y con el objetivo de verificar que las distintas proteínas y péptidos se estaban expresando en levaduras, aún en los casos en los que no presentaron actividad, se analizaron los niveles proteicos de todas las construcciones mediante ensayos de *western-blot* utilizando anticuerpos anti-c-Myc. Las proteínas mutantes de los HD-Zip I fueron detectadas y mostraron diferencias al equilibrar las unidades de DO₆₀₀. Estas diferencias enfatizaron nuestras conclusiones, dado que se observaron mayores concentraciones proteicas en aquellas construcciones que habían mostrado la menor actividad β -galactosidasa (panel derecho de la figura C1-4). En la literatura se han informado también algunos resultados semejantes de disparidad en la concentración proteica cuando se compararon las proteínas completas con sus mutantes; este es el caso de los FTs HSF (Döring y col., 2000; Kotak y col., 2004).

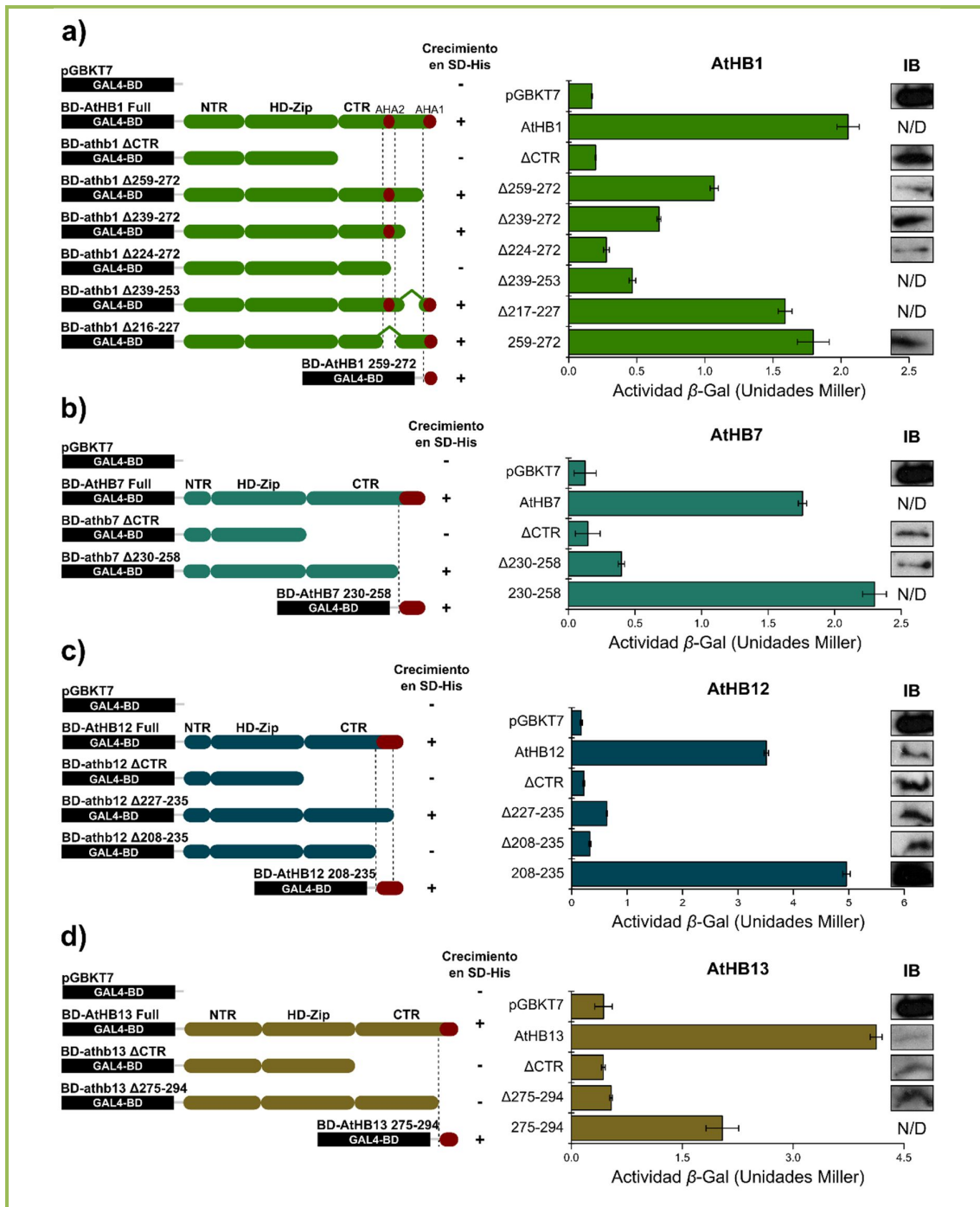


Figura C1-4. Los motivos AHA putativos son necesarios y suficientes para la capacidad de transactivación de los HD-Zip I en levaduras

Paneles izquierdos: Representación esquemática de las construcciones genéticas analizadas en el sistema de simple híbrido en levaduras y a la derecha de cada construcción se indica el crecimiento, o no, de las células en un medio selectivo (“+”, crecimiento en placas con medio mínimo SD sin His; “-”, sin crecimiento). Las secuencias completas o mutadas de las proteínas HD-Zip I (a, AtHB1; b, AtHB12; c, AtHB7; y d, AtHB13) fueron fusionadas al dominio de unión al ADN de GAL4. El vector vacío que sólo expresa GAL4-BD, *pGBKT7*, fue utilizado como control negativo. Paneles derechos: Ensayos de actividad β -galactosidasa. La actividad fue cuantificada en unidades Miller, y las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos independientes. Panel derecho (IB): señal de *immunoblot* con anticuerpos anti-c-Myc luego de un SDS-PAGE. N/D, no detectado.

Los motivos AHAs presentes en los HD-Zip I son funcionales en plantas

Dado que hasta ese momento habíamos utilizado un sistema heterólogo, nos preguntamos si los motivos identificados en AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 eran funcionales en plantas; en otras palabras, si las observaciones realizadas en levaduras tenían significado funcional. Para ello, se realizaron construcciones en vectores que permitieran la transformación de plantas, y se co-transformaron plántulas de *Arabidopsis* con estas construcciones y con una adicional que contiene un fragmento de la región promotora de *GAL1* (que posee sitios reconocidos por GAL4) dirigiendo la expresión de los genes reporteros *GFP* y *GUS*. Una vez transformadas las plántulas, se hicieron extracciones de ARN y se cuantificaron los niveles de transcripto de *GUS* por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El resultado fue bastante diferente al observado en levaduras; la remoción de cualquier segmento de AtHB1 que contuviera ya sea un motivo AHA putativo o la región intermedia entre los motivos resultó en una pérdida completa de la actividad transcripcional (figura C1-5a). AtHB12 perdió toda su actividad transcripcional al eliminar el extremo carboxilo terminal, mientras que la remoción de los últimos 9 o 29 aminoácidos causó una disminución de alrededor de un 75 % de su actividad (figura C1-5b). Por otro lado, AtHB13 perdió su capacidad de activación por completo al quitar los últimos 19 aminoácidos, que contienen el único motivo AHA putativo, en forma similar a lo observado en levaduras (figura C1-5c).

Los amonioácidos triptófanos desempeñan un papel importante dentro de los motivos AHAs de los HD-Zip I

Los motivos AHAs de los factores de transcripción HSF se caracterizan por poseer aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos dentro de un contexto ácido. Se ha demostrado que los residuos triptófanos (W) contribuyen de forma importante a la capacidad activadora de los FTs (Treuter y col., 1993), por lo que decidimos investigar el papel de estos aminoácidos en los motivos AHAs de los HD-Zip I. Como otros miembros del mismo clado (Arce y col., 2011), AtHB1 y AtHB13 presentan respectivamente los motivos FWGWP y FWPWL en la región final de su CTR. Para poder estudiar el rol de los triptófanos se generaron construcciones en las que distintos aminoácidos fueron mutados a alanina (A). Las construcciones fueron utilizadas para transformar levaduras, y posteriormente se analizó la expresión del gen *HIS3* y se cuantificó la actividad β -galactosidasa. La figura C1-6 muestra los resultados obtenidos.

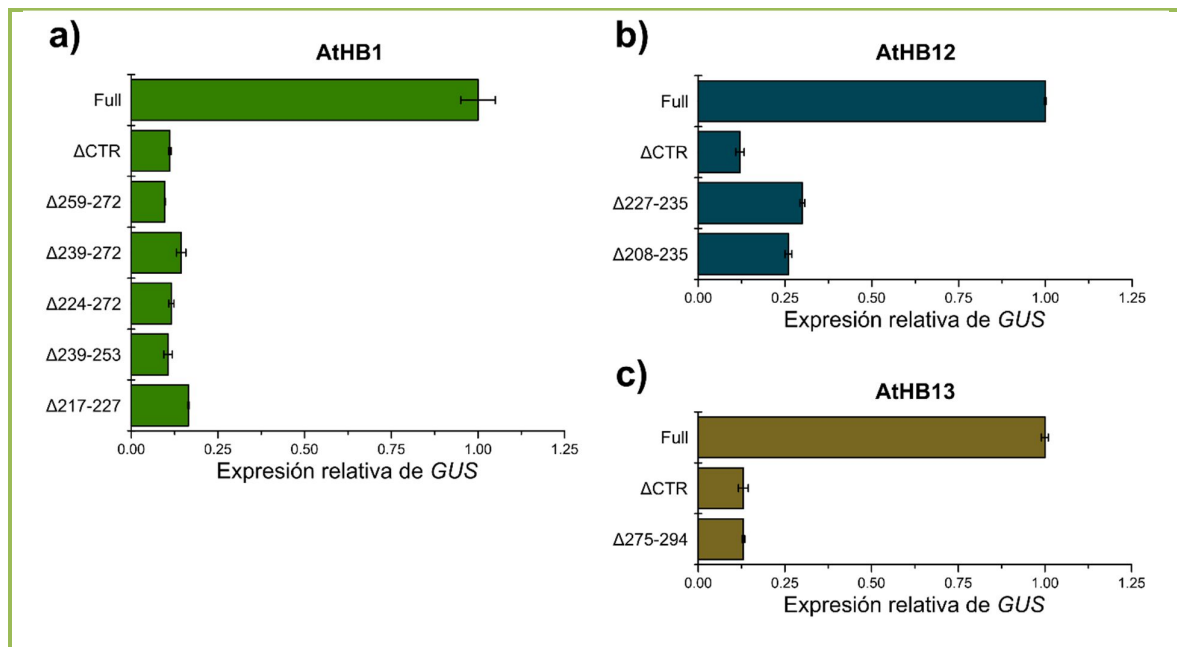


Figura C1-5. Los motivos AHA de AtHB1, AtHB12 y AtHB13 son funcionales en plantas

Las plántulas de *Arabidopsis thaliana* fueron co-transformadas transitoriamente con construcciones que contenían *35S::GAL4BD::HD-Zip* (a, AtHB1; b, AtHB12; y c, AtHB13) y *pMC::GAL1::GFP::GUS*. Los niveles de transcrito de β -glucuronidasa se expresan como una proporción de la construcción que contenía el FT completo, al que arbitrariamente se le asignó un valor unitario. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados biológicos independientes.

La mutación en AtHB1 de los aminoácidos E264, F268, G270, W269, W271, o ambos W a alanina no modificó la capacidad activadora de este FT en levaduras. Sólo la eliminación del CTR generó una pérdida completa de la actividad, lo que indica que, al menos en levaduras, estos aminoácidos no son esenciales para la capacidad transactivadora. En AtHB13, la mutación de los aminoácidos S282 y F284 o D289 no alteró considerablemente su nivel de actividad comparado a la proteína salvaje, pero la modificación de ambos residuos W fue suficiente para disminuir significativamente la capacidad transcripcional. Estos resultados indican que los triptófanos en el motivo AHA de AtHB13 tienen un papel crucial en su relación estructura/función, aunque no son los únicos determinantes de la actividad de transactivación, dado que la misma no desaparece completamente al ser mutados.

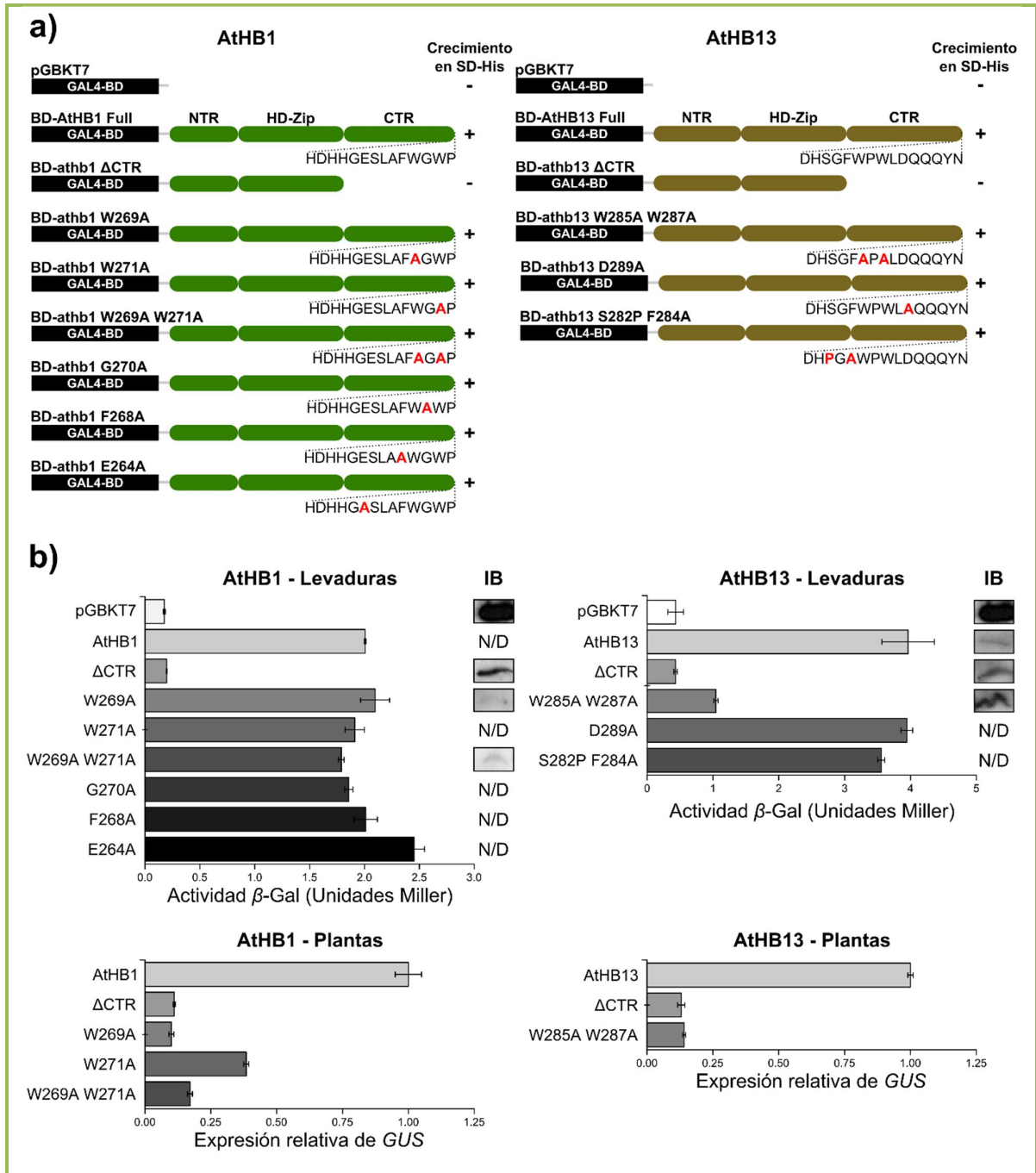


Figura C1-6. Los residuos triptófano en los motivos AHA juegan diferentes papeles en los HD-Zip I analizados

a) Representación esquemática de las construcciones genéticas analizadas en ensayos de simple híbrido en levaduras y en plantas. A la derecha de cada construcción, se indica el crecimiento o la ausencia de las células en un medio selectivo (“+”, crecimiento en placas con medio mínimo SD sin His; “-”, sin crecimiento). La secuencia completa o las mutaciones simples o dobles de dos de las proteínas HD-Zip I fueron fusionadas al dominio de unión al ADN de GAL4. El vector vacío que sólo expresa GAL4-BD, *pGBKT7*, fue utilizado como control negativo. b) Ensayo de actividad β-galactosidasa en levaduras y de niveles de transcritos de β-glucuronidasa en plantas transformadas con las diferentes construcciones. La actividad β-galactosidasa fue cuantificada en unidades Miller. Los niveles de expresión de *GUS* fueron expresados como una proporción de la construcción que contenía el FT completo, al que arbitrariamente se le asignó un valor unitario. Todos los ensayos representan triplicados, fueron repetidos al menos 3 veces, y las barras de error representan la desviación estándar. N/D, no detectado.

En plantas, la capacidad de activación de estos FT se perdió completamente al mutar los residuos W, con la excepción de la construcción *BD-athb1 W271A* que presentó un 30 % de la actividad de la proteína salvaje. Esto sugiere que el sistema heterólogo de levaduras tiene limitaciones importantes, probablemente por la existencia o falta de factores interactuantes, para modular la acción de los HD-Zip I en plantas.

AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 interaccionan diferencialmente con componentes de la maquinaria transcripcional basal

La transactivación ocurre frecuentemente a través de la interacción de un dominio o motivo particular de un FT con algún componente de la maquinaria transcripcional basal. Las proteínas TBP y TFIIB (*TATA binding protein* y *Transcription Factor IIB*, por sus siglas en inglés) son dos componentes muy importantes dentro de dicha maquinaria. Estas proteínas interaccionan con el dominio ácido de activación (semejante a un motivo AHA) de VP16, un FT que exhibe una región carboxilo terminal desordenada al igual que los FTs HD-Zip I (Stringer y col., 1990; Ingles y col., 1991; Lin y col., 1991; Shen y col., 1996).

En base a esto, nos preguntamos si los motivos AHA presentes en las proteínas HD-Zip I estarían interaccionando con alguno de los componentes de la maquinaria basal, y decidimos realizar un ensayo de doble híbrido en levaduras. Para ello, se generaron construcciones genéticas que contenían el ADNc de *AtTBP2* (At1g55520) y *AtTFIIB* (At2g41630), respectivamente, fusionados al dominio de activación de GAL4 (GAL4-AD), y las mismas fueron utilizadas para co-transformar levaduras con los cuatro HD-Zip I seleccionados fusionados al GAL4-BD. Luego, las células seleccionadas fueron utilizadas para cuantificar la actividad β -galactosidasa.

Para estos ensayos de doble híbrido en levaduras, como controles negativos se utilizaron las co-transformaciones del GAL4-BD vacío con el GAL4-AD vacío o con el GAL4-AD fusionado a *AtTBP2* o a *AtTFIIB*. Como se muestra en la figura C1-7a, BD-AtHB1 y BD-AtHB7 presentaron un aumento en el nivel de activación cuando fueron co-transformados con AD-*AtTBP2* respecto a GAL4-AD vacío; mientras que BD-AtHB12 y BD-AtHB13 no mostraron diferencias significativas, lo que indica que estos últimos FTs no interaccionan con *AtTBP2* (figura C1-7a). Por otra parte, las co-transformaciones con AD-*AtTFIIB* indicaron una clara interacción entre este componente

de la maquinaria transcripcional basal y AtHB7 y AtHB12, mientras que con AtHB13, la misma resultó ser débil. Además, no se pudo observar una interacción entre AtHB1 y AtTFIIB.

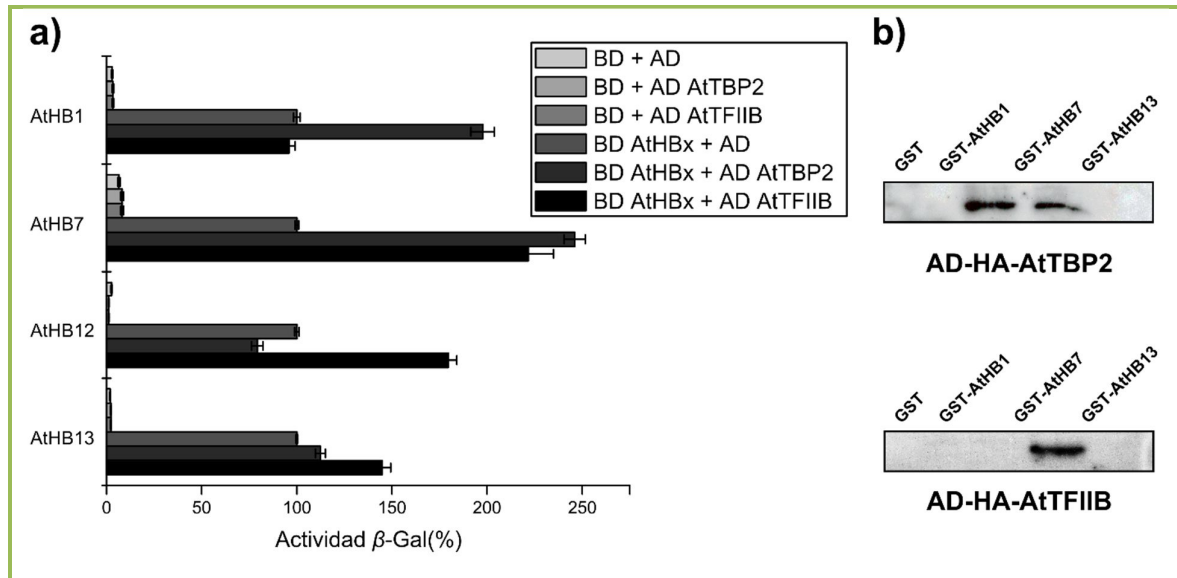


Figura C1-7. AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 interactúan en forma diferencial con los factores de transcripción basales AtTBP2 y AtTFIIB

a) Ensayo de actividad β -galactosidasa en levaduras. Las proteínas HD-Zip I completas fueron fusionadas a GAL4-BD, mientras que AtTBP2 y AtTFIIB fueron fusionados, en forma separada, a GAL4-AD. Se utilizó el sistema de doble híbrido en levaduras para analizar la interacción. La actividad fue expresada como un porcentaje de la evaluada con la construcción que contenía el FT completo fusionado a GAL4-BD, al que se le asignó un valor unitario de 100 %. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos independientes. b) Ensayos de GST *pull-down*. Las proteínas completas correspondientes a AtHB1, AtHB7 y AtHB13 fusionadas a GST fueron utilizadas para analizar la interacción con AtTBP2 y AtTFIIB en ensayos de *pull-down*. La interacción fue revelada por *western-blot* con anticuerpos anti-HA.

Para poder corroborar estas interacciones, las mismas fueron ensayadas *in vitro*. Para ello, tres HD-Zip I fueron clonados como fusiones a GST y expresados en *Escherichia coli*. Luego de la inducción con IPTG, las bacterias fueron lisadas y las proteínas de fusión fueron inmovilizadas en una matriz de glutatión-Sepharose. A su vez, se prepararon extractos de levaduras que contenían las proteínas quiméricas AD-AtTBP2 o AD-AtTFIIB fusionadas a una etiqueta de hemaglutinina (HA), y fueron pasados por la resina que contenía las fusiones entre GST y los HD-Zip I. Posteriormente, los eluatos fueron separados por SDS-PAGE, y se realizaron ensayos de *western-blot*, revelando con anticuerpos monoclonales anti-HA hechos en ratón, para detectar las interacciones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura C1-7b, y confirman que AtHB7 interactúa con AtTBP2 y AtTFIIB, AtHB1 sólo con AtTBP2, mientras que AtHB13 no

interacciona con ninguno de estos FTs, en forma consistente con lo observado previamente en los ensayos de doble híbrido.

Para poder saber si el motivo AHA presente en AtHB1 es una región necesaria para la interacción con AtTBP2, las construcciones *BD-athb1* Δ 259-272 y *BD-athb1* W269A-W271A, previamente obtenidas, fueron utilizadas para co-transformar levaduras con la construcción *AD-AtTBP2*. Las células seleccionadas fueron utilizadas para cuantificar la actividad β -galactosidasa. Estos ensayos de doble híbrido en levaduras indicaron que tanto la mutación de los residuos triptófanos 269 y 271 como la eliminación de los últimos 12 aminoácidos (que comprenden uno de los motivos AHA de AtHB1) impiden la interacción entre AtTBP2 y AtHB1 (figura C1-8).

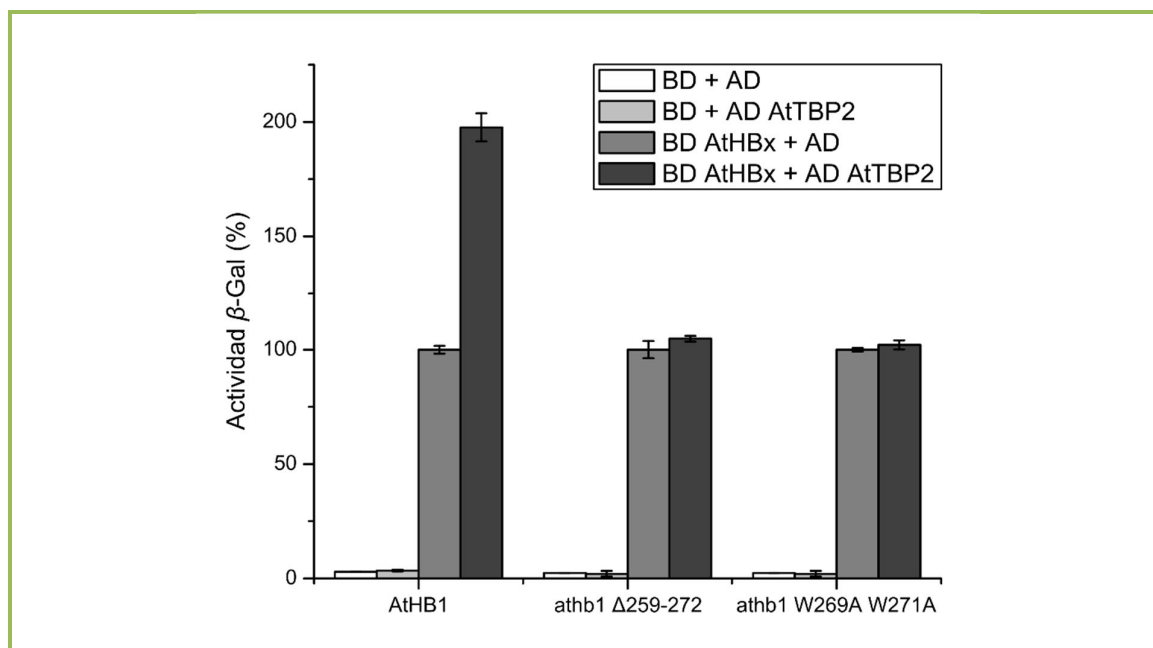


Figura C1-8. Los residuos triptófanos en los motivos AHA de AtHB1 son esenciales para su interacción con AtTBP2

Ensayo de actividad β -galactosidasa en levaduras. La proteína completa o las versiones mutadas de AtHB1 fueron fusionadas a GAL4-BD, mientras que AtTBP2 fue fusionada a GAL4-AD. Estas construcciones fueron utilizadas en un sistema de doble híbrido en levaduras para analizar la interacción. La actividad fue expresada como un porcentaje de la medida con la construcción que contenía el FT completo fusionado a GAL4-BD, al que se le asignó un valor unitario de 100 %. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados técnicos independientes.

En conclusión, estos FTs son capaces de interactuar con proteínas de la maquinaria transcripcional basal, aunque cada uno establece diferentes interacciones. Esto podría explicar en forma parcial la divergencia funcional de estas proteínas, como fue propuesto previamente por Arce y colaboradores (2011).

Discusión

Los 17 miembros de la familia de FTs HD-Zip I de *Arabidopsis* han sido clasificados en seis grupos (α a ϕ) de acuerdo a la relación filogenética, particularmente de acuerdo a la localización y al número de intrones dentro de la estructura génica (Henriksson y col., 2005). Una reconstrucción filogenética más reciente, en la que se utilizaron 178 HD-Zip I de diferentes especies vegetales (Arce y col., 2011) resolvió los miembros de *Arabidopsis* en seis grupos, denominados I a VI. Si bien en ambas clasificaciones, los grupos resultantes fueron seis, éstos no incluyen, en todos los casos, los mismos miembros ya que las reconstrucciones se basan en características estructurales diferentes. Por ejemplo, los miembros de los grupos I (*AtHB7* y *AtHB12*), V (*AtHB3*, *AtHB13*, *AtHB20* y *AtHB20*), y VI (*AtHB21*, *AtHB40* y *AtHB53*) tuvieron una correlación directa con los grupos γ , α y δ , respectivamente; sin embargo, los genes de los clados II (*AtHB5*, *AtHB6* y *AtHB16*) y III (*AtHB1*) pertenecían a un único grupo, el β según la clasificación de Henriksson y col. (2005). Las diferencias en estas dos clasificaciones se explican mayormente porque Arce y col. (2011) tomaron primordialmente las secuencias de los CTRs que no habían sido consideradas por Henriksson y col., ni por otros autores anteriormente. En este trabajo de Tesis, consideramos especialmente la clasificación hecha en el laboratorio por considerarla más abarcadora y darle importancia a los motivos funcionales de los CTRs.

Con la hipótesis que plantea que en los CTRs hay motivos proteicos funcionales que son responsables de la diversidad funcional de los HD-Zip I, encaramos primariamente la identificación de algunos de estos motivos con herramientas informáticas que permitieron encontrar varios motivos con una elevada semejanza a los AHAs (Arce y col., 2011). En ese trabajo también se determinó experimentalmente la funcionalidad del CTR completo de *AtHB1*, perteneciente al grupo III, pero no se identificaron los motivos dentro del CTR responsables de esta función (Arce y col., 2011).

Varios trabajos previos han demostrado, en forma indirecta, la importancia funcional *in planta* de los motivos AHA presentes en los HD-Zip I. Por ejemplo, Sakuma y col. (2010) identificaron el gen *HvHox2*, y mostraron que presenta 14 aminoácidos adicionales con respecto a su parálogo putativo *VRS1*. Cuando examinamos en detalle la secuencia proteica de este motivo, pudimos

observar que posee las características de un motivo AHA. Por otro lado, se ha mostrado que plantas mutantes del guisante de jardín (*Pisum sativum*) que no expresan el gen HD-Zip I *Tendrill less* (*TL*) desarrollan hojas en lugar de zarcillos. Este fenotipo también puede ser observado cuando el gen *TL* codifica una proteína trunca que carece de los últimos 12 aminoácidos del CTR (Hofer y col., 2009). Es de hacer notar que estos 12 residuos contienen un motivo parecido a un AHA.

La hipótesis que planteaba que los motivos identificados en los extremos de los CTRs de los FTs HD-Zip I eran motivos de tipo AHA fue corroborada experimentalmente en este trabajo. La eliminación de estos motivos en cuatro miembros de la familia de Arabidopsis produjo la pérdida de la capacidad activadora, tanto en el sistema heterólogo de levaduras como en las transformaciones transitorias de plantas. Esto representa una información novedosa, ya que los estudios previos sólo habían asignado la capacidad activadora al CTR completo de AtHB12 en Arabidopsis (Lee y col., 2001). Diferentes grupos informaron la capacidad de activar la transcripción de varios miembros HD-Zip I de Arabidopsis, como es el caso de AtHB1, AtHB5, AtHB6, AtHB12, entre otros (Aoyama y col., 1995; Lee y col., 2001; Henriksson y col., 2005). Sin embargo, en este trabajo de Tesis pudimos no sólo demostrar que son los CTRs los responsables de dicha capacidad, sino que también acotamos las regiones que ejercen la habilidad transcripcional a los aminoácidos 259-272, 230-258, 208-235 y 275-294 para AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13, respectivamente. Fue interesante encontrar distintas capacidades de activación en estos cuatro HD-Zip I así como distintos segmentos, en largo y composición, responsables de esta actividad. Estos resultados son el primer indicio de la base molecular de la diversidad funcional. También se observaron diferencias entre los cuatro FTs analizados en la posición y funcionalidad de los residuos W en estos motivos.

