

PARTICIPACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ATHB23 DE LA FAMILIA HD-ZIP I Y PHL1 DE LA FAMILIA MYB-CC EN LA SENESCENCIA FOLIAR Y LA ADAPTACIÓN DE LAS PLANTAS A LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y LA FALTA DE FOSFATO

Spies, Fiorella P.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal (LBV), Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL – UNL- CONICET) – Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB – UNL)

Área: Ciencias Biológicas – Sub-área: Biotecnología – Grupo: X

Introducción:

Los factores de transcripción (FT) son proteínas capaces de regular vías de señalización completas. En plantas, estas proteínas son más abundantes y variadas que en organismos de otros reinos y se les han adjudicado muy diversas funciones en el desarrollo y la adaptación al medio ambiente. Sus características estructurales permiten clasificarlas en distintas familias y subfamilias. Los FT activan o reprimen la expresión de genes blancos, regulando de esta forma cascadas completas de señalización. Estas proteínas son modulares y poseen al menos un dominio de unión al ADN, responsable de reconocer secuencias específicas de ADN en las regiones regulatorias de sus blancos y uno de transactivación o represión. Además de estos dominios que las definen, a veces presentan otros motivos a través de los cuales interactúan con otros FT o son regulados postraduccionalmente (Bornberg-Bauer y col., 2005). Los FT de plantas constituyen alrededor del 6% de las proteínas totales, dependiendo de la especie, y se clasifican en familias y subfamilias principalmente de acuerdo a sus dominios de unión a ADN (Riechmann y col., 2002).

La familia HD-Zip (homeodominio-cierre de leucinas, del inglés *Homeodomain-Leucine Zipper*) es exclusiva de plantas y a su vez, se divide en cuatro subfamilias (I a IV) en base a características estructurales (Ariel y col., 2007; Capella y col., 2015; Perotti y col., 2017). La característica estructural principal es que sus miembros presentan una secuencia conservada de 60 aminoácidos conocida como homeodominio (HD), que es el dominio de unión a ADN, asociado a un cierre de leucinas (LZ), dominio de dimerización que les confiere a estas proteínas la particularidad de unirse al ADN como homo- o heterodímeros.

AtHB23 codifica un miembro de la familia HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana* y tiene un gen parálogo en esta especie, *AtHB13*. Ambos presentan patrones de expresión que se superponen en ciertos tejidos y estadios, pero no en todos, lo que descarta la idea de redundancia. Los estudios hechos en nuestro laboratorio mostraron que *AtHB23*, al igual que su parálogo *AtHB13*, jugaría un papel importante en el desarrollo vegetal, concretamente en la elongación de la vara floral (Ribone y col., 2015) mientras que sólo *AtHB23* interactúa con *AtPhyB* (Choi y col., 2014) interviniendo en la respuesta a la luz roja. Al igual que otros miembros de la subfamilia I, *AtHB23* y *AtHB13* unen *in vitro* la secuencia de ADN (CAAT(A/T)ATTG) a través de la hélice III (hélice de reconocimiento del HD). A pesar de las similitudes estructurales, en el patrón de expresión y en la unión de ADN, los estudios hechos en nuestro laboratorio indicaron que *AtHB13* y *AtHB23* tienen

XXI ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

distintas funciones (Ribone y col., 2015). Estas observaciones enfatizan la importancia de las interacciones proteína-proteína como responsables de la especificidad de función.

En colaboración con el Dr. JC Hong, de la Gyeongsang National University de Corea se hizo un ensayo de doble híbrido en levaduras con una biblioteca de FTs de *Arabidopsis* y éste indicó que AtHB23 interacciona con PHL1 (PHOSPHATE RESPONSE1-like1), AtMYB68 y AtMYB12, todos de la familia MYB, además de un miembro de la familia WRKY. PHL1 (o PHR1-like1) pertenece a la subfamilia MYB-CC y la bibliografía indica que participa en el control de la respuesta al déficit de fosfato que involucra, entre otras cosas, un aumento en la producción de antocianinas en los tejidos vegetativos de la planta (Bustos y col., 2010; Sun y col., 2016). Este FT actúa uniéndose a los promotores de varios genes inducidos por falta de fosfato.

Nos planteamos como hipótesis que la interacción entre AtHB23 y PHL1 sería necesaria para que estos FT cumplan alguna/s de sus funciones específicas. Estas funciones podrían estar relacionadas con la falencia de fosfato (PHL1), con la respuesta a la luz o con cualquier otro evento del desarrollo vegetal en el cual estos FT actúen en conjunto. Es por eso que nos planteamos también como hipótesis que *AtHB23* y *PHL1* deberían coexpresarse en el mismo tejido en algún momento del desarrollo vegetal.

