



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

CÁTEDRA DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**"Mecanismos moleculares de expresión
de componentes de los complejos respiratorios
de plantas"**

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR: Lic. Raúl Nicolás Comelli

DIRECTOR: Dr. Daniel H. González

- 2010 -

Índice y abreviaturas

ÍNDICE

Índice	i
Abreviaturas	vii
1. Introducción	1
1.1. Estructura de la mitocondria.	1
1.2. Origen de la mitocondria.	2
1.2.1. Teoría endosimbiótica.	3
1.2.2. Hipótesis del hidrógeno.	4
1.3. Funciones de las mitocondrias.	5
1.3.1. Cadena respiratoria mitocondrial.	6
1.4. Mitocondrias de plantas.	9
1.4.1. Segunda vía respiratoria.	9
1.4.2. NADH/NADPH deshidrogenasas adicionales.	10
1.4.3. Proteína desacoplante que disipa el gradiente de protones.	12
1.4.4. Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS).	12
1.5. Genoma mitocondrial de plantas.	13
1.5.1. Estructura del genoma mitocondrial de plantas.	13
1.5.2. Información genética contenida en el genoma mitocondrial de plantas.	15
1.5.3. Migración de genes mitocondriales al núcleo.	15
1.6. Interconexión entre el núcleo y las organelas.	17
1.6.1. Importación de proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol.	19
1.7. Biogénesis mitocondrial.	22
1.7.1. Biogénesis de la citocromo c oxidasa (COX).	22
1.7.1.1. Subunidades estructurales codificadas en el genoma mitocondrial.	24
1.7.1.2. Subunidades estructurales codificadas en el genoma nuclear.	24
1.7.1.3. Centros catalíticos de COX.	26
1.7.1.4. Otros componentes.	26
1.7.2. Ensamblado de COX.	26
1.7.2.1. Ensamblado de COX en levaduras.	27
1.7.2.2. Ensamblado de COX en mamíferos.	29
1.7.2.3. Ensamblado de COX en plantas.	31
2. Objetivos	32
	33

3. Materiales y Métodos

3.1. Cepas utilizadas.	33
3.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .	33
3.1.2. Cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	33
3.1.3. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	33
3.2. Material vegetal utilizado.	34
3.2.1. Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	34
3.2.2. Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo.	34
3.3. Vectores empleados.	34
3.3.1. Vectores para el clonado de fragmentos de ADN.	35
3.3.2. Vectores para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias.	35
3.3.3. Plásmidos empleados en estudios de interacción proteína-ADN y proteína-proteína	35
3.4. Medios de cultivo y soluciones empleadas	35
3.4.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> .	35
3.4.2. Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	36
3.4.3. Medios de cultivos para plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	36
3.5. Métodos de clonado.	37
3.5.1. Aislamiento y clonado de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	37
3.5.2. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR.	38
3.5.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.	39
3.5.4. Ligación de moléculas de ADN.	39
3.5.5. Transformación de bacterias y levaduras.	39
3.5.5.1. Transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico por electroporación.	39
3.5.5.2 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con ADN plasmídico por electroporación.	40
3.5.5.3. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> en presencia de acetato de litio.	40
3.5.6. Análisis de transformantes por hibridización en colonias.	41
3.5.7. Preparación de ácidos nucleicos.	42
3.5.7.1. Minipreparación de ADN plasmídico.	42
3.5.7.2. Minipreparación de ADN de <i>S. cerevisiae</i> .	42
3.5.7.3. Minipreparación de ADN de <i>A. thaliana</i> .	43
3.5.7.4. Extracción y purificación de ARN de <i>A. thaliana</i> .	43
3.5.8. Cuantificación de ácidos nucleicos.	44
3.5.9. Análisis de ácidos nucleicos.	44
3.5.9.1. Determinación de la secuencia de los fragmentos de ADN clonados.	44
3.5.9.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	44
3.5.9.3. Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes.	45

3.5.9.4. Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida.	45
3.5.9.5. Técnica de southern blot.	45
3.5.9.6. Técnica de northern blot.	46
3.5.9.7. Transcripción reversa.	46
3.5.9.8. Hibridización de membranas de nylon.	47
3.5.10. Marcación de sondas de ADN.	47
3.5.10.1. Purificación de fragmentos de ADN.	47
3.5.10.2. Marcado radioactivo de los fragmentos de ADN doble hebra.	47
3.6. Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	48
3.6.1. Método de inmersión floral.	48
3.6.2. Selección de las plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas.	49
3.6.3. Análisis de plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas.	49
3.6.4. Análisis de la expresión del gen reportero en plantas transformadas.	49
3.6.4.1. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa.	49
3.6.4.2. Análisis fluorométrico de la actividad β -glucuronidasa.	50
3.6.5. Tratamiento de plantas de <i>A. thaliana</i> con distintos compuestos.	51
3.6.6. Transformación transiente de plántulas de <i>A. thaliana</i> .	52
3.7. Proteínas.	53
3.7.1. Cuantificación de proteínas totales.	53
3.7.2. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .	53
3.7.2.1. Proteínas recombinantes fusionadas a GST.	53
3.7.2.2. Proteínas recombinantes fusionadas a MBP.	53
3.7.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .	54
3.7.3.1. Purificación de las proteínas de fusión con GST.	54
3.7.3.2. Purificación de las proteínas de fusión con MBP.	55
3.7.3.3. Corte de las proteínas fusionadas a GST y a MBP.	55
3.7.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.	55
3.7.5. Preparación de extractos proteicos nucleares de inflorescencias de coliflor.	56
3.8. Ensayos <i>in vitro</i> de interacción ADN-proteínas.	57
3.8.1. Ensayos de retardo en geles (EMSA).	57
3.8.2. Marcación radiactiva de fragmentos de ADN para EMSA.	57
3.9. Ensayos de interacción ADN-proteínas en levaduras.	58
3.9.1. Sistema de simple híbrido.	58
3.9.2. Obtención de la cepa con el gen reportero.	59
3.9.2.1. Gen <i>HIS3</i> como reportero.	60
3.9.2.2. Gen <i>LacZ</i> como reportero.	60

3.9.3. Ensayo de la expresión del gen reportero <i>HIS3</i> .	60
3.9.4. Ensayo de la actividad β -galactosidasa.	61
3.9.5. Sistema de doble híbrido.	62
ANEXO I	64
ANEXO II	65
Resultados y Discusión	68
4. Capítulo I	
“Estudio de la región promotora del gen <i>COX5b-1</i>, codificante para una isoforma de la subunidad 5b del complejo citocromo c oxidasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>”	68
4.1. Introducción	68
4.1.1. Complejo IV o citocromo c oxidasa.	68
4.1.2. Subunidad COX5b de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	69
4.1.2.1. Estudios previos de la región promotora del gen <i>COX5b-1</i> .	70
4.2. Resultados	71
4.2.1. El fragmento comprendido entre las posiciones -387 y -196 de <i>COX5b-1</i> contiene dos regiones requeridas para la expresión del gen.	71
4.2.2. La región -259/-196 del promotor de <i>COX5b-1</i> contiene un elemento G-box esencial para la expresión del gen.	75
4.2.2.1. Proteínas nucleares son capaces de interactuar <i>in vitro</i> con el elemento G-box identificado en la región promotora de <i>COX5b-1</i>	77
4.2.3. La región -333/-259 del promotor de <i>COX5b-1</i> contiene varios elementos <i>cis</i> involucrados en la expresión del gen en tejidos vegetativos.	80
4.2.3.1. Proteínas nucleares son capaces de interactuar <i>in vitro</i> con los elementos identificados en la región -333/-259 del promotor de <i>COX5b-1</i>	85
4.2.4. El gen <i>COX5b-1</i> se induce por sacarosa, ABA y otros factores.	88
4.2.5 Identificación de las regiones mínimas del promotor de <i>COX5b-1</i> necesarias para la respuesta a diferentes compuestos.	89
4.2.5.1. Las secuencias ATCATT presentes en la región promotora -333/-259 de <i>COX5b-1</i> son responsables de la respuesta a sacarosa	94
4.2.5.2. Las secuencias similares al elemento <i>distalB</i> presentes en la región promotora -333/-259 de <i>COX5b-1</i> intervienen en la respuesta a ABA.	95
4.3. Discusión	96
5. Capítulo II	
“Estudio de la región promotora del gen <i>COX5b-2</i>, codificante para otra isoforma de la subunidad 5b del complejo citocromo c oxidasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>”	102
5.1. Introducción	102
5.1.1. Biogénesis mitocondrial en plantas.	102
5.1.2. Estudios sobre el gen <i>COX5b-2</i> (At1g80230).	103
5.2. Resultados	104
5.2.1. El promotor de <i>COX5b-2</i> dirige la expresión del gen en forma específica de órgano o tejido.	104
5.2.2. El promotor de <i>COX5b-2</i> contiene elementos regulatorios positivos y negativos	105

negativos.

5.2.3. Un elemento G-box ubicado en la posición -636 del promotor de <i>COX5b-2</i> actúa como regulador negativo de la expresión del gen en tejidos vegetativos.	107
5.2.4. La región -398/-83 del promotor de <i>COX5b-2</i> contiene varios elementos <i>cis</i> requeridos para la máxima expresión del gen.	110
5.2.5. Los elementos <i>Iniciadores</i> y <i>site II</i> localizados en la región promotora -199/-83 de <i>COX5b-2</i> son requeridos para la expresión basal del gen.	111
5.2.5.1. Proteínas nucleares son capaces de interactuar <i>in vitro</i> con los elementos identificados en la región -199/-83 del promotor de <i>COX5b-2</i> .	114
5.2.6. El gen <i>COX5b-2</i> se induce por sacarosa, luz UV y otros factores.	116
5.2.7. Identificación de las regiones mínimas del promotor de <i>COX5b-2</i> necesarias para la respuesta a diferentes compuestos.	117
5.2.7.1. Los elementos <i>site II</i> presentes en el promotor de <i>COX5b-2</i> son responsables de la respuesta a sacarosa.	119
5.2.7.2. El elemento G-box localizado en la posición -636 del promotor de <i>COX5b-2</i> es responsable de la respuesta a luz UV.	120
5.2.8. La región promotora de <i>COX5b-2</i> se superpone con la región codificante de un gen adyacente.	122
5.3 Discusión.	124
6. Capítulo III	
“Identificación de factores de transcripción involucrados en la regulación de los genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa de <i>A. thaliana</i>”	129
6.1. Introducción	129
6.1.1. Origen y organización del promotor eucariota.	129
6.1.2. Factores de transcripción en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	130
6.2. Resultados	132
6.2.1. Los promotores de los genes <i>COX5b-1</i> , <i>COX5b-2</i> y <i>Cytc-2</i> presentan elementos G-box cercanos a un motivo ACGT.	132
6.2.2. El factor de transcripción AREB2/ABF4 interactúa con el elemento G-box de <i>COX5b-1</i> .	135
6.2.2.1. El dominio bZIP de AREB2/ABF4 reconoce específicamente el elemento G-box presente en el promotor de <i>COX5b-1</i> .	136
6.2.3. El factor de transcripción AtbZIP68 interactúa específicamente con el elemento G-box de <i>COX5b-2</i> .	138
6.2.4. La región -333/-259 de <i>COX5b-1</i> es reconocida por factores de transcripción con dominios de unión al ADN de tipo HD, trihélice y AP2.	140
6.2.4.1. Los factores de transcripción ATHB-21 y GT3b reconocen las secuencias de núcleo TCAT presentes en el promotor de <i>COX5b-1</i> .	144
6.2.4.2. El factor de transcripción AT3G23220 interactúa con las secuencias similares al elemento <i>distalB</i> presentes en el promotor de <i>COX5b-1</i> .	147
6.2.5. Los factores de transcripción AREB2/ABF4, ATHB-21, GT3b y AT3G23220 son reguladores positivos de la expresión del gen <i>COX5b-1</i> .	148
6.2.6. Los factores de transcripción ATHB21 y AT3G23220 establecen interacciones de tipo proteína-proteína con AREB2/ABF4.	150