Un punto muy importante a destacar a partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis es que la misma proteína presenta diferencias entre los ensayos realizados entre el sistema heterólogo de levaduras y el sistema homólogo en Arabidopsis. AtHB1 perdió casi toda su capacidad de activar en plantas cuando se eliminaron los últimos 12 aminoácidos, mientras que en levaduras fue necesaria la remoción de los últimos 48 residuos o del CTR completo para obtener un resultado similar. Una de las explicaciones posibles sería que en levaduras la transactivación ocurre a través de interacciones proteína-proteína menos específicas. Por otro lado, los resultados indicaron que en algunos casos, no se detectaron diferencias entre sistema homólogo y heterólogo. Este es el caso de AtHB12 y AtHB13 cuyas versiones que carecen del AHA putativo presentaron una actividad del

25 % y del 0 % respecto a la proteína completa, respectivamente, tanto en levaduras como en plantas. Al analizar las mutaciones puntuales en los HD-Zip I estudiados, también se encontraron similitudes y discrepancias entre levaduras y plantas dependiendo del FT analizado. Para AtHB1 las mutaciones puntuales no modificaron su habilidad para transactivar en levaduras pero en plantas las mutaciones en los residuos de W provocaron una pérdida casi completa de esta capacidad. Para AtHB13, la mutante W285A-W287A presentó un efecto mucho más severo en plantas que en levaduras. El conjunto de estos resultados indicaron las limitaciones del sistema heterólogo de levaduras. Este tipo de discrepancias entre ambos sistemas también fue informado previamente por Meijer y col. (2000). Estos autores demostraron que un miembro de la subfamilia HD-Zip II, Oshox1, actuaba como represor de la transcripción en arroz, mientras que en levaduras se comportaba como un activador.

Los estudios hechos con los FTs de la familia HSF de *Arabidopsis thaliana*, arrojaron resultados similares a los descritos en este trabajo, particularmente con los miembros de la clase A (Kotak y col., 2004). Estas proteínas presentaron diferentes capacidades de activación, y comportamientos semejantes, pero no idénticos, en los ensayos de levaduras y protoplastos de tabaco, en relación a la funcionalidad y al número de motivos AHA.

De todas formas, hay que destacar que, a pesar de las discrepancias observadas entre levaduras y plantas, los cuatro HD-Zip I analizados se comportaron como activadores independientemente del sistema. Si bien las levaduras han sido ampliamente utilizadas en la caracterización de FTs de plantas, se ha informado que para algunos FTs el sistema de levaduras no fue adecuado. Un ejemplo es el de Ohta y col. (2000) que estudiaron FTs de la familia ERF (del inglés *Ethylene Response Factors*). Estos autores mostraron que ERF2 y ERF4 eran capaces de activar la transcripción tanto en levaduras como en plantas y que ERF3 era un represor en plantas, por lo que no pudo ser evaluado en levaduras. Finalmente y teniendo en cuenta que se pudo utilizar el sistema de plantas para el análisis de nuestros FTs y que éste es homólogo, concluimos que esos resultados son los más confiables.

Finalmente, la interacción demostrada entre los FTs HD-Zip I y los de la maquinaria basal, que fue diferencial para los miembros analizados indicaría que la activación transcripcional cursaría a través del reclutamiento directo de estos componentes. Esta habilidad de reclutamiento ya ha sido atribuida a otros activadores transcripcionales (Pugh, 1996).

Es interesante marcar que un ortólogo putativo de AtHB7 y AtHB12 de *Medicago truncatula*, MtHB1, reprime la transcripción de *MtLBD1* (del inglés, *LOB Binding Domain*) *in planta* (Ariel y col., 2010a) y también que AtHB5, perteneciente al clado II, regula negativamente a *BODENLOS* (De Smet y col., 2013). Ambos resultados pusieron en evidencia que los HD-Zip I pueden tener actividad represora, además de capacidad activadora. Si bien no está demostrado que un solo HD-Zip sea activador y represor, sino que distintos miembros con mucha similitud tienen una u otra actividad, es probable que así sea, que un mismo FT dependiendo del estadio de desarrollo, órgano, tejido o condición externa funcione como activador o como represor.

En conclusión, las cuatro proteínas HD-Zip I analizadas se comportan como activadores, tanto en levaduras como en plantas. Cada una presenta una distribución particular de motivos AHA y los residuos W presentan importancias diferentes para la funcionalidad del motivo en plantas. A su vez, cada uno de estos cuatro FTs interacciona con diferentes componentes de la maquinaria transcripcional basal. Por último, a partir de este trabajo se podría especular con mayor grado de certidumbre que la divergencia en los CTRs es la responsable de las diferentes funciones asignadas a estos HD-Zip I.

CAPÍTULO 2:

AtHB1, un factor de transcripción HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*, es regulado por *Phytochrome-Interacting Factor 1* para promover la elongación del hipocotilo

Introducción

La regulación de la elongación del hipocotilo

La luz es uno de los factores ambientales más importantes que afectan el desarrollo de las plantas. Además de proveer la fuente de energía para la fotosíntesis, actúa como una señal ambiental de modulación del desarrollo vegetal. En una planta dicotiledónea el hipocotilo es el tallo embrionario que forma la conexión entre las dos hojas embrionarias (también conocidas como cotiledones) y la raíz de la plántula. Este órgano posee una arquitectura simple: transversalmente, desde el haz vascular hacia afuera, tiene una capa de células endodérmicas, dos corticales y una epidérmica (figura C2-1; Gendreau y col., 1997). Desde la base hasta la parte superior, hay aproximadamente 20 células epidérmicas en un hipocotilo de *Arabidopsis*. La mayoría de dichas células se forman en el embrión. Consecuentemente, sólo ocurren pocas divisiones celulares en este órgano luego de la germinación, por lo que el hipocotilo crece principalmente a través de la expansión longitudinal de las células (Gendreau y col., 1997; Saibo y col., 2003). Este crecimiento está fuertemente influenciado por señales tanto externas como internas, tales como la luz, la gravedad, la temperatura y las fitohormonas (auxinas, citoquininas, etileno, giberelinas y brasinosteroides). Cabe destacar que la división celular sólo ocurre durante la formación estomática (Gendreau y col., 1997; Berger y col., 1998; Vandenbussche y col., 2005). Además, dependiendo de la dirección de la gravedad o del ángulo de la luz ambiental puede ocurrir un crecimiento diferencial, conocido como respuesta fototrópica (Liscum, 2002). Esto permite que el tejido aéreo de la planta se oriente y crezca lejos del suelo, en forma opuesta a la gravedad y hacia la fuente de luz fotosintética (Vandenbussche y col., 2005).

El hipocotilo de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en oscuridad se alarga hasta 10 veces respecto al tamaño que alcanza en las mismas plantas crecidas en luz. Primero se alargan las células basales y con el paso del tiempo la zona de elongación se mueve hacia el ápice (Gendreau y col., 1997). Además, las plántulas etioladas (crecidas en oscuridad) forman un gancho apical (una curvatura en la parte superior del hipocotilo) para proteger el meristema apical, tienen los cotiledones cerrados (plegados a lo largo de la nervadura) y un crecimiento reducido de la raíz (Cosgrove, 1994; Quail y col., 1995; Nemhauser y Chory, 2002). En luz, los cotiledones se abren

y se expanden, y se establece el aparato fotosintético (Cosgrove, 1994; Quail y col., 1995; Nemhauser y Chory, 2002). A su vez, el crecimiento del hipocotilo se inhibe fuertemente por la luz, principalmente a través de la activación de los fotorreceptores de la planta, particularmente los fitocromos (phy) y los criptocromos (cry), que absorben luz roja/roja lejana y azul, respectivamente (Nemhauser y Chory, 2002; Wang y Deng, 2002).

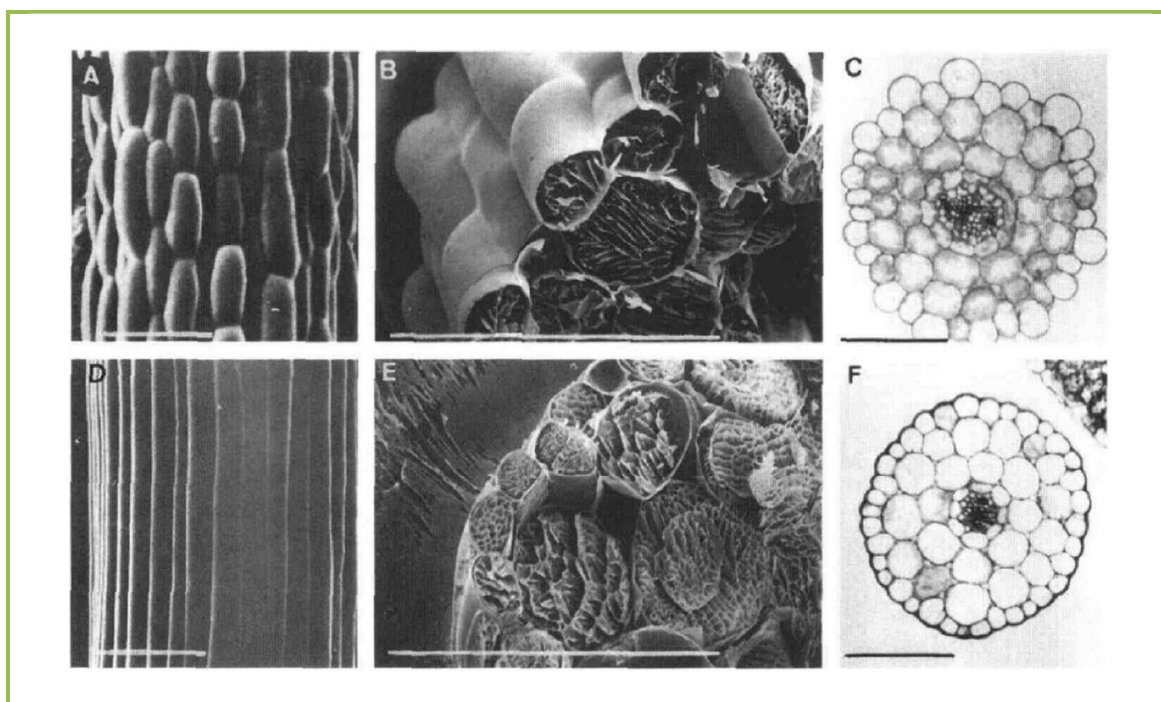


Figura C2-1. El hipocotilo de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de luz u oscuridad

Estructura celular del hipocotilo de plántulas salvajes crecidas en presencia (A-C) o ausencia de luz (D-F). Se muestran secciones longitudinales tomadas por microscopía electrónica de barrido (A, B, D y E) y transversales tomadas por microscopía óptica (C y F) de plántulas crecidas durante 7 días en luz o en oscuridad. Para B y F, los hipocotilos se fracturaron antes de su análisis por microscopía electrónica de barrido. La barra de escala es de 100 μm . Adaptado de Gendreau y col., 1997

Uno de los mecanismos a través de los cuales los fitocromos afectan el crecimiento y el desarrollo de las plantas es la modulación de la actividad y la abundancia de los FTs de tipo MYC que pertenecen a la familia bHLH (del inglés, *basic helix-loop-helix*) subfamilia 15, denominada *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS* (PIFs; Castillon y col., 2007; Bae y Choi, 2008). En oscuridad, las proteínas PIFs se acumulan en el núcleo y promueven la elongación celular en el hipocotilo, mientras que en luz, interaccionan con Pfr lo que dispara su rápida fosforilación. Esta modificación post-traduccional puede marcar las PIFs para ubiquitilación y degradación por el

proteosoma o, alternativamente, puede inhibir su capacidad de unir ADN, lo que conlleva a un arresto de la elongación del hipocotilo (Bauer y col., 2004; Park y col., 2004; Shen y col., 2005; Al-Sady y col., 2006; Oh y col., 2006; Nozue y col., 2007; Shen y col., 2007; Lorrain y col., 2008; Shen y col., 2008; Li y col., 2012).

El máximo crecimiento de los hipocotilos ocurre en oscuridad continua. Según la bibliografía, la cuádruple mutante *pif1/pif3/pif4/pif5* (conocida como *pifq*) presenta un fenotipo semejante a la fotomorfogénesis constitutiva cuando estas plantas mutantes se crecen en condiciones de completa oscuridad (Leivar y col., 2008b; Shin y col., 2009). En cambio, en plantas crecidas en ciclos de luz/oscuridad, la extensión del crecimiento del hipocotilo depende de la longitud del período de oscuridad, y de la acción de PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5 (Nozue y col., 2007; Niwa y col., 2009; Soy y col., 2012; Soy y col., 2014). Además, los transcritos de PIF1 presentan un nivel constitutivo en condiciones de día corto y las oscilaciones impuestas por phy en la abundancia proteica de PIF1 determinan la acumulación de esta última y su acción durante la noche (Soy y col., 2014).

Los factores de transcripción HD-Zip I: el caso particular del gen *Arabidopsis thaliana* *Homeobox 1 (AtHB1)*

AtHB1 pertenece al grupo III de la subfamilia I y actúa como un activador transcripcional (Arce y col., 2011). Las mutaciones puntuales en el CTR de AtHB1, seguidas por ensayos de activación en levaduras y en plantas, indicaron que este FT es capaz de interactuar con AtTBP2, un componente de la maquinaria transcripcional basal. Con respecto a la expresión de este gen, es reprimido por NaCl y bajas temperaturas, y es inducido por oscuridad (Henriksson y col., 2005). Aoyama y col. (1995) mostraron que la sobre-expresión de *AtHB1* en plantas de tabaco afecta el desarrollo de las células del parénquima en empalizada y confiere un fenotipo de fotomorfogénesis constitutiva cuando las plantas son crecidas en oscuridad. Por lo tanto, AtHB1 fue propuesto como un FT involucrado en el desarrollo de las hojas y en la percepción de la luz (Aoyama y col., 1995). A pesar de que estos estudios contribuyeron al conocimiento de la función de AtHB1, nada más se informó sobre este gen y, hasta la fecha, su papel en el desarrollo de *Arabidopsis* sigue siendo desconocido.

Resultados

***AtHB1* se expresa principalmente en hipocotilo y tejido radicular**

Con el objeto de caracterizar la función de *AtHB1*, la primera estrategia de estudio fue determinar su patrón de expresión a lo largo del ciclo de vida. Para ello, aislamos mediante PCR la región génica que contiene el promotor de *AtHB1* (1052 pb) seguido del primer exón que contiene la región 5' no codificante (365 pb), utilizando como molde ADN genómico de *Arabidopsis thaliana* (la secuencia se muestra en el Anexo I). Este número de nucleótidos fue definido en base a la existencia de secuencias satélites que podrían deberse al comienzo del gen corriente arriba. Si bien las secuencias de los elementos reguladores de los promotores de plantas se encuentran poco caracterizadas aún, la comparación de la región promotora de *AtHB1* con las existentes en las base de datos PLACE indicó la existencia de elementos en *cis* involucrados en la respuesta a diversos factores. Por ejemplo, se encontraron cinco elementos putativos de respuesta a luz, denominados E-Box (Hartmann y col., 2005), y un elemento de respuesta al ritmo circadiano del gen *LHC* de tomate (*Circadian LeLHC*; Piechulla y col., 1998). Una vez aislado dicho fragmento, generamos una construcción genética en la cual la región promotora de *AtHB1* dirige la expresión de los genes reporteros *Proteína Fluorescente verde* (*GFP*; del inglés, *Green Fluorescence Protein*) y β -*Glucuronidasa* (*GUS*), denominada *PromAtHB1::GUS*. Con esta construcción, se obtuvieron las plantas transgénicas homocigotas de *Arabidopsis* y se las analizó por reacción histoquímica de GUS en distintos estadios de desarrollo en condiciones normales de crecimiento. En plántulas de cuatro días post-germinación se detectó la expresión del reportero en los hipocotilos, en el tejido vascular de las raíces y en sus ápices (figura C2-2a), mientras que en plantas maduras la expresión se visualizó en las anteras.

Los niveles de transcripto de *AtHB1* aumentan en oscuridad (Henriksson y col., 2005) y la información disponible en bases de datos de microarreglos indica que las condiciones de día corto también inducen la expresión de este gen. Estos estudios previos nos llevaron a plantear la posibilidad de regulación de *AtHB1* por el fotoperíodo en general. Para abordar experimentalmente esta hipótesis, se crecieron plántulas transformadas con la construcción *PromAtHB1::GUS* en regímenes de fotoperíodo largo y corto durante cuatro días. A estas plántulas se les extrajeron las

proteínas totales y se analizaron por fluorimetría. Como control negativo, se utilizaron plántulas transformadas con una construcción que no expresa el gen reportero *GUS*, el vector *pKGWFS7*. El análisis de la actividad de GUS mostró que la expresión de *AtHB1* se induce en condiciones de día corto comparadas con las de día largo (figura C2-2b). Consecuentemente, cuantificamos los niveles de transcripto de *GUS* y de *AtHB1* por RT-PCR en tiempo real en ARNs obtenidos a partir de las mismas plántulas, y los resultados indicaron, en forma consistente con los ensayos fluorométricos, que los transcriptos correspondientes a ambos genes (*GUS* y *AtHB1*) también se inducen en condiciones de día corto. Además se analizaron por histoquímica las plantas transgénicas *PromAtHB1::GUS*, crecidas en un régimen de día corto, indicando que la expresión de *GUS* se produce en los mismos tejidos, aunque con una mayor intensidad.

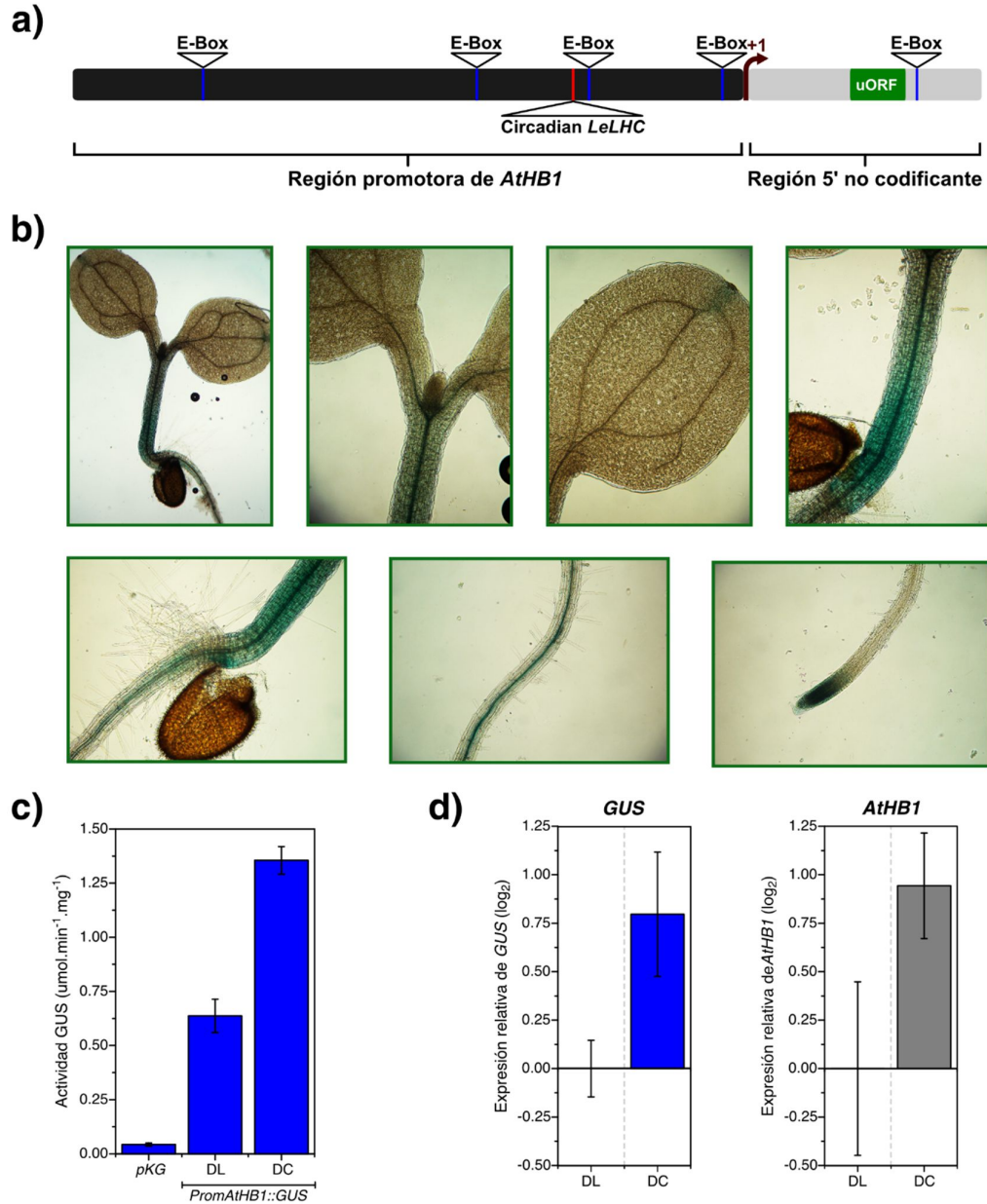
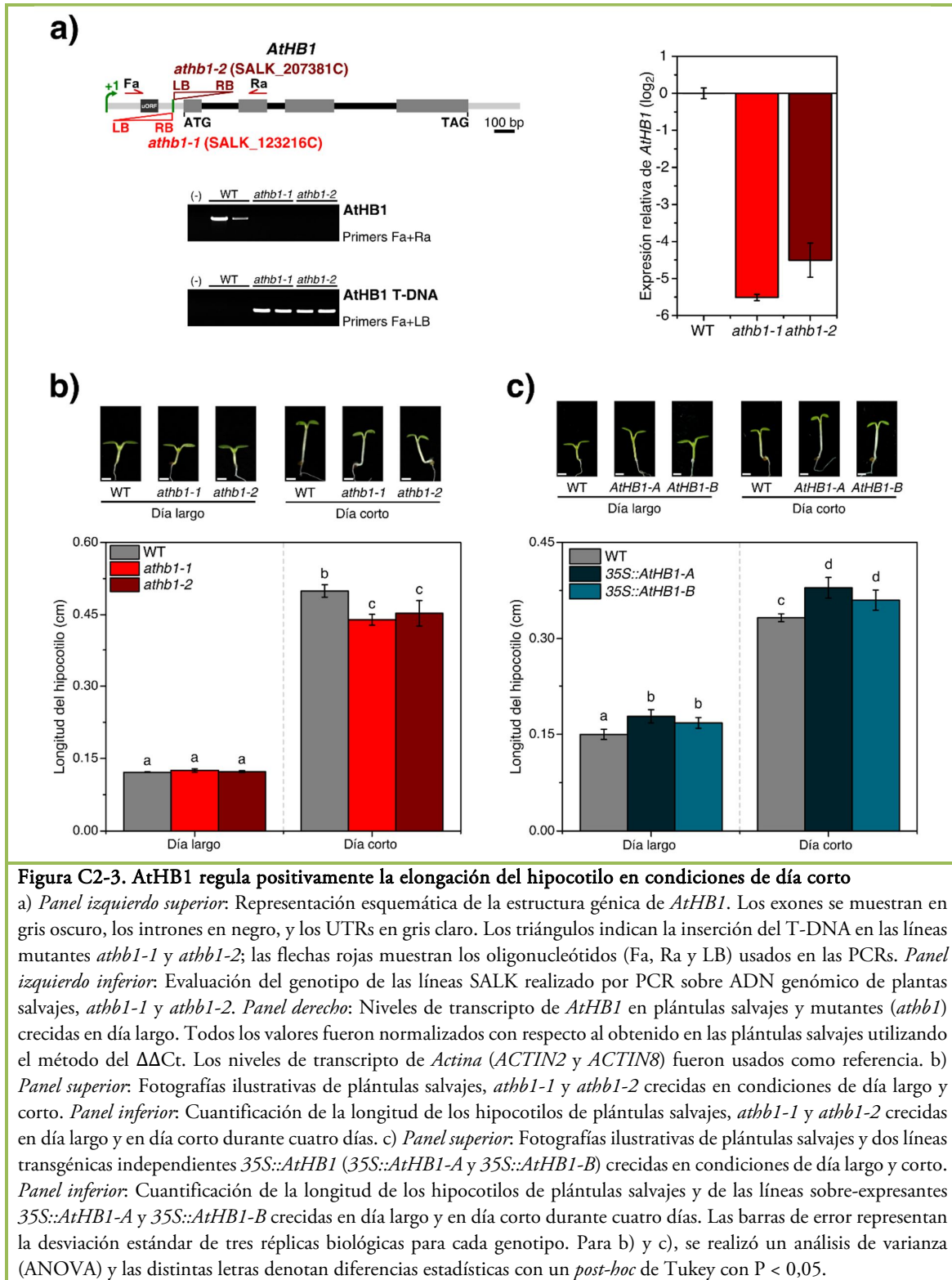


Figura C2-2. *AtHB1* se expresa en hipocotilos, vasculatura y el ápice de la raíz, y su expresión se induce en condiciones de día corto

a) Esquema de la región promotora de *AtHB1* (gris oscuro) junto con la región 5' no codificante (gris claro). En verde se resalta un marco de lectura abierto corriente arriba (uORF) de la región codificante de *AtHB1*, conocido como CPuORF33. Los elementos de respuesta a la luz (E-box) y al ritmo circadiano (Circadian *LeLHC*) se muestran en color azul y rojo, respectivamente. b) El patrón de expresión de *AtHB1* analizado por detección histoquímica de la actividad enzimática de GUS en plántulas *PromAtHB1::GUS* crecidas en día largo (DL) durante cuatro días. c) Análisis fluorométrico de la actividad GUS en extractos proteicos de plántulas *PromAtHB1::GUS* o una construcción con GUS sin promotor (*pKG*, usado como control negativo) crecidas en DL o día corto (DC) durante cuatro días. d) Niveles de transcripto de *GUS* (panel izquierdo) y de *AtHB1* (panel derecho) cuantificados por RT-PCR en tiempo real utilizando ARN aislado de plántulas *PromAtHB1::GUS* crecidas en un régimen de día corto o de día largo. Todos los valores fueron normalizados con respecto al obtenido en DL utilizando el método del $\Delta\Delta Ct$. Los niveles de transcripto de *Actina* (*ACTIN2* y *ACTIN8*) fueron usados como referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes.

AtHB1 juega un rol en la elongación del hipocotilo

Considerando el patrón de expresión de *AtHB1*, la inducción de esta expresión por condiciones de fotoperíodo corto y la relación entre la elongación del hipocótilo y las condiciones de iluminación, decidimos analizar si este FT regula de alguna manera la elongación del hipocotilo. El primer paso en la estrategia de estudio fue la obtención y el análisis de dos líneas de plantas mutantes homocigotas (*athb1-1* y *athb1-2*) que no expresan el gen *AtHB1*. Estas líneas se obtuvieron en el centro ABRC, se corroboró la presencia del T-DNA y se las llevó a homocigosis. Las inserciones y la homocigosis se evaluaron por PCR sobre ADN genómico (figura C2-3a). Ambas mutantes presentan la inserción del T-DNA en zonas muy cercanas de la región 5' no codificante (5' UTR) lo que resultó en una reducción de los transcritos de aproximadamente 20 veces comparadas con sus pares salvajes (figura C2-3a). A continuación se midieron las longitudes de los hipocotilos de plántulas salvajes y mutantes *athb1* crecidas en condiciones de día largo y día corto durante cuatro días. Bajo un régimen de día corto, las mutantes *athb1-1* y *athb1-2* presentaron hipocotilos más cortos que las plántulas salvajes, mientras que en condiciones de día largo no se detectaron diferencias entre los distintos genotipos (figura C2-3b). Para investigar más a fondo la función de *AtHB1*, se obtuvieron plantas transgénicas que sobre-expresan este gen (*35S::AtHB1-A* y *35S::AtHB1-B*) y se las caracterizó en las mismas condiciones. Estas plántulas exhibieron hipocotilos más largos que los controles salvajes, tanto en condiciones de día largo como de día corto (figura C2-3c). Sin embargo, no se pudieron encontrar otras características fenotípicas evidentes ni en las plantas mutantes ni en las sobre-expresantes de *AtHB1* cuando fueron crecidas en condiciones de día largo, indicando que la función del gen en el evento de elongación del hipocotilo está relacionada con las condiciones de fotoperíodo.



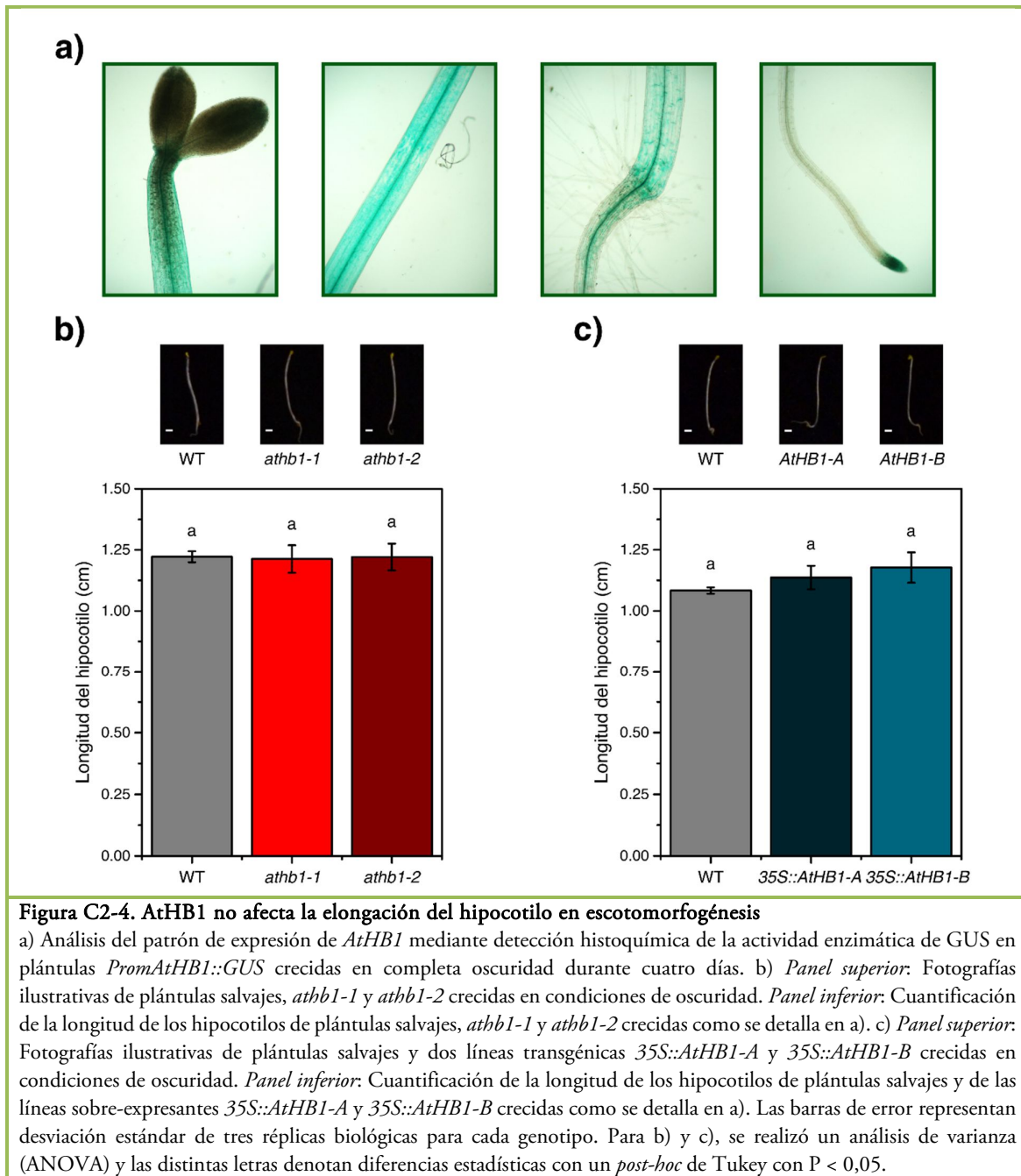
Para evaluar si el fenotipo de fotomorfogénesis constitutiva observado en plantas de tabaco por el Aoyama y col. (1995) estaba conservado en *Arabidopsis* y con el objetivo de corroborar que

AtHB1 estaba involucrado en la escotomorfogénesis, se analizaron el patrón de expresión de *AtHB1* y el fenotipo de plántulas mutantes y sobre-expresantes en condiciones de etiolación. La tinción histoquímica de GUS indicó que *AtHB1* se expresa en los hipocotilos y las raíces cuando las plántulas *PromAtHB1::GUS* fueron crecidas en condiciones de completa oscuridad durante cuatro días (figura C2-4a), en forma semejante a lo observado en plántulas de-etioladas. Por otro lado, a diferencia de la fotomorfogénesis constitutiva observada en las plantas de tabaco (Aoyama y col., 1995), las plántulas *athb1* y *35S::AtHB1* no mostraron diferencias significativas comparadas con los controles salvajes cuando se las creció en oscuridad absoluta (figuras C2-4b y C2-4c).