Objetivo:

El objetivo general es investigar las interacciones entre AtHB23 y AtPHL1, así como la función de estas interacciones en el proceso de senescencia y eventualmente, en otros procesos del desarrollo vegetal así como en las respuestas de las plantas a la radiación ultravioleta y la falta de fosfato. Nos interesa comprender cómo actúan estos FTs en forma individual o conjunta o con otras proteínas para ejercer sus funciones así como qué partes de sus moléculas son necesarias para la interacción.

Metodología:

Todas las técnicas de Ingeniería Genética (clonado, *Northern*, RT-qPCR, aislamiento y purificación de ácidos nucleicos, ensayos de interacción proteína-ADN, ensayos de doble híbrido, etc.) son de uso rutinario en el laboratorio donde se desarrolla el presente trabajo y se realizan según protocolos debidamente establecidos (Ausubel y col., 1983; Sambrook y col., 1989). Asimismo la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana* por el método de *floral dip* (Clough y Bent, 1998) y su análisis es rutinaria en el laboratorio. Las secuencias de los nuevos clones obtenidos se hicieron a través de servicios especializados (MacrogenKorea o similares). La caracterización de plantas mutantes se hizo en cámaras de cultivo con condiciones controladas de temperatura (22-24°C) y fotoperíodo largo.

Resultados/conclusiones:

XXI ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

El primer paso para determinar la función de los FT en estudio fue caracterizar las plantas mutantes en los genes codificantes. Las plantas mostraron un ingreso temprano a la senescencia comparadas con las plantas salvajes (WT) utilizadas como controles (Figura 1). Es importante notar que las condiciones de crecimiento implicaron riego con 3,5 ml de fertilizante por cada litro de agua de riego.

Por otro lado, para evaluar en detalle el proceso de ingreso a la senescencia, se realizaron medidas del contenido de clorofila en dos líneas de plantas mutantes *phl1-1*, plantas sobreexpresantes en el gen *AtHB23*, plantas silenciadas en el mismo gen y plantas salvajes a modo de control, a los días 20, 35 y 49 de crecimiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2. No se obtuvieron diferencias significativas en ninguna de las líneas ensayadas respecto al control. Esto podría deberse a que las plantas utilizadas para estos ensayos fueron regadas en distintas condiciones que las plantas utilizadas originalmente para la determinación del fenotipo, con 10 ml de fertilizante por cada litro de agua de riego. El fertilizante empleado provee a las plantas de los nutrientes necesarios para su desarrollo y crecimiento, entre ellos de fosfato, el cual, al estar en exceso, posiblemente enmascaró el fenotipo de senescencia observado en el primer fenotipado realizado.

Para profundizar nuestra búsqueda de una función conjunta para *AtHB23* y *PHL-1* se analizaron los patrones de expresión de *PHL-1* transformando plantas con construcciones a las que se fusionó el promotor de este gen a la región codificante del gen reportero *GUS*. Los resultados obtenidos (Figura 3) se compararon con trabajos previos similares realizados en el laboratorio con el gen *AtHB23* y los resultados sugieren que podría existir una acción conjunta de ambos FT asociada a procesos de desarrollo en la raíz.

Con los resultados obtenidos hasta ahora no podemos concluir acerca de la función conjunta de los FT *AtHB23* y *PHL-1*. Podemos especular acerca de una acción en la respuesta a la disponibilidad de fosfato relacionada con la senescencia. Nos basamos en el fenotipo observado, los patrones de expresión de los FT y el hecho de que las distintas condiciones de riego variaron ese fenotipo.

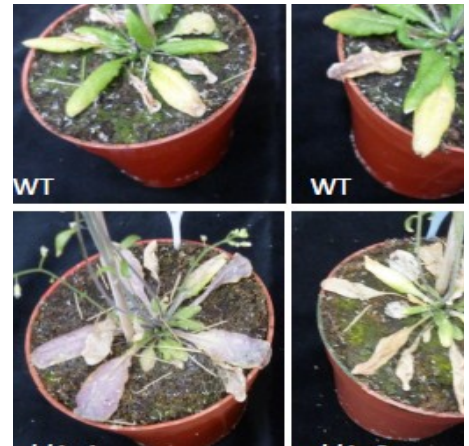


Figura 1. Fotografías representativas de plantas salvajes (WT) y plantas mutantes en *PHL1* (*phl1-1* y *phl1-2*) de 45 días. Se puede observar que las plantas *phl1* presentan una senescencia temprana, en comparación con las plantas salvajes.