6.3 Discusión	152
7. Capítulo IV	
“Análisis de la duplicación de genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria de respiración mitocondrial en <i>Arabidopsis thaliana</i>”	159
7.1 Introducción	159
7.1.1 Genes duplicados. Modelo clásico y modelo DDC.	159
7.2 Discusión	162
8. Conclusiones	168
9. Resumen/Abstract	176
10. Bibliografía	181

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNmt	ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa A
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
cm	centímetros
Ci	curie
col.	colaboradores
COX	citocromo c oxidasa
cpm	cuentas por minuto
Da	daltons
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitidina trifosfato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
dNTP	mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP.
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina trifosfato

EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
g	gravedad
GST	glutación S-transferasa
GSH	glutación reducido
GUS	β -glucuronidasa
h	hora
HD	homeodominio
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	kilodaltons
kpb	kilopares de bases
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	miliamper/s
Mb	megabases
Mpb	megapares de bases
min	minuto
ml	mililitro/s
mM	milimolar
mm	milímetros
mmol	milimoles
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico
MS	medio de cultivo Murashige-Skoog
MU	4-metilumbeliferona
nm	nanómetros
MUG	4-metilumbeliferil- β ,D-glucurónido

P/V	peso en volumen
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
Poli (dIdC)	ácido polidesoxiinosínico-polidesoxicitidínico
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio
T	temperatura
TA	temperatura ambiente
TCA	ácido tricarboxílico
TEMED	N,N,N',N',-tetrametilendiamina
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
U	unidad/es de actividad enzimática
UV	luz ultravioleta
V/V	volumen en volumen
vol	volumen/es
W	watt/s
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-galactósido.
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido
ZIP	cierre de leucinas

A lo largo de este manuscrito, las proteínas se escriben en mayúscula (por ejemplo: COX5b-1 o AT3G23220) y los genes se nombran en itálica (por ejemplo: *COX5b-1* o *napA*).

Introducción

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Estructura de la mitocondria.

Las mitocondrias son organelas complejas propias de los organismos eucariotas, delimitadas por dos membranas muy diferentes (Figura 1). La membrana externa posee numerosas copias de porina, proteína de transporte que forma grandes canales acuosos a través de la bicapa lipídica y presenta una estructura similar a las porinas bacterianas. La membrana interna se encuentra altamente especializada, presentando una gran cantidad de plegamientos, llamados crestas, que se proyectan hacia el compartimiento central de la organela, denominado matriz mitocondrial. La membrana interna es intrínsecamente impermeable a casi todos los iones y moléculas polares, posee mayor proporción de proteínas en relación con otras membranas celulares y contiene una elevada proporción de cardiolipina, fosfolípido poco frecuente responsable de la impermeabilidad de la membrana a los protones. Posee, además, diversas proteínas de transporte que permiten el pasaje selectivo de pequeñas moléculas metabolizadas por las numerosas enzimas que se encuentran en la matriz mitocondrial (Alberts y col., 1996; Lodish y col., 2002). Las dos membranas mencionadas están separadas por un espacio intermembrana, de composición bioquímica similar a la del citosol, debido a que las porinas de la membrana externa determinan la permeabilidad frente a moléculas relativamente grandes, las que no pueden atravesar la membrana interna. La matriz mitocondrial contiene una elevada concentración de enzimas solubles, sustratos, cofactores e iones inorgánicos, así como también la maquinaria genética propia de la mitocondria, esto es, ADN, ARN y ribosomas (Alberts y col., 1996; Lodish y col., 2002).

Las mitocondrias contienen su propio genoma y son capaces de realizar la transcripción y traducción del mismo (Binder y Brennicke, 2002), incorporan activamente proteínas y metabolitos desde el citosol a través de complejos mecanismos de importación perfectamente regulados (Braun y Schmitz, 1999; Lister y col., 2003), juegan un papel central en la regulación de la muerte celular programada o apoptosis (Balk y Leaver, 2001) y responden a señales celulares tales como el estrés oxidativo (Moller, 2001; Sweetlove y col., 2002) y la falta de nutrientes (Giegé y col., 2005). Entonces, resulta evidente que estas organelas desempeñan un papel central en la regulación de las actividades metabólicas de una célula.

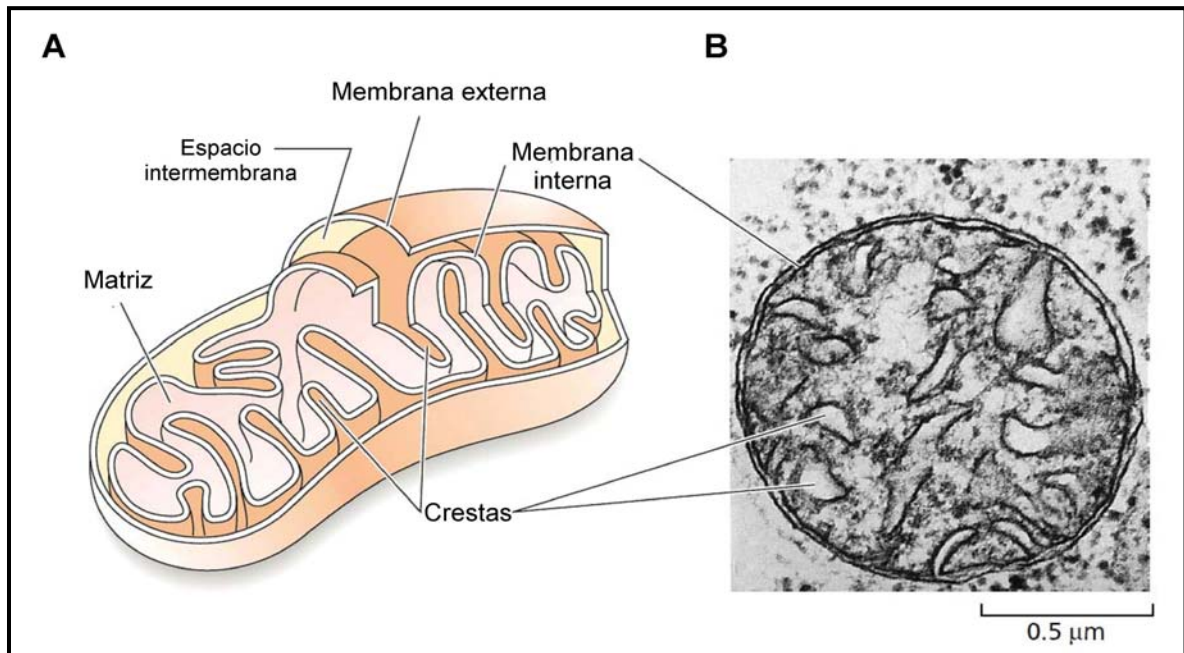


Figura 1. Estructura de una mitocondria. **(A)** Diagrama tridimensional de un corte longitudinal de una mitocondria, mostrando las invaginaciones de la membrana interna (crestas) y la localización de la matriz y el espacio intermembrana. **(B)** Micrografía electrónica de una mitocondria (Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002).

1.2. Origen de la mitocondria.

La evidencia actual avala la idea de que las mitocondrias se habrían originado a partir de un endosimbionte de la familia de las eubacterias captado mediante endocitosis por una célula ancestral que contenía un núcleo eucariota, hace aproximadamente 1,5 billones de años (Sicheritz-Pontén y col., 1998; Gray y col., 1999; Lang y col., 1999). El análisis filogenético de genes codificantes para proteínas y ARN ribosomales (ARNr) permitió establecer que el endosimbionte pertenecería a la subdivisión de los α -proteobacteriales, en particular, miembros de la familia de los Rickettsiales (Gray y col., 2001). El estudio de secuencias de ADN mitocondrial de diferentes organismos demostró una similitud sorprendente entre el genoma de las mitocondrias y el genoma de la bacteria *Rickettsia prowazekii*, en comparación con genomas de secuencia conocida de otros parásitos intracelulares obligados (Alberts y col., 1996; Cooper, 2000; Lodish y col. 2002).

Los genomas mitocondriales caracterizados difieren marcadamente en su estructura, por lo que resulta difícil especular acerca de la estructura inicial del genoma proto-mitocondrial. Sin embargo, el genoma mitocondrial del protozoo *Reclinomonas americana* presenta características (contenido de genes y organización de los mismos) similares a las encontradas en eubacterias, indicando que el ADN mitocondrial del

protozoo se asemejaría estrechamente al genoma del ancestro proto-mitocondrial (Lang y col., 1997).

Los genomas mitocondriales han sufrido una marcada pérdida de capacidad codificante respecto a la esperada según el genoma de los ancestros más cercanos. Según las secuencias disponibles en las bases de datos actuales, el genoma mitocondrial de *Arabidopsis* es uno de los más grandes. Sin embargo, su tamaño es sólo un tercio del tamaño del genoma de *R. prowazekii*, mientras que la capacidad codificante del genoma mitocondrial de la planta es aproximadamente un 4% respecto al total de proteínas presentes en el genoma de la bacteria (34 versus 834, respectivamente), presentando casi un 80% de secuencias de ADN no codificantes comparadas con un 24% en *Rickettsia* (Gray y col., 1999). Esta diferencia en la capacidad codificante es atribuida fundamentalmente a la transferencia de genes desde la mitocondria al núcleo, proceso denominado “reducción evolutiva” (Martin y col., 1998; Adams y col., 2000). Este proceso impone un requisito previo, esto es, la existencia de una maquinaria de importación de proteínas presente en las membranas de las mitocondrias (Martin y Herrmann, 1998). Por otro lado, también podría haber ocurrido una temprana pérdida de genes mitocondriales, cuya función habría sido sustituida por un gen no relacionado de codificación nuclear. Un ejemplo notable sería el reemplazo de la ARN polimerasa presente en algunos ancestros proto-mitocondriales por la ARN polimerasa del bacteriófago T₃/T₇, la que dirige la transcripción de genes mitocondriales en la mayoría de los eucariotas (Gray y col., 2001). Por último, otros genes del parásito endosimbionte se habrían perdido completamente durante el proceso evolutivo, con la consecuente pérdida de la función, siendo ejemplos de esto la falta del complejo I (genes *nad*) en la cadena de transporte de electrones de levaduras (Kurland y Andersson, 2000) y algunos genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y nucleósidos y en la glicólisis anaeróbica (Martin y col., 1998; Adams y col., 2000).