El conjunto de estos resultados sugiere que AtHB1 parecería actuar como un regulador positivo del crecimiento del hipocotilo durante la fotomorfogénesis, especialmente en condiciones de día corto. Por otro lado, este FT parece no estar participando del proceso de escotomorfogénesis en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

PIF1 actúa corriente arriba de AtHB1 y regula positivamente su expresión

Los factores de transcripción similares a Myc del tipo bHLH conocidos como PIFs tienen un papel central en la regulación negativa del desarrollo fotomorfogénico y promueven la elongación del hipocotilo en respuesta a la oscuridad. Según un trabajo de Oh y col. (2009) en el cual se informan los resultados de un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de un microarreglo de ADN de (*ChIP-chip*), PIF1 es capaz de reconocer y unir la región promotora de *AtHB1*; sin embargo, no regula a nivel transcripcional a este HD-Zip I en el sistema de semillas embebidas que utilizaron estos autores. Dado que PIF1 y AtHB1 participan del control del crecimiento del hipocotilo, nos preguntamos si PIF1 (también conocido como PIL5) podría regular la expresión de *AtHB1* en plántulas crecidas en un régimen de día largo y de día corto. Para ello, se obtuvieron dos líneas mutantes insercionales en *pif1* (anteriormente llamadas *pil5-2* y *pif1-2*) y se las germinó en ambos fotoperíodos durante cuatro días. Luego, se cuantificó la expresión de *AtHB1* por RT-PCR en tiempo real. Como se muestra en la figura C2-5a, tanto las plántulas mutantes *pil5-2* como las *pif1-2* presentaron menores niveles de expresión de *AtHB1* comparados con los medidos en las plantas salvajes en las dos condiciones ensayadas.



Como segunda estrategia para investigar la regulación putativa de *AtHB1* por PIF1, se realizaron co-transformaciones transitorias en hojas de *Nicotiana benthamiana*, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción *PromAtHB1::GUS* junto a construcciones en las que el promotor *35S CaMV* se fusionó al ADNc de *PIF1* o *mGFP* (*35S::PIF1* o *35S::mGFP*, respectivamente); al vector vacío *pKGWFS7*, que posee el gen reportero *GUS* sin un promotor, se lo utilizó como control negativo. Luego de la infiltración, las plantas de tabaco fueron crecidas en

condiciones de día largo o día corto, y dos días post-infiltración se cuantificó la actividad GUS. Las medidas de actividad enzimática de las hojas co-transformadas con *PromAtHB1::GUS* más *35S::mGFP* fue positiva lo que indica que la región promotora de *AtHB1* pudo dirigir la expresión de *GUS* en este tejido de tabaco. Además, esta actividad fue mayor en un régimen de día corto, comparada con día largo (figura C2-5b), en forma consistente con los resultados obtenidos previamente.

En cuanto a la acción de *35S::PIF1* sobre la actividad de *PromAtHB1::GUS*, ésta fue positiva, incrementando los niveles GUS hasta tres veces por sobre el control *PromAtHB1::GUS* más *35S::mGFP* (figura C2-5b), tanto en condiciones de día largo como de día corto. Estos resultados indicaron que la expresión ectópica de *PIF1* afecta positivamente la actividad del promotor de *AtHB1* en el sistema heterólogo de tabaco.

Cuando se analizó el fenotipo de plántulas del genotipo salvaje y de los genotipos mutantes, *athb1-1*, *pil5-2* y *pif1-2* se pudo observar que las plántulas *pif1* exhiben hipocotilos más cortos que sus pares salvajes cuando son crecidas en condiciones de día corto, en forma similar a lo observado en las plantas mutantes *athb1-1* (figura C2-5c). En cambio, en condiciones de día largo no se observaron diferencias significativas entre los distintos genotipos. En conjunto, estos resultados sugieren que *AtHB1* podría ser un blanco de *PIF1* involucrado en la regulación del crecimiento del hipocotilo.

Con el fin de analizar si las otras proteínas PIF también regulan la expresión de *AtHB1* se cuantificó la expresión de este HD-Zip I en mutantes simples (*pif1-2*, *pif3-7*, *pif4-2*, *pif5-3*) y en la cuádruple (*pifq*) de *pif* crecidas en condiciones de día corto. Estos resultados mostraron que *pif1-2*, *pif5-3* y *pifq* tienen menores niveles de transcripto de *AtHB1* que los controles salvajes, mientras que *pif3-7* y *pif4-2* no mostraron diferencias significativas (figura C2-6a). Además, los análisis fenotípicos de plántulas salvajes y mutantes de cuatro días de edad crecidas en oscuridad, día largo y día corto, indicaron que el fenotipo de longitud de los hipocotilos de *athb1-1* fue similar al observado en las mutantes simples *pil5-2*, *pif1-2* y *pif5-3* (figuras C2-6b, C2-6c y C2-6d). Estos resultados sugirieron que tanto *PIF1* como *PIF5* podrían estar regulando la expresión de *AtHB1*. En base a los datos experimentales obtenidos y a que *PIF1* reconoce la región promotora de *AtHB1* (Oh y col., 2009), mientras que lo mismo no fue informado para *PIF5* (Hornitschek y col., 2012), decidimos continuar estudiando la relación existente entre *PIF1* y *AtHB1*.

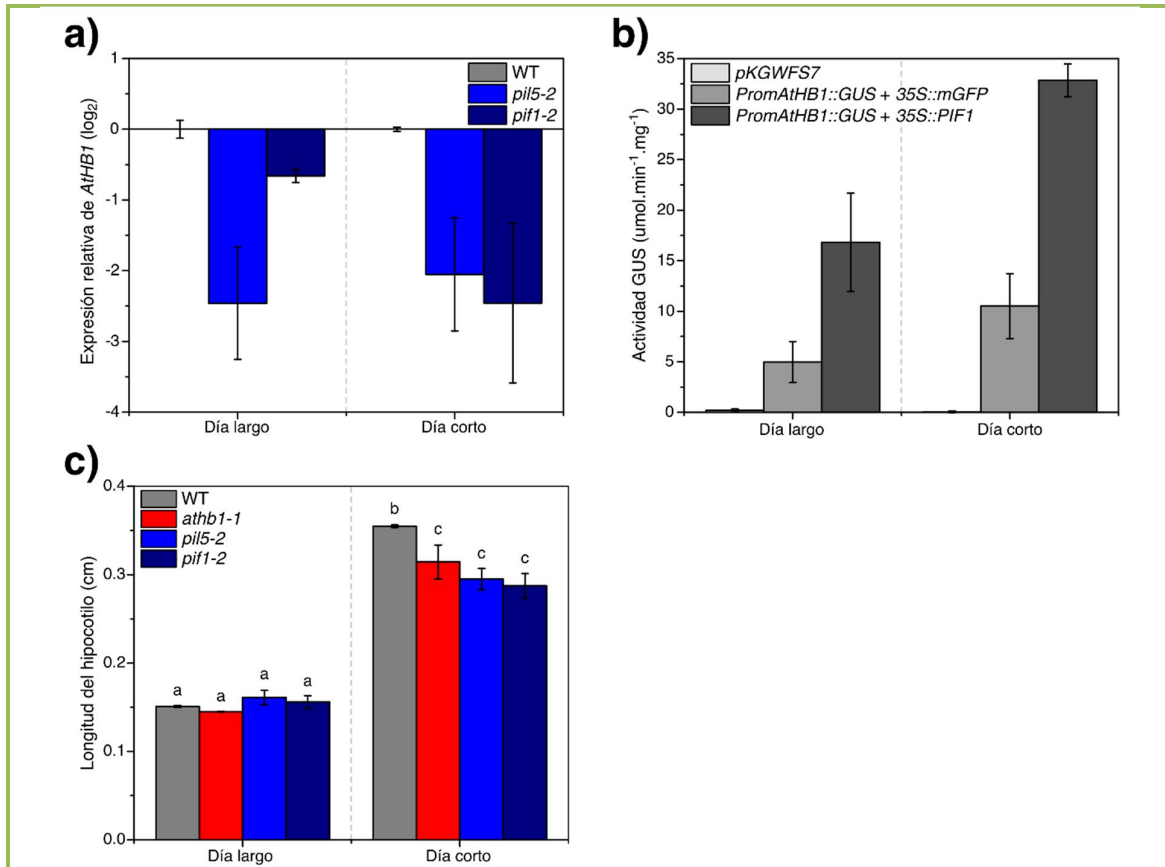


Figura C2-5. PIF1 regula positivamente la expresión de *AtHB1*

a) Niveles de transcripto de *AtHB1* en plántulas salvajes y mutantes *pif1* (*pil5-2* y *pif1-2*) de cuatro días crecidas en condiciones de día largo o de día corto. Todos los valores fueron normalizados con los de las plántulas salvajes aplicando el método del $\Delta\Delta C_t$. b) Actividad de GUS evaluada por fluorometría en extractos proteicos de hojas de plantas de tabaco de dos semanas co-transformadas con *A. tumefaciens* que contenían *PromAtHB1::GUS* o *GUS* sin promotor (*pKGWFS7*) combinados con *35S::mGFP* o *35S::PIF1*. c) Cuantificación de la longitud del hipocotilo en plántulas salvajes, *athb1-1*, *pil5-2* y *pif1-2* crecidas como se indica en a). Las barras de error representan la desviación estándar de cinco réplicas biológicas para b), y de tres réplicas biológicas para cada a) y c). Para c), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las distintas letras denotan diferencias estadísticas con un *post-hoc* de Tukey con $P < 0,05$.

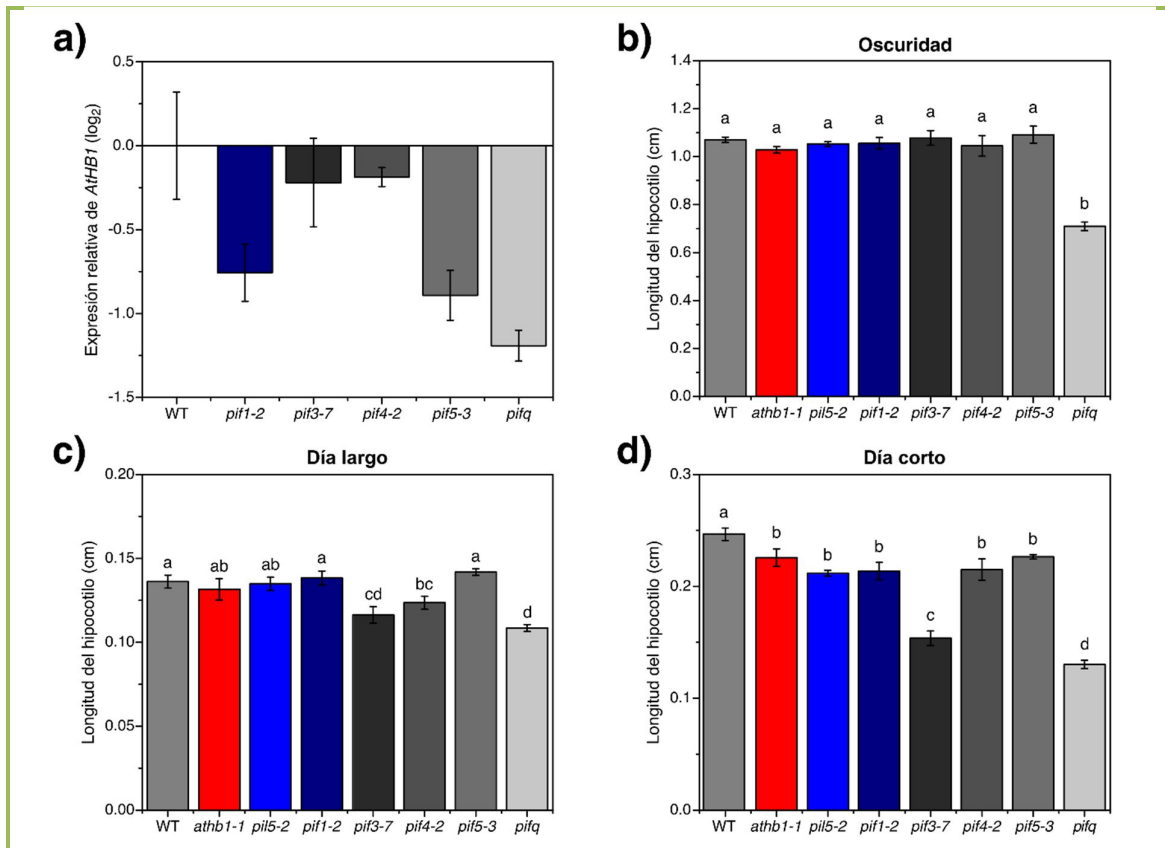


Figura C2-6. La longitud del hipocotilo se encuentra afectada en algunas mutantes *pif*

a) Niveles de transcritos de *AtHB1* en plántulas salvajes y mutantes *pif1-2*, *pif3-7*, *pif4-2*, *pif5-3* y *pifq* de cuatro días crecidas en condiciones de día corto. Todos los valores fueron normalizados con los obtenidos en las plántulas salvajes aplicando el método del $\Delta\Delta C_t$. b), c) y d) Cuantificación de la longitud del hipocotilo de plántulas salvajes, *athb1-1*, *pil5-2*, *pif1-2*, *pif3-7*, *pif4-2*, *pif5-3* y *pifq*, crecidas durante cuatro días en oscuridad (b), día largo (c) y día corto (d). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Para b), c) y d), se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las distintas letras denotan diferencias estadísticas con un *post-hoc* de Tukey con $P < 0,05$.

Dadas las evidencias experimentales que indicaban que PIF1 actúa corriente arriba de AtHB1 en el control de la elongación del hipocotilo, y con el objeto de verificar esta relación entre los dos FTs y el evento de desarrollo, se transformaron plantas salvajes y mutantes *athb1-1* con una construcción que permite sobre-expresar *PIF1* (*35S::PIF1*). Se obtuvieron tres líneas independientes para cada genotipo (denominadas A, B y C), y se procedió a su análisis fenotípico. La comparación de la longitud de los hipocotilos en plántulas de cuatro días crecidas en condiciones de día largo y de día corto, resultó en que las plántulas *35S::PIF1* en el fondo genético salvaje exhibieron hipocotilos más largos que los controles sin transformar; pero en el fondo *athb1-1* no se observaron diferencias significativas (figuras C2-7a y C2-7b). Estas observaciones reforzaron las

anteriores indicando que AtHB1 es necesario para la regulación del crecimiento del hipocotilo mediada por PIF1.

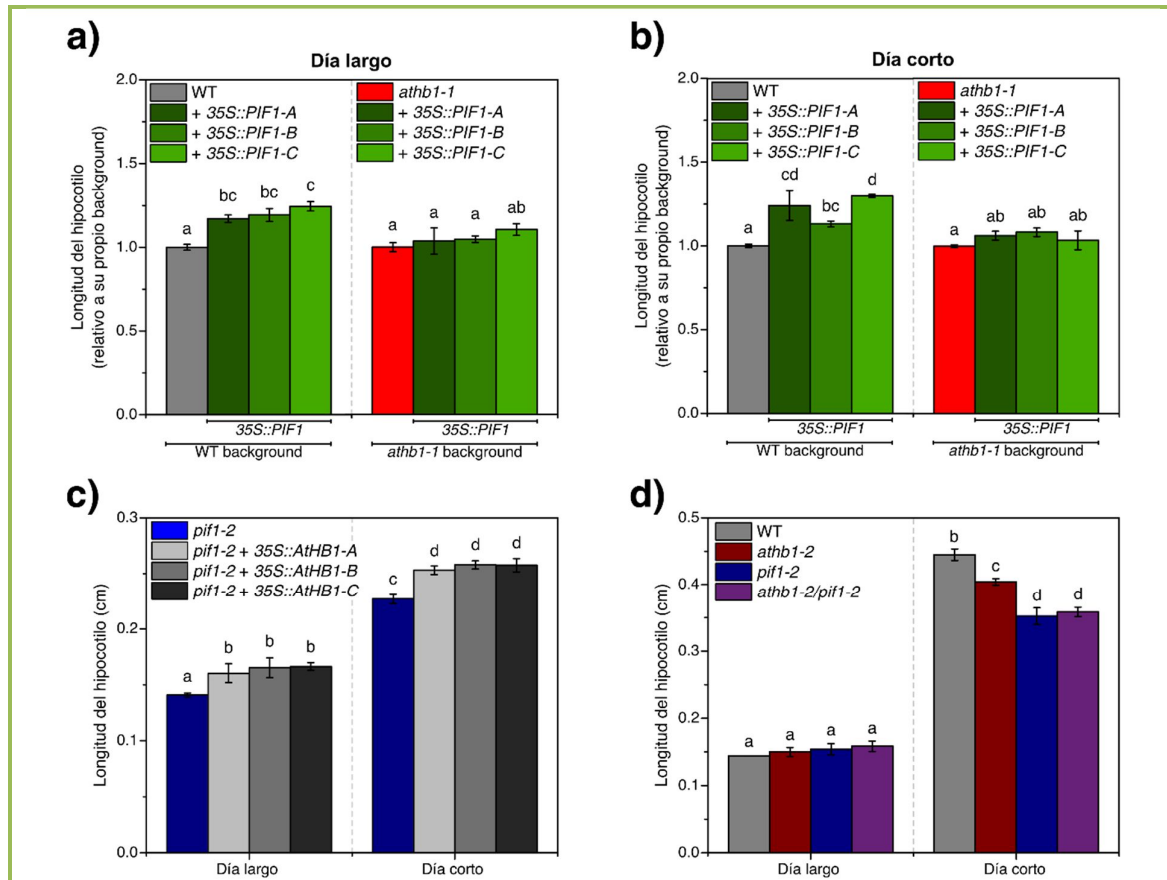


Figura C2-7. AtHB1 actúa corriente abajo de PIF1 en la regulación de la longitud del hipocotilo

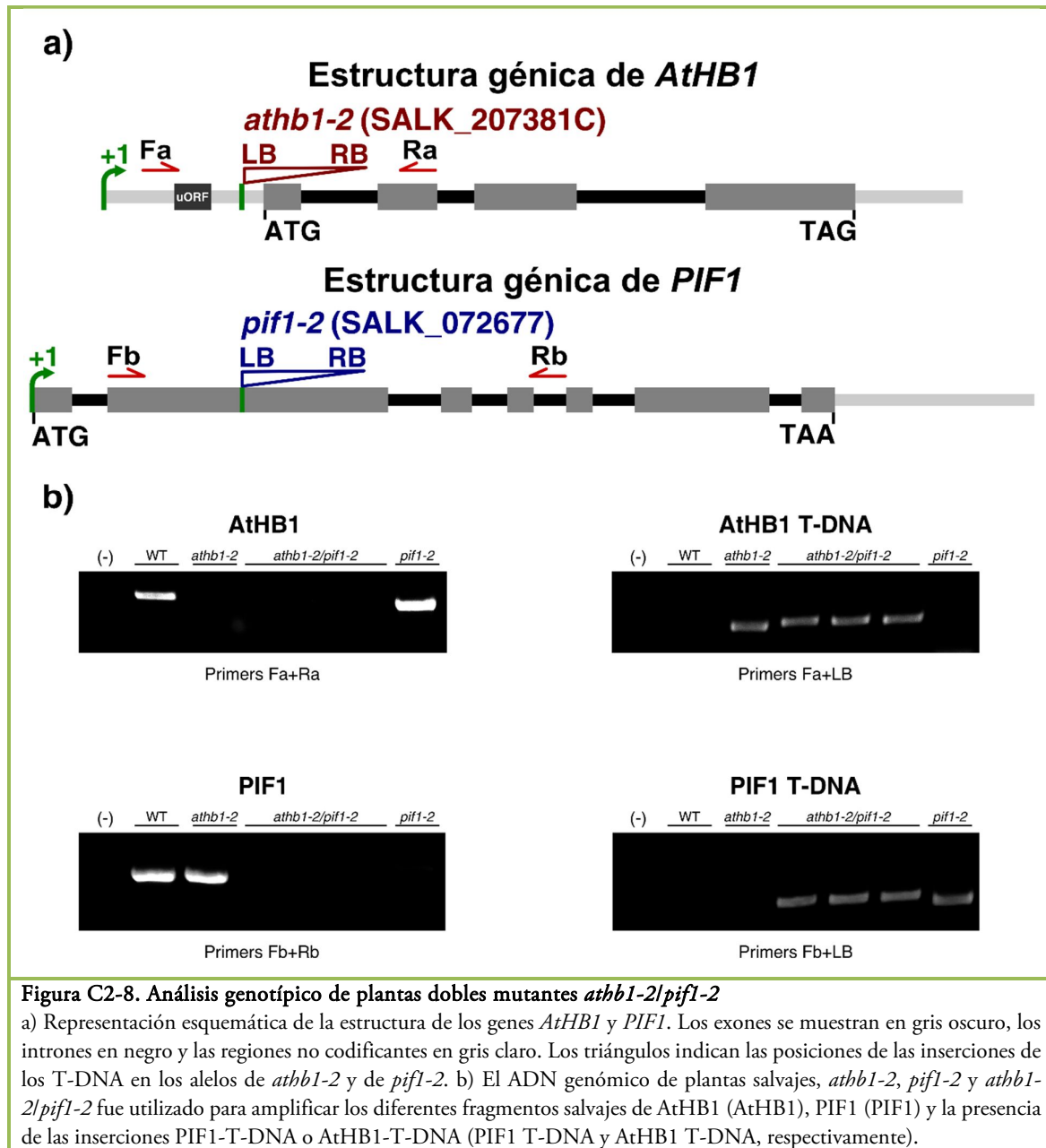
a) y b) Cuantificación de la longitud de los hipocotilos de plántulas salvajes, *athb1-1* y tres líneas transgénicas independientes *35S::PIF1* (A, B, C) sobre fondo genético salvaje o *athb1-1*. Las plántulas fueron crecidas en día largo en a) y en día corto en b) durante cuatro días. Los valores están expresados como una proporción de lo cuantificado para cada genotipo sin transformar, al que se le dio arbitrariamente el valor unitario. c) Cuantificación de la longitud de los hipocotilos de plántulas mutantes *pif1-2* de cuatro días y de tres líneas transgénicas independientes *35S::AtHB1* (A, B, C) obtenidas en un fondo genético *pif1-2*. d) Cuantificación de la longitud de los hipocotilos de plántulas salvajes, *athb1-2*, *pif1-2* y *athb1-2/pif1-2* crecidas durante cuatro días en día largo y en día corto. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas para cada genotipo. Para todos los puntos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y las distintas letras denotan diferencias estadísticas con un *post-hoc* de Tukey con $P < 0,05$.

En paralelo y complementando los estudios anteriores se transformaron plantas mutantes *pif1-2* con la construcción *35S::AtHB1* y se obtuvieron tres líneas independientes, denominadas A, B y C; posteriormente, estas plantas fueron crecidas bajo dos diferentes condiciones fotoperiódicas. En las plántulas de cuatro días analizadas, la sobre-expresión de *AtHB1* promovió el crecimiento del

hipocotilo aún en ausencia de una proteína PIF1 funcional y en una forma independiente del fotoperíodo (figura C2-7c).

Por último, se realizaron cruces entre las plantas mutantes *athb1-2* y *pif1-2* para generar la doble mutante *athb1-2/pif1-2*. Una representación esquemática de la estructura génica de *AtHB1* y *PIF1*, así como las reacciones de PCR realizadas para corroborar las mutaciones, se muestran en la figura C2-8. Al ser crecidas en condiciones de día corto, los hipocotilos de la doble mutante *athb1-2/pif1-2* fueron más cortos que los de las salvajes y las mutantes *athb1-2*, y semejantes a los de las mutantes simples *pif1-2*. Por otro lado, crecidas en un fotoperíodo de día largo, los distintos genotipos no mostraron diferencias significativas.

Tomados en conjunto, estos resultados indicaron que PIF1 regula la expresión de *AtHB1* y ambos FTs participan de una vía de señalización que controla la elongación del hipocotilo.



***AtHB1* regula el crecimiento del hipocotilo mediante la regulación de genes involucrados en la elongación celular**

Para poder comprender a nivel molecular cómo *AtHB1* afecta el crecimiento del hipocotilo en plántulas de *Arabidopsis thaliana*, decidimos realizar un ensayo de RNA-Seq utilizando plántulas salvajes y mutantes *athb1-1* de cuatro días crecidas en un régimen de día corto, por ser ésta la condición en la que fueron detectadas las mayores diferencias entre el genotipo salvaje y mutante. Se detectó un conjunto de 426 genes regulados diferencialmente con una inducción o represión de

dos veces o más. Sin embargo, sólo 22 genes se mostraron inducidos y 24 reprimidos con lecturas confiables (tablas C2-1 y C2-2). Los resultados del RNA-Seq fueron validados por RT-PCR en tiempo real, utilizando alguno de los genes expresados diferencialmente (figura C2-9).

Entre los genes regulados diferencialmente, 15 presentan elementos en sus regiones promotoras que se parecen parcialmente a la secuencia unida *in vitro* con máxima afinidad por los HD-Zip I, CAAT(A/T)ATTG (Sessa y col., 1993; Palena y col., 1999).

En cuanto a la función de estos genes regulados, algunos habían sido descritos como moduladores de la elongación celular, particularmente en la composición y elongación de la pared celular. Éstos fueron *PATATIN-LIKE PROTEIN 4 (PLP4, At4g37050; Rietz y col., 2010; Li y col., 2011)*, *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 26 (XTH26, At4g28850; Maris y col., 2009)* y *GAUT12 (At5g54690, también conocido como IRX8; Persson y col., 2007)*. Notoriamente, estos genes estaban inducidos en las plántulas *athb1-1*. Por otro lado, el gen *CRUCIFERIN3* que codifica una proteína de almacenamiento 12S (*CRU3, At4g28520*), se encontraba reprimido en las plantas mutantes.

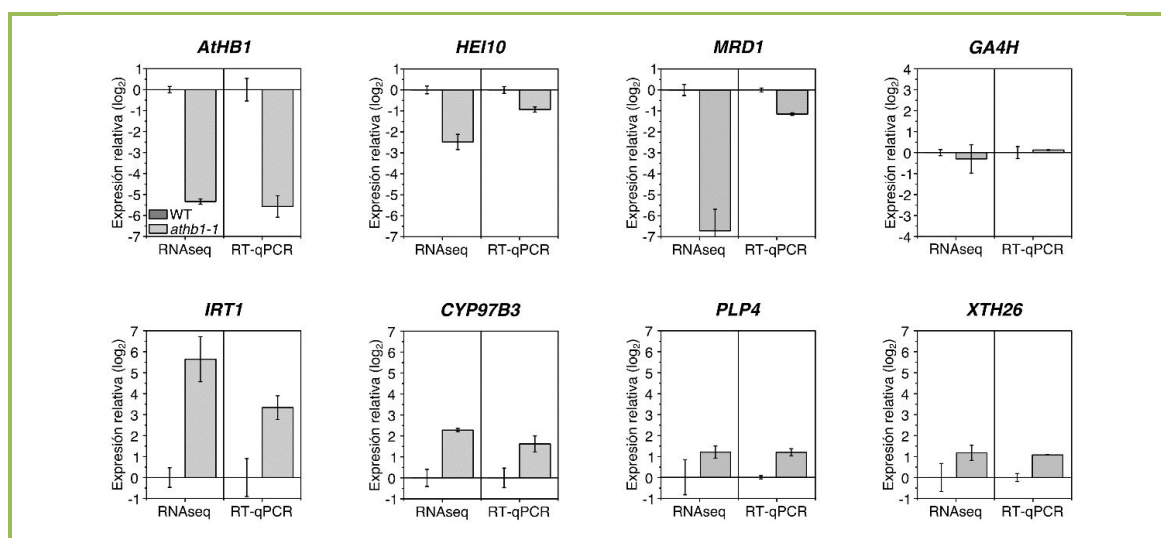


Figura C2-9. AtHB1 promueve la elongación del hipocotilo regulando genes involucrados en elongación celular

Niveles de transcritos de varios genes de Arabidopsis cuantificados por RNA-Seq y validados por RT-PCR en tiempo real utilizando ARN total aislado a partir de plántulas salvajes y mutantes *athb1-1* crecidas en día corto durante cuatro días. Todos los valores fueron normalizados con respecto al obtenido en las plántulas salvajes utilizando el método del $\Delta\Delta C_t$. Los niveles de transcritos de *Actina (ACTIN2 y ACTIN8)* fueron usados como referencia. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas para cada genotipo. *HEI10, ENHANCER OF CELL INVASION NO.10 (At1g53490); MRD1, MTO 1 RESPONDING DOWN 1 (At1g53480); GA4H, GIBBERELLIN 3-OXIDASE 2 (At1g80340); IRT1, IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (At4g19690); CYP97B3, CYTOCHROME P450 FAMILY 97 SUBFAMILY B POLYPEPTIDE 3 (At4g15110); PLP4, PATATIN-LIKE PROTEIN 4 (At4g37050); XTH26, XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 26 (At4g28850).*

Tabla C2-1. Lista de genes de expresión inducida en las plántulas mutantes *athb1-1*

Código AGI	Nombre	Veces de inducción	Valor p	Caja HD-Zip
At4g19690	IRT1	56.64	8.79E-20	TAATTATTG
At5g35935		12.49	2.37E-68	CAATTATTA
At5g42770	Maf-like protein	7.08	1.54E-26	
At4g15110	CYP97B3	4.74	1.02E-42	
At2g30750	CYP71A12	3.15	7.95E-04	TAATTATTA
At4g37050	PLP4	2.99	2.10E-03	
At2g01020	rRNA	2.92	1.06E-03	
At3g51760		2.53	1.36E-04	
At1g29020		2.50	1.09E-05	
At2g23410	ACPT	2.45	5.55E-04	
At1g26380	T1K7.24	2.44	8.49E-06	
At1g26240	F28B23.10	2.43	3.61E-04	CAATAATTG
At3g27940	LBD26	2.20	2.77E-04	
At3g12860		2.19	3.93E-03	
At4g28850	XTH26	2.19	2.53E-03	CAATAATTG
At3g07070		2.12	6.79E-04	
At1g18140	LAC1	2.07	2.67E-02	
At4g01525	SADHU5-1	2.07	1.03E-03	
At2g37870	T8P21.22	2.07	2.39E-04	
At5g54690	GAUT12	2.06	3.06E-04	
At1g74490	F1M20.17	2.04	6.41E-03	
At5g45960		2.04	4.73E-04	
At1g21120	T22I11.5	2.01	3.43E-05	TAATTATTA

Tabla C2-2. Lista de genes de expresión reprimida en las plántulas mutantes *athb1-1*.