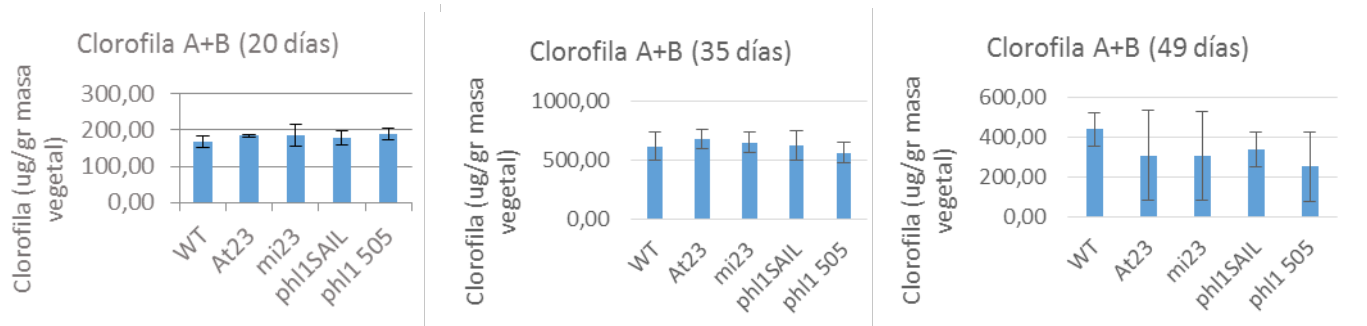


Figura 2. Medición de clorofila A y B a los días 20, 35 y 40.

Nos proponemos corroborar la interacción por BiFC en hojas de tabaco transformadas transitoriamente, caracterizar el fenotipo de mutantes y sobreexpresantes en condiciones de variación de la concentración de fosfato y determinar si en hambreado total de este elemento surgen fenotipos diferenciales adicionales.

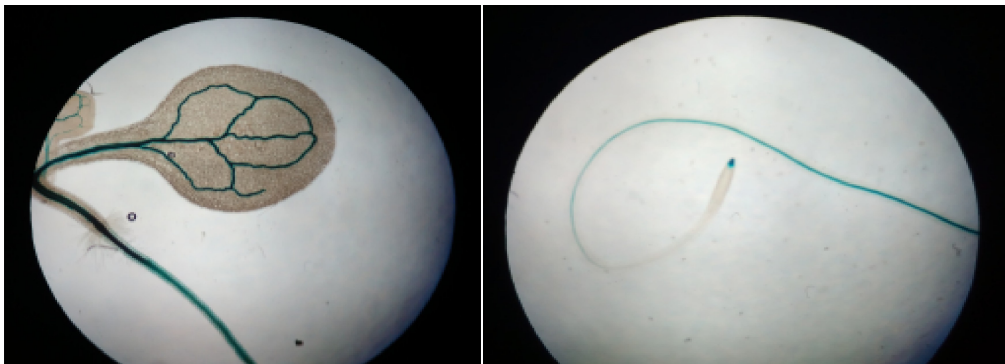


Figura 3. Patrón de expresión de *PHL-1* obtenido al expresar en plantas de *Arabidopsis thaliana* el promotor del gen fusionado al gen reportero *GUS*.

BIBLIOGRAFÍA:

Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL (2007) The true story of the HD-Zip family. Trends in Plant Science 12:419-426.

Bornberg-Bauer E, Beaussart F, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Weiner J (2005) The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. CMLS Cellular and Molecular Life Sciences 62:435-445. **Bradshaw HD and Schemske DW** (2003) Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. Nature 426:176-178.

Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Pérez-Pérez J, Solano R, Leyva A, Paz-Ares J. (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in Arabidopsis. PLoS Genetics 6:e1001102.

Capella M, Ribone PA, Arce AL, Chan RL* (2015) Homeodomain–Leucine Zipper Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants. In “Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects”. Chapter 7. Edited by Daniel González, Academic Press/Elsevier.

Mendez M, Jones DG, Manetas Y (1999) Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. New Phytologist 144:275-282.

Perotti MF, Ribone PA, Chan RL (2017) Plant transcription factors from the Homeodomain-Leucine Zipper family I. Role in development and stress responses. IUBMB Life 69(5), 280-289.

Ribone PA, Capella M, Chan RL (2015) Functional characterization of the homeodomainleucine zipper I transcription factor AtHB13 reveals a crucial role in Arabidopsis development. Journal of Experimental Botany 66:5929-5943