1.2.1. Teoría endosimbiótica.

La teoría endosimbiótica serial constituye el modelo más aceptado para explicar el origen de la mitocondria. Según esta teoría, el paso de las células procariotas a las células eucariotas, así como también el origen de organelas eucariotas tales como mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas, serían el resultado de tres incorporaciones simbiogenéticas (simbióticas) sucesivas (Figura 2; Margulis, 1975). La primera incorporación simbiótica de dos procariotas habría originado una célula eucariota amitocondrial, siendo el organismo huésped, probablemente, un Arqueabacterium del

género *Thermoplasma* (posee metabolismo heterotrófico anaeróbico, característico de células eucariotas), mientras que el simbiote sería un *Proteobacterium* del grupo de las espiroquetas (bacteria nadadora anaeróbica). La segunda incorporación representaría la adquisición de la mitocondria por endosimbiosis de una bacteria “respiradora”, probablemente un α -*Proteobacterium* del género *Rickettsia*, mientras que la posterior incorporación simbiótica (la tercera) de una cianobacteria, es decir, de una bacteria con capacidad fotosintética, habría originado a los cloroplastos (Lang y col., 1997; Gray y col., 1999). Antes que la mitocondria y el cloroplasto entraran a escena, la célula eucariota amitocondrial debió haber adquirido necesariamente la capacidad de hacer endocitosis o fagocitosis (Doolittle y col., 2003). Luego de esta adquisición, se podría hablar de una co-evolución de ambos genomas, siendo el genoma nuclear una quimera generada por contribuciones de las arqueobacterias y de las eubacterias (Raven y Allen, 2003).

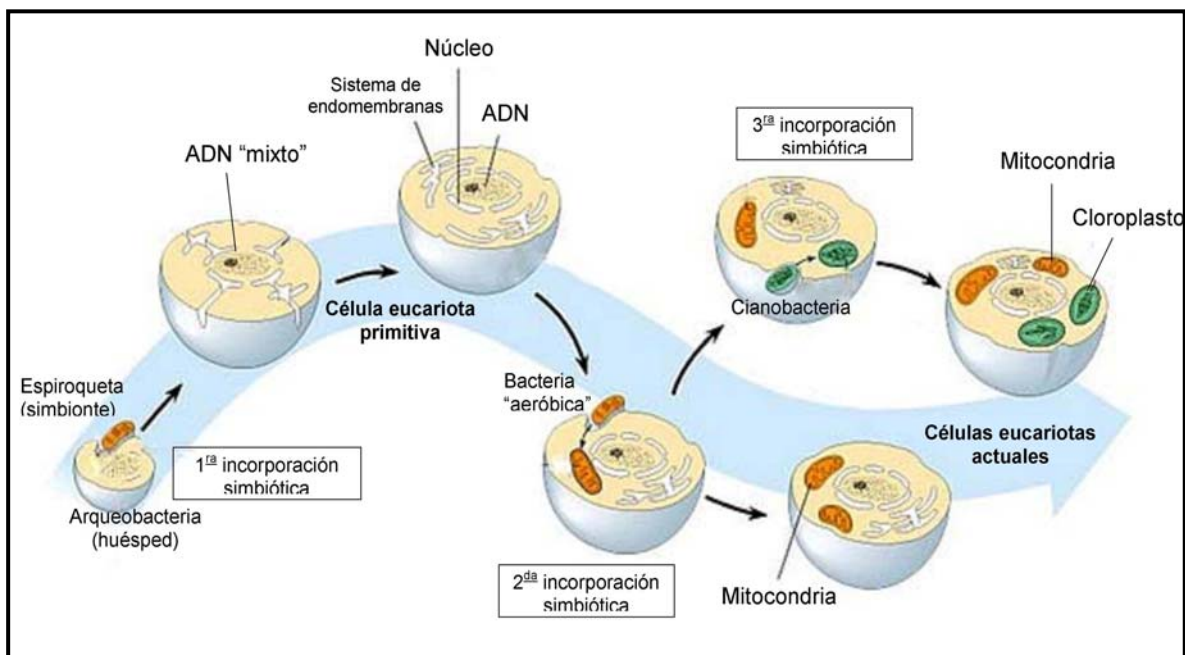


Figura 2. Teoría de la endosimbiosis serial. Las células eucariotas, las mitocondrias y los cloroplastos serían el resultado de incorporaciones simbióticas sucesivas de organismos procariotas. La primera incorporación habría involucrado un *Arqueobacterium* como huésped y una espiroqueta, originando una célula eucariota primitiva. La mitocondria se habría originado por endosimbiosis de una bacteria “respiradora” (segunda incorporación), mientras que la posterior incorporación (tercera) de una cianobacteria habría originado a los cloroplastos (Adaptado de Lang y col., 1997).

1.2.2. Hipótesis del hidrógeno

El análisis de secuencias genómicas de eucariotas unicelulares del reino Protista permitió la elaboración de una hipótesis alternativa a la teoría endosimbiótica, denominada “hipótesis del hidrógeno” (Martin y Müller, 1998; Müller y Martin, 1999). Este modelo sostiene la creación simultánea de núcleo y mitocondria mediante la asociación de una α -proteobacteria productora de hidrógeno (simbionte) y una Arqueobacteria metanogénica consumidora de hidrógeno como organismo huésped. Esta asociación habría generado el núcleo eucariótico y un metabolismo energético anaeróbico mediado por un hidrogenosoma¹, el cual derivó posteriormente en un metabolismo aeróbico mediado por la mitocondria (Figura 3). Esta teoría sostiene que el origen de la mitocondria está íntimamente relacionado con el surgimiento de la célula eucariota y predice, además, que no existieron nunca eucariontes primitivos carentes de mitocondrias, en contraste con la teoría endosimbiótica serial (Gray y col., 1999).

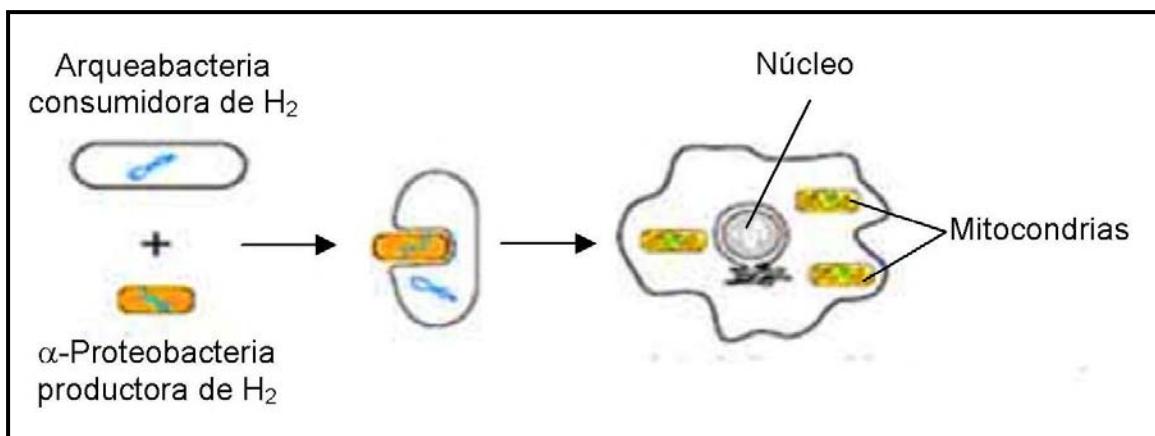


Figura 3. Hipótesis del hidrógeno. El núcleo eucariota y la mitocondria se habrían originado en forma simultánea por fusión entre una Arqueobacteria metanogénica consumidora de hidrógeno (huésped) y una α -proteobacteria productora de hidrógeno (Adaptado de Gray y col., 1999).

1.3. Funciones de las mitocondrias.

El papel fundamental de las mitocondrias es proporcionar la energía necesaria para que la célula eucariota pueda llevar a cabo todos sus procesos metabólicos. El ATP es la forma de energía utilizable por la maquinaria celular y se produce principalmente en

¹ Organela responsable de la generación de ATP en forma anaeróbica, produciendo hidrógeno como producto final del metabolismo energético. Se encuentra en eucariotas que carecen de mitocondrias, por ejemplo, algunos protistas (Müller, 1993; Dyall y Johnson, 2000).

la membrana interna y la matriz mitocondrial, a través de un proceso denominado “oxidación aeróbica” (Lodish y col., 2002). Las reacciones que tienen lugar en las mitocondrias pueden agruparse en tres eventos:

1- Oxidación del piruvato y de los ácidos grasos a CO_2 a través de un proceso cíclico denominado ciclo de Krebs o de los ácidos tricarbóxicos. Estas reacciones ocurren en la matriz mitocondrial o en proteínas de la membrana interna que se proyectan hacia la matriz, y están acopladas a la reducción de las coenzimas NAD^+ (dinucleótido de nicotinamida-adenina) y FAD (dinucleótido de flavina-adenina).

2- Transferencia de electrones del NADH o FADH_2 al oxígeno. Estas reacciones ocurren en la membrana interna y están acopladas al bombeo de protones, en contra del gradiente de concentración, desde la matriz hacia el espacio intermembrana, generando una fuerza protón-motriz a través de la membrana interna.

3- Síntesis de ATP a expensas de la energía generada por el gradiente de protones, los cuales retornan a la matriz desde el espacio intermembrana a favor del gradiente de concentración.

Los procesos antes mencionados involucran una serie de complejos multienzimáticos ubicados en la membrana interna mitocondrial que actúan como transportadores de electrones. Estos complejos conforman la cadena respiratoria o de transporte de electrones mitocondrial (Siedow y Umbach, 1995).

1.3.1. Cadena respiratoria mitocondrial.

El mecanismo fundamental de transducción de energía en la mitocondria se basa en la teoría quimiosmótica como mecanismo general de conservación de energía a través de membranas biológicas. Según esta teoría, la orientación asimétrica de los transportadores de electrones dentro de la membrana interna permite la transferencia de protones a través de la misma durante el flujo de electrones, generando un potencial electroquímico que es utilizado en etapas subsiguientes para la síntesis del ATP (Frey y Mannella, 2000; Taiz y Zeiger, 2002). Los complejos o transportadores de electrones están compuestos por un gran número de subunidades codificadas en el genoma nuclear o en el genoma mitocondrial, según el caso (Barrientos y col., 2002).

Una molécula de glucosa es oxidada durante la glicólisis y el ciclo de Krebs generando diez moléculas de NADH (dos en el citosol y ocho en la matriz mitocondrial) y dos de FADH_2 (asociados a la enzima succinato deshidrogenasa) en la matriz

mitocondrial (Taiz y Zeiger, 2002). Los complejos involucrados en la transferencia de electrones de las coenzimas reducidas mencionadas hacia el O_2 se detallan a continuación (Figura 4).