Código AGI	Nombre	Veces de represión	Valor-p	Caja HD-Zip
At3g01345		0.004	0.00E+00	
At1g53480	MRD1	0.007	2.04E-32	
At4g28520	CRU3	0.030	7.28E-05	
At1g53490	HEI10	0.182	1.25E-17	TAATAATTA
At5g35660		0.218	3.63E-04	
At2g18540		0.236	1.48E-04	TAATTATTG
At3g28790		0.256	3.53E-06	TAATTATTA
At5g59310	LTP4	0.265	2.01E-05	
At1g52270	F19K6.11	0.317	2.74E-08	TAATTATTA
At5g35940		0.334	2.12E-14	
At5g07330	T2I1_40	0.364	1.30E-05	
At5g59660		0.372	4.71E-04	
At5g33370		0.391	6.46E-05	TAATTATTA
At4g16745		0.410	1.96E-15	
At5g40720		0.411	3.14E-11	
At5g07550	GRP19	0.424	1.51E-04	TAATTATTA
AtMg00070	NAD9	0.427	2.55E-03	
At3g30122		0.442	2.95E-03	
At5g62360		0.456	6.21E-03	
At5g24780	VSP1	0.460	1.60E-07	CAATAATTG
At1g04660	T1G11.8	0.473	8.23E-04	TAATAATTA
At1g14490	F14L17.27	0.479	2.44E-03	
At2g13550		0.481	2.03E-04	
At2g25890		0.492	7.02E-04	CAATCATTG

Discusión

Los FTs de tipo HD-Zip I fueron identificados por primera vez en *Arabidopsis thaliana* (Ruberti y col., 1991; Schena y Davis, 1992) y desde ese momento, se identificaron y aislaron miembros de esta subfamilia en un amplio rango de especies vegetales. La caracterización funcional de muchos de estos FTs indicó que se están relacionados a procesos de desarrollo asociados a cambios ambientales. Sólo en algunos casos, la caracterización de plantas mutantes que presentaban fenotipos anormales permitió determinar que estos FTs también participan en procesos de desarrollo, no necesariamente asociados a condiciones de estrés. En este sentido, se demostró que LMI1 de *Arabidopsis* (Saddic y col., 2006), TL de arveja (Hofer y col., 2009) y VRS1 de cebada (Komatsuda y col., 2007) juegan papeles importantes en diferentes eventos de desarrollo.

En este capítulo, se mostró que *AtHB1* se expresa principalmente en hipocotilos y en tejidos radiculares, y que se encuentra involucrado en el crecimiento vinculado a las condiciones lumínicas. Más precisamente, este gen promueve la elongación del hipocotilo, especialmente en condiciones de día corto. Las mutantes *athb1* presentaron hipocotilos más cortos que las plántulas salvajes bajo un régimen de día corto, mientras que las sobre-expresantes de *AtHB1* mostraron el fenotipo opuesto (hipocotilos más largos) tanto en condiciones de día largo como de día corto.

Previo a este trabajo de Tesis, *AtHB1* fue descrito por otros autores como un FT que confiere un fenotipo de-etiolado constitutivo al sobre-expresarlo en plantas de tabaco crecidas en oscuridad (Aoyama y col., 1995). Sin embargo, las plántulas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción *35S::AtHB1* no mostraron ese fenotipo y tampoco las mutantes *athb1*, el opuesto. Esto sugiere que el efecto de *AtHB1* sobre las redes regulatorias de genes en tabaco que conducen al fenotipo de de-etiolación constitutiva podría ser un artefacto de la expresión heteróloga. A pesar de esto, es importante destacar que los experimentos realizados con las sobre-expresantes en tabaco fueron los primeros que permitieron involucrar a *AtHB1* en las respuestas a la luz. Debido a que la luz junto con la disponibilidad de agua son los factores ambientales más importantes que afectan el desarrollo de las plantas, y a que los FTs de tipo HD-Zip I fueron relacionados con las respuestas a cambios ambientales, es probable que *AtHB1* actúe como un vínculo entre la percepción de la luz y el desarrollo de la planta. Otros miembros de la familia HD-Zip I fueron relacionados previamente a

las respuestas a la luz. Estos son los casos de *AtHB16* y de *AtHB23*, que pertenecen a los clados II y V, respectivamente (Arce y col., 2011). Las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresan *AtHB16* o *antiAtHB16* presentaron hipocotilos más largos o más cortos que sus pares salvajes bajo condiciones de luz azul (Wang y col., 2003). Además, se demostró que *AtHB23* confiere el fenotipo opuesto al que provoca *AtHB16* (hipocotilos cortos) pero en respuesta a la luz roja (no azul), actuando como un componente de la vía de señalización mediada por phyB. El fenotipo de las plantas mutantes *athb23* presenta además de hipocotilos largos, un tamaño menor de los cotiledones y un menor índice de germinación que las plántulas salvajes cuando son crecidas en condiciones de luz roja continua (Choi y col., 2014). Si bien existen estos informes sobre FTs de tipo HD-Zip I relacionados a condiciones lumínicas, en el caso de *AtHB1* la función era desconocida y los experimentos presentados en esta Tesis sugieren que cumple un papel en la regulación del crecimiento del hipocotilo.

Dada la interacción establecida entre *AtHB1* y las condiciones de iluminación, se abordó el estudio de la relación posible entre este HD-Zip I y PIF1. Esto es porque según la bibliografía, PIF1 (también conocido como PIL5), promueve la elongación del hipocotilo en condiciones de día corto, además de cumplir otras funciones como la de reprimir la germinación y la biosíntesis de clorofila (Huq y col., 2004; Oh y col., 2004). Este FT interactúa con VQ MOTIF-CONTAINING PROTEIN29 (VQ29) y con los complejos COP1-SPA para reprimir la fotomorfogénesis en *Arabidopsis* (Li y col., 2014; Soy y col., 2014; Xu y col., 2014). Sin embargo, hasta el momento la vía de señalización activada por PIF1 para regular el crecimiento del hipocotilo no se caracterizó en detalle. Aquí, demostramos que PIF1 induce la expresión de *AtHB1*, y a su vez *AtHB1* promueve la elongación del hipocotilo. La sobre-expresión de *AtHB1* en el fondo genético *pif1-2* indujo el crecimiento del hipocotilo, mientras que la sobre-expresión de *PIF1* no rescató el fenotipo de la mutante *athb1-1*, lo que indicaría que PIF1 actúa corriente arriba de *AtHB1*. Además, las dobles mutantes *athb1-2/pif1-2* mostraron el mismo fenotipo que las mutantes simples *pif1-2* en todas las condiciones ensayadas, lo que refuerza esta idea. Estos resultados fueron consistentes con los descritos previamente por otros autores (Oh y col., 2009) que mostraron que la región promotora de *AtHB1* es uno de los sitios de unión de PIF1. Esta demostración la hicieron mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de un microarreglo de ADN (*ChIP-chip*) utilizando semillas embebidas que sobre-expresan el ADNc de *PIF1*. Sin embargo, no

podemos descartar la posibilidad de que PIF1, junto con otras proteínas PIF, también regule la elongación del hipocotilo a través de una vía independiente a AtHB1, lo que podría explicar por qué las plántulas mutantes *pif1-2* son más cortas que las *athb1-2*. En este sentido, PIF1, a través de la interacción con el co-regulador transcripcional VQ29, regula la expresión del gen *XTR7* (del inglés, *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE7*), que se encuentra relacionado con la elongación celular. De esta forma, PIF1 promueve la elongación del hipocotilo en condiciones de baja luminosidad (Li y col., 2014).

Es claro que el crecimiento del hipocotilo es un evento complejo en el cual, además de PIF1 y AtHB1, participan otras proteínas. De otra manera, habríamos encontrado un fenotipo más pronunciado que muestre que las mutantes simples *athb1* o dobles *athb1-2/pif1-2* fueran letales o incapaces de crecer, pero éste no fue el caso. A modo de ejemplo de la complejidad molecular de este evento del desarrollo, *AtHB2*, un FT HD-Zip II, actúa corriente debajo de las PIFs en la regulación de la elongación del hipocotilo, siendo directamente inducido por PIF4 y PIF5 y controlado por el fotoperíodo (Kunihiro y col., 2011).

Por otro lado y según los resultados del estudio transcriptómico, la mutación de *AtHB1* afectó la expresión de genes involucrados en la composición y elongación de la pared celular. Entre estos genes, *PLP4*, también conocido como *AtPLAIVC*, es una fosfolipasa A relacionada a patatin que hidrolisa fosfolípidos y galactolípidos (Rietz y col., 2010; Li y col., 2011). Los cambios en la expresión de *PLP4* causaron alteraciones en la composición lipídica, resultando en modificaciones de la elongación celular: las plántulas mutantes *plp4* mostraron hipocotilos más largos que las salvajes, mientras que las sobre-expresantes tuvieron el fenotipo opuesto (Rietz y col., 2010; Li y col., 2011). Nuestros resultados fueron consistentes con éstos debido a que, según análisis transcriptómico de *athb1-1*, AtHB1 reprime la expresión de *PLP4*. Por otro lado, algunos de los resultados obtenidos en el análisis de RNA-Seq fueron desconcertantes. Éste es el caso de la inducción de *XTH26* en las mutantes *athb1-1*. Este gen codifica una enzima perteneciente a una familia de proteínas involucradas en el ablandamiento de la pared celular, pero se ha propuesto que en realidad cumple un rol en el endurecimiento de la pared celular previniendo el crecimiento celular (Maris y col., 2009). Otro gen reprimido por AtHB1 es *GAUT12* (también conocido como *IRX8*), que pertenece a la familia de genes relacionados a *GAUT1*, un subgrupo de la familia 8 de glicosil-transferasas (Brown y col., 2005; Persson y col., 2005). Se ha sugerido que este gen afecta

positivamente la integridad de la pared celular secundaria (Persson y col., 2007). Cabe destacar que el gen más inducido en las plántulas mutantes *atbb1-1* fue el que codifica la proteína transportadora de Fe^{2+} más importante en *Arabidopsis*, denominado *IRON-REGULATED TRANSPORTER 1* (*IRT1*). *IRT1* es un miembro de la familia de transportadores del tipo *Zrt/lrt*, y presenta una amplia especificidad por metales pesados divalentes, mediando el transporte de zinc, manganeso, cobalto y cadmio en condiciones de deficiencia de hierro (Korshunova y col., 1999; Connolly y col., 2002; Varotto y col., 2002; Vert y col., 2002). La expresión de *IRT1* se induce por diferentes FTs, pero hasta la fecha no se informó de la existencia de ningún represor (Yuan y col., 2008; Sivitz y col., 2012). *AtHB1* podría estar reprimiendo la expresión de *IRT1*, por lo que sería interesante profundizar este tema y estudiar si realmente este HD-Zip I está involucrado, de alguna manera, en el transporte de Fe^{2+} .

Los resultados aquí presentados nos permitieron proponer el modelo presentado en la figura C2-10, que esquematiza cómo *AtHB1* regula la elongación del hipocotilo en *Arabidopsis thaliana*. De acuerdo a los datos experimentales obtenidos en este trabajo, *PIF1* regula la vía de señalización del crecimiento del hipocotilo induciendo la expresión de *AtHB1*, y este HD-Zip I a su vez reprime la expresión de *PLP4*, *XTH26* y *GAUT12* e induce a *CRU3* y a otros genes, que jugarían un papel en este importante evento de desarrollo.

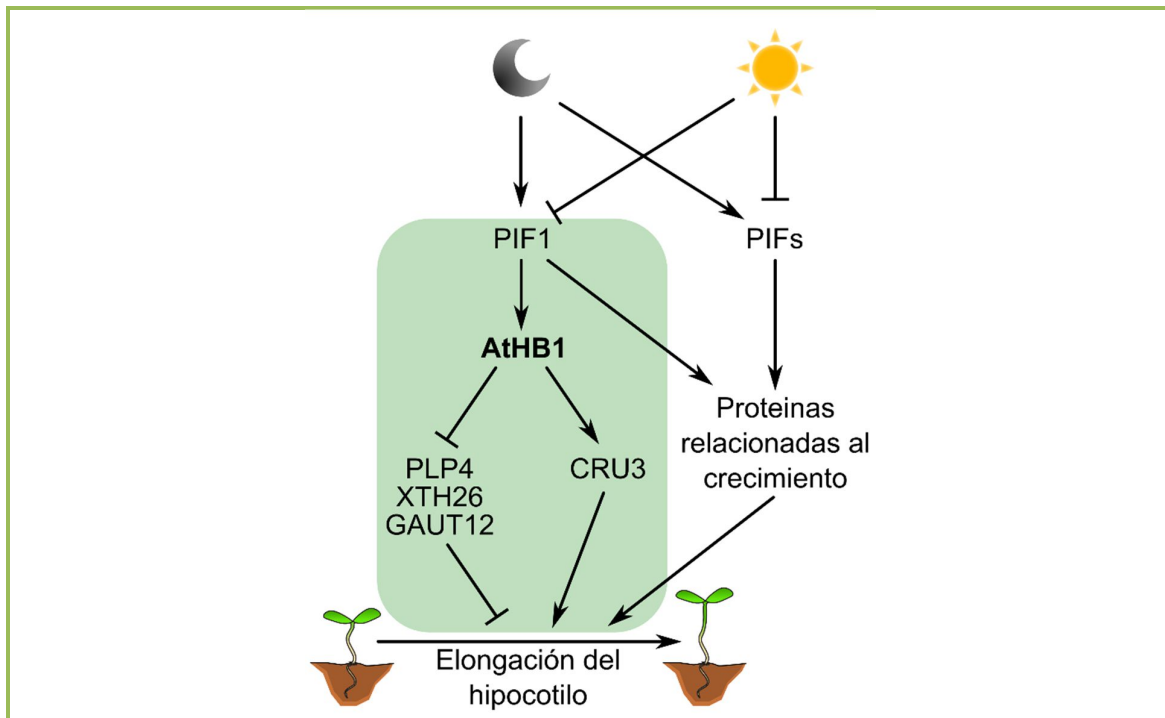


Figura C2-10. Modelo propuesto para el rol de AtHB1 en la regulación de la longitud del hipocotilo

Durante la noche, PIF1 se acumula en el núcleo e induce la expresión de AtHB1. Esto contribuye a la regulación de varios genes involucrados en la composición de la pared celular y en la elongación celular, lo que promueve el crecimiento del hipocotilo. PIF1 y otras proteínas PIFs relacionadas (como PIF3, PIF4 y PIF5) también regulan la expresión de otras proteínas relacionadas al crecimiento, que se encuentran involucradas en la elongación celular del hipocotilo.

CAPÍTULO 3:

La expresión de *AtHB1*, un HD-Zip I que cumple un papel negativo en la respuesta al etileno, es regulada a través de la región 5' no codificante, que presenta un pequeño marco de lectura abierto conservado

Introducción

La fitohormona etileno

El etileno (C_2H_4) fue una de las primeras hormonas vegetales en ser descubiertas. Es un hidrocarburo gaseoso simple con un potente efecto modulador del desarrollo de las plantas (Ecker, 1995). Esta hormona se encuentra involucrada en muchos aspectos del ciclo de vida de la planta, incluyendo la germinación, el desarrollo de los pelos radiculares, la nodulación, la senescencia de la flor, la abscisión, y la maduración del fruto (Johnson y Ecker, 1998). La biosíntesis de etileno se produce en casi todos los tejidos de la planta, si bien su tasa de producción varía entre los distintos órganos y estadios de desarrollo. Además, su producción está fuertemente regulada por señales internas durante el desarrollo y en respuesta a estímulos ambientales causados por estrés biótico, como el ataque por patógenos, o abiótico, tales como las heridas, la hipoxia, el ozono y el frío (Wang y col., 2002).

La biosíntesis de esta hormona ocurre a través de la vía de Yang, utilizando como único precursor el aminoácido metionina, que se encuentra en exceso en las células vegetales. Este proceso utiliza dos enzimas de biosíntesis claves, la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) sintetasa (ACS) y la ACC oxidasa (ACO), que se encuentran codificadas por familias multigénicas cuyos miembros se expresan en forma diferencial (Kende, 1993; Zarembinski y Theologis, 1994; Taiz y Zeiger, 2002). En el ciclo de Yang, la metionina es convertida en S-adenosil-metionina (S-AdoMet) por la AdoMet-sintetasa. Posteriormente, este compuesto es transformado en ACC por la ACS, siendo esta etapa el paso limitante de la vía, ya que la ACS tiene una vida media extremadamente corta, es sumamente lábil y se encuentra en muy bajas concentraciones en la célula (Sato y Theologis, 1989; Rottmann y col., 1991). Finalmente, el ACC es transformado en etileno por la ACO.

Cuando una molécula de etileno es percibida por uno de sus receptores de membrana específicos, comienza la activación de los procesos mediados por esta hormona. Estos receptores son homólogos a las histidín-quinasa de dos componentes de bacterias, y en *Arabidopsis* existen cinco miembros: ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4 (Wang y col., 2002). Una vez unidos, el etileno le produce al receptor un cambio conformacional que resulta en la inactivación de CTR1, una

proteína de tipo MAP quinasa, que se encuentra unida al dominio intracelular del receptor (Kieber y col., 1993). La inactivación de CTR1 impide una cascada de fosforilación, resultando en la activación del receptor intracelular EIN2 (Alexander y Gierson, 2002). Este receptor es capaz de activar tres FTs llamados EIN3, EIL1 y EIL2, que al unir las secuencias reguladoras de sus genes blancos, inducen la transcripción de una serie de genes que generan “la respuesta al etileno” (Wang y col., 2002).

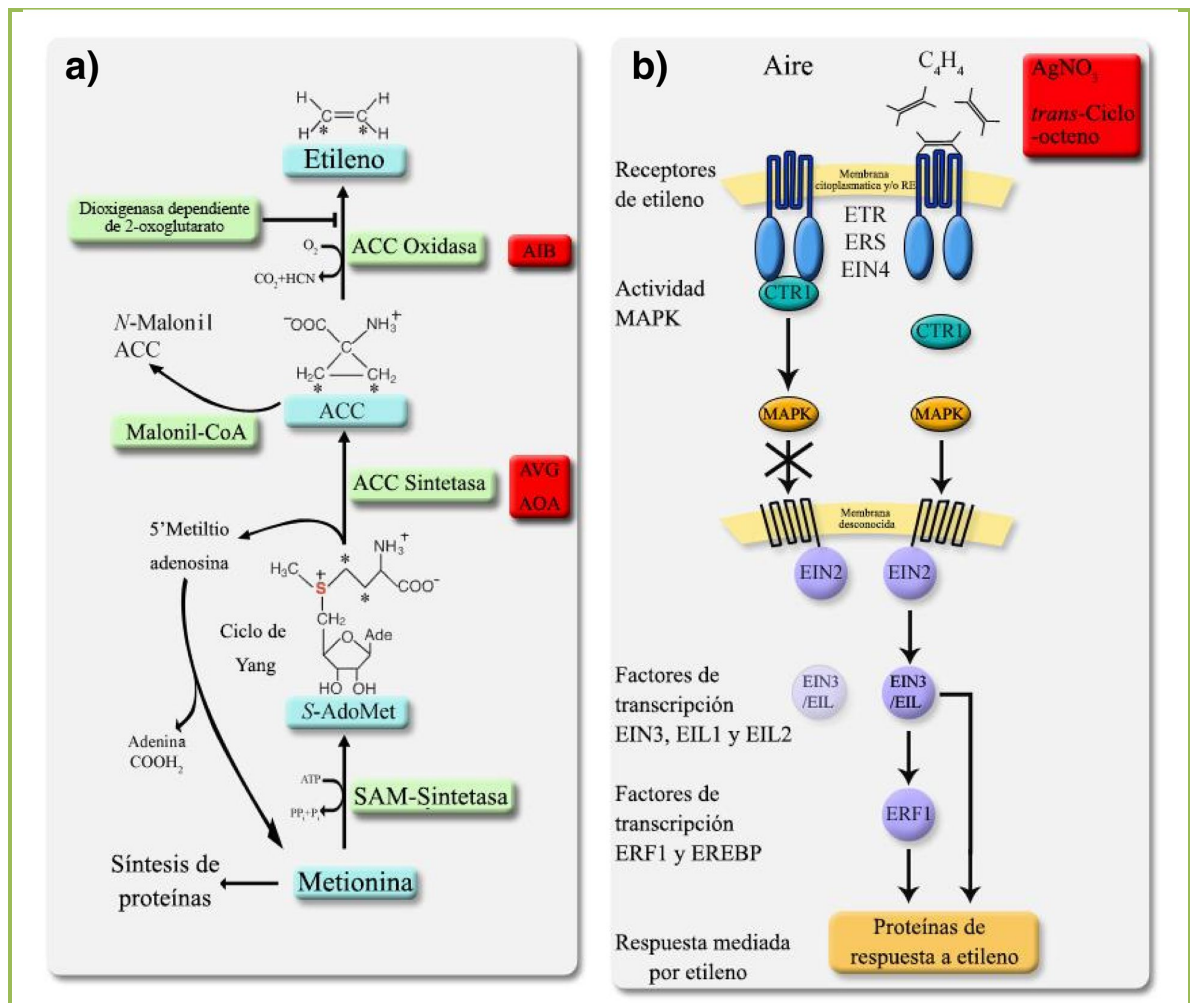


Figura C3-1. Síntesis, percepción y transducción de señales de la fitohormona etileno

a) Representación esquemática de la vía de biosíntesis de etileno. En los cuadros celestes están representados los compuestos intermediarios de la reacción catabólica y los cuadros verdes representan las enzimas involucradas en cada paso. ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; AIB, ácido α -aminoisobutírico; AOA, ácido amino-oxicético; ATP, adenosina 5' trifosfato; AVG, aminoetoxivinilglicina; S-AdoMet: S-adenosil-metionina. b) Representación esquemática de las vías de percepción y transducción de señales de etileno. Los cuadros rojos indican los inhibidores conocidos de estas vías y la etapa en la cual actúan. Adaptado de Manavella, 2008.

Cuando las plántulas de especies dicotiledóneas son germinadas en oscuridad, el etileno reduce la elongación celular en los hipocotilos y, al mismo tiempo, promueve la expansión radial, la exacerbación en la formación del gancho apical y una reducción marcada del desarrollo de las raíces. Este fenómeno se conoce como la triple respuesta al etileno (Taiz y Zeiger, 2002). En forma opuesta, el etileno estimula la elongación del hipocotilo en plántulas de-etioladas, teniendo un efecto más pronunciado en plántulas crecidas en un medio pobre en nutrientes que en uno rico (Smalle y col., 1997). El mecanismo a través del cual el etileno promueve el crecimiento del hipocotilo es mediante el aumento de la importación nuclear de COP1. De esta forma, COP1 puede mediar la degradación de HY5, contribuyendo a la elongación del hipocotilo en luz (Yu y col., 2013). También se demostró que el complejo COP1-HY5 integra la vía de señalización de la luz y del etileno actuando corriente abajo de EIN3 (Yu y col., 2013).

La región 5' no codificante de *AtHB1* presenta un marco de lectura abierto que codifica un péptido conservado

Los *upstream Open Reading Frames* (o uORFs) son péptidos codificados por los ARN mensajeros que se encuentran corriente arriba de la secuencia codificante primaria, por ejemplo, en la región 5' no codificante (5'UTR, del inglés 5' *untranslated region*; von Arnim y col., 2014). De acuerdo al modelo del inicio de la traducción de Kozak, los ribosomas buscan el primer triplete AUG en el ARN mensajero comenzando desde el capuchón del extremo 5'. Por lo tanto, cuando el primer AUG es el codón de inicio de un *uORF*, por lo general se reduce la eficiencia de traducción de la región codificante principal del mensajero (Kozak, 1987; Kozak, 2002).

Para una pequeña fracción de los uORFs, la secuencia proteica se encuentra notablemente conservada en especies evolutivamente distantes, por lo que se conocen con el nombre de péptidos conservados uORF (CPuORF, del inglés, *Conserved Peptide uORF*). En estos casos, esta secuencia se describió como esencial para la represión de la traducción (Hayden y Jorgensen, 2007; Tran y col., 2008; Jorgensen y Dorantes-Acosta, 2012; Takahashi y col., 2012). A través de la comparación de las secuencias completas de ADNc de Arabidopsis y arroz, se identificaron 26 grupos homólogos distintos de CPuORFs, tres de los cuales se habían descrito previamente (Hanfrey y col., 2002; Wiese y col., 2004; Hayden y Jorgensen, 2007). En particular, se describió que la región 5' no

codificante de *AtHB1* presenta el *CPuORF33*, que pertenece al grupo 14 (Hayden y Jorgensen, 2007) al que no se le asignó hasta la fecha ninguna función en la expresión de este HD-Zip I.

Existen varios mecanismos involucrados en el control de la traducción por los uORFs (Somers y col., 2013). Entre los mismos se pueden citar la reiniciación de los ribosomas, la dependencia nucleotídica, la expresión y funcionalidad del péptido traducido, la evasión del uORF, la interacción con las IRES (segmento interno de entrada al ribosoma) y el decaimiento mediado por ARNm sin sentido (NMD, del inglés *nonsense-mediated decay*). El NMD permite la detección y la eliminación de los transcritos que codifican péptidos con un codón de terminación prematuro. Los principales componentes del complejo involucrado en la vía del NMD son las proteínas UPF1, UPF2 y UPF3, y su función básica se encuentra conservada en eucariotas (Conti e Izaurre, 2005). La mutación o el silenciamiento de los genes que las codifican resulta en la estabilización de los ARNm que contienen codones de terminación de la traducción prematuros (Conti e Izaurre, 2005). Mediante ensayos de microarreglos comparando los transcriptomas de hojas de plantas salvajes y de plantas mutantes *upf1* o *upf3*, se demostró que los niveles de transcritos de *AtHB1* se encuentran inducidos en las mutantes *upf3*, indicando que este FT podría ser regulado por NMD (Rayson y col., 2012).

Resultados

CPuORF33 se encuentra conservado en plantas evolutivamente distantes

Con el objeto de analizar si el péptido codificado por el 5'UTR de *AtHB1* se encuentra conservado en diversas especies vegetales, decidimos comenzar con un análisis de secuencias *in silico*. En primer lugar, se realizó una búsqueda BLASTP contra la base de datos de secuencias proteicas no redundantes del NCBI (se utilizaron los parámetros predeterminados; Altschul y col., 1990), utilizando la secuencia aminoacídica de *AtHB1*. Posteriormente, se analizaron las regiones 5' no codificantes de los mensajeros disponibles de las proteínas encontradas en busca de uORFs. Este filtrado nos permitió obtener un total de 17 secuencias proteicas de entre 30 a 40 aminoácidos pertenecientes a diferentes organismos vegetales, desde mono- a dicotiledóneas (Anexo II). Este conjunto de secuencias resultante fue alineado mediante el programa PRALINE (Simossis y Heringa, 2005), obteniéndose los resultados que se muestran en la figura C3-2a (el alineamiento de las proteínas completas se encuentra en el Anexo III). El alineamiento de los 17 péptidos permitió determinar el grado de conservación de los residuos presentes en estos uORFs pertenecientes al previamente identificado grupo 14 (Hayden y Jorgensen, 2007). Cabe destacar que a pesar de la elevada conservación de secuencias, se pudo encontrar una diferencia importante en la longitud de los uORFs pertenecientes a las especies monocotiledóneas comparadas a las dicotiledóneas, conteniendo los uORFs de las primeras aproximadamente 10 aminoácidos más.

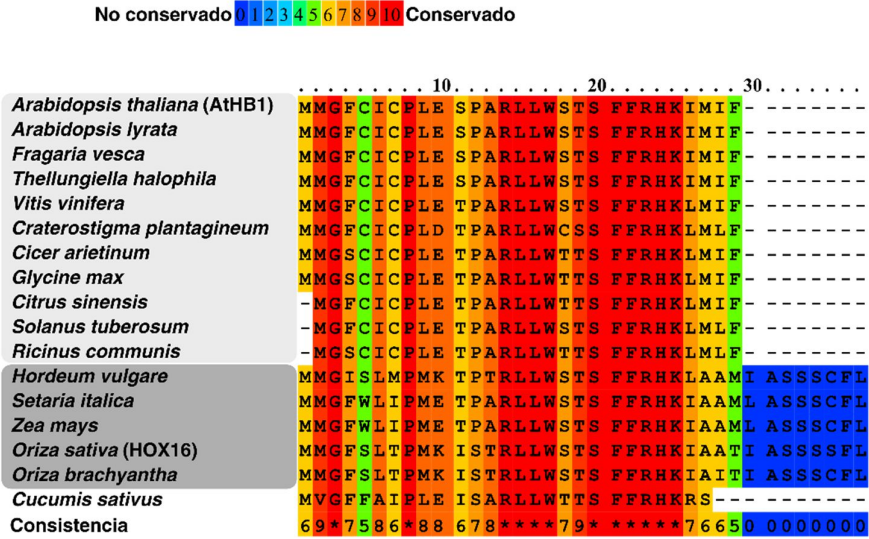
Posteriormente, este alineamiento fue ingresado en el programa PhyML (Guindon y Gascuel, 2003) para la reconstrucción de un árbol filogenético basado en el principio de ML. Para ello, se usó el modelo JTT+I+G (Jones y col., 1992; Reeves, 1992; Yang, 1993). Además, se hicieron 100 réplicas de *bootstrap*. El análisis del árbol filogenético nos permitió observar la separación previamente identificada entre los uORFs de las especies mono- y dicotiledóneas. A su vez, se pusieron en evidencia dos clados marcados en las dicotiledóneas y uno para las monocotiledóneas. Finalmente, el uORF de *Cucumis sativus* no pudo ser agrupado en ningún grupo, quedando como un *outgroup*, a pesar de la homología de secuencia que presenta la proteína principal con *AtHB1*.

La elevada conservación entre especies de este elemento genético sugiere que podría estar cumpliendo un papel regulatorio muy importante en el control de la expresión de *AtHB1* y sus homólogos.

La eliminación del 5'UTR en *AtHB1* expande su patrón de expresión e induce su transcripción y traducción

Con el objeto de analizar la funcionalidad putativa del CPuORF en *AtHB1*, generamos una construcción genética en la cual la región promotora de *AtHB1*, pero en este caso sin el 5'UTR, dirige la expresión de los genes reporteros *GFP* y *GUS*, denominada *PromAtHB1-5'UTR::GUS*. Con esta construcción, se obtuvieron las plantas transgénicas homocigotas de *Arabidopsis* y se analizaron tres líneas independientes por reacción histoquímica de GUS en distintos estadios de desarrollo en condiciones normales de crecimiento. Como control se utilizaron las plantas *PromAtHB1::GUS*, obtenidas previamente en las que la construcción lleva además de la región promotora, el segmento 5' no codificante que contiene el CPuORF (Capítulo 2 de esta Tesis). En plántulas de cuatro días post-germinación se detectó la expresión del reportero en los hipocotilos, en el tejido vascular de las raíces y en sus ápices, como en las plántulas *PromAtHB1::GUS*, aunque con mayor intensidad (figura C3-3). Además, en las plántulas *PromAtHB1-5'UTR::GUS* se pudo detectar actividad en los cotiledones (figura C3-3b).

a)



b)

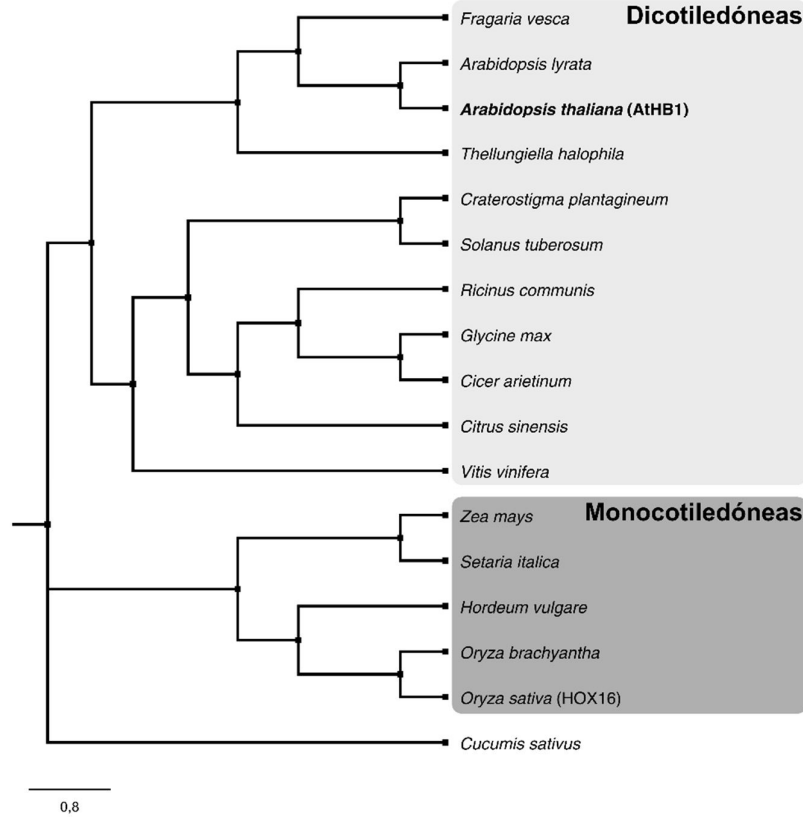


Figura C3-2. Los CPuORF de diferentes especies vegetales presentan una elevada homología de secuencia con CPuORF33

a) Alineamiento de las secuencias proteicas de los péptidos encontrados en los 5'UTR de los mensajeros de proteínas con homología de secuencia a AtHB1. Los aminoácidos se muestran en el sistema de anotación de una letra. La coloración azul y roja implica mínima y máxima conservación de secuencia, respectivamente. b) Árbol filogenético de los diferentes CPuORFs en el cual se muestran los nombres de las distintas especies vegetales a las que pertenecen. En negrita se resalta el lugar que ocupa el uORF de AtHB1. Para a) y b), en recuadro gris claro se marcan las plantas dicotiledóneas, mientras que las monocotiledóneas se resaltan en gris oscuro.

Al haber observado esta mayor intensidad de la tinción en las plántulas *PromAtHB1-5'UTR::GUS*, decidimos cuantificar la actividad GUS. Para ello, se crecieron tres líneas independientes transformadas con la construcción *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* en un régimen de fotoperíodo largo durante cuatro días. A estas plántulas se les extrajeron las proteínas totales y se analizaron por fluorometría. Como control negativo, se utilizaron plántulas transformadas con una construcción que no expresa el gen reportero *GUS*, el vector *pKGWFS7* (*pKG*). En forma consistente con lo observado por histoquímica, este análisis indicó que la expresión de *GUS* es más fuerte en las plantas transformadas con la construcción que carece del 5'UTR (figura C3-4a). Teniendo en cuenta que el uORF podría estar actuando como un represor de la traducción, nos propusimos analizar si el aumento de la actividad se debía a un incremento en los niveles de transcripto o a un aumento en la tasa de traducción. Consecuentemente, cuantificamos los niveles de transcripto del reportero por RT-PCR en tiempo real en ARNs obtenidos a partir de las plántulas *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS*. Los resultados indicaron que los transcriptos correspondientes a *GUS* tienen niveles más altos en las plántulas *PromAtHB1-5'UTR::GUS* (figura C3-4b) que en los controles, indicando una regulación a nivel transcripcional negativa por parte del 5'UTR de *AtHB1*.

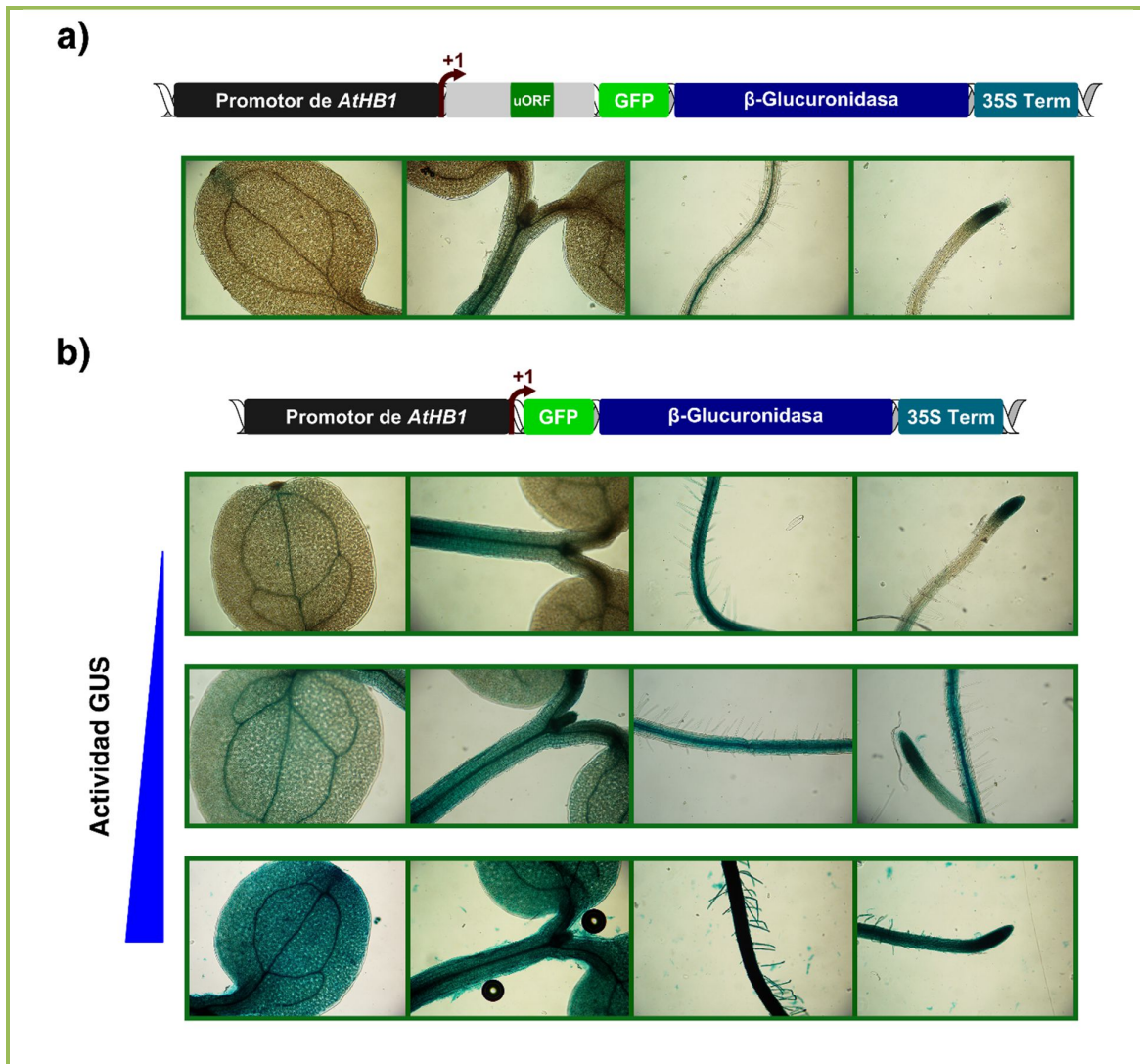


Figura C3-3. *AtHB1* se expresa en hipocotilos, raíces y cotiledones de plántulas *PromAtHB1-5'UTR::GUS*
a) y b) *Panel superior*: Esquema de las construcciones *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS*, en el que se muestra la región promotora de *AtHB1* (gris oscuro) junto con la región 5' no codificante (gris claro). En verde se resalta el uORF. Los reporteros *GFP* y *GUS* se muestran en verde y azul, respectivamente. *Panel inferior*: El patrón de expresión de *AtHB1* analizado por detección histoquímica de la actividad enzimática de GUS en plántulas *PromAtHB1::GUS* y en tres líneas independientes *PromAtHB1-5'UTR::GUS*, crecidas en día largo durante cuatro días.

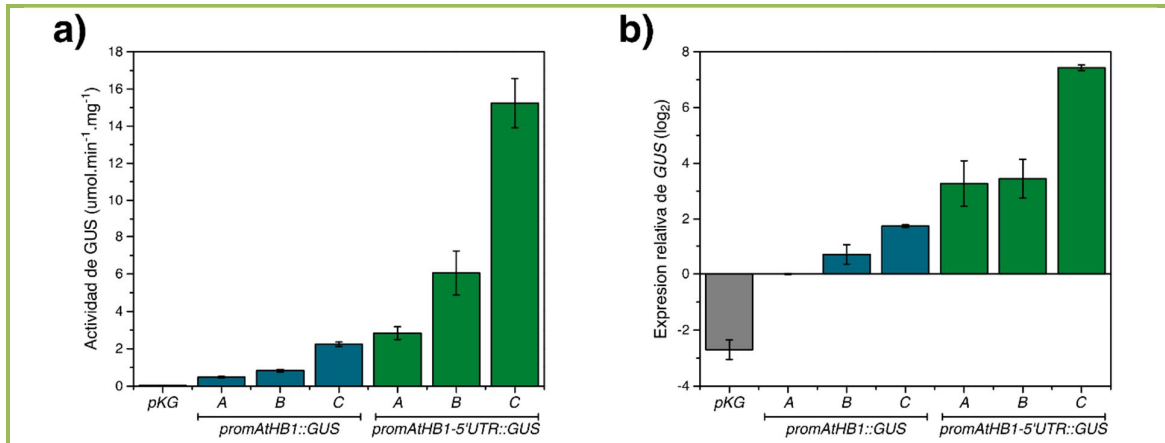


Figura C3-4. El 5'UTR de *AtHB1* inhibe la transcripción y la traducción del reportero *GUS*

a) Análisis fluorométrico de la actividad *GUS* en extractos proteicos de plántulas *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* o una construcción con *GUS* sin promotor (*pKG*, usado como control negativo) crecidas en condiciones de día largo durante cinco días. b) Niveles de transcripto de *GUS* en plántulas de tres líneas independientes para *PromAtHB1::GUS*, *PromAtHB1-5'UTR::GUS* o una construcción con *GUS* sin promotor (*pKG*, usado como control negativo) crecidas durante cinco días en un régimen de día largo. Todos los valores fueron normalizados con los de las plántulas *PromAtHB1::GUS-A* aplicando el método del $\Delta\Delta C_t$. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas.

El 5'UTR inhibe la inducción por etileno de *AtHB1*

La expresión de *AtHB1* aumenta en condiciones de día corto (capítulo 2 de esta Tesis); en consecuencia nos propusimos analizar si el 5'UTR cumple algún papel en esta regulación. Para ello, se crecieron plántulas transformadas con la construcción *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* en regímenes de fotoperíodo largo y corto durante cuatro días. El análisis fluorométrico de la actividad de *GUS* mostró que la expresión de *AtHB1* se induce en condiciones de día corto comparada con la medida de día largo en la misma proporción, tanto en las plántulas *PromAtHB1::GUS* como en las *PromAtHB1-5'UTR::GUS* (figura C3-5a). Este resultado indicó que la inducción de *AtHB1* por el fotoperíodo de día corto es independiente del 5'UTR de este HD-Zip.

En estudios hechos en tejidos aéreos de plantas de 24 días tratadas con etileno y en hojas senescentes, se había observado que los niveles de *AtHB1* aumentaban con respecto a los controles sin tratar (Van Zhong y Burns, 2003; Guo y col., 2004). Estas observaciones hechas por otros autores nos indujeron a analizar la regulación de *AtHB1* en estadios tempranos del desarrollo. Para abordarlo experimentalmente, se crecieron plántulas *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* en medio MS suplementado con el precursor de etileno ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), en condiciones de día largo durante cinco días. A estas plántulas

se les extrajeron las proteínas totales y se analizaron por fluorometría. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de GUS se indujo por etileno sólo en las plántulas que carecen del 5'UTR de *AtHB1* (figura C3-5b). Consecuentemente, cuantificamos los niveles de transcripto de *GUS* por RT-PCR en tiempo real en ARNs obtenidos a partir de las mismas plántulas, y los resultados indicaron que los transcriptos correspondientes al reportero no presentan diferencias frente al suplemento de ACC con respecto a los controles sin tratar (figura C3-5c). Como control del tratamiento por ACC, cuantificamos los niveles de transcripto de un gen de respuesta a etileno, *ETR2*. Como se puede ver en la figura C3-5d, la expresión de *ETR2* se indujo frente al agregado de ACC en ambos genotipos, lo que implica que las plántulas pudieron percibir el etileno exógeno. El conjunto de estos resultados indica que la región no codificante cumpliría un papel en la regulación de la expresión de este FT por etileno.

La sobre-expresión de *AtHB1* reprime la respuesta a etileno

Considerando que el 5'UTR cumpliría un papel en la respuesta de *AtHB1* al etileno, decidimos analizar si este FT regula de alguna manera la elongación del hipocotilo en respuesta a esta hormona. En primer lugar, se midieron las longitudes de los hipocotilos de plántulas salvajes y mutantes *athb1* crecidas en condiciones de día largo, en medio con o sin el agregado de ACC. Los resultados obtenidos indicaron que las plántulas *athb1* no mostraron diferencias significativas comparadas con los controles salvajes cuando se las creció en medio con ACC (figuras C3-6a). Como segunda estrategia para investigar la función de *AtHB1* en respuesta al etileno, las plantas transgénicas *35S::AtHB1-A* y *35S::AtHB1-B* se caracterizaron en las mismas condiciones. Cabe aclarar que estas construcciones no incluyen el segmento 5' no codificante que contiene el ORF. Estas plántulas exhibieron hipocotilos más largos que los controles salvajes en condiciones normales, pero con el agregado de ACC se comportaron de forma opuesta; presentaron hipocotilos ligeramente más cortos que sus pares salvajes (figura C3-6b). Para investigar más a fondo la respuesta a la fitohormona en las plántulas sobre-expresantes de *AtHB1*, se crecieron plántulas salvajes y *35S::AtHB1* en medio suplementado con concentraciones crecientes de ACC. En las plántulas de cinco días analizadas, la sobre-expresión de *AtHB1* inhibió el crecimiento del hipocotilo en presencia del precursor de etileno (figura C3-6c).

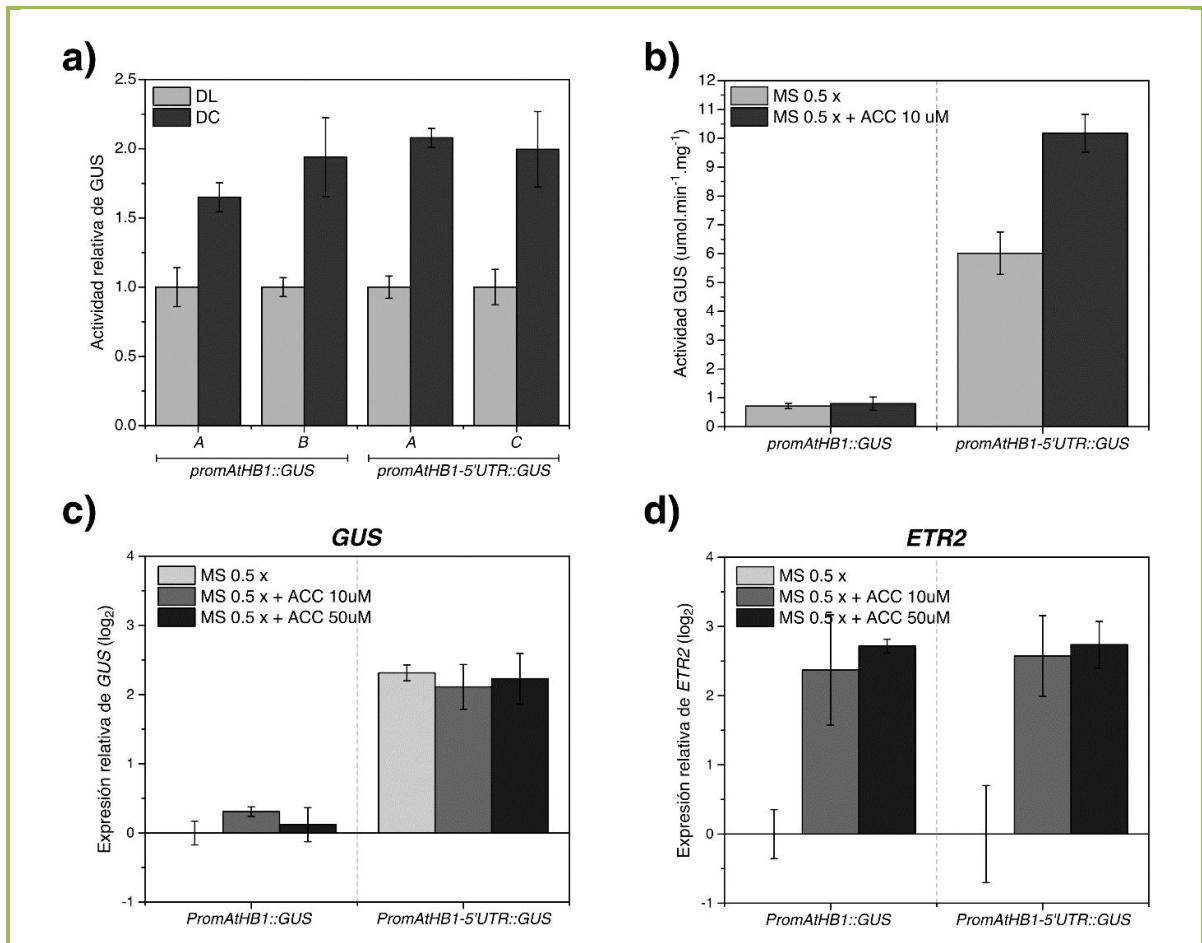
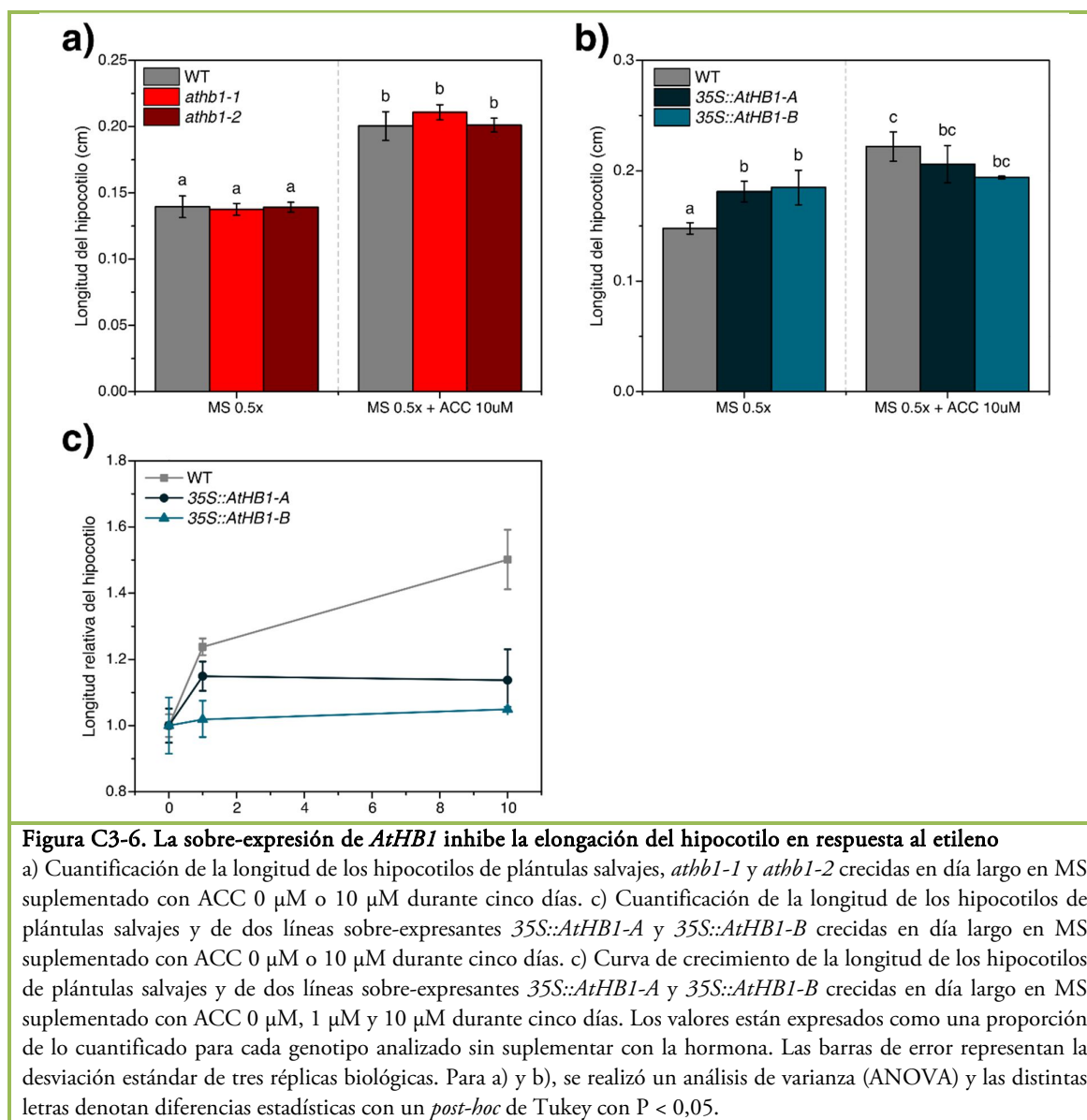


Figura C3-5. El 5'UTR no afecta la regulación de *AtHB1* en condiciones de día corto y regula negativamente su inducción por etileno

a) Análisis fluorométrico de la actividad GUS en extractos proteicos de plántulas *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* crecidas en día largo (DL) o día corto (DC) durante cuatro días. Los niveles de expresión de *GUS* fueron expresados como la proporción del valor obtenido para cada línea en condiciones de DL. b) Análisis fluorométrico de la actividad GUS en extractos proteicos de plántulas *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* crecidas en MS suplementado con ACC 0 μM o 10 μM en condiciones de día largo durante cinco días. c) y d) Niveles de transcripto de *GUS* y de *ETR2* en plántulas de *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* crecidas durante cinco días en MS suplementado con ACC 0 μM, 10 μM o 50 μM en un régimen de día largo. Todos los valores fueron normalizados con los de las plántulas *PromAtHB1::GUS* aplicando el método del $\Delta\Delta C_t$. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes.

Tomados en conjunto, estos resultados indicaron el uORF inhibe la expresión de *AtHB1* en presencia de etileno. A su vez, aunque el etileno y la sobre-expresión de este FT inducen en forma independiente la elongación del hipocotilo en condiciones normales, en presencia de etileno los altos niveles de *AtHB1* anularían esta respuesta, al menos en plántulas. Esto podría sugerir que el etileno induciría la expresión de este HD-Zip I para que cumpla alguna función desconocida en un

estadio de desarrollo determinado, y que la región 5' no codificante estaría inhibiendo este incremento de la traducción de *AtHB1* en el estadio de plántulas de Arabidopsis.



En plántulas, la expresión de *AtHB1* no se regula por el mecanismo NMD, *nonsense-mediated mRNA decay*

Considerando que los uORFs pueden controlar la traducción a través de NMD (Somers y col., 2013), que los niveles de transcripto de *AtHB1* se inducen en hojas de plantas mutantes *upf3* (Rayson y col., 2012), y que la remoción del 5'UTR induce tanto la transcripción como la

traducción del reportero GUS, nos propusimos analizar si la expresión de *AtHB1* se encuentra regulada por este mecanismo. Para ello, se obtuvieron dos líneas mutantes insercionales en los genes *UPF1* y *UPF3* (llamadas *upf1-5* y *upf3-1*), que codifican proteínas involucradas en NMD. Una vez obtenidas, se las germinó en día largo durante cinco días, debido a que estábamos realizando los estudios de las plantas en estas condiciones de cultivo. Luego se cuantificó la expresión de *AtHB1* por RT-PCR en tiempo real. Como se muestra en la figura C3-7a, tanto las plántulas mutantes *upf1-5* como las *upf3-1* presentaron niveles de expresión de *AtHB1* semejantes a los medidos en las plántulas salvajes.

Si el uORF de un gen regula los niveles de transcritos mediante el mecanismo de NMD, el agregado de cicloheximida (CHX), un inhibidor de la traducción, produce un incremento mayor en su nivel de expresión comparado con el control no tratado. Por lo tanto, como segunda estrategia para investigar la regulación de *AtHB1* por NMD, nos propusimos cuantificar por RT-PCR en tiempo real la expresión del reportero GUS en plántulas *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* luego de un tratamiento con CHX. Como se puede observar en la figura C3-7, el tratamiento con el inhibidor produjo un aumento en los niveles de transcripto del reportero en las plántulas *PromAtHB1::GUS* y también en las plántulas transformadas con la construcción que carece del 5'UTR, indicando que el tratamiento con CHX aumenta la expresión de *GUS* en forma independiente a la región 5' no codificante.

En base a estos resultados se podría concluir que la expresión de *AtHB1* en plántulas es independiente del mecanismo NMD de degradación de ARN mensajeros.

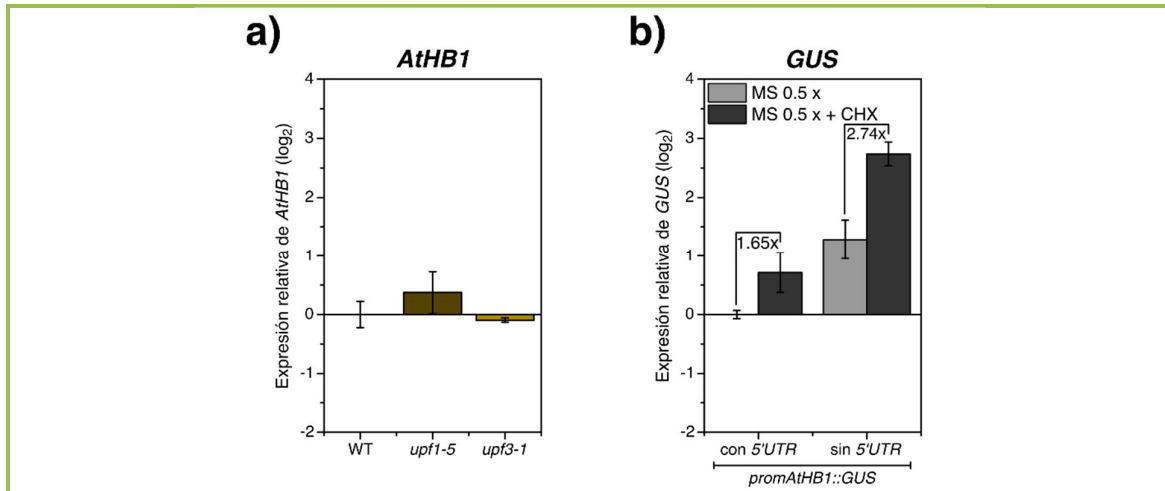


Figura C3-7. El 5'UTR de *AtHB1* no media el *nonsense-mediated decay* del ARNm en plántulas

a) Niveles de transcripto de *AtHB1* cuantificados por RT-PCR en tiempo real utilizando ARN aislado de plántulas salvajes y mutantes *upf1-5* y *upf3-1* de cinco días crecidas en condiciones de día largo. b) Niveles de transcripto de *GUS* en plántulas *PromAtHB1::GUS* y *PromAtHB1-5'UTR::GUS* crecidas en un régimen de día largo, en un medio con o sin el suplemento de CHX 20 μ M. Todos los valores fueron normalizados con los de las plántulas salvajes (a) o *PromAtHB1::GUS* no tratado (b) aplicando el método del $\Delta\Delta$ Ct. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas biológicas.

Discusión

Los análisis bioinformáticos revelaron la presencia de uORFs en las regiones 5' no codificantes en un gran porcentaje de ARNm, sugiriendo que estos elementos estructurales cumplen un papel central en la regulación post-transcripcional (Hayden y Bosco, 2008; Nagalakshmi y col., 2008; Calvo y col., 2009; Zhang y col., 2010). En plantas, aunque el número de ARNm que contienen uORFs predichos es cercano al 60 % de todos los mensajeros, sólo en unos pocos casos se demostró su funcionalidad (Tran y col., 2008). En este capítulo, mostramos que el 5'UTR de *AtHBI*, probablemente a través del CPuORF33, regula negativamente la expresión de este FT en plántulas e impide su inducción por etileno.

Existen varias características del CPuORF33 que sostienen la hipótesis de una conservación funcional de este uORF y sus homólogos en la regulación de la expresión del ARNm. Por un lado, el CPuORF33 se ha conservado a lo largo de la evolución, dado que la búsqueda de homólogos de *AtHBI* en plantas identificó 16 uORFs similares a CPuORF33 en transcritos que pertenecen a especies mono- y dicotiledóneas. Todos los homólogos que en las bases de datos se contaba con la secuencia 5' no codificante, contenían un uORF en dicha región; sin embargo, para el caso de varios genes semejantes a *AtHBI* aún no se cuenta con la secuencia del 5'UTR, por lo que sería interesante analizar la presencia de algún uORF en un futuro. La elevada similitud de secuencia que presentan estos uORFs, así como su composición aminoacídica y la longitud de los péptidos codificados, en especies distantes a *Arabidopsis* sugiere un origen ancestral para este elemento regulatorio estructural. Esta conservación también fue observada para el CPuORF30 en 32 diferentes especies vegetales, que se encuentra en el 5'UTR del gen *XIPOTL1*, que codifica una fosfoetanolamina N-metiltransfera que posee un papel central en la biosíntesis de la fosfatidilcolina (Alatorre-Cobos y col., 2012). En *Arabidopsis*, la mutación de residuos de serina altamente conservados en el uORF2 de *bZIP11* eliminó por completo la inhibición de la traducción de este gen inducida por sacarosa (Rahmani y col., 2009).