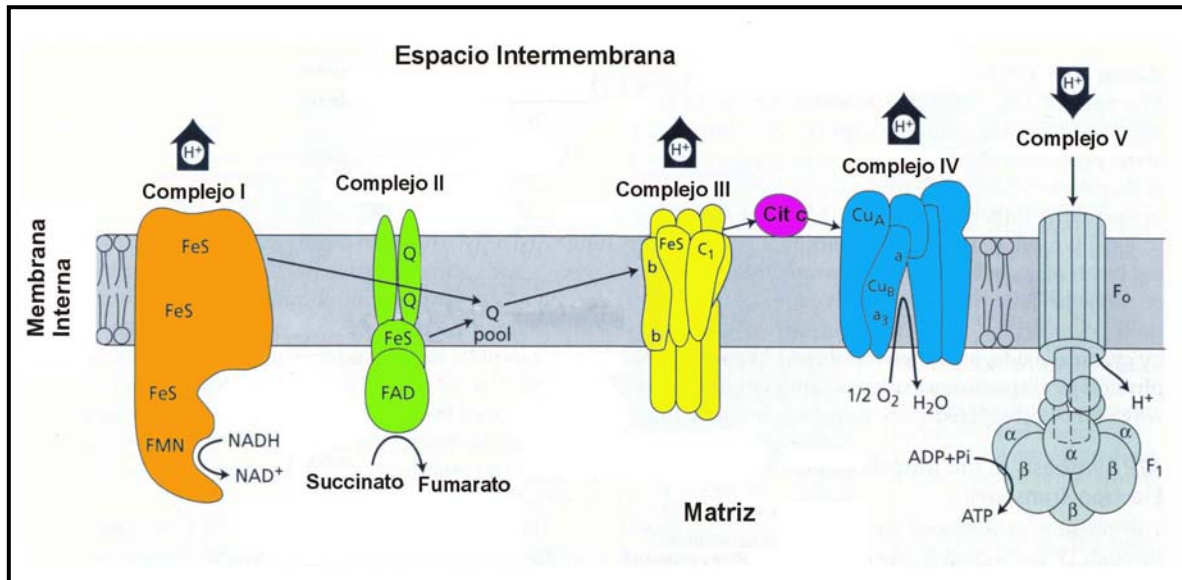


Figura 4. Cadena de transporte de electrones presente en la membrana interna mitocondrial. Los complejos respiratorios involucrados se muestran en colores. El complejo I o NADH deshidrogenasa (anaranjado) acepta electrones (e^-) del NADH y los transfiere a la ubiquinona (Q) a través del mononucleótido de flavina (FMN) y proteínas de hierro-azufre (FeS). El complejo II o succinato deshidrogenasa (verde) transfiere e^- del FADH₂ (generado por oxidación de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs) a la Q vía dinucleótido de flavina-adenina (FAD) y un transportador FeS. La Q reducida difunde a través de la membrana y cede e^- al complejo III o citocromo c reductasa (amarillo), luego transferidos secuencialmente a un FeS, dos citocromos b , un citocromo c_1 y, finalmente, al citocromo c (fucsia). Esta proteína hidrosoluble del espacio intermembrana transfiere e^- al complejo IV o citocromo c oxidasa (celeste), encargado de transportarlos al O_2 vía una serie de iones de cobre (Cu_A y Cu_B) y citocromos (a y a_3). El complejo V o ATP sintetasa cataliza la conversión de ADP en ATP a expensas del potencial electroquímico generado por el transporte de e^- (Texto adaptado de Lodish y col., 2002).

El Complejo I, también conocido como NADH deshidrogenasa o NADH-UQ oxidorreductasa, acepta los electrones de alta energía del NADH y los transfiere al complejo III a través de la ubiquinona (UQ) o coenzima Q, molécula química y funcionalmente similar a la plastoquinona de la cadena de transporte fotosintética (Lodish

y col., 2002). Este complejo está formado por más de 30 subunidades (Rasmusson y col., 1998), algunas de las cuales sólo ocurren en plantas (Heazlewood y col., 2003), como ser una enzima con actividad de anhidrasa carbónica (Parisi y col., 2004) y la galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH), enzima involucrada en la síntesis de ascorbato, un antioxidante muy abundante en plantas (Bartoli y col., 2000).

El Complejo II, o succinato deshidrogenasa, es una enzima tanto del ciclo de Krebs como de la cadena de transporte de electrones, de modo que los electrones provenientes de la oxidación del succinato son transferidos vía FADH_2 hacia la ubiquinona, reacción que no libera energía suficiente para la translocación de protones en contra del gradiente de concentración (Lodish y col., 2002). Este complejo está constituido por cuatro subunidades: una flavoproteína (SDH1), una subunidad hierro-azufre (SDH2) y dos subunidades de anclaje a membranas (SDH3 y SDH4; Figueroa y col., 2002). En los organismos estudiados hasta el momento, todas las subunidades son de codificación nuclear, constituyendo una excepción dentro de los componentes de la cadena de transporte de electrones (Eubel y col., 2003; Millar y col., 2004).

El Complejo III, denominado también citocromo *c* reductasa o citocromo *b-c₁*, acepta electrones de la ubiquinona reducida (ubiquinol) y los transfiere al citocromo *c* vía un centro hierro-azufre (Fe-S), dos citocromos de tipo *b* (*b₅₆₅* y *b₅₆₀*) y un citocromo *c₁* unido a la membrana (Siedow y col., 1995). En *Arabidopsis*, este complejo consiste en diez subunidades, en su mayoría codificadas por el genoma nuclear (Kruft y col., 2001), con la sola excepción del citocromo *b* (subunidad *cob*), codificado por el genoma mitocondrial (Unsel y col., 1997).

El citocromo *c* representa el único componente de la cadena respiratoria que no es una proteína integral de membrana y funciona como un transportador móvil ubicado hacia el espacio intermembrana, llevando los electrones (de a uno) hacia el complejo citocromo *c* oxidasa (Lodish y col., 2002).

El Complejo IV o citocromo *c* oxidasa contiene dos centros de cobre (Cu_A y Cu_B) y citocromos *a* y *a₃*. Este complejo tendría alrededor de 10 a 14 subunidades, según el organismo considerado (Eubel y col., 2003; Millar y col., 2004) y emplea cuatro electrones para la reducción del O_2 , formando dos moléculas de agua (Lodish y col., 2002).

El transporte de electrones en los complejos I, III y IV se acopla a la translocación de H^+ hacia el espacio intermembrana en contra de su gradiente de concentración, generando un potencial electroquímico que luego será utilizado por el complejo V (F_1F_0 ATP sintetasa) para catalizar la conversión de ADP en ATP. Este complejo consiste en una porción hidrofílica (F_1), sitio de unión a nucleótidos, y un canal de protones (F_0), sitio

de ingreso de éstos desde el espacio intermembrana a la matriz a favor del gradiente de concentración (Lodish y col., 2002). La estructura general y las subunidades que constituyen el núcleo de la enzima se encuentran altamente conservadas tanto en organismos eucariotas como en procariotas (Millar y col., 2004).

Por último, la evidencia actual indica que los complejos enzimáticos constituyentes de la cadena respiratoria mitocondrial interactúan entre sí formando estructuras supramoleculares, denominadas supercomplejos (Eubel y col., 2003). Uno de los más ampliamente estudiados recibe el nombre de respirasoma, fue encontrado tanto en mamíferos como en plantas y presenta una composición I::III₂::IV₁₋₄ (Eubel y col., 2004).

1.4. Mitocondrias de plantas.

Las mitocondrias de plantas poseen características distintivas. Varias de estas características constituyen adaptaciones en respuesta a la condición ubicua de las plantas, mientras que otras surgieron como resultado de la coordinación de las funciones mitocondriales con las del resto de la célula (Logan, 2007). Las mitocondrias de plantas producen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios a expensas de cadenas carbonadas en respuesta a agresiones específicas o situaciones de estrés (Mackenzie y col., 1994), tienen la facultad de fotorrespirar y coexisten con los cloroplastos, organelas capaces de sintetizar sustratos respiratorios (Mackenzie y McIntosh, 1999). En este contexto, las mitocondrias de plantas poseen mecanismos para disipar energía con la finalidad de prevenir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales son producidas por la cadena de transporte de electrones durante el metabolismo normal y se incrementan en condiciones de estrés (Dat y col., 2000). A bajas concentraciones, las ROS constituyen señales que activan la defensa de las plantas, mientras que a altos niveles producen daño celular actuando sobre proteínas, lípidos y ADN (Dat y col., 2000; Mittler, 2002). Las características distintivas de las mitocondrias de plantas se comentan a continuación.

1.4.1. Segunda vía respiratoria.

Las mitocondrias de plantas, al igual que algunos protistas y hongos, poseen una vía oxidativa independiente del citocromo *c* (Figura 5A). Esta vía alternativa de respiración comprende una oxidasa terminal que recibe electrones de la ubiquinona y los cede directamente al oxígeno para obtener agua como producto final, es decir, no involucra a los complejos III y IV y su actividad no está asociada a la generación de un gradiente de protones (Vanlerberghe y McIntosh, 1997; Siedow y Umbach, 2000).

Las relaciones ATP/ADP y NADH/NAD⁺ se incrementan cuando la vía de transporte de electrones a través del citocromo *c* se satura, y esta situación limita la producción de esqueletos carbonados por medio del ciclo de Krebs (Taiz y Zieger, 2002). La oxidasa terminal o alternativa (AOX, Alternative OXidase) aumenta su expresión en estas condiciones y cumple una función regulatoria, esto es, se acopla al ciclo de Krebs para compensar la demanda de compuestos carbonados aún bajo condiciones de saturación de la vía respiratoria principal. La acumulación de ubiquinona reducida, NADPH o piruvato conduciría a un mayor flujo de electrones hacia la vía alternativa (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Además, la síntesis de AOX se induce como respuesta a la acumulación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Poyton y McEwen, 1996; Wagneer y Moore, 1997).

En *Arabidopsis*, la oxidasa alternativa es codificada por cinco genes, y la expresión de éstos es específica de tejido y del estadio de desarrollo de la planta (Thirkettle-Watts y col., 2003).

1.4.2. NADH/NADPH deshidrogenasas adicionales.

Las NAD(P)H deshidrogenasas incluyen a las de tipo I, representadas, por ejemplo, por el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, y las de tipo II. Las mitocondrias de plantas poseen NAD(P)H deshidrogenasas adicionales, de tipo II, capaces de oxidar NADH o NADPH transportando los electrones a la ubiquinona, sin contribuir al gradiente de protones ni a la síntesis de ATP (Figura 5A). Estas enzimas se localizan en la membrana mitocondrial interna hacia el espacio intermembrana o hacia la matriz mitocondrial, oxidando NAD(P)H proveniente del citosol o de la matriz, respectivamente (Kercher, 2000; Møller, 1997 y 2001; Møller y Rasmusson, 1998; Rasmusson y col., 1998 y 2004). Las mitocondrias de mamíferos no disponen de NAD(P)H deshidrogenasas tipo II; en su lugar poseen dos glicerol-3-fosfato deshidrogenasas, una dependiente de NAD⁺ (en el citosol) y otra dependiente de Ca²⁺ y que utiliza FAD (en la superficie de la membrana interna, de cara al espacio intermembrana). La primera reduce dihidroxiacetona fosfato utilizando NADH y genera glicerol-3-fosfato, mientras que la segunda convierte glicerol-3-fosfato en dihidroxiacetona fosfato con la producción de FADH₂. La acción coordinada de estas enzimas resulta en la transferencia de dos equivalentes de reducción del glicerol-3-fosfato a la ubiquinona, generando la misma cantidad de ATP que se obtiene en plantas (Shen y col., 2003).