En el capítulo 2, se mostró que *AtHBI* se expresa principalmente en hipocotilos y en tejidos radiculares. La eliminación del 5'UTR de este FT hace que se incremente dicha expresión y que se expanda a los cotiledones. Esto sugiere que esta región estaría inhibiendo la expresión de *AtHBI*.

Sin embargo, desconocemos el mecanismo mediante el cual se ejerce esta represión. Podría deberse a la presencia del CPuORF33, ya que para otros casos se ha demostrado que el uORF posee un efecto negativo en la expresión del gen que regula (Hanfrey y col., 2002; Wiese y col., 2004; David-Assael y col., 2005). A pesar de esto, no podemos descartar la posibilidad de que el aumento de expresión que observamos se deba a la falta de algún elemento en *cis* presente en el extremo 5' no codificante. Esta duda se podría contestar analizando la expresión del reportero en plantas transformadas con una construcción en la que los dos codones AUG del CPuORF33 se encuentren mutados.

Dado que se informó que *AtHBI* se induce por etileno en plantas adultas (Van Zhong y Burns, 2003; Guo y col., 2004), se abordó el estudio de la posible relación entre el 5'UTR y la hormona. Demostramos que el etileno sólo aumenta la traducción del gen reportero guiada por la región promotora de *AtHBI* en ausencia de la región no codificante. Esta regulación pareciera específica para esta hormona ya que la inducción por fotoperíodo de *AtHBI* mostró ser independiente de la presencia del 5'UTR. Por otro lado, el análisis fenotípico en respuesta a etileno de las plántulas mutantes *athb1* y sobre-expresantes *35S::AtHBI* indicó que la sobre-expresión de *AtHBI* genera insensibilidad al agregado exógeno de etileno, medido a partir de la elongación del hipocotilo en luz. En cambio, las plántulas mutantes *athb1* no presentaron diferencias fenotípicas con respecto a sus pares salvajes al ser crecidas en un medio suplementado con la fitohormona. En base a estos resultados se podría especular que el 5'UTR inhibiría la traducción de *AtHBI* en presencia de etileno, lo que impediría que este FT actúe negativamente en la vía de señalización de la hormona. Esta inhibición podría ser mediada por el CPuORF33. En este sentido, se informó que un aumento en la cantidad de sacarosa reprime la traducción de *bZIP11*, pero no afecta el nivel de transcritos, a través de la acción del uORF2, que codifica para un péptido de 42 aminoácidos (Wiese y col., 2004). A su vez, la desregulación de la traducción controlada por dicho azúcar de un FT de tabaco filogenéticamente relacionado a *bZIP11* resulta en una acumulación de sacarosa en las hojas (Thalor y col., 2012).

En *Arabidopsis*, la acumulación de los transcritos de varios genes que contienen un CPuORF en su región 5' no codificante es controlada a través del NMD, como es el caso de *AdoMetDC1* y *AtMHX*, que codifican una enzima involucrada en la biosíntesis de poliaminas y un transportador vacuolar de metales, respectivamente (Saul y col., 2009; Uchiyama-Kadokura y col., 2014). Para

encontrar el mecanismo mediante el cual el 5'UTR inhibe la expresión de *AtHB1*, analizamos si la regulación era mediada por NMD. Los niveles de transcritos de *AtHB1* cuantificados en las mutantes *upf* no presentaron diferencias con respecto a los controles. En concordancia, el tratamiento con cicloheximida incrementó la expresión del reportero tanto en las plantas transformadas con el promotor más el 5'UTR como en las que carecían de la región no codificante. Estos resultados implicarían que *AtHB1* no se encuentra regulado por NMD en plántulas. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que este proceso ejerza un control a nivel transcripcional en otros estadios de desarrollo. A pesar de que se informó que los niveles de transcritos de este FT se encuentran inducidos en los tejidos aéreos de plantas mutantes *upf3* (Rayson y col., 2012), estos resultados fueron obtenidos por análisis de microarreglos y no fueron validados.

Los resultados aquí presentados nos permitieron proponer un modelo putativo, que se muestra en la figura C3-8. El mismo esquematiza cómo el 5'UTR de *AtHB1* regula la expresión de este gen para controlar la respuesta al etileno en *Arabidopsis thaliana*. De acuerdo a los datos experimentales obtenidos en este trabajo, *AtHB1* por un lado induce la elongación del hipocotilo, y, por otro, inhibe la respuesta al etileno. A su vez, la inducción de *AtHB1* mediada por el etileno se ve impedida por el 5'UTR de este FT. En trabajos futuros se seguirá profundizando este estudio para poder proponer un modelo más completo que incluya distintos estadios del ciclo de *Arabidopsis*.

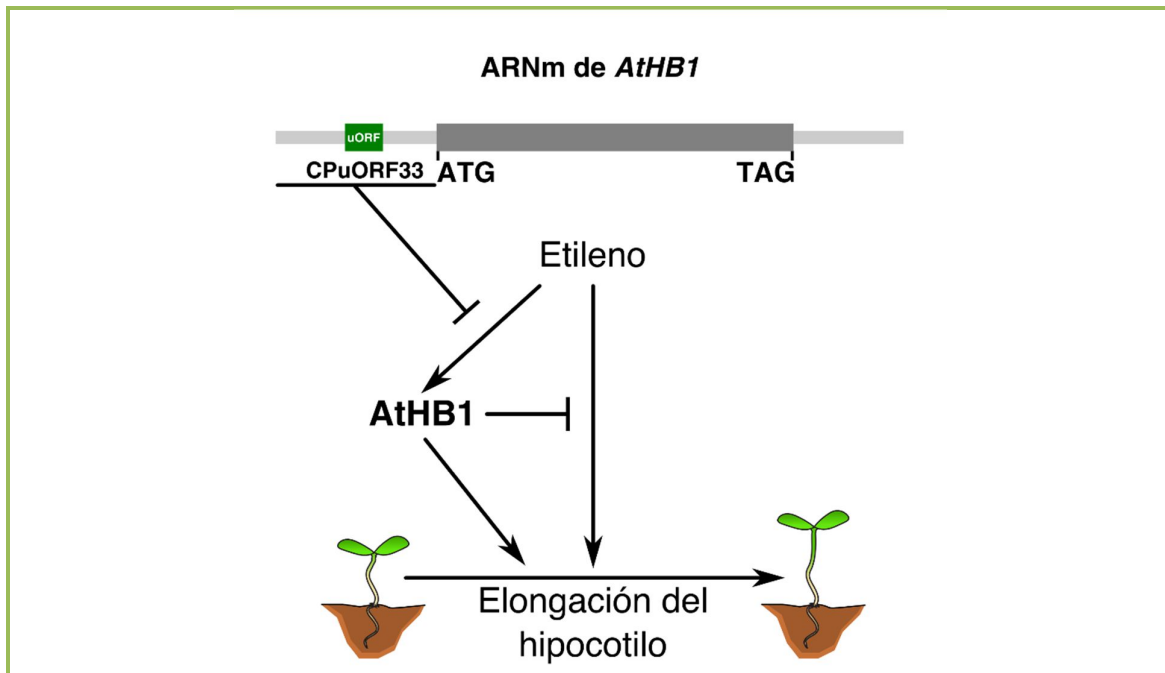


Figura C3-8. Modelo propuesto para *AtHB1* en la inducción de la longitud del hipocotilo regulada por etileno
 En luz, el etileno regula positivamente la elongación del hipocotilo y produce un incremento en la expresión de *AtHB1*. Por otro lado, la región 5' no codificante de *AtHB1* regula negativamente su inducción por etileno. A su vez, la sobre-expresión del FT promueve la elongación del hipocotilo, pero hace que las plántulas sean insensibles al etileno.

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones Generales

Capítulo 1:

- Los FTs de tipo HD-Zip I AtHB1, AtHB7, AtHB12 y AtHB13 son capaces de activar la transcripción tanto en el sistema heterólogo de levaduras como en el homólogo de plantas, pero con diferentes grados de intensidad.
- Los FTs de tipo HD-Zip I tienen motivos de tipo AHAs en los extremos de sus CTRs, responsables de la capacidad activadora.
- El residuo W269 presente en el motivo AHA de AtHB1 es fundamental para su actividad transcripcional en plantas, mientras que el W271 no lo es. Además, los residuos W285 y W287 son esenciales para la capacidad transcripcional AtHB13, tanto en plantas como en levaduras.
- Los cuatro FTs estudiados interactúan con los componentes de la maquinaria transcripcional basal AtTBP2 y AtTFIIB, aunque cada uno establece diferentes interacciones: AtHB1 interactúa con AtTBP2, AtHB12 interactúa con AtTFIIB, AtHB7 interactúa tanto con AtTBP2 como con AtTFIIB, mientras que AtHB13 presenta una interacción débil con ambos.
- En particular, el motivo AHA de AtHB1 es necesario para la interacción con AtTBP2, y los residuos W juegan un papel fundamental en dicha interacción.
- Existen similitudes y discrepancias en las capacidades transcripcionales ensayadas en levaduras y en plantas dependiendo del FT analizado.

Capítulo 2:

- La región promotora de *AtHB1* dirige la expresión de un gen reportero principalmente en el hipocotilo y la raíz, y esta expresión aumenta en condiciones de día corto.
- *AtHB1* cumple un papel en la regulación de la elongación del hipocotilo, principalmente en un régimen de día corto y no participaría del proceso de escotomorfogénesis en plantas de *Arabidopsis thaliana* como había sido informado previamente por otros autores.
- PIF1 regula positivamente la expresión de *AtHB1* promoviendo la elongación del hipocotilo.

- AtHB1 regula el crecimiento del hipocotilo mediante la regulación de genes involucrados en la elongación celular, particularmente en la composición y elongación de la pared celular.

Capítulo 3:

- El péptido CPuORF33 presenta una elevada conservación de secuencia en diversas especies vegetales, tanto mono- como dicotiledóneas.
- La región 5' no codificante que contiene el CPuORF33 de *AtHB1* actúa como un regulador negativo de la expresión del gen impidiendo su expresión cotiledones.
- El 5'UTR impide la inducción de *AtHB1* por etileno, pero no afecta el aumento de expresión ejercido por el fotoperíodo.
- AtHB1 inhibe la respuesta al etileno en plántulas crecidas en un fotoperíodo de día largo.
- En plántulas, AtHB1 no se encuentra regulado por el *nonsense-mediated mRNA decay*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

- Aarts, M.G.; Fiers, M.W. (2003). *What drives plant stress genes?* Trends Plant Sci. 8: 99-102.
- Ades, S.E.; Sauer, R.T. (1995). *Specificity of minor-groove and major-groove interactions in a homeodomain-DNA complex.* Biochemistry, 34: 14601–14608.
- Agalou, A.; Purwantomo, S.; Overnas, E.; Johannesson, H.; Zhu, X.; Estiadi, A.; de Kam, R.J.; Engström, P.; Slamet-Loedin, I.H.; Zhu, Z.; Wang, M.; Xiong, L.; Meijer, A.H.; Ouwkerk, P.B.F. (2008). *A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members.* Plant Mol. Biol. 66: 87-103.
- Al-Sady, B.; Ni, W.; Kircher, S.; Schäfer, E.; Quail, P.H. (2006). *Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation.* Mol. Cell, 23: 439–446.
- Al-Sady, B.; Kikis, E.A.; Monte, E.; Quail, P.H. (2008). *Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105: 2232–2237.
- Alatorre-Cobos, F.; Cruz-Ramírez, A.; Hayden, C.A., Pérez-Torrez, C.-A.; Chauvin, A.-L.I Ibarra-Laclette, E.; Alva-Cortés, E.; Jorgensen, R.A.; Herrera-Estrella, L. (2012). *Translational regulation of Arabidopsis XIPOTL1 is modulated by phosphocholine levels via the phylogenetically conserved upstream open reading frame 30.* J. Exp. Bot. 63: 5203-5221.
- Alexander, L.; Grierson, D. (2002). *Ethylene Biosynthesis and Action in Tomato: A Model for Climacteric Fruit Ripening.* J. Exp. Bot. 53: 2039-2055.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.* Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- Aoyama, T.; Dong, C.-H.; Wu, Y.; Carabelli, M.; Sessa, G.; Ruberti, I.; Morelli, G.; Chua, N.-H. (1995). *Ectopic expression of the Arabidopsis transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco.* Plant Cell, 7: 1773-1785.
- Arciga-Reyes, L.; Wootton, L.; Kieffer, M.; Davies, B. (2006). *UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis.* Plant J. 47: 480-489.
- Ariel, F.D.; Manavella, P.A.; Dezar, C.A.; Chan, R.L. (2007). *The true story of the HD-Zip*

- family*. Trends Plant Sci. 12: 419-426.
- Ariel, F.; Diet, A.; Verdenaud, M.; Gruber, V.; Frugier, F.; Chan, R.; Crespi, M. (2010a). *Environmental regulation of lateral root emergence in Medicago truncatula requires the HD-Zip I transcription factor HBI*. Plant Cell, 22: 2171–2183.
- Ariel, F.; Diet, A.; Crespi, M.; Chan, R. (2010b). *The LOB-like transcription factor MtLBD1 controls Medicago truncatula root architecture under salt stress*. Plant Signal. Behav. 5: 1666–1668.
- Arce, A.L.; Raineri, J.; Capella, M.; Cabello, J.V.; Chan, R.L. (2011). *Uncharacterized conserved motifs outside the HD-Zip domain in HD-Zip subfamily I transcription factors; a potential source of functional diversity*. BMC Plant Biol. 11: 42.
- Asamizu, E.; Shimoda, Y.; Kouchi, H.; Tabata, S.; Sato, S. (2008). *A Positive Regulatory Role for LjERF1 in the Nodulation Process Is Revealed by Systematic Analysis of Nodule-Associated Transcription Factors of Lotus japonicus*. Plant Physiol. 147: 2030-2040.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. (1983). In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Bae, G.; Choi, G. (2008). *Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins*. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 281–311.
- Bailey, T.L.; Boden, M.; Buske, F.A.; Frith, M.; Grant, C.E.; Clementi, L.; Ren, J.L.; Wilfred, W.; Noble, W.S. (2009). *MEME SUITE: tools for motif discovery and searching*. Nucleic Acids Res. 35: 202-208.
- Bauer, D.; Viczian, A.; Kircher, S.; Nobis, T.; Nitschke, R.; Kunkel, T.; Panigrahi, K.C.S.; Ádám, É.; Fejes, E.; Schäfer, E.; Nagy, F. (2004). *Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in Arabidopsis*. Plant Cell, 16: 1433–1445.
- Bayarsaihan, D.; Enkhmandakh, B.; Makeyev, A.; Grealley, J.M.; Leckman, J.F.; Ruddle, F.H. (2003). *Homez, a homeobox leucine zipper gene specific to the vertebrate lineage*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 10358–10363.
- Bender, W.; Akam, M.; Karch, F.; Beachy, P.A.; Peifer, M.; Spierer, P.; Lewis, E.B.; Hogness, D.S. (1983). *Molecular Genetics of the Bithorax Complex in Drosophila melanogaster*. Science, 221: 23-29.

- Berger, F.; Linstead, P.; Dolan, L.; Haseloff, J.** (1998). *Stomata patterning on the hypocotyl of Arabidopsis thaliana is controlled by genes involved in the control of root epidermis patterning.* Dev. Biol. 194: 226–234.
- Bimboim, H.C.; Doly, J.** (1979). *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.
- Bornberg-Bauer, E.; Beaussart, F.; Kummerfeld, S.K.; Teichmann, S.A.; Weiner, J.** (2005). *The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks.* Cell. Mol. Life Sci. 62: 435-445.
- Branden, C.; Tooze, J.** (1999). *Introduction to Protein Structure.* Second Edition. Garland Publishing, New York.
- Bray, E.A.** (2004). *Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana.* J. Exp. Bot. 55: 2331-2341.
- Briggs, W.R.; Huala, E.** (1999). *Blue-light photoreceptors in higher plants.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15: 33–62.
- Briggs, W.R.; Christie, J.M.** (2002). *Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors.* Trends Plant Sci. 7: 204–210.
- Brown, D.M.; Zeef, L.A.H.; Ellis, J.; Goodacre, R.; Turner, S.R.** (2005). *Identification of novel genes in Arabidopsis involved in secondary cell wall formation using expression profiling and reverse genetics.* Plant Cell, 17: 2281–2295.
- Bu, Q.; Zhu, L.; Dennis, M.D.; Yu, L.; Lu, S.X.; Person, M.D.; Tobin, E.M.; Browning, K.S.; Huq, E.** (2011). *Phosphorylation by CK2 Enhances the Rapid Light-induced Degradation of Phytochrome Interacting Factor 1 in Arabidopsis.* J. Biol. Chem. 286: 12066-12074.
- Cabello, J.V.; Dezar, C.A.; Manavella, P.A.; Chan, R.L.** (2007). *The intron of the Arabidopsis thaliana COX5c gene is able to improve the drought tolerance conferred by the sunflower Hahb-4 transcription factor.* Planta, 226: 1143-1154.
- Cabello, J.V.; Arce, A.L.; Chan, R.L.** (2012). *The homologous HD-Zip I transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer cold tolerance via the induction of pathogenesis related and glucanase proteins.* Plant J. 69: 141-153.
- Cabello, J.V.; Chan, R.L.** (2012). *The homologous homeodomain-leucine zipper transcription factors*

- HaHB1 and AtHB13 confer tolerance to drought and salinity stresses via the induction of proteins that stabilize membranes.* Plant Biotech. J. 10: 815-825.
- Calvo, S.E.; Pagliarini, D.J.; Mootha, V.K.** (2009). *Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 7507–7512.
- Canto, T.; Uhrig, J.F.; Swanson, M.; Wright, K.M. I MacFarlane, S.A.** (2006). *Translocation of Tomato Bushy Stunt Virus P19 Protein into the Nucleus by ALY Proteins Compromises Its Silencing Suppressor Activity.* J. Virol. 80: 9064-9072.
- Casadaban, M.J.; Cohen, S.N.** (1980). *Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli.* J. Mol. Biol. 138: 179-207.
- Castillon, A.; Shen, H.; Huq, E.** (2007). *Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks.* Trends Plant Sci. 12: 514-521.
- Chan, R.L.; Gago, G.M.; Palena, C.M.; González, D.H.** (1998). *Homeoboxes in plant development.* Biochim. Biophys. Acta, 1442: 1-19.
- Chang, K.S.; Lee, S.H.; Hwang, S.B.; Park, K.Y.** (2000). *Characterization and translational regulation of the arginine decarboxylase gene in carnation (Dianthus caryophyllus L.).* Plant J. 24: 45–56.
- Charrier, B.; Champion, A.; Henry, Y.; Kreis, M.** (2002). *Expression profiling of the whole Arabidopsis shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.* Plant Physiol. 130: 577-590.
- Cheong, Y.H.; Chang, H.S.; Gupta, R.; Wang, X.; Zhu, T.; Luan, S.** (2002). *Transcriptional Profiling Reveals Novel Interactions between Wounding, Pathogen, Abiotic Stress, and Hormonal Responses in Arabidopsis.* Plant Physiol. 129: 661-677.
- Chinnusamy, V.; Schumaker, K.; Zhu, J.-K.** (2004). *Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants.* J. Exp. Bot. 55: 225-236.
- Choi, H.; Jeong, S.; Kim, D.S.; Na, H.J.; Ryu, J.S.; Lee, S.S.; Nam, H.G.; Lim, P.O.; Woo, H.R.** (2013). *The homeodomain-leucine zipper ATHB23, a phytochrome B-interacting protein, is important for phytochrome B-mediated red light signaling.* Physiol. Plant. 150: 308-320.

- Chomczynski, P.; Sacchi, N.** (1987). *Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction*. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Clough, S.J.; Bent, A.F.** (1998). *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Comnier, J.P.; de Billy, F.; Gamas, P.; Niebel, A.; Rivas, S.** (2008). *Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP 2-1 by a uORF controls root nodule development*. *Genes Dev.* 22: 1549–1559.
- Comelli, R.N.; Welchen, E.; Kim, H.J.; Hong, J.C.; González, D.H.** (2012). *Delta subclass HD-Zip proteins and a B-3 AP2/ERF transcription factor interact with promoter elements required for expression of the Arabidopsis cytochrome c oxidase 5b-1 gene*. *Plant Mol. Biol.* 80: 157-167.
- Connolly, E.L.; Fett, J.P.; Guerinot, M.L.** (2002). *Expression of the IRT1 Metal Transporter Is Controlled by Metals at the Levels of Transcript and Protein Accumulation*. *Plant Cell*, 14: 1347-1357.
- Conti, E.; Izaurralde, E.** (2005). *Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 316-325.
- Cosgrove, D.J.** (1994). *Photomodulation of growth*. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds). *Photomorphogenesis in plants*. Kluwer, Dordrecht, pp 631–658.
- Crooks, G.E.; Hon, G.; Chandonia, J.M.; Brenner, S.E.** (2004). *WebLogo: a sequence logo generator*. *Genome Res.* 14: 1188–1190.
- Dai, M.; Hu, Y.; Ma, Q.; Zhao, Y.; Zhou, D.X.** (2008). *Functional analysis of rice HOMEBOX4 (Osbox4) gene reveals a negative function in gibberellin responses*. *Plant Mol. Biol.* 66: 289-301.
- David-Assael, O.; Saul, H.; Saul, V.; Mizrachy-Dagri, T.; Berezin, I.; Brook, E.; Shaul, O.** (2005). *Expression of AtMHX, an Arabidopsis vacuolar metal transporter, is repressed by the 5' untranslated region of its gene*. *J. Exp. Bot.* 56: 1039-1047.
- de Felippes, F.F.; Weigel, D.** (2010). *Transient assays for the analysis of miRNA processing and function*. *Methods Mol. Biol.* 592: 255-264.
- de Lucas, M.; Daviere, J.M.; Rodriguez-Falcon, M.; Pontin, M.; Iglesias-Pedraz, J.M.; Lorrain, S.; Fankhauser, C.; Blazquez, M.A.; Titarenko, E.; Prat, S.** (2008). *A*

- molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation.* Nature, 451: 480-U411.
- De Smet, I.; Lau, S.; Ehrismann, J.S.; Axiotis, I.; Kolb, M.; Kientz, M.; Weijers, D.; Jürgens, G.** (2013). *Transcriptional repression of BODENLOS by HD-ZIP transcription factor HB5 in Arabidopsis thaliana.* J. Exp. Bot. 64: 3009–3019.
- Deng, X.; Phillips, J.; Meijer, A.H.; Salamini, F.; Bartels, D.** (2002). *Characterization of five novel dehydration-responsive homeodomain leucine zipper genes from the resurrection plant Craterostigma plantagineum.* Plant Mol. Biol. 49: 601-610.
- Dezar, C.A.; Fedrigo, G.V.; Chan, R.L.** (2005a). *The promoter of the sunflower HD-Zip protein gene Habb4 directs tissue-specific expression and is inducible by water stress, high salt concentrations and ABA.* Plant Sci. 169: 447-456.
- Dezar, C.A.; Gago, G.M.; González, D.H.; Chan, R.L.** (2005b). *Habb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to Arabidopsis thaliana plants.* Transgenic Res. 14: 429-440.
- Döring, P.; Treuter, E.; Kistner, C.; Lyck, R.; Chen, A.; Nover, L.** (2000). *The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2.* Plant Cell, 12: 265-278.
- Duek, P.D.; Fankhauser, C.** (2005). *bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling.* Trends Plant Sci. 10: 51–54.
- Ecker, J.R.** (1995). *The ethylene signal transduction pathway in plants.* Science, 268: 667–675.
- Fankhauser, C.; Chory, J.** (1997). *Light control of plant development.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13: 203–229.
- Fankhauser, C.; Casal, J.J.** (2004). *Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant.* Plant J. 39: 747-760.
- Feng, S.H., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J.L., Wang, F., Chen, L.Y., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schäfer, E.; Fu, X.; Fan, L.-M.; Wang, X.** (2008). *Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins.* Nature, 451: 475-U479.
- Finch-Savage, W.E.; Leubner-Metzger, G.** (2006). *Seed dormancy and the control of germination.* New Phytol. 171: 501-523.

- Finn, R.D.; Tate, J.; Mistry, J.; Coghill, P.C.; Sammut, S.J.; Hotz, H.-R.; Ceric, G.; Forslund, K.; Eddy, S.R.; Sonnhammer, E.L.L.; Bateman, A. (2008). *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res. 36: 281-288.
- Franklin, K.A.; Quail, P.H. (2010). *Phytochrome functions in Arabidopsis development*. J. Exp. Bot. 61: 11–24.
- Fujimori, T.; Yamashino, T.; Kato, T.; Mizuno, T. (2004). *Circadian-Controlled Basic/Helix-Loop-Helix Factor, PIL6, Implicated in Light-Signal Transduction in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 45: 1078-1086.
- Gabriele, S.; Rizza, A.; Martone, J.; Circelli, P.; Constantino, P.; Vittorioso, P. (2010). *The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene AtGA3ox1*. Plant J. 61: 312-323.
- Gago, G.M.; Almoguera, C.; Jordano, J.; Gonzalez, D.H.; Chan, R.L. (2002). *Habb-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower*. Plant, Cell & Environ. 25: 633-640.
- Gamborg, O.L.; Miller R.A.; Ojima, K. (1968). *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- Garber, R.L.; Kuroiwa A.; Gehring, W.J. (1983). *Genomic and cDNA clones of the homeotic locus Antennapedia in Drosophila*. EMBO J. 2: 2027-2036.
- Gehring, W.J. (1987). *Homeoboxes in the study of development*. Science, 236: 1245-1252.
- Gehring, W.J.; Qian, Y.Q.; Billeter, M.; Furukubo-Tokunaga, K.; Schier, A.F.; Resendez-Perez, D.; Affolter, M.; Otting, D.; Wüthrich, K. (1994). *Homeodomain-DNA recognition*. Cell, 78: 211-223.
- Gendreau, E.; Traas, J.; Desnos, T.; Grandjean, O.; Caboche, M.; Höfte, H. (1997). *Cellular basis of hypocotyl growth in Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 114: 295–305.
- Gietz, D.; Jean, A.S.; Woods, R.A.; Schiestl, R.H. (1992). *Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells*. Nucleic Acids Res. 20: 1425-.
- Guindon, S.; Gascuel, O. (2003). *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood*. Syst. Biol. 52: 696-704.
- Guo, Y.; Cai, Z.; Gan, S. (2004). *Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence*. Plant Cell Environ. 27: 521-549.

- Gyula, P.; Schäfer, E.; Nagy, F. (2003). *Light perception and signalling in higher plants*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 446-452.
- Hajdukiewicz, P.; Svab, Z.; Maliga, P. (1994). *The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation*. *Plant Mol. Biol.* 25: 989-994.
- Hanfrey, C.; Franceschetti, M.; Mayer, M.J.; Illingworth, C.; Michael, A.J. (2002). *Abrogation of Upstream Open Reading Frame-mediated Translational Control of a Plant S-Adenosylmethionine Decarboxylase Results in Polyamine Disruption and Growth Perturbations*. *J. Biol. Chem.* 277: 44131-44139.
- Hanson, J.; Johannesson, H.; Engström, P. (2001). *Sugar-dependent alterations in cotyledon and leaf development in transgenic plants expressing the HD-Zip gene ATHB13*. *Plant Mol. Biol.* 2: 247-262.
- Harrison, S.J.; Mott, E.K.; Parsley, K.; Aspinal, S.; Gray, J.C.; Cottage, A. (2006). *A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation*. *Plant Methods*, 2: 19.
- Harper, J.W.; Adami, G.R.; Wei, N.; Keyomarsi, K.; Elledge, S.J. (1993). *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. *Cell*, 75: 805-816.
- Hartmann, U.; Sagasser, M.; Mehrrens, F.; Stracke, R.; Weisshaar, B. (2005). *Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes*. *Plant Mol. Biol.* 57: 155-171.
- Hayden, C.A.; Bosco, G. (2008). *Comparative genomic analysis of novel conserved peptide upstream open reading frames in Drosophila melanogaster and other dipteran species*. *BMC Genomics*, 9: 61.
- Hayden, C.A.; Jorgensen, R.A. (2007). *Identification of novel conserved peptide uORF homology groups in Arabidopsis and rice reveals ancient eukaryotic origin of select groups and preferential association with transcription factor-encoding genes*. *BMC Biology*, 5: 32.
- Henriksson, E.; Olsson, A.S.B.; Johannesson, H.; Johansson, H.; Hanson, J.; Engström, P.; Söderman, E. (2005). *Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships*. *Plant Physiol.* 139: 509-518.

- Higuchi, R.; Krummel, B.; Saiki, R.K. (1988). *A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions*. Nucleic Acids Res. 16: 7351–7367.
- Hiltbrunner, A.; Nagy, F.; Schäfer, E. (2007). *Phytochromes*. In: Light and Plant Development. Eds: Whitelam, G.C. and Halliday, K.J. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Hjellström, M.; Olsson, A.S.B.; Engström, P.; Söderman, E.M. (2003). *Constitutive expression of the water deficit-inducible homeobox gene ATHB7 in transgenic Arabidopsis causes a suppression of stem elongation growth*. Plant Cell Environ. 26: 1127-1136.
- Hofer, J.; Turner, L.; Moreau, C.; Ambrose, M.; Isaac, P.; Butcher, S.; Weller, J.; Dupin, A.; Dalmais, M.; Le Signor, C.; Bendahmane, A.; Ellis, N. (2009). *Tendrill-less regulates tendrill formation in pea leaves*. Plant Cell, 21: 420-428.
- Hornitschek, P.; Lorrain, S.; Zoete, V.; Michielin, O.; Fankhauser, C. (2009). *Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers*. EMBO J. 28: 3893-3902.
- Hornitschek, P.; Kohnen, M.V.; Lorrain, S.; Rougemont, J.; Ljung, K.; Lopez-Vidriero, I.; Franco-Zorrilla, J.M.; Solano, R.; Trevisan, M.; Pradervand, S.; Xenarios, I.; Fankhauser, C. (2012). *Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling*. Plant J. 71: 699-711.
- Huq, E.; 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.
- Huq, E.; Al-Sady, B.; Hudson, M.; Kim, C.; Apel, K.; Quail, P.H. (2004) *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 Is a Critical bHLH Regulator of Chlorophyll Biosynthesis*. Science, 305: 1937-1941.
- Ingles, C.J.; Shales, M.; Cress, W.D.; Triezenberg, S.J.; Greenblatt, J. (1991). *Reduced binding of TFIID to transcriptionally compromised mutants of VP16*. Nature, 351: 588–590.
- James, P.; Halladay, J.; Craig, E.A. (1996). *Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast*. Genetics, 144: 1425-1436.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A.; Bevan, M.W. (1987). *GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. EMBO J. 6: 3901-3907.
- Jiao, Y.; Lau, O.S.; Deng, X.W. (2007). *Light-regulated transcriptional networks in higher plants*.

Nat. Rev. Genet. 8: 217-230.