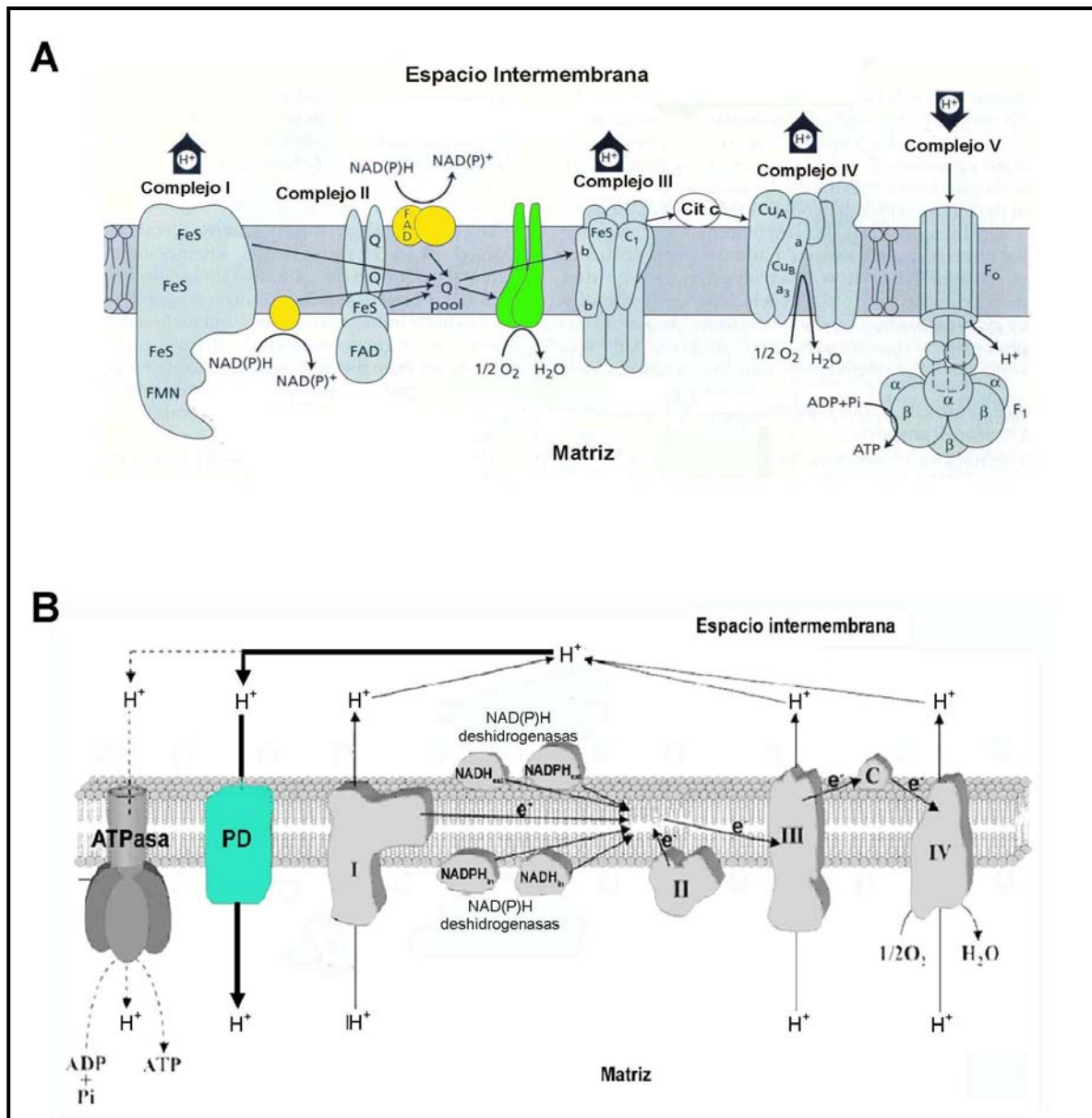


Figura 5. Proteínas adicionales en la cadena respiratoria mitocondrial de plantas. **(A)** La oxidasa terminal o alternativa (en verde) cataliza la transferencia de electrones (e^-) desde la ubiquinona (Q) directamente al oxígeno, evitando los complejos III y IV, por lo que la cantidad de ATP sintetizado en estas condiciones es menor respecto al producido por la cadena completa de transporte de e^- . Las NAD(P)H deshidrogenasas adicionales (en amarillo) se orientan tanto hacia el espacio intermembrana como hacia la matriz, y su función es oxidar NADH o NADPH transportando los e^- a la Q, sin contribuir al gradiente de H^+ ni a la síntesis de ATP. **(B)** La proteína desacoplante (PD,

en celeste) facilita el transporte de H^+ desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial, evento que disipa la energía generada por el potencial de membrana y disminuye drásticamente la síntesis de ATP (Adaptado de Pastore y col., 2007).

1.4.3. Proteína desacoplante que disipa el gradiente de protones.

En la membrana interna mitocondrial de plantas se encuentran proteínas desacoplantes que catalizan el paso directo de protones a través de la membrana (Figura 5B), disipando el gradiente generado por los Complejos I, III y IV de la cadena de transporte de electrones (Krauss y col., 2005). La actividad de estas proteínas es inducida por ácidos grasos, superóxido y productos de la peroxidación lipídica (Borecky y col., 2001; Considine y col., 2003). La formación de superóxido y otras especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte de la cadena respiratoria se incrementa a un alto potencial de membrana, y en estas condiciones también se incrementa la actividad de la proteína desacoplante, sugiriendo un papel moderador de ésta en la producción y acumulación de ROS en la mitocondria (Sweetlove y col., 2006).

1.4.4. Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Los Complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial constituyen los sitios de formación de ROS, dado que producen aniones superóxido (O_2^-), luego reducidos a H_2O_2 por la actividad de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD; Møller, 2001; Sweetlove y Foyer, 2004). El H_2O_2 es un compuesto de baja toxicidad capaz de reaccionar con iones Fe^{2+} y Cu^+ , produciendo radicales altamente tóxicos que pueden salir de la mitocondria debido a su neutralidad de cargas. El pool de ubiquinona determina la capacidad de reducción de la cadena de transporte de electrones, por lo que constituye una señal primaria en la producción de ROS (Sweetlove y Foyer, 2004). Se estima que los niveles de ROS son considerablemente menores en mitocondrias respecto a cloroplastos o peroxisomas en condiciones de iluminación debido a la fotosíntesis y a la fotorrespiración (Foyer y Noctor, 2003), mientras que en oscuridad o en tejidos no fotosintéticos esta relación se invierte, siendo las mitocondrias los mayores sitios de producción de ROS (Rhoads y col., 2006).

En condiciones normales, las mitocondrias deben controlar sus propios niveles de ROS, modulando la producción apropiadamente en función del papel que cumplen como moléculas señal (Rhoads y col., 2006). En condiciones de estrés ambiental, las ROS se acumulan y el daño oxidativo en las mitocondrias incluye peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados de la membrana mitocondrial (Rhoads y col., 2006), daño y/o

inhibición de la actividad de las proteínas por oxidación directa de aminoácidos (Berlett y Stadtman, 1997), ruptura de la estructura principal de péptidos (Dean y col., 1997), reacciones con especies reactivas de nitrógeno (producidas por reacción de óxido nítrico con las ROS; Sakamoto y col., 2003) o interferencia con cofactores metálicos (Flint y col., 1993; Verniquet y col., 1991) y daño en el ADN mitocondrial (Doudican y col., 2005; Roldan-Arjona y col., 2000).

El daño oxidativo también forma parte de procesos normales en las plantas, como la maduración de hojas en *Arabidopsis* (Johansson y col., 2004) o la oxidación selectiva de proteínas durante la germinación de las semillas, siendo el Complejo V uno de los principales blancos de acción (Job y col., 2005). Por otro lado, el ADN mitocondrial de plantas posee secuencias genómicas redundantes (Backert y col., 1997) y existen eventos de recombinación que ayudan a eliminar las mutaciones del genoma mitocondrial, manteniendo su integridad (Barr y col., 2005). Estos factores son importantes en la prevención del efecto de las ROS. Sin embargo, no son suficientes para mitigar las consecuencias del daño al ADN mitocondrial cuando las condiciones de estrés oxidativo son severas (Rhoads y col., 2006).

1.5. Genoma mitocondrial de plantas.

Las mitocondrias son organelas semiautónomas, dado que codifican menos de 40 proteínas en comparación con los cerca de 2000 productos génicos presentes en una organela funcional (Emanuelsson y col., 2000). En plantas, la función mitocondrial depende de la coordinación bioquímica y genética establecida respecto de un segundo sistema generador de energía, los cloroplastos. La mayoría de los componentes necesarios para las funciones de estas dos organelas están codificados en el genoma nuclear. La presencia de información genética dentro de mitocondrias, cloroplastos y núcleo requiere, necesariamente, la existencia de mecanismos de regulación altamente coordinados (Goffart y Wiesner, 2006; Woodson y Chory, 2008).

1.5.1. Estructura del genoma mitocondrial de plantas.

La mayoría de los genomas mitocondriales adoptan *in vivo* una estructura circular (Schuster y Brennicke, 1994), mientras que en plantas superiores adoptan una estructura heterogénea y, llamativamente, en muchas ocasiones adquieren una conformación lineal. Los genomas mitocondriales de plantas pueden replicarse mediante un mecanismo denominado “de círculo rodante” (Figura 6A), a diferencia de lo que ocurre en mamíferos, cuyo genoma mitocondrial se replica en forma bidireccional (Figura 6B) mediante la

formación de estructuras que recuerdan a la letra griega “theta” (Mackenzie y col., 1994; Mackenzie y McIntosh, 1999).

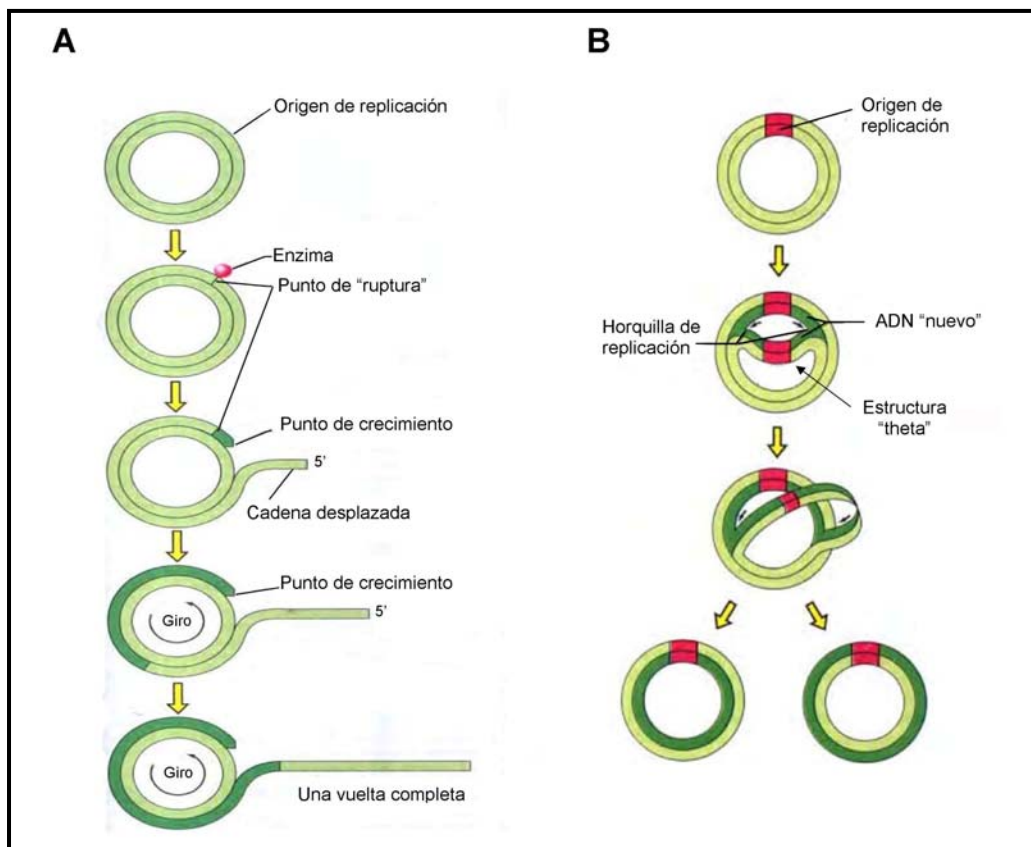


Figura 6. Mecanismos de replicación del ADN mitocondrial en plantas **(A)** y mamíferos **(B)**, mediante un mecanismo “de círculo rodante”.o en forma bidireccional mediante la formación de estructuras “theta”, respectivamente (Adaptado de Madigan y col., 2004).

El genoma mitocondrial de plantas, a diferencia de los de otros eucariotas superiores, presenta una gran diversidad en tamaño y en estructura (Taiz y Zeiger, 2002). Los genomas mitocondriales de mamíferos son más pequeños y completamente funcionales, es decir, toda la molécula codifica proteínas o participa en la transcripción y replicación (Lodish y col., 2002), mientras que dentro de una misma familia de plantas se evidencian amplias diferencias en cuanto a la longitud del genoma mitocondrial, lo cual no se ve reflejado en la capacidad codificante del mismo (Mackenzie y col., 1994). El análisis de los genomas mitocondriales de la briófito *Marchantia polymorpha* (Oda y col., 1992) y de las angiospermas *Arabidopsis thaliana* (Unsold y col., 1997), *Beta vulgaris* (Kubo y col., 2000; Satoh y col., 2004), *Brassica napus* (Handa 2003), *Nicotiana*

tabaccum (Sugiyama y col., 2005), *Oryza sativa* (Notsu y col., 2002) y *Zea mays* (Clifton y col., 2004), determinó que la alta variabilidad en el tamaño de los mismos se debe a la presencia de secuencias intergénicas redundantes, mientras que los cambios en estructura dependen de eventos de recombinación y/o integración de ADN foráneo (Mackenzie y McIntosh, 1999; Kubo y Mikami, 2007). El genoma mitocondrial de angiospermas presenta secuencias homólogas a ADN nuclear y plastídico, razón por la cual se denominó “ADN promiscuo” (Timmis y col., 2004). En *Arabidopsis*, se encontraron en el genoma mitocondrial dieciséis piezas de ADN plastídico (representadas por seis ARNt funcionales), fragmentos de genes nucleares, retrotransposones y secuencias similares a ADN de patógenos de plantas (Blanchard y Lynch, 2000). La integración y mantenimiento del ADN promiscuo en el genoma mitocondrial de plantas se encuentra bajo una débil presión selectiva (Kubo y Mikami, 2007).

1.5.2. Información genética contenida en el genoma mitocondrial de plantas.

El genoma mitocondrial de *A. thaliana* (367 kpb) contiene 26 marcos abiertos de lectura y 57 genes codificantes, esto es, menos del diez por ciento del total de los productos de expresión génica encontrados en mitocondrias. Entre los genes codificados por este genoma se encuentran *nad1* a *nad9* (complejo I), *cob* (complejo III), *cox1*, 2 y 3 (complejo IV), *atp1*, 6 y 9 (complejo V), genes relacionados con la biogénesis del citocromo *c*, genes codificantes para los ARNr 26S, 18S y 5S y las proteínas ribosomales rpl2, 5 y 16 y rps3, 4, 7 y 12 (Unsold y col., 1997) y 22 genes de ARNt, los cuales resultan insuficientes para decodificar el total de los codones encontrados en el genoma, por lo que el resto de los ARNt son incorporados desde el citosol (Kubo y Mikami, 2007).

La expresión de los genes mitocondriales es regulada principalmente a nivel post-transcripcional y existe evidencia de que la abundancia de los transcritos mitocondriales no se correlaciona con la actividad relativa de los promotores de los genes que los codifican (Giegé y col., 2000). En la bibliografía se han reportado mecanismos complejos de procesamiento y maduración que transforman al transcrito primario mitocondrial en un ARN mensajero maduro, entre los que se incluyen el editado del ARN (cambio de una C por U), el corte de las regiones intrónicas y su posterior empalme y la maduración del transcrito mediante el procesamiento de los extremos 5' y 3' (Farré, 2001). Además, el control de la actividad génica puede tener lugar durante la traducción o la degradación del mensajero. A diferencia de lo que sucede con los ARNm codificados en el núcleo, la poliadenilación de los mensajeros mitocondriales constituye un mecanismo para la degradación de los mismos (Gagliardi y col., 2001).

1.5.3. Migración de genes mitocondriales al núcleo.

La teoría endosimbiótica postula que la transferencia de genes mitocondriales al núcleo tuvo lugar principalmente durante los primeros tiempos de la evolución de la célula eucariota y pudo haber ocurrido, en varios casos, con la participación de intermediarios de ARN (Adams y col., 1999 y 2000). La incorporación eficiente de un gen mitocondrial en el genoma nuclear supone la presencia de un promotor al comienzo del gen que facilite la transcripción en el núcleo, secuencias específicas para la adición de la cola de poli A en el mensajero correspondiente y la incorporación de una secuencia señal para que la proteína sintetizada en el citosol pueda ser transportada a la mitocondria. Además, deben estar presentes los elementos de regulación propios de diferentes tipos de células y bajo determinadas condiciones, permitiendo la expresión estable y adecuada de los genes transferidos (Taiz y Zeiger, 2002). Estos elementos indispensables habrían surgido por eventos de duplicación y recombinación de diferentes regiones génicas (Kadowaki y col., 1996). Los genomas de las organelas contienen varios genes que no han sido transferidos al núcleo y existen varias hipótesis que intentan explicar esta particularidad:

1- La hipótesis “co-localización para la regulación redox de la expresión” (CORR; Co-location for Redox Regulation) sostiene que tanto cloroplastos como mitocondrias han retenido aquellos genes cuya expresión es regulada por el estado redox de los productos que codifican o por los transportadores de electrones con los que estos productos interactúan. Esta regulación sería indispensable para la aclimatación y respuesta rápida a cambios ambientales como los niveles de oxígeno, luz o dióxido de carbono (Allen, 2003).

2- La hipótesis “lock-in” sostiene que los componentes constituyentes del núcleo de los complejos multienzimáticos respiratorios o fotosintéticos deben ser sintetizados *de novo* en el compartimiento celular correcto para impedir que dichos complejos puedan ensamblarse en la membrana equivocada (Bogoard, 1975).

3- La hipótesis “evolutiva” interpreta la transferencia de genes de las organelas al núcleo como un proceso activo que aún no ha cesado y sostiene que la información codificada en el genoma de las organelas comprende genes que aún no migraron al núcleo (Adams y col., 2000; Daley y col., 2002).

4- Otras hipótesis sostienen que la migración de genes hacia el núcleo se detuvo debido a algún “accidente” o a características de hidrofobicidad o estructurales de determinadas proteínas o cofactores que imposibilitan su importación y, por lo tanto, deben ser sintetizados dentro de la organela (Allen, 2003).

Las hipótesis comentadas no constituyen modelos excluyentes y, probablemente, el mecanismo que intentan explicar sea el resultado de la integración de varias de ellas.

1.6. Interconexión entre el núcleo y las organelas.

La alta complejidad y distribución de las actividades metabólicas en las diferentes organelas representa un desafío para la célula eucariota, en particular, si se considera la evidente coordinación que debe existir respecto a la regulación de la expresión génica y el control de los niveles de proteínas en cada organela. Además de cambios propios de diferentes eventos del desarrollo, las organelas deben adaptarse a cambios en las condiciones del ambiente, incluyendo modificaciones en el estado redox, daño oxidativo o disponibilidad de nutrientes (Taiz y Zieger, 2002). Las mitocondrias y los cloroplastos poseen su propio genoma, agregando mayor complejidad al proceso de organización y regulación de la expresión génica. Los mecanismos de coordinación incluyen señales desde las organelas al núcleo (señalización retrógrada) y desde el núcleo a las organelas (señalización anterógrada). La señalización anterógrada coordina la expresión de genes en las organelas en respuesta a estímulos endógenos o ambientales detectados por el núcleo, mientras que la señalización retrógrada transmite señales originadas en las organelas para regular la expresión de genes nucleares (Figura 7; Woodson y Chory, 2008).

El núcleo y las proteínas de codificación nuclear controlan la función de las organelas y la composición del proteoma de una célula eucariota. La concentración de varias proteínas de organelas codificadas en el núcleo es eficientemente regulada a nivel transcripcional (Kleffmann y col., 2004), mientras que en otros casos, proteínas de codificación nuclear regulan eventos posteriores a la traducción, como ser el transporte de proteínas, el ensamblado de diferentes subunidades de un complejo proteico y la regulación de la actividad de diferentes enzimas (Fontanesi y col., 2006; Tanaka y Tanaka, 2007). En los últimos años se han reportado numerosas proteínas de codificación nuclear involucradas en el control y la regulación de la expresión de genes en mitocondrias y cloroplastos (Woodson y Chory, 2008)

Los mecanismos de señalización retrógrada han evolucionado permitiendo la comunicación del estado funcional y de desarrollo de las organelas al núcleo, haciendo que este último module las señales anterógradas y regule el metabolismo celular en forma acorde a las necesidades puntuales. Estas señales permiten la expresión coordinada de los genomas nuclear y de las organelas, dirigiendo cambios adaptativos en

respuesta a fluctuaciones o cambios drásticos en las condiciones ambientales, o para informar al núcleo de situaciones de estrés celular (Woodson y Chory, 2008).