- Johannesson, H.; Wang, Y.; Engström, P.** (2001). *DNA-binding and dimerization preferences of Arabidopsis homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro*. Plant Mol. Biol. 45: 63-73.
- Johnson, P.R.; Ecker, J.R.** (1998). *The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective*. Annu. Rev. Genet. 32: 227-254.
- Jones, D.T.; Taylor, W.R.; Thornton, J.M.** (1992). *The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences*. Bioinformatics, 8: 275-282.
- Jorgensen, R.A.; Dorantes-Acosta, A.E.** (2012). *Conserved peptide upstream open read-ing frames are associated with regulatory genes in angiosperms*. Front. Plant Sci. 3: 191.
- Karimi, M.; Inze, D.; Depicker, A.** (2002). *GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation*. Trends Plant Sci. 7: 193-195.
- Katoh, K.; Toh, H.** (2008). *Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program*. Brief Bioinform. 9: 286-298.
- Kende, H.** (1993). *Ethylene biosynthesis*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44: 283-307.
- Khanna, R.; Huq, E.; Kikis, E.A.; Al-Sady, B.; Lanzatella, C.; Quail, P.H.** (2004). *A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors*. Plant Cell, 16: 3033-3044.
- Kieber, J.J.; Rothenberg, M.; Roman, G.; Feldmann, K.A.; Ecker, J.R.** (1993). *Ptr1, a Negative Regulator of the Ethylene Response Pathway in Arabidopsis, Encodes a Member of the Raf Family of Protein Kinases*. Cell, 72: 427-441.
- Kim, D.H.; Yamaguchi, S.; Lim, S.; Oh, E.; Park, J.; Hanada, A.; Kamiya, Y.; Choi, G.** (2008). *SOMNUS, a CCCH-Type Zinc Finger Protein in Arabidopsis, Negatively Regulates Light-Dependent Seed Germination Downstream of PIL5*. Plant Cell, 20: 1260-1277.
- Kim, J.; Yi, H.; Choi, G.; Shin, B.; Song, P.-S.; Choi, G.** (2003). *Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction*. Plant Cell, 15: 2399-2407.
- Kim, K.; Shin, J.; Lee, S.H.; Kweon, H.S.; Maloof, J.N.; Choi, G.** (2011). *Phytochromes inhibit hypocotyl negative gravitropism by regulating the development of endodermal amyloplasts through phytochrome-interacting factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108: 1729-1734.

- Kim, Y.-K.; Son, O.; Kim, M.-R.; Nam, K.-H.; Kim, G.-T.; Lee, M.-S.; Choi, S.-Y.; Cheon, C.-I. (2007). *ATHB23, an Arabidopsis class I homeodomain-leucine zipper gene, is expressed in the adaxial region of young leaves*. Plant Cell Rep. 26: 1179-1185.
- Komatsuda, T.; Pourkheirandish, M.; He, C.; Azhaguvel, P.; Kanamori, H.; Perovic, D.; Stein, N.; Graner, A.; Wicker, T.; Tagiri, A.; Lundqvist, U.; Fujimura, T.; Matsuoka, M.; Matsumoto, T.; Yano, M. (2007). *Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper I-class homeobox gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 1424–1429.
- Korshunova, Y.O.; Eide, D.; Clark, W.G.; Guerinot, M.L.; Pakrasi, H.B. (1999). *The IRT1 protein from Arabidopsis thaliana is a metal transporter with a broad substrate range*. Plant Mol. Biol. 40: 37-44.
- Kotak, S.; Port, M.; Ganguli, A.; Bicker, F.; von Koskull-Döring, P. (2004). *Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization*. Plant J. 39: 98–112.
- Kozak, M. (1987). *Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes*. Mol. Cell. Biol. 7: 3438–3445.
- Kozak, M. (2002). *Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation*. Gene, 299: 1–34.
- Kramer, P.J.; Boyer, J.S. (1995). *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego.
- Kunihiro, A.; Yamashino, T.; Nakamichi, N.; Niwa, Y.; Nakanishi, H.; Mizuno, T. (2011). *PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 and 5 (PIF4 and PIF5) Activate the Homeobox ATHB2 and Auxin-Inducible IAA29 Genes in the Coincidence Mechanism Underlying Photoperiodic Control of Plant Growth of Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 52: 1315-1329.
- Kushnirov, V.V. (2000). *Rapid and reliable protein extraction from yeast*. Yeast, 16: 857–860.
- Laemmli, U. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227: 680-685.
- Lambers, H.; Chapin, F.S.; Pons, T.J. (2008). *Plant Physiological Ecology*. Second edition. Eds: Springer Science + Business Media, LLC, New York, USA.

- Landschulz, W.H.; Johnson, P.F.; McKnight, S.L. (1988). *The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins*. *Science*, 240: 1759-1764.
- Lau, O.S.; Deng, X.W. (2010). *Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 571-577.
- Lee, Y.H.; Chun, J.Y. (1998). *A new homeodomain-leucine zipper gene from Arabidopsis thaliana induced by water stress and abscisic acid treatment*. *Plant Mol. Biol.* 37: 377-384.
- Lee, Y.H.; Oh, H.S.; Cheon, C.I.; Hwang, I.T.; Kim, Y.J.; Chun, J.Y. (2001). *Structure and expression of the Arabidopsis thaliana homeobox gene Athb-12*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 133-141.
- Leivar, P.; Monte, E.; Al-Sady, B.; Carle, C.; Storer, A.; Alonso, J.M.; Ecker, J.; Quail, P.H. (2008a). *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.; Oka, Y.; Liu, T.; Carle, C.; Castillon, A.; Huq, E.; Quail, P.H. (2008b). *Multiple Phytochrome-Interacting bHLH Transcription Factors Repress Premature Seedling Photomorphogenesis in Darkness*. *Curr. Biol.* 18: 1815-1823.
- Leivar, P.; Tepperman, J.M.; Monte, E.; Calderon, R.H.; Liu, T.L.; Quail, P.H. (2009). *Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young Arabidopsis seedlings*. *Plant Cell*, 21: 3535-3553.
- Leivar, P.; Quail, P.H. (2011). *PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub*. *Trends Plant Sci.* 16: 19-28.
- Leivar, P.; Monte, E.; Cohn, M.M.; Quail, P.H. (2012a). *Phytochrome signaling in green Arabidopsis seedlings: Impact assessment of a mutually negative phyB-PIF feedback loop*. *Mol. Plant*, 5: 734-749.
- Leivar, P.; Tepperman, J.M.; Cohn, M.M.; Monte, E.; Al-Sady, B.; Erickson, E.; 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.
- Leivar, P.; Monte, E. (2014). *PIFs: Systems Integrators in Plant Development*. *Plant Cell*, 26: 56-78.

- Li, J.; Chory, J. (1998). *Preparation of DNA from Arabidopsis*. In *Methods in Molecular Biology* 82, Arabidopsis Protocols. Martinez-Zapateur, J.M. and Salinas, J. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Li, J.-F.; Park, E.; von Arnim, A.G.; Nebenführ, A. (2009). *The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species*. *Plant Methods*, 5: 6.
- 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.; Ecker, J.R.; Kay, S.A.; Chory, J. (2012). *Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture*. *Genes Dev.* 26: 785–790.
- Li, M.; Bahn, S.C.; Guo, L.; Musgrave, W.; Berg, H.; Welti, R.; Wang, X. (2011). *Patatin-Related Phospholipase pPLAIIIb-Induced Changes in Lipid Metabolism Alter Cellulose Content and Cell Elongation in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 1107-1123.
- Li, Y.; Jing, Y.; Li, J.; Xu, G.; Lin, R. (2014). *Arabidopsis VQ MOTIF-CONTAINING PROTEIN29 Represses Seedling Deetiolation by Interacting with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1*. *Plant Physiol.* 164: 2068-2080.
- Lin, Y.; Schiefelbein, J. (2001). *Embryonic control of epidermal cell patterning in the root and hypocotyl of Arabidopsis*. *Development*, 128: 3697-3705.
- Lin, Y.S.; Ha, I.; Maldonado, E.; Reingberg, D.; Green, M.R. (1991). *Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activation region*. *Nature*, 353: 569–571.
- Lin, Z.; Hong, Y.; Yin, M.; Li, C.; Zhang, K.; Grierson, D. (2008). *A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening*. *Plant J.* 55: 301–310.
- Liu, L.; White, M.J.; MacRae, T.H. (1999). *Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation*. *Eur. J. Biochem.* 262: 247-257.
- Liscum, E. (2002). *Phototropism: mechanisms and outcomes*. In: *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, doi/10.1199/tab.0042, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method*. *Methods*, 25: 402-408.
- Lorrain, S.; Allen, T.; Duek, P.D.; Whitelam, G.C.; Fankhauser C. (2008). *Phytochrome-*

- mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors.* Plant J. 53: 312–323.
- Lü, P.; Zhang, C.; Liu, J.; Liu, X.; Jiang, G.; Jiang, X.; Khan, M.A.; Wang, L.; Hong, B.; Gao, J. (2014). *RhHB1 mediates the antagonism of gibberellins to ABA and ethylene during rose (Rosa hybrida) petal senescence.* Plant J. 78: 578-590.
- Manavella, P.A.; Arce, A.L.; Dezar, C.A.; Bitton, F.; Renou, J.P.; Crespi, M.; Chan, R.L. (2006). *Cross-talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Habb-4 transcription factor.* Plant J. 48: 125-137.
- Manavella, P.A.; Dezar, C.A.; Bonaventure, G.; Baldwin, I.T.; Chan, R.L. (2008). *HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses.* Plant J. 56: 376-388.
- Manavella, P.A. (2008). *El factor de transcripción HAHB4 modula la comunicación entre distintas vías de respuesta a factores bióticos y abióticos en plantas de girasol.* Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.
- Maris, A.; Suslov, D.; Fry, S.C.; Verbelen, J.-P.; Vissenberg, K. (2009). *Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of Arabidopsis and their effect of root growth and cell wall extension.* J. Exp. Biol. 60: 3959-3972.
- Martínez-García, J.F.; Huq, E.; Quail, P.H. (2000). *Direct Targeting of Light Signals to a Promoter Element-Bound Transcription Factor.* Science, 288: 859-863.
- Matsushita, T.; Mochizuki, N.; Nagatani, A. (2003). *Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus.* Nature, 424: 571-574.
- Meijer, A.H.; de Kam, R.J.; d'Erfurth, I.; Shen, W.; Hoge, J.H.C. (2000). *HD-Zip proteins of families I and II from rice: interactions and functional properties.* Mol. Gen. Genet. 263: 12-21.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, J. H. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; p. 74.

- Mitsuda, N.; Ohme-Takagi, M.** (2009). *Functional analysis of transcription factors in Arabidopsis*. Plant Cell Physiol. 50: 1232–1348.
- Miura, K.; Jin, J.B.; Lee, J.; Yoo, C.Y.; Stirm, V.; Miura, T.; Ashworth, E.N.; Bressan, R.A.; Yun, D.-J.; Hasegawa, P.M.** (2007). *SIZ1-Mediated Sumoylation of ICE1 Controls CBF3/DREB1A Expression and Freezing Tolerance in Arabidopsis*. Plant Cell, 19: 1403-1414.
- Miura, K.; Hasegawa, P.** (2010). *Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants*. Trends Cell Biol. 20: 223-232.
- Moens, C.B.; Selleri, L.** (2006). *Hox cofactors in vertebrate development*. Dev. Biol. 291: 193-206.
- Möller, S.G.; Ingles, P.J.; Whitelan, G.C.** (2002). *The cell biology of phytochrome signaling*. New Phytol. 154: 553–590.
- Monte, E.; Tepperman, J.M.; Al-Sady, B.; Kaczorowski, K.A.; Alonso, J.M.; Ecker, J.R.; Li, X.; Zhang, Y.; Quail, P.H.** (2004). *The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 16091–16098.
- Montgomery, B.L.; Lagarias, J.C.** (2002). *Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light*. Trends Plant Sci. 7: 357–366.
- Mukherjee, K.; Brocchieri, L.; Bürglin, T.R.** (2009). *A Comprehensive Classification and Evolutionary Analysis of Plant Homeobox Genes*. Mol. Biol. Evol. 26: 2775-2794.
- Murashige, T.; Skoog, F.** (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nagalakshmi, U.; Zhong, W.; Waern, K.; Shou, C.; Raha, D.; Gerstein, M.; Snyder, M.** (2008). *The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing*. Science, 320: 1344–1349.
- Nemhauser, J.; Chory, J.** (2002). *Photomorphogenesis*. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, doi: 10.1199/tab.0054, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Ni, M.; Tepperman, J.M.; Quail, P.H.** (1998). *PIF3, a Phytochrome-Interacting Factor Necessary for Normal Photoinduced Signal Transduction, Is a Novel Basic Helix-Loop-Helix Protein*. Cell, 95: 657-667.

- Ni, M.; Tepperman, J.M.; Quail, P.H. (1999). *Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light*. *Nature*, 400: 781–784.
- Niwa, Y.; Yamashino, T.; Mizuno, T. (2009). *The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 50: 838–854.
- Nozue, K.; Covington, M.F.; Duek, P.D.; Lorrain, S.; Fankhauser, C.; Harmer S.L.; Maloof J.N. (2007). *Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues*. *Nature*, 448: 358–361.
- Oh, E.; Kim, J.; Park, E.; Kim, J.-I.; Kang, C.; Choi, G. (2004). *PIL5, a Phytochrome-Interacting Basic Helix-Loop-Helix Protein, Is a Key Negative Regulator of Seed Germination in Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16: 3045-3058.
- Oh, E.; Yamaguchi, S.; Kamiya, Y.; Bae, G.; Chung, W.-I.; Choi, G. (2006). *Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabiodopsis*. *Plant J.* 47: 124-139.
- Oh, E.; Yamaguchi, S.; Hu, J.; Yusuke, J.; Jung, B.; Paik, I.; Lee, H.-S.; Sun, T.; Kamiya, Y.; Choi, G. (2007). *PIL5, a Phytochrome-Interacting bHLH Protein, Regulates Gibberellin Responsiveness by Binding Directly to the GAI and RGA Promoters in Arabidopsis Seeds*. *Plant Cell*, 19: 1192-1208.
- Oh, E.; Kang, H.; Yamaguchi, S.; Park, J.; Lee, D.; Kamiya, Y.; Choi, G. (2009). *Genome-Wide Analysis of Genes Targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during Seed Germination in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 403-419.
- Oh, E.; Zhu, J.-Y.; Wang, Z.-Y. (2012). *Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses*. *Nat. Cell Biol.* 14: 802-809.
- Ohta, M.; Ohme-Takagi, M.; Shinshi, H. (2000). *Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions*. *Plant J.* 22: 29-38.
- Oka, Y.; Matsushita, T.; Mochizuki, N.; Suzuki, T.; Tokutomi, S.; Nagatani, A. (2004). *Functional analysis of a 450-amino acid Nterminal fragment of phytochrome B in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16: 2104-2116.
- Olsson, A.S.; Engström, P.; Söderman, E. (2004). *The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in Arabidopsis*. *Plant Mol.*

Biol. 55: 663-677.

- Ooms, G.; Hooykaas, P.J.; Van Veen, R.J.; Van Beelen, P.; Regensburg-Tuink, T.J.; Schilperoort, R.A. (1982). *Octopine Ti-plasmid deletion mutants of Agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region*. Plasmid, 7: 15-29.
- Palena, C.M.; González, D.H.; Chan, R.L. (1999). *A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain leucine-zipper protein Habb-4 with DNA*. Biochem. J. 341: 81-87.
- Palena, C.M.; Tron, A.E.; Bertocini, C.W.; González, D.H.; Chan, R.L. (2001). *Positively charged residues at the N-terminal arm of the homeodomain are required for efficient DNA binding by homeodomain-leucine zipper proteins*. J. Mol. Biol. 308: 39-47.
- Park, E.; Kim, J.; Lee, Y.; Shin, J.; Oh, E.; Chung, W.I.; Liu, J.R.; Choi, G. (2004). *Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling*. Plant Cell Physiol. 45: 968-975.
- Park, E.; Park, J.; Kim, J.; Nagatani, A.; Lagarias, J.C.; Choi, G. (2012). *Phytochrome B inhibits binding of phytochrome-interacting factors to their target promoters*. Plant J. 72: 537-546.
- Penfield, S.; Josse, E.-M.; Kannangara, R.; Gilday, A.D.; Halliday, K.J.; Graham, I.A. (2005). *Cold and Light Control Seed Germination through the bHLH Transcription Factor SPATULA*. Curr. Biol. 15: 1998-2006.
- Persson, S.; Wei, H.; Miline, J.; Page, G.P.; Somerville, C.R. (2005). *Identification of genes required for cellulose synthesis by repression analysis of public microarray data sets*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 8633-8638.
- Piechulla, B.; Merforth, N.; Rudolph, B. (1998). *Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression*. Plant Mol. Biol. 38: 655-662.
- Pugh, B.F. (1996). *Mechanisms of transcription complex assembly*. Curr. Opin. Cell Biol. 8: 303-311
- Qin, Y.-F.; Li, D.-D.; Wu, Y.-J.; Liu, Z.-H.; Zhang, J.; Zheng, Y.; Li, X.-B. (2010). *Three cotton homeobox genes are preferentially expressed during early seedling development and in response to phytohormone signaling*. Plant Cell Rep. 29: 1147-1156.
- Quail, P.H.; Boylan, M.T.; Parks, B.M.; Short, T.W.; Xu, Y.; Wagner, D. (1995). *Phytochromes: photosensory perception and signal transduction*. Science, 268: 675-680.

- Quail, P.H. (2002). *Phytochrome photosensory signaling networks*. Nat. Rev. 3: 85–92.
- Rahmani, F.; Hummel, M.; Schuurmans, J.; Wiese-Klinkenberg, A.; Smeekens, S.; Hanson, J. (2009). *Sucrose control of translation mediated by an upstream open reading frame-encoded peptide*. Plant Physiol. 150: 1356–1367.
- Rayson, S.; Arciga-Reyes, L.; Wootton, L.; De Torres Zabala, M.; Truman, W.; Graham, N.; Grant, M.; Davies, B. (2012). *A Role for Nonsense-Mediated mRNA Decay in Plants: Pathogen Responses Are Induced in Arabidopsis thaliana NMD Mutants*. PLoS ONE, 7: e31917.
- Ré, D.A.; Dezar, C.A.; Chan, R.L.; Baldwin, I.; Bonaventure, G. (2011). *Nicotiana attenuata NaHD20 plays a role in leaf ABA accumulation during water stress, benzylacetone emission from flowers, and the timing of bolting and flower transitions*. J. Exp. Bot. 62: 155–166.
- Ré, D.A.; Raud, B.; Chan, R.L.; Baldwin, I.; Bonaventure, G. (2012). *RNAi-mediated silencing of the HD-Zip gene HD20 in Nicotiana attenuata affects benzyl acetone emission from corollas via ABA levels and the expression of metabolic genes*. BMC Plant Biol. 12: 60.
- Ré, D.A.; Capella, M.; Bonaventure, G.; Chan, R.L. (2014). *Arabidopsis AtHB7 and AtHB12 evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress*. BMC Plant Biol. 14: 150.
- Reeves, J.H. (1992). *Heterogeneity in the substitution process of amino acid sites of proteins coded for by mitochondrial DNA*. J. Mol. Evol. 35: 17–31.
- Ribichich, K.F.; Arce, A.L.; Chan, R.L. (2014). *Coping with Drought and Salinity Stresses: The Role of Transcription Factors in Crop Improvement*. En: Tuteja N, Gill SS, eds. Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance. Weinheim, Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; pp. 1208.
- Riechmann, J.L.; Heard, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Ziang, C.-Z.; Keddie, J.; Adam, L.; Pineda, O.; Ratcliffe, O.J.; Samaha, R.R.; Creelman, R.; Pilgrim, M.; Broun, P.; Zhang, J.Z.; Ghandehari, D.; Sherman, B.K.; Yu, G.-L. (2000). *Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes*. Science, 290: 2105–2110.
- Riechmann, J.L. (2002). *Transcriptional regulation: a genomic overview*. In: The Arabidopsis Book. Rockville, M.D. American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0085,

<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.

- Riechmann, J.L. (2006). *Transcription factors of Arabidopsis and rice: a genomic perspective*. In Regulation of Transcription in Plants – Annual Plants Reviews Volume 29. Grasser, K.D. Blackwell Publishing.
- Rietz, S.; Dermendjiev, G.; Oppermann, E.; Getah Tafesse, F.; Effendi, Y.; Holk, A.; Parker, J.E.; Teige, M.; Scherer, G.F.E. (2010). *Roles of Arabidopsis Patatin-Related Phospholipases A in Root Development Are Related to Auxin Responses and Phosphate Deficiency*. Mol. Plant, 3: 524-538.
- Rizzini, L.; Favory, J.-J.; Cloix, C.; Faggionato, D.; O'Hara, A.; Kaiserli, E.; Baumeister, R.; Schäfer, E.; Nagy, F.; Jenkins, G.I.; Ulm, R. (2011). *Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein*. Science, 332: 103–106.
- Rottmann, W.H.; Peter, G.F.; Oeller, P.W.; Keller, J.A.; Shen, N.F.; Nagy, B.P.; Taylor, L.P.; Campbell, A.D.; Theologis, A. (1991). *1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase in Tomato Is Encoded by a Multigene Family Whose Transcription Is Induced During Fruit and Floral Senescence*. J. Mol. Biol. 222: 937-961.
- Ruberti, I.; Sessa, G.; Luccheti, S.; Morelli, G. (1991). *A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif*. EMBO J. 10: 1787-1791.
- Saddic, L.; Huvermann, B.; Bazhani, S.; Su, Y.; Winter, C.; Kwon, C.; Collum, R.; Wagner, D. (2006). *The LEAFY target LMI1 is a meristem identity regulator and acts together with LEAFY to regulate expression of CAULIFLOWER*. Development, 133: 1673–1682.
- Saibo, N.J.; Vriezen, W.H.; Beemster, G.T.; Van Der Straeten, D. (2003). *Growth and stomata development of Arabidopsis hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins*. Plant J. 33: 989–1000.
- Sakuma, S.; Pourkheirandish, M.; Matsumoto, T.; Koba, T.; Komatsuda, T. (2010). *Duplication of a well-conserved homeodomain-leucine zipper transcription factor gene in barley generates a copy with more specific functions*. Funct. Integr. Genomics, 10: 123–133.
- Sakuma, S.; Pourkheirandish, M.; Hensel, G.; Kumlehn, J.; Stein, N.; Tagiri, A.; Yamaji, N.; Ma, J.F.; Sassa, H.; Koba, T.; Komatsuda, T. (2013). *Divergence of expression pattern contributed to neofunctionalization of duplicated HD-Zip I transcription factor in barley*. New Phytol. 197: 939–948.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saul, H.; Elharrar, E.; Gaash, R.; Eliaz, D.; Valenci, M.; Akua, T.; Avramov, M.; Frankel, N.; Berezin, I; Gottlieb, D.; Elazar, M.; David-Assael, O.; Tcherkas, V.; Mizrachi, K.; Shaul, O.** (2009). *The upstream open reading frame of the Arabidopsis AtMHX gene has a strong impact on transcript accumulation through the nonsense-mediated mRNA decay pathway*. *Plant J.* 60, 1031-1042.
- Sato, T.; Theologis, A.** (1989). *Cloning the Mrna Encoding 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase, the Key Enzyme for Ethylene Biosynthesis in Plants*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6621-6625.
- Schena, M.; Davis, R.W.** (1992). *HD-Zip Proteins: Members of an Arabidopsis Homeodomain Protein Superfamily*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3894-3898.
- Sedmak, J.; Grossberg, S.** (1977). *A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250*. *Anal. Biochem.* 79: 544-552.
- Sessa, G.; Morelli, G.; Ruberti, I.** (1993). *The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities*. *EMBO J.* 12: 3507-3517.
- Shen, F.; Triezenberg, S.J.; Hensley, P.; Porter, D.; Knutson, J.R.** (1996). *Transcriptional activation domain of the herpesvirus protein VP16 becomes conformationally constrained upon interaction with basal transcription factors*. *J. Biol. Chem.* 271: 4827-4837.
- Shen, H.; Moon, J.; Huq, E.** (2005). *PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in Arabidopsis*. *Plant J.* 44: 1023-1035.
- Shen, H.; Zhu, L.; Castillon, A.; Majee, M.; Downie, B.; Huq, E.** (2008). *Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from Arabidopsis depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes*. *Plant Cell*, 20: 1586-1602.
- Shen, Y.; Khanna, R.; Carle, C.M.; Quail, P.H.** (2007). *Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation*. *Plant Physiol.* 145: 1043-1051.
- Sherman, F.** (1991). *Getting started with yeast*. *Methods Enzymol.* 194: 3-21.

- Shimizu-Sato, S.; Huq, E.; Tepperman, J.M.; Quail, P.H.** (2002). *A light-switchable gene promoter system*. *Nat. Biotechnol.* 20: 1041–1044.
- Shin, D.; Koo, Y.D.; Lee, J.; Lee, H.; Baek, D.; Lee, S.; Cheon, C.-I.; Kwak, S.-S.; Lee, S.Y.; Yun, D.-J.** (2004). *At**hb**-12, a homeobox-leucine zipper domain protein from Arabidopsis thaliana, increases salt tolerance in yeast by regulating sodium exclusion*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 534-540.
- Shin, J.; Kim, K.; Kang, H.; Zulfugarov, I.S.; Bae, G.; Lee, C.-H.; Lee, D.; Choi, G.** (2009). *Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 7660-7665.
- Shinomura, T.; Nagatani, A.; Chory, J.; Furuya, M.** (1994). *The induction of seed germination in Arabidopsis thaliana is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A*. *Plant Physiol.* 104: 363-371.
- Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.** (1997). *Gene expression and signal transduction in water-stress response*. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Simossis, V.A.; Heringa, J.** (2005). *PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information*. *Nucleic Acids Res.* 33: W289-W298.
- Singh, K.B.; Foley, R.C.; Oñate-Sanchez, L.** (2002). *Transcription factors in plant defense and stress responses*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 430-436.
- Sivitz, A.B.; Hermand, V.; Curie, C.; Vert, G.** (2012). *Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 Control Iron Homeostasis via a FIT-Independent Pathway*. *PLoS ONE*, 7: e44843.
- Smalle, J.; Haegman, M.; Kurepa, J.; Van Montagu, M.; Van Der Straeten, D.** (1997). *Ethylene can stimulate Arabidopsis hypocotyl elongation in the light*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 2756–2761.
- Smith, H.** (2000). *Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis*. *Nature*, 407: 585-591.
- Smith, D.; Johnson, K.** (1988). *Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with Glutathione S-Transferase*. *Gene*, 67: 31-40.
- Söderman, E.; Mattsson, J.; Engström, P.** (1996). *The Arabidopsis homeobox gene AT**HB**-7 is induced by water deficit and by abscisic acid*. *Plant J.* 10: 375-381.

- Somers, J.; Pöyry, T.; Willis, A.E. (2013). *A perspective on mammalian upstream open reading frame function*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45: 1690-1700.
- Son, O.; Hur, Y.S.; Kim, Y.K.; Lee, H.J.; Kim, S.; Kim, M.R.; Nam, K.H.; Lee, M.S.; Kim, B.Y.; Park, J.; Park, J.; Lee, S.C.; Hanada, A.; Yamaguchi, S.; Lee, I.J.; Kim, S.K.; Yun, D.J.; Söderman, E.; Cheon, C.I. (2010). *ATHB12, an ABA-Inducible Homeodomain-Leucine Zipper (HD-Zip) Protein of Arabidopsis, Negatively Regulates the Growth of the Inflorescence Stem by Decreasing the Expression of a Gibberellin 20-Oxidase Gene*. Plant Cell Physiol. 51: 1537-1547.
- Soy, J.; Leivar, P.; González-Schain, N.; Sentandreu, M.; Prat, S.; Quail, P.H.; Monte, E. (2012). *Phytochrome-imposed oscillations in PIF3 protein abundance regulate hypocotyl growth under diurnal light/dark conditions in Arabidopsis*. Plant J. 71: 390-401.
- Soy, J.; Leivar, P.; Monte, E. (2014). *PIF1 promotes phytochrome-regulated growth under photoperiodic conditions in Arabidopsis together with PIF3, PIF4, and PIF5*. J. Exp. Bot. 65: 2925-2936.
- Stephenson, P.G.; Fankhauser, C.; Terry, M.J. (2009). *PIF3 is a repressor of chloroplast development*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 7654–7659.
- Stringer, K.F.; Ingles, C.J.; Greenblatt, J. (1990). *Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID*. Nature, 345: 783–786.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Takahashi, H.; Takahashi, A.; Naito, S.; Onouchi, H. (2012). *BAIUCAS: a novel BLAST-based algorithm for the identification of upstream open reading frames with conserved amino acid sequences and its application to the Arabidopsis thaliana genome*. Bioinformatics, 28: 2231–2241.
- Thalor, S.K.; Berberich, T.; Lee, S.S.; Yang, S.H.; Zhu, X.; Imai, R.; Takahashi, Y.; Kusano, T. (2012). *Deregulation of Sucrose-Controlled Translation of a bZIP-Type Transcription Factor Results in Sucrose Accumulation in Leaves*. PLoS ONE, 7: e33111.
- Toledo-Ortiz, G.; Huq, E.; Quail, P.H. (2003). *The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family*. Plant Cell, 15: 1749-1770.
- Toledo-Ortiz, G.; Huq, E.; Rodríguez-Concepción 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.
- Tran, M.K.; Schultz, C.J.; Baumann, U.** (2008). *Conserved upstream open reading frames in higher plants*. BMC Genom. 9: 361.
- Treuter, E.; Nover, L.; Ohme, K.; Scharf, K.-D.** (1993). *Promoter specificity and deletion analysis of three heat stress transcription factors of tomato*. Mol. Gen. Genet. 240: 113-125.
- Tron, A.E.; Welchen, E.; González, D.H.** (2004). *Engineering the loop region of a homeodomain-leucine zipper protein promotes efficient binding to a monomeric DNA binding site*. Biochemistry, 43: 15845-15851.
- Uchiyama-Kadokura, N.; Murakami, K.; Takemoto, M.; Koyanagi, N.; Murota, K.; Naito, S.; Onouchi, H.** (2014). *Polyamine-Responsive Ribosomal Arrest at the Stop Codon of an Upstream Open Reading Frame of the AdoMetDC1 Gene Triggers Nonsense-Mediated mRNA Decay in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 55: 1556-1567.
- Valdés, A.; Övernäs, E.; Johansson, H.; Rada-Iglesias, A.; Engström, P.** (2012). *The homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) class I transcription factors ATHB7 and ATHB12 modulate abscisic acid signalling by regulating protein phosphatase 2C and abscisic acid receptor gene activities*. Plant Mol. Biol. 80: 405-418.
- Van Zhong, G.; Burns, J.K.** (2003). *Profiling ethylene-regulated gene expression in Arabidopsis thaliana by microarray analysis*. Plant Mol. Biol. 53: 117-131.
- Vandenbussche, F.; Vervelen, J.-P.; Van Der Straeten, D.** (2005). *Of light and length: regulation of hypocotyl growth in Arabidopsis*. Bioessays, 27: 275-284.
- Varotto, C.; Maiwald, D.; Pesaresi, P.; Jahns, P.; Salamini, F.; Leister, D.** (2002). *The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in Arabidopsis thaliana*. Plant J. 31: 589-599.
- Vert, G.; Grotz, N.; Dédaldéchamp, F.; Gaymard, F.; Guerinot, M.L.; Briat, J.-F.; Curie, C.** (2002). *IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth*. Plant Cell, 14: 1223-1233.
- Vollbrecht, E.; Veit, B.; Sinha, N.; Hake, S.** (1991). *The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family*. Nature, 350: 241-243.
- von Arnim, A.G.; Jia, Q.; Vaughn, J.N.** (2014). *Regulation of plant translation by upstream open reading frames*. Plant Sci. 214: 1-12.