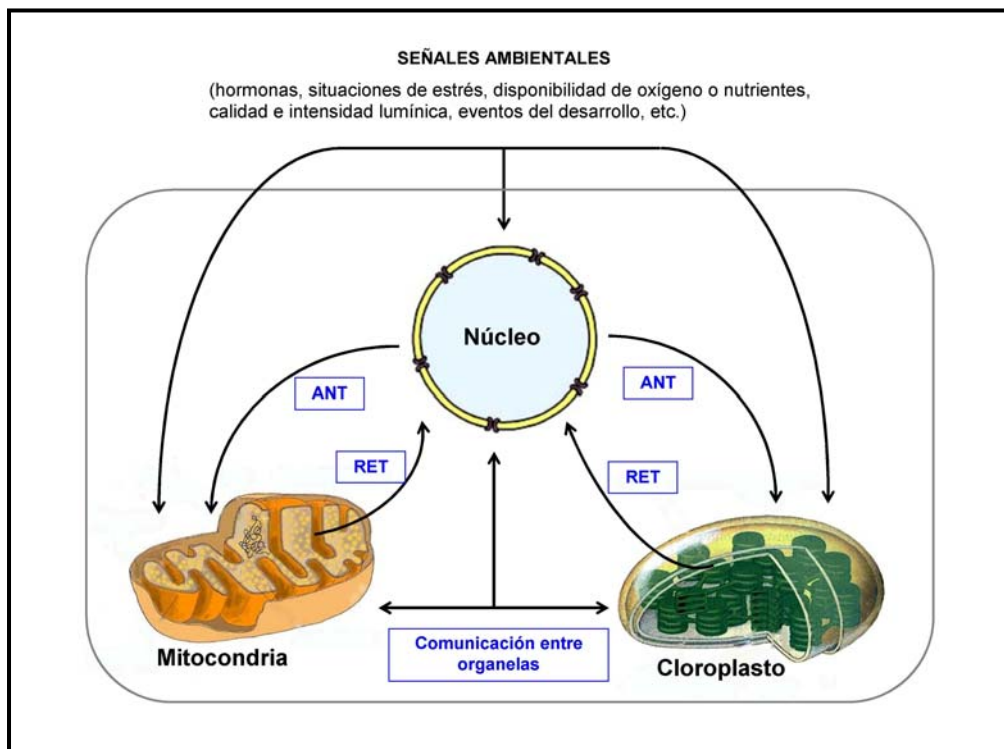


Figura 7. Coordinación entre los genomas del núcleo y las organelas. Señales provenientes del ambiente afectan la expresión de genes nucleares codificantes para proteínas de organelas. Este proceso afecta, a su vez, la función y expresión de genes mitocondriales y cloroplásticos a través de las vías de señalización anterógrada (ANT). Las organelas también son capaces de detectar algunos estímulos o condiciones ambientales que afectan su funcionalidad, por ejemplo, la intensidad o calidad lumínica (cloroplastos) o la disponibilidad de oxígeno (mitocondria). Éstas comunican al núcleo, mediante las vías de señalización retrógrada (RET), los estímulos recibidos y su estatus funcional, determinando la expresión y regulación de genes nucleares (Adaptado de Woodson y Chory, 2008).

Además, existe una marcada interdependencia metabólica entre plástidos y mitocondrias, siendo un ejemplo claro el proceso de fotosíntesis, el cual proporciona los sustratos necesarios para la respiración mitocondrial y, a la vez, depende de algunos compuestos sintetizados por la mitocondria. (Hoefnagel y col., 1998; Raghavendra y

Padmasree, 2003). Los genes fotosintéticos codificados en el núcleo son regulados negativamente en respuesta a cambios simultáneos de la traducción en cloroplastos y mitocondrias, sugiriendo un papel sinérgico de las dos organelas en esta regulación (Pesaresi y col., 2006). El pasaje redox entre organelas puede ocurrir a través del transporte de ácidos orgánicos e interconversiones relacionadas con los mismos, en conjunto con la oxidación y reducción de coenzimas específicas. Sin embargo, se desconoce el funcionamiento de esta maquinaria de diálogo intracelular (Mackenzie y McIntosh, 1999), aunque se ha sugerido que la mitocondria tendría un papel fundamental, siendo las ROS las moléculas señal entre organelas y núcleo (Apel y Hirt, 2004). Esta idea es avalada por varios estudios reportados en los últimos años, en los cuales se demostró que el aumento en los niveles de H_2O_2 en la mitocondria, cloroplastos y peroxisomas se relaciona con cambios en el transcriptoma nuclear (Pesaresi y col., 2006), mientras que los equivalentes reductores generados por la fotosíntesis tienden a acumularse en el estroma de los cloroplastos causando fotoinhibición debida a la producción de ROS por parte de la cadena de transporte de electrones fotosintética (Foyer y Noctor, 2000; Allen, 2002). Se ha propuesto que el exceso de equivalentes de reducción puede ser disipado mediante su exportación (vía la lanzadera de malato) desde los cloroplastos a la mitocondria (Scheibe y col., 2005), donde serían utilizados por la cadena de transporte de electrones, permitiendo que la fotosíntesis continúe activa (Noctor y col., 2007). El ciclo de Krebs, las vías de respiración que involucran al citocromo *c* y a la oxidasa alternativa y la proteína desacoplante median este diálogo (Nunes-Nesi y col., 2008; Woodson y Chory, 2008).

1.6.1. Importación de proteínas mitocondriales sintetizadas en el citosol.

Las mitocondrias han adquirido una eficiente maquinaria para la importación de proteínas sintetizadas en el citosol, incluyendo receptores de la membrana externa, translocasas (en la membrana externa y en la interna), chaperonas (citosólicas y mitocondriales) y peptidasas encargadas de remover el péptido señal, porción de la proteína que contiene la información necesaria para su correcta localización intracelular (Neupert, 1997; Pfanner y Geissler, 2001). La maquinaria de importación ha sido estudiada extensamente en levaduras. En la membrana externa, la translocasa TOM (Translocase of Uter Membrane) contiene siete proteínas con dos receptores primarios, TOM20 y TOM70, encargados del reconocimiento de los precursores que poseen el péptido señal en el extremo N-terminal o en una región interna de la proteína, respectivamente (Wiedemann y col., 2004). Luego del reconocimiento, los receptores transfieren las proteínas al poro central TOM40 vía TOM22 (también puede actuar como

receptor para un número pequeño de proteínas). El complejo SAM (Sorting and Assembly Machinery), localizado en la membrana externa, actúa en conjunto con el complejo TOM, permitiendo la inserción en dicha membrana de diferentes proteínas con la colaboración de un complejo de chaperonas del espacio intermembrana (Taylor y Pfanner, 2004; Stojanovski y col., 2007). En la membrana interna, TIM 17:23 y TIM22 (Translocase of Inter Membrane) actúan en la vía general de importación o en la vía que incorpora proteínas con funciones metabólicas y de transporte, respectivamente (Pfanner y Geissler, 2001). El primer complejo contiene a TIM50 y TIM44 (Yamamoto y col., 2002; Mokranjac y col., 2003) y es responsable de la importación de precursores que contienen un péptido señal en el extremo N-terminal, removido luego por la peptidasa mitocondrial MPP (Mitochondrial Processing Peptidase; Neupert, 1997; Pfanner y Geissler, 2001). El complejo TIM22, junto a chaperonas del espacio intermembrana (TIM8, 9, 10 y 13), es responsable de la importación de proteínas hacia la membrana interna (Sirrenberg y col., 1996; Koehler, 2000; Rehling y col., 2003; Davis y col., 2007). Una tercera translocasa de la membrana interna, Oxa1p (Luirink y col., 2001), participa en la incorporación de proteínas que exponen su dominio N-terminal hacia el espacio intermembrana (Hell y col., 2001). Numerosas proteínas presentes en el espacio intermembrana poseen motivos de cisteína y son importadas a través de una vía adicional, mediada por Mia40 (Mitochondrial Intermembrane space Assembly system), proteína que se reduce formando puentes disulfuro en las proteínas importadas (Chacinska y col., 2004). Una sulfhidril-oxidasa, Erv-1, interactúa con Mia40 permitiendo que pueda actuar sobre nuevas proteínas (Mesecke y col., 2005). El estado reducido de Mia40 es estabilizado, probablemente, por la unión de metales como zinc y cobre (Terziyska y col., 2005) y la re-oxidación de esta proteína depende de la presencia de citocromo c oxidado, el cual recibe electrones a partir de Erv-1, es decir, la importación de proteínas a través de este sistema depende del estado energético de la cadena respiratoria. Además de facilitar la re-oxidación de Mia40, la conexión entre ésta y el citocromo c previene la formación de peróxido de hidrógeno en el espacio intermembrana mitocondrial (Bihlmaier y col., 2007).

En plantas, se han encontrado numerosas proteínas involucradas en la maquinaria de importación mitocondrial (Figura 8), caracterizándose los complejos TOM, MPP y TIM (Braun y Schmitz, 1999; Glaser y Dessi, 1999; Werhahn y col., 2001; Murcha y col., 2007). No se han encontrado ortólogos de los receptores TOM20, TOM22 y TOM70 presentes en levaduras y mamíferos. Sin embargo, en *Arabidopsis* se identificó una proteína pequeña (TOM9) que presenta una región transmembrana y un dominio en el espacio intermembrana similar a TOM22 de levaduras (Macasev y col., 2000; 2004; Yamano y col., 2008) y una proteína similar a TOM20 anclada en una orientación opuesta

a la de sus contrapartes de levaduras y mamíferos (Lister y Whelan, 2006; Perry y col., 2006). La proteína METAXINA en Arabidopsis (Heazlewood y col., 2004) es homóloga a una subunidad del complejo SAM en levaduras (Bolender y col., 2008). A diferencia de levaduras, MPP de plantas es un componente integral de membrana relacionado con el supercomplejo citocromo *b-c*/citocromo *c* oxidasa de la cadena respiratoria y parece existir una actividad específica en la matriz (Braun y Schmitz, 1999; van der Laan y col., 2006).

En levaduras, las subunidades que conforman los complejos TOM, TIM y SAM están codificadas por genes nucleares únicos, mientras que en plantas y animales estos complejos están codificados, generalmente, por pequeñas familias multigénicas, desconociéndose el significado de la existencia de las mismas, aunque podrían representar diferentes isoformas con funciones específicas (Lister y col., 2007).