- Wang, H.; Deng, X.-W. (2002). *Phytochrome signaling mechanism*. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists, doi: 10.1199/tab.0074.1, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Wang, K.L.-C.; Li, H.; Ecker, J.R. (2002). *Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks*. Plant Cell, Supplement 2002: S131-S151.
- Wang, Y.J.; Li, Y.D.; Luo, G.Z.; Tian, A.G.; Wang, H.W.; Zhang, J.S.; Chen, S.Y. (2005). *Cloning and characterization of an HDZip I gene GmHZ1 from soybean*. Planta, 221: 831–843.
- Wang, Y.; Henriksson, E.; Söderman, E.; Henriksson, K.N.; Sundberg, E.; Engström, P. (2003). *The Arabidopsis homeobox gene, ATHB16, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in Arabidopsis*. Dev. Biol. 264: 228-239.
- Welchen, E.; Gonzalez, D.H. (2005). *Differential Expression of the Arabidopsis Cytochrome c Genes Cytc-1 and Cytc-2. Evidence for the Involvement of TCP-Domain Protein-Binding Elements in Anther- and Meristem-Specific Expression of the Cytc-1 Gene*. Plant Physiol. 139: 88-100.
- Westhof, E. (2004). *How to silence silencing*. Chem. Biol. 11: 158-160.
- Wiese, A.; Elzinga, N.; Wobbes, B.; Smeekens, S. (2004). *A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation*. Plant Cell, 16: 1717-1729.
- Wolberger, C.; Vershon, A.K.; Liu, B.; Johnson, A.D.; Pabo, C.O. (1991). *Crystal structure of a MAT α 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions*. Cell, 67: 517–536.
- Xiong, L.; Schumaker, K.S.; Zhu, J.-K. (2002). *Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress*. Plant Cell, 14: S165-S183.
- Xiong, L.; Zhu, J.K. (2002). *Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress*. Plant Cell Environ. 25: 131-139.
- Xiong, Y.; Liu, T.; Tian, C.; Sun, S.; Li, J.; Chen, M. (2005). *Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots*. Plant Mol. Biol. 59: 191–203.
- Xu, X.; Paik, I.; Zhu, L.; Bu, Q.; Huang, X.; Deng, X.W.; Huq, E. (2014). *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR1 Enhances the E3 Ligase Activity of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 to Synergistically Repress Photomorphogenesis in Arabidopsis*.

Plant Cell, 26: 1992-2006.

- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.** (2005). *Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters*. Trends Plant Sci. 10: 88-94.
- Yamashino, T.; Matsushika, A.; Fujimori, T.; Sato, S.; Kato, T.; Tabata, S.; Mizuno, T.** (2003). *A link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 44: 619-629.
- Yang, Z.** (1993). *Maximum-likelihood estimation of phylogeny from DNA sequences when substitution rates differ over sites*. Mol. Biol. Evol. 10: 1396-1401.
- Yu, Y.; Wang, J.; Zhang, Z.; Quan, R.; Zhang, H.; Deng, X.W.; Ma, L.; Huang, R.** (2013). *Ethylene Promotes Hypocotyl Growth and HY5 Degradation by Enhancing the Movement of COP1 to the Nucleus in the Light*. PLoS Genet. 9: e1004025.
- Yuan, Y.; Wu, H.; Wang, N.; Li, J.; Zhao, W.; Du, J.; Wang, D.; Ling, H.-Q.** (2008). *FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis*. Cell Res. 18: 385-397.
- Zarembinski, T.I.; Theologis, A.** (1994). *Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation*. Plant Mol. Biol. 26: 1579-1597.
- Zhang, G.; Guo, G.; Hu, X.; Zhang, Y.; Li, Q.; Li, R.; Zhuang, R.; Lu, Z.; He, Z.; Fang, X.; Chen, L.; Tian, W.; Tao, Y.; Kristiansen, K.; Zhang, X.; Li, S.; Yang, H.; Wang, J.; Wang J.** (2010). *Deep RNA sequencing at single base-pair resolution reveals high complexity of the rice transcriptome*. Genome Res. 20: 646-654.
- Zhang, S.; Haider, I.; Kohlen, W.; Jiang, L.; Bouwmeester, H.; Meijer, A.H.; Schluempmann, H.; Liu, C.-M.; Ouwerkerk, P.B.F.** (2012). *Function of the HD-Zip I gene Oshox22 in ABA-mediated drought and salt tolerances in rice*. Plant. Mol. Biol. 80: 571-585.
- Zhu, Y.; Tepperman, J.M.; Fairchild, C.D.; Quail, P.H.** (2000). *Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 13419-13424.

ANEXOS

Anexo I

Secuencia genómica de *AtHB1*

GAAAATAGCTGAATGTGTAAGAAAAACAAAAAAAAAAGACAGGACGAAGCTACGTGGGGACTTGTGTAAACAA
CATGATAAGTTAATATAACTAAATTAGTGCGGCGATAAGCAATTCATGCACCTGGTCTGTTTTCTTTTTCTC
CGTAAGGTGACATGAAATCGATATTCACCAAATTTGGTTGTATACTAGTATATTTTTTTTTTCATAAATAGCA
ATAGTAAAACAAAGTTACTAACCATATAAATGTGATTTTTAAAGAGTAATTTGCTGTAAACAGTCACGCAATA
CGTATAATTTGAAATTAATATTGTGTGCAAAGACGTCAAGGTGCATTAATAAGAAACAAATACTAAAAGAT
AGGAATGACGTGAATTTGATTTTAATGAATTTTTAATGACATGGTGATACAGTGACAGGGCTGTGCAAATA
GGAAGTAACAGGATGAGGAGGACCGTTAGATGAATGAGGATCAAGCGTAGATCCGACACTGACCCGACCGTCCG
AGTATGCAACCCATTTAACACACTCTGGCCGAACCACCACAGCTGAATAAACTATTTTTTTAATAATAAT
AAATAACTTTAGAGAAAAGGTATAATTCAAATCCAACGGATGAGATCTGTTCCAAGTCCACTCGCTAAAGAA
AGTGGACCCCAGAGACTCAGAAAAGTCCACTTCCGATTTGTAAACAAGCCAATCACTTTTCGATTTACCACAA
TTGCCCTTTTCAAGATTCGTTGAAAACTTTGTAGTTTTTAAGTAGTACTTATTATATAAGAAAATAAG
TAAATTC AACCATCATGTCATTTTTAAATTTTTAAGCAAAGTACGATTTCTTACATATTGATAGAAATTTG
TAGCCTAGTTATTCTCGATAGTATTTGCTCTCTGTGACACACTACACAAATTTAATCCAGTTGATTGCAA
AGTGTGAGATGTAGGAAAAAAGAGAGGGTATAAGAGTCATTTAACGAGGATTGCTGGTTGGTATAAAAGAC
GGCGCTTGTGAAGGAAATGAGTTTAGCTgagacgctcacattgcaaaaacaaaccaagaacttgtct
ctctctctggctctcttctcttaacgtgatcataacgtgattcgaaaattggatatagataggttcttgg
ggatcttgatccctctggaaaaggaggggagaatagcagttcatgatgggattttgtatctgccggtggagt
caactgagagattactatggagtacaagcttcttccgccataagatcagatcttotaatccttctactctct
tcccactcttttaatacatctctctcgctatctctgcttctctctctctctgcttctctctctcagaactcag
aagtagttgttgttttattctgttgatcaaaaATCGAATCCAATTCGTTTTCTTCGATCCATCTGCTTCAC
ACGGCAACAGCATGTTCTTCTTGGGAATCTCAATCCCCTCGTCCAAGgttcttttctcactctcttaatctt
attcatcatcttggaaacacattacttttcggtgaattcccctgtttttgtgtataaaaacgtaggaacaca
catacacacacatgagaaccaatttgaatatgaataacctcattcgattattgacagcagttgttctgttgaat
ttgtgaagGAGGAGGAGCAAGATCGATGATGAACATGGAGGAACTTCGAAGCGAAGGCCCTCTTTAGCTCC
CCTGAGGATCTCTACGACGATGACTTTTACGACGACCAGTTGCCTGAAAAGAAGCGTCGCCCTACTACCGAAC
AAgtagattctctcactatccacaataataattaacgatccactattcaaaaacaagtttgatagattctcat
tatattatggtaaaaagGTGCATCTGCTGGAGAAAAGCTTCGAGACAGAGAACAAGCTAGAGCCTGAACGCAAG
ACTCAGCTTGCCAAGAAGCTTGGTCTACAGCCAAGGCAAGTGGCTGTCTGGTTTCAGAATCGCCGAGCTCGTT
GGAAAACAAAACAGCTTGAGAGAGACTACGATCTTCTCAAGTCCACTTACGACCAACTTCTTTCTAACTACGA
CTCCATCGTCATGGACAACGATAAGCTCAGATCCGAGgtacttatacatgggactattatctcaacaag
attacaaattgaatgatttaccttaattggtccaaaggagaaaaataaaaaagcatcaagtgaagagagaat
atgcttttctattttcaacacaagctgatagagagaatccatcatcatatataataattagaggagaga
ctagaaaaagaaagaaaattggggaatcaaatcaatcaacgagtttaattatctttttatgggaggaggttgc
ttgtgttgaccgttgtgattaaagttagaatctttccaacccgacagGTACTTCCCTGACCGAAAAGCTTCA

GGGCAAACAAGAGACAGCTAATGAACCACCTGGTCAAGTGCCCGAACCAAACCAACTTGATCCGGTTTACATT
AATGCGGCAGCAATCAAACCCGAGGACCGGTTAAGTTCAGGGAGCGTTGGGAGCGCGGTACTAGACGACGACG
CACCTCAACTACTAGACAGCTGTGACTCTTACTTCCCAAGCATCGTACCCATCCAAGACAACAGCAACGCCAG
TGATCATGACAATGACCCGGAGCTGTTTCGCCGACGTCTTTGTGCCCACTTCACCGTCGCACGATCATCAC
GGTGAATCATTGGCTTCTGCGGATGGCTTAGaaaaccactctgataataaatgtgtgtttatttaagtcca
agagtcacatcttctgtgtttccatggtgacgataattggtgactcgtggaataattccgctgttcaacggta
tttttatcagttgcattatatgcttttatgaaatcaagtcaatgcagtggtctgatttgaagttaaaagatt
gatcttcttcagaaagcctctctagagagaaagagagagattataaagaataattgaagtttccgt

La región 5' no codificante, los intrones y la region 3' no codificante se muestran en minúscula y resaltada en verde, amarillo y gris, respectivamente. El marco de lectura abierto (uORF) se resalta en negrita y cursiva. El codón de iniciación y de terminación se muestran en negrita y subrayados.

Secuencia proteica de *AtHB1*

MESNSFFFDPSSASHGNSMFFLGNLNPVVQGGGARSMNMEETS **KRRPFFSSPEDLYDDDFYDDQLPEKKRRLT**
TEQVHLLLEKSFETENKLEPERKTQLAKKLGLOPROQAVVWFQNRARWKTKQLERDYDLLKSTYDQLLSNYDSI
VMDNDKLRSEVTSLTEKLQGKQETANEPGQVPEPNQLDPVYINAAAIKTEDRLSSGSVGSAVLDDAPQLLD
SCDSYFPSIVPIQDNSNASDHDNDRSCFADVFPVPTTSPSHDHHGESLAFWGP

El homeodominio y el cierre de leucinas se resaltan en verde y amarillo, respectivamente, mientras que las regiones correspondientes a los motivos AHA se muestran en gris.

Anexo II

Secuencias de los diferentes homólogos a AtHB1 utilizadas en los análisis bioinformáticos

Proteína	Especie	Código identificador
HAT5	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002882180
Símil HAT5 por homología de secuencia	<i>Cicer arietinum</i>	XP_004489298
Símil HAT5 por homología de secuencia	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006470354
CPHB-5	<i>Craterostigma plantagineum</i>	AAL57495
Símil HAT5 por homología de secuencia	<i>Cucumis sativus</i>	XP_004141083
Símil HAT5 por homología de secuencia	<i>Fragaria vesca</i>	XP_004304607
Símil HAT5 por homología de secuencia	<i>Glycine max</i>	XP_003542698
Proteína hipotética	<i>Hordeum vulgare</i>	BAJ95209
Símil HOX16	<i>Oryza brachyantha</i>	XP_006647837
HOX16	<i>Oryza sativa</i>	A2X980
Proteína hipotética	<i>Ricinus communis</i>	XP_002517348
Símil HOX16 isoforma X1	<i>Setaria italica</i>	XP_004953793
Símil HAT5 por homología de secuencia	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006338548
Proteína sin nombre	<i>Thellungiella halophila</i>	BAJ33940
Símil HAT5 por homología de secuencia	<i>Vitis vinifera</i>	XP_002278872
ZmHB-5	<i>Zea mays</i>	ACG33646

Anexo III

Alineamiento de las secuencias proteicas de los HD-Zip I homólogos a AtHB1

	No conservado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Conservado
		10	20	30	40				50				
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtHB1)		-MESNSFFFD	PSASHGNSMF	FLGNL--NPV	VQGGG---	A	RS	MM	NM	ME	ET	S	
<i>Craterostigma plantagineum</i>		-MNSARIFFD	PSSHGNNMLQF	LGNAGGDSSV	FRGTR---	S	SS	VL	NM	EE	SS		
<i>Cucumis sativus</i>		-MESGRFLFN	PPPYGGNMLY	LGGAG-GDPC	LRGGR---	T	MM	SM	TM	NE	SP		
<i>Vitis vinifera</i>		-MDSCLRFFD	PSSGHGNNMLF	LGN---GDSL	FRGPR---	S	T	--	MN	IE	ET	S	
<i>Fragaria vesca</i>		MMEPGRLLFD	PQQGGGGNML	FLGSGDQVFR	G-----	--	SR	SM	MG	ME			
<i>Hordeum vulgare</i>		-MEPGRLLFN	TSGSGNGQML	FMDCGAGAAG	MFHR----	G	VR	PV	LG	ME			
<i>Setaria italica</i>		-MESGRLLFN	ATGSGAGQML	FLDCGAGGGG	LFHR----	G	GR	PM	MG	LEE			
<i>Zea mays</i>		-MESGRLLFN	APGSGAGQML	FLDCGAGGGP	GGGLFH---	R	GR	PM	LG	LEE			
<i>Oriza sativa</i> (HOX16)		-MESGRLLFS	TAGSGAGQML	FLDCGAGGGG	VGGGAMFHRG	AR	PV	LG	ME	EE	G		
<i>Oriza brachyantha</i>		-MESGRLLFS	TAGSGAGQML	FLDCGAGGGA	GGGAMFHRG	AR	PV	LG	ME	DE	G		
<i>Cicer arietinum</i>		-MESGRLLFD	TTSVCRGNNS	MNMLYLGNAD	LSFR-----	--	GR	SM	MS	MEE			
<i>Glycine max</i>		-MESGRIFFD	ASA----SRG	NNMLFLGNTE	LAFR-----	--	GR	SM	MS	MEE			
<i>Citrus sinensis</i>		-MESGRLLFD	RSS----CPG	NMLFLGNGDS	FFGG-----	--	TR	S	--	MMS			
<i>Thellungiella halophila</i>		-MESNSFFFD	PSP----SHG	NMFFLGNLNP	VVQG-----	--	AK	S	--	VL	NMD		
<i>Solanus tuberosum</i>		-MGSGHIFFD	PSS----CHG	NMLFLGNGDP	VFRG-----	--	ER	ST	MM	KME			
<i>Arabidopsis lyrata</i>		-MESNSFFFG	PSASHGNNNM	FFLGNLNPVV	Q-----	--	GG	SAR	SM				
<i>Ricinus communis</i>		MDQSGRLLFN	PSASSCHGGN	MLFLGNCDSV	FRG-----	--	PR	SM	FK	MME			
Consistencia		08786776*	6563323443	4433324433	4232000001	1234353456							
		60	70	80	90				100				
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtHB1)		KRRPFFSS--	-PEDLYDDDF	YDDQLPEKKR	RLTTEQVHLL	EKS	FET	EN	KN	KL			
<i>Craterostigma plantagineum</i>		LKRQIFSGGG	GDEFYDEEY	DEQLPEKKR	RLTAEQVHLL	EKS	FEA	EN	KN	KL			
<i>Cucumis sativus</i>		KGRPFFRS--	-PDDLVDDEY	YDEFYPEKKR	RLTHDQVQML	EKN	FEE	EN	KN	KL			
<i>Vitis vinifera</i>		KRRPFFTS--	-PEDMFDEEY	YDEQMPEKKR	RLTPEQVHLL	EKS	FEA	EN	KN	KL			
<i>Fragaria vesca</i>		ETSRRRSFFS	TQDELYEEY	YDEQMPEKKR	RLTTEQVHLL	EKS	FET	EN	KN	KL			
<i>Hordeum vulgare</i>		GRGVKRFFFT	SPDLLLEEY	YDEQLPEKKR	RLTPEQVHLL	ERS	FEE	EN	KN	KL			
<i>Setaria italica</i>		GRGVKRFFFT	SPDELLEEY	YDEQLPEKKR	RLTPEQVHLL	ERS	FEE	EN	KN	KL			
<i>Zea mays</i>		GRGVKRFFFT	SPDELLEEY	YDEQLPEKKR	RLTPEQVLL	ERS	FEE	EN	KN	KL			
<i>Oriza sativa</i> (HOX16)		GRGVKRFFFT	TPDELLEEY	YDEQLPEKKR	RLTPEQVHLL	ERS	FEE	EN	KN	KL			
<i>Oriza brachyantha</i>		GRGVKRFFFT	TPDELLEEY	YDEQLPEKKR	RLTPEQVHLL	ERS	FEE	EN	KN	KL			
<i>Cicer arietinum</i>		GSKRRPFFSS	PDELVDDEY	EEQSP--EKKR	RLTSEQVHLL	EKS	FEE	EN	KN	KL			
<i>Glycine max</i>		ASKRRPFFTS	PDELVDDEY	DKQSPKKKHH	RLSSEQVHLL	EKN	FEE	EN	KN	KL			
<i>Citrus sinensis</i>		ETSKRRPFFS	SPDDLFDDEY	YDEQLPEKKR	RLTAEQVHLL	EKS	FEA	EN	KN	KL			
<i>Thellungiella halophila</i>		ETSKRRPFFS	SPEDLYEEY	YDDQMPEKKR	RLTTEQVHLL	EKS	FEE	EN	KN	KL			
<i>Solanus tuberosum</i>		DSSKRRPFFS	SPEDLYDEY	YDEQSPKKR	RLTPEQVHLL	EKS	FET	EN	KN	KL			
<i>Arabidopsis lyrata</i>		ETSKRRPFFS	SPEDLYDDY	YDDQLPEKKR	RLTTEQVHLL	EKS	FET	EN	KN	KL			
<i>Ricinus communis</i>		DTSKRRPFFS	SPEDFFDEY	YDEQLPEKKR	RLTSEQVHLL	EKS	FEE	EN	KN	KL			
Consistencia		4554555644	4785748859	7877689**9	**959**79*	*89**5****							
		110	120	130	140				150				
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtHB1)		EPERKTQLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	LL	K	ST	YD	QL		
<i>Craterostigma plantagineum</i>		EPERKAELAK	KLGLQPRQVA	IWFQNRARW	KTKQLERD	YD	KL	K	S	S	YD	S	LL
<i>Cucumis sativus</i>		EPERKSQAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	VL	K	A	S	YD	LL	V
<i>Vitis vinifera</i>		EPERKTQLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	LL	K	S	S	YD	S	V
<i>Fragaria vesca</i>		EPDRKTQLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	VL	K	A	S	YD	S	LL
<i>Hordeum vulgare</i>		EPERKTELAR	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	FD	RL	K	A	S	F	D	AL
<i>Setaria italica</i>		EPERKTELAR	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	FD	RL	K	D	S	F	D	AL
<i>Zea mays</i>		EPERKTELAR	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	FD	RL	K	A	S	F	D	AL
<i>Oriza sativa</i> (HOX16)		EPERKTELAR	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	FD	RL	K	A	S	F	D	AL
<i>Oriza brachyantha</i>		EPERKTELAR	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	FA	RL	K	A	S	F	D	AL
<i>Cicer arietinum</i>		EPERKTQLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	VL	K	S	S	YD	S	LL
<i>Glycine max</i>		EPERKTQLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	VL	K	S	S	YD	T	LL
<i>Citrus sinensis</i>		EPERKGLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	LL	K	S	S	YD	D	ALL
<i>Thellungiella halophila</i>		EPERKTQLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	FD	LL	K	ST	YD	QL		
<i>Solanus tuberosum</i>		EPERKTQLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	QL	K	S	S	YD	S	LL
<i>Arabidopsis lyrata</i>		EPDRKTQLAK	KLGLQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	LL	K	ST	YD	QL		
<i>Ricinus communis</i>		EPERKTQLAK	KLGMQPRQVA	VWFQNRARW	KTKQLERD	YD	VL	K	A	S	YD	S	LL
Consistencia		**9**88**8	**9*****	9***9*****	**9***89	4**788*6*5							
		160	170	180	190				200				
<i>Arabidopsis thaliana</i> (AtHB1)		SNYDSIVMDN	DKLRSEVTS	TEKLQKQET	-----ANEP	-----	PG						
<i>Craterostigma plantagineum</i>		STYDSIRQEN	DKLKAELL	NEKLQPKDD	DPS--AEIGRN	-----	LS						
<i>Cucumis sativus</i>		SNYDSIVKEN	AVLKSEVAS	TEKLAKELG	GGEATIP	SIT	-----	ST					
<i>Vitis vinifera</i>		SEYDSILKEK	EKLKSEV	TEKLQAKEV	GTF--TLTVQK	-----	VE						

<i>Fragaria vesca</i>	ANYDSILKEN	QKLEKSEVVTI	TEKLEAKDQE	AKGAAAFGDH	DHDEKCDPVH
<i>Hordeum vulgare</i>	ADHDALLQDN	HRLRSQVVTL	TEKMQEKEAP	EGCFGAAVDA	SESEQATAEA
<i>Setaria italica</i>	ADHDVLLQDN	HRLRSQVASTL	TEKLEKEEVT	DGAGADA AVL	--PVDVKASL
<i>Zea mays</i>	ADHDALLQDN	NRLRSQVVSL	TEKLEKEEDA	TEGGATADTA	APAVDVEASL
<i>Oriza sativa (HOX16)</i>	ADHDALLQDN	HRLHSQVMSL	TEKLEKEETT	TEGSAGA AVD	VPLPAAADV
<i>Oriza brachyantha</i>	ADHDALLQDN	NRLHSQVMSL	TEKLEKEEAS	EGSAGA AVD	SGLPAADVKV
<i>Cicer arietinum</i>	STYDSIVKEN	EKLKSEVVSL	NEKLQVQAKE	M----LGEPL	-----LD
<i>Glycine max</i>	SSYDSLKKN	EKLKSEVVSL	NEKLQVQAKE	V----PEETL	-----CD
<i>Citrus sinensis</i>	SSYDSLKKN	QKLEKSEVVSL	NEKIEAKEEE	SKEAKSDKKT	-----ET
<i>Thellungiella halophila</i>	SNYDSIVKEN	DLRSQMASL	AEKLQAK---	-----EAAAI	-----EP
<i>Solanus tuberosum</i>	SDFDSIRKDN	DKLEKSEVVSL	MEKLQGVVVG	GAGVSEKSDV	-----LE
<i>Arabidopsis lyrata</i>	SNYDSIVKDN	DKLRSEVTSL	TEKLQGVVVG	-----	-----TA
<i>Ricinus communis</i>	SDFDNTVKEN	QKLEKSEVVSL	TEKLQTKELT	GATIPGQEP	-----SLPAV
Consistencia	857*786789	57*7989699	6**8849533	2111224333	000000033

<i>Arabidopsis thaliana (AtHB1)</i>	QVPEPNQLDP	VYINAAAIKT	EDRLSSG---	---SVG-	SA	VLD	DDAPQLL
<i>Craterostigma plantagineum</i>	SSSPVDAAE	PPCLKLTVKV	EDRLSTG---	---SNG-	SA	V---	MDGDFQI
<i>Cucumis sativus</i>	SELLLADITN	ISVPHSGRKA	EDRLSSG---	---SDS-	SA	VID	DNCPQLI
<i>Vitis vinifera</i>	PLQADAADV	PVPCSVKVE-	--DRLSS---	---GSASA	VV	ED	GGPQLL
<i>Fragaria vesca</i>	LLPSEKEMIT	DVNVPMSTLQL	SVKVEDRLSS	G--S	GGSAVV	DE	ESPQLVDS
<i>Hordeum vulgare</i>	KASLADAEQ	AAAAEAFVQ	QQQLHVKDEE	RLSP	GGSGSA	ILD	DARDALLG
<i>Setaria italica</i>	ADDIEEPAAA	AEEAAFEAQQ	VKSEDRLSTG	S---	GGSAVV	DAD	ALLCGRF
<i>Zea mays</i>	ADDVEEPAEP	AATFEVLQEV	KSEDRISTGS	---	GGSAVV	DAD	ALLYGRF
<i>Oriza sativa (HOX16)</i>	KVAVPDAEAP	ALEAAAAAFE	EQQEQQVKA	DRLS	TGSGGS	AV	VDTDAQLV
<i>Oriza brachyantha</i>	AVADAEQAP	AEAVFEVQV	KAEDRVSTGS	---	GGSAVV	DAD	TLLGCCR
<i>Cicer arietinum</i>	KEANPLPIEI	AQIFSIK	DDHMSAG---	---SVGSAV	VDE	GS	PHVVV
<i>Glycine max</i>	KKVDPPLVDE	DMAPIFSTRV	EDHLSGG---	---SVGSAV	VDE	GS	PQVVV
<i>Citrus sinensis</i>	HHQPTVETNN	ICGIQLQLSN	NKTEDRL---	---SSGCSG	ES	AV	DEGPF
<i>Thellungiella halophila</i>	PGQVPEPNQL	DPLNINRFEP	AIKTEDR---	---LSSGSV	GS	AV	LDEDAF
<i>Solanus tuberosum</i>	VDAMTATLQV	KVKAEDRLSS	GGSGSAV---	---VDEHSP	QL	VD	SGDSYF
<i>Arabidopsis lyrata</i>	NEPPLVPEP	NQLDVTYINP	AAIKTED---	---RLSSGS	VGS	AV	LDEDA
<i>Ricinus communis</i>	TANASAFELN	VKLRGTGSALE	ALEVQW---	---	---	---	---
Consistencia	4343443343	4333333443	4343433000	0000435344	3343322322	---	---

<i>Arabidopsis thaliana (AtHB1)</i>	DSCDSYFPI	V--FIQDNSN	ASDHDNDRSC	FADVFP---	---	---	---
<i>Craterostigma plantagineum</i>	QLLDDSGDSY	FE--NDEEYDC	AAASLAAAKE	DDGSDEG---	---	---	---
<i>Cucumis sativus</i>	DSGDSYFPNI	E-----YP	QCSNLENGLH	MEDDDTNDN-	---	---	---
<i>Vitis vinifera</i>	DSGDSYFQNA	E-----YP	GCLGVQSEED	DGSDDGQ--	---	---	---
<i>Fragaria vesca</i>	GDSYFPSSCD	VHNYDHPHLP	HDDHHCMLV	VGVHSEEDD-	---	---	GS
<i>Hordeum vulgare</i>	GGCGLAGVVD	SSVDSYCFPG	GAGADEYHEC	VVGPVAGG-	I	QSE	EDDGAGS
<i>Setaria italica</i>	AAAVDSSVES	YFPGGEDHYH	DCGMGPMNPC	AGGIQSDD-	---	---	DGAGS
<i>Zea mays</i>	AAAVDSSVES	YFPGGEDHYH	DCGTMPVNH	GAGGGIQ---	---	---	SDDDGAGS
<i>Oriza sativa (HOX16)</i>	VGCGRQLAA	VDSVESYFP	GGDEYHDCVM	GPMDDHAA	AGGI	QSE	EDDGAGS
<i>Oriza brachyantha</i>	QLAAVDSSVE	SYFPGDEYHD	CVMGPMDDHAA	AGIQSEE-	---	---	DDGAGS
<i>Cicer arietinum</i>	DSVDSYFPAD	N-----YG	GCVAPIERVQ	SEEDDGSD-	---	---	---
<i>Glycine max</i>	DSVDSYFPAD	N-----YG	GCMGPVERVQ	SEQEDGSD-	---	---	---
<i>Citrus sinensis</i>	QRVDTGDSF	F-----GC	MDPVVDAASQ	EEDGGSD-	---	---	---
<i>Thellungiella halophila</i>	QL-LDSCDSY	F-----PI	IVPHSEDDN	NYNNPGTA-	---	---	---
<i>Solanus tuberosum</i>	HTDHEEYFPG	G-----GC	NVPPHMDGLQ	SEEDDGSD-	---	---	---
<i>Arabidopsis lyrata</i>	PQLLDSY	F-----FP	SIVPIQDTNA	SDNDNDRS-	---	---	---
<i>Ricinus communis</i>	---	---	---	---	---	---	---
Consistencia	3322433343	2000010132	332223233	333333200	000000011	---	---

<i>Arabidopsis thaliana (AtHB1)</i>	---TTSFSH	DHGESLA-	---	---	---	F	WGWF
<i>Craterostigma plantagineum</i>	---GCYFTE	ALAAEEEE--	-A-	---	---	PFAW	CIWS
<i>Cucumis sativus</i>	---CNYLFSDM	FAATNQNQE	GR	---	---	PPAL	WAWF
<i>Vitis vinifera</i>	---SYFSDA	LVLPEHHHEE	GE	---	---	ALL	WVWF
<i>Fragaria vesca</i>	DDGRNYFSEV	FAAAAVQ--	---	---	---	QFEDGVS	SMGW
<i>Hordeum vulgare</i>	DEGCSYYPDD	AAAVFFAAAQ	GQHHTH--TDD	DDQDDGQISY	WMWN	---	---
<i>Setaria italica</i>	DEGCSYYPED	EAAAAAALFA	G--HANPHAA	EDEDAGQISW	WMWN	---	---
<i>Zea mays</i>	DEGCSYYPAD	AAAAAAAF	AGHATHHHAD	EDEDAGQISW	WMWN	---	---
<i>Oriza sativa (HOX16)</i>	DEGCSYYPAD	AGVLFADHGH	HHHHQHADDD	EEDGQQISW	WMWN	---	---
<i>Oriza brachyantha</i>	DEGCSYYPAD	AGVLFADHN-	---HHHHADD	DEEDGQSISW	WMWN	---	---
<i>Cicer arietinum</i>	--DGRSYFNV	FVASETEQQN	---	---	---	HGE	EALNW
<i>Glycine max</i>	--DGRSYLDV	FVASETENQN	---	---	---	HEE	EALGW
<i>Citrus sinensis</i>	--GRSYFSDV	LVPADHVS	---	---	---	QHEE	PLGW
<i>Thellungiella halophila</i>	--NDRS-CFA	DVFVPTTSPS	---	---	---	BDH	GSLGF
<i>Solanus tuberosum</i>	--DGSCGYF	SNVFTVQ	---	---	---	HEE	GEPIG
<i>Arabidopsis lyrata</i>	--CFADVFP	TTSFSDHGE	---	---	---	SLAF	WVWF
<i>Ricinus communis</i>	---	---	---	---	---	---	---
Consistencia	1021434343	345333322	000000000	0122213334	73640000	---	---