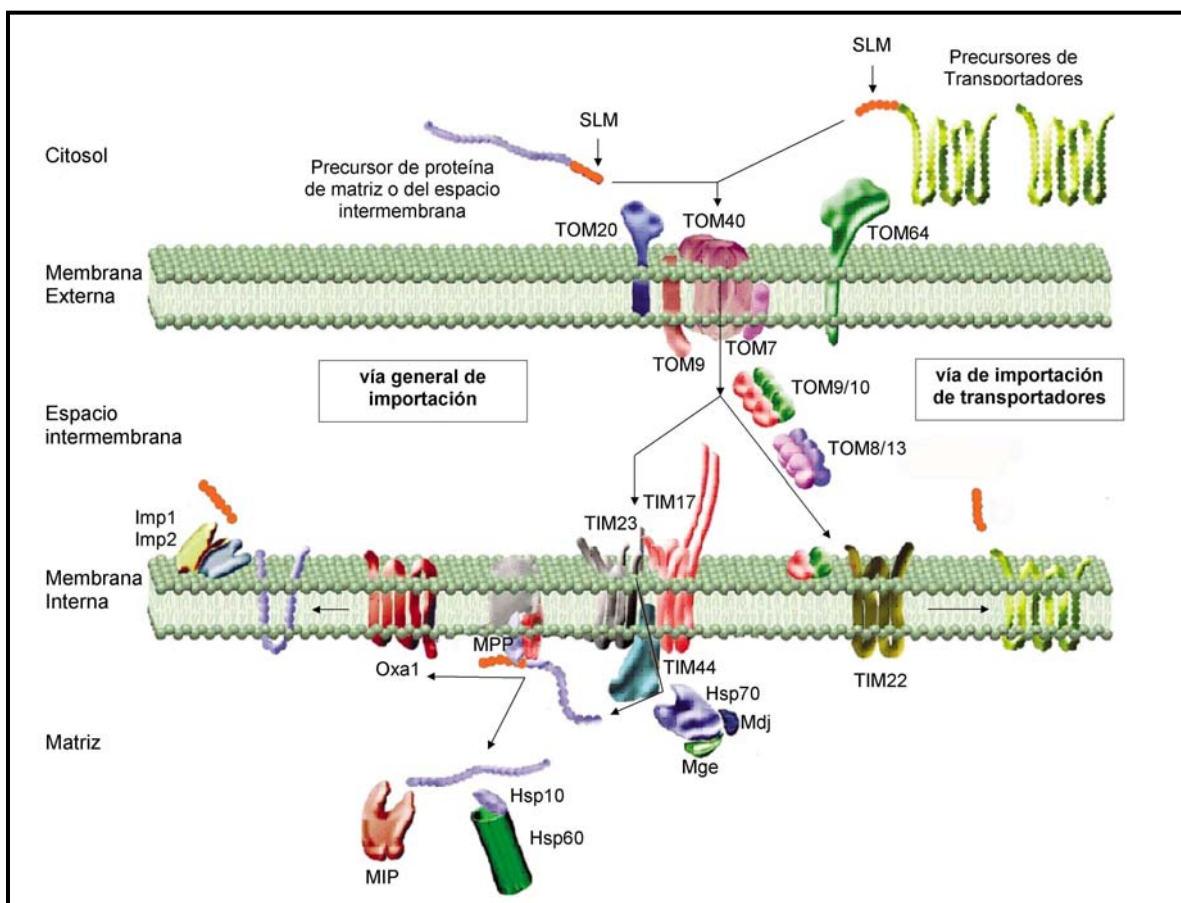


Figura 8. Importación de proteínas a mitocondrias de plantas. Modelo basado en las similitudes con levaduras. Las proteínas precursoras pueden ser incorporadas por la vía general de importación o por la vía para importar transportadores. Las proteínas que siguen la vía general usualmente poseen una secuencia de localización mitocondrial (SLM), se unen al receptor TOM20

y son translocadas vía TOM40 y TIM17:23 a través de las membranas externa e interna, respectivamente, con la colaboración de la chaperona Hsp70. La SLM es removida por la proteasa MPP y la proteína puede adquirir su conformación final por acción de la chaperona Hsp60, o bien, ser re-direccionada a la membrana interna vía Oxa1 para su posterior procesamiento por los factores Imp1 y/o Imp2. Las proteínas transportadoras son translocadas a la membrana interna vía TIM22 con la colaboración de pequeñas proteínas del espacio intermembrana. Los precursores de los transportadores pueden no contener una SLM, pero en aquellos que la poseen, ésta es removida por una proteína desconocida (Adaptado de Lister y col., 2003).

1.7. Biogénesis mitocondrial.

La biogénesis mitocondrial puede definirse como *el aumento del número o masa de mitocondrias*, y las señales que estimulan este proceso pueden originarse tanto en el interior de la organela como a partir de necesidades metabólicas propias del desarrollo o adaptativas frente a cambios en el medioambiente (Nunnari y Walter, 1996).

La coordinación y regulación de la expresión génica en una célula vegetal es extremadamente compleja, lo que se evidencia al estudiar la regulación de la expresión de los complejos respiratorios de la cadena de transporte de electrones (Lee y col., 2002; Gómez-Casati y col., 2002; Lister y col., 2004). Los genes nucleares codificantes para proteínas mitocondriales responden también a varias señales metabólicas. Por ejemplo, la mayoría de los componentes de la cadena respiratoria aumentan su expresión en presencia de sacarosa o luz (Ohtsu y col., 2001; Figueroa y col., 2002; Curi y col., 2003; Welchen y col., 2002; 2004) y se ha propuesto que elementos regulatorios denominados *site II* (5'-TGGGCC/T-3'), presentes en las regiones promotoras de la mayoría de los genes nucleares codificantes para proteínas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, podrían participar en la coordinación de la expresión de los mismos (Welchen y González, 2005; 2006). La citocromo c oxidasa (complejo IV) evidencia la alta complejidad de la biogénesis mitocondrial, dado que está constituida por subunidades codificadas en el genoma nuclear y en el mitocondrial, y durante su ensamblado requiere de una gran cantidad de proteínas accesorias de codificación nuclear. La expresión de cada una de las proteínas involucradas es delicadamente regulada espacial y temporalmente (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

1.7.1. Biogénesis de la citocromo c oxidasa (COX).

La citocromo c oxidasa constituye la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones en eucariotas y algunos procariotas. Está constituida por alrededor de 11-14 subunidades, dependiendo del organismo considerado (Millar y col., 2004). El núcleo enzimático de COX está formado por tres subunidades grandes e hidrofóbicas (Cox1,

Cox2 y Cox3), altamente conservadas entre diferentes organismos, generalmente codificadas en el genoma mitocondrial y traducidas en los ribosomas de la organela (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Las restantes subunidades de COX son de codificación nuclear, resultan esenciales para el ensamblado y funcionalidad de la enzima y, a diferencia de sus contrapartes codificadas en la mitocondria, presentan un menor nivel de conservación entre los diferentes organismos (Millar y col., 2004). En procariotas, la organización del complejo es más simple, dado que los homólogos de las tres subunidades codificadas en la mitocondria constituyen la enzima funcional (Lang y col., 1997; Das y col., 2004).

La biogénesis de COX es un proceso complejo por su localización subcelular, el reclutamiento de subunidades codificadas en dos genomas, la naturaleza hidrofóbica de la mayoría de sus componentes y la presencia de grupos prostéticos requeridos para su función (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Las subunidades estructurales de COX se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Subunidades estructurales conocidas de la citocromo c oxidasa (COX) de mamíferos, levaduras y *Arabidopsis*. Se destacan las que forman el núcleo enzimático y están codificadas en el genoma mitocondrial (en amarillo) o nuclear (en celeste). Las proteínas exclusivas de *A. thaliana* se muestran sin sombrear. Los guiones corresponden a subunidades ausentes en los organismos mencionados (Khalimonchuk y Rödel, 2005; Barrientos y col., 2009).

Mamíferos		Levaduras		<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen
Cox1	Cox1	Cox1p	cox1	COX1	<i>AtMg01360</i>
Cox2	Cox2	Cox2p	cox2	COX2	<i>AtMg00160</i>
Cox3	Cox3	Cox3p	cox3	COX3	<i>AtMg00730</i>
Cox4	Cox4	Cox5p (a/b)	cox5a/b	-	-
Cox5a	Cox5a	Cox6p	cox6	-	-
Cox5b	Cox5b	Cox4p	cox4	COX5b	<i>At3g15640</i> <i>At1g80230</i>
Cox6a	Cox6a	Cox6ap	cox13	COX6a	<i>At4g37830</i>
Cox6b	Cox6b	Cox6bp	cox12	COX6b	<i>At5g57815</i> <i>At4g28060</i> <i>At1g22450</i> <i>At1g32710</i>
Cox6c	Cox6c	Cox7ap	cox9	COX6c	<i>At3g22210</i>
Cox7a	Cox7a	Cox7p	cox7	-	-
Cox7b	Cox7b	-	-	-	-
Cox7c	Cox7c	Cox8p	cox8	-	-
Cox8	Cox8	-	-	COX5c	<i>At2g47380</i> <i>At3g62400</i>

					<i>At5g61310</i>
-	-	-	-	COXX1	<i>At5g27760</i> <i>At3g05550</i>
-	-	-	-	COXX2	<i>At4g00860</i> <i>At1g01170</i>
-	-	-	-	COXX3	<i>At1g72020</i>
-	-	-	-	COXX4	<i>At4g21105</i>
-	-	-	-	COXX5	<i>At3g43410</i>
-	-	-	-	COXX6	<i>At2g16460</i>

1.7.1.1. Subunidades estructurales codificadas en el genoma mitocondrial.

La subunidad Cox1, la más grande e hidrofóbica del núcleo enzimático de COX, está compuesta por doce hélices transmembrana, posee un hemo a de bajo spin y un sitio bimetalico compuesto de un hemo a_3 de alto spin y un ión de cobre (Cu_B) responsable de la reducción del oxígeno molecular (Carr y Winge, 2003). Esta subunidad participa en la translocación de protones a través de dos canales de tipo D y K (aspartato y lisina), formados por residuos hidrofílicos unidos a una red de moléculas de agua. El canal D guía los protones desde la matriz hacia un residuo glutamato conservado, mientras que el canal K conecta la matriz con el centro Cu_B (Khalimonchuk y Rodel, 2005). La subunidad Cox2 está compuesta por dos dominios transmembrana y posee un centro binuclear hemo a/Cu_A expuesto al espacio intermembrana, sitio de entrada para los electrones que viajan a través de la cadena de transporte de electrones (Poyton y McEwen, 1996). La subunidad Cox3 es hidrofóbica, atraviesa siete veces la membrana interna, no posee grupos prostéticos y se propone que está involucrada en el ensamblado y/o estabilidad de la enzima (Khalimonchuk y Rodel, 2005). En la Figura 9 se esquematiza el núcleo enzimático de COX, formado por las subunidades mencionadas en este punto.

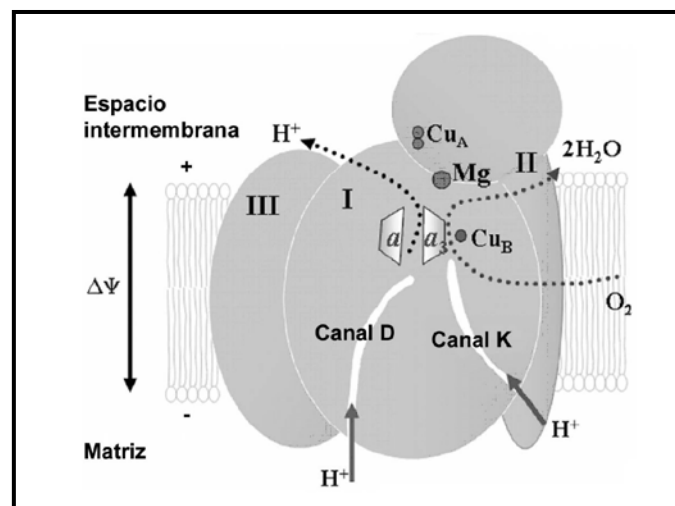


Figura 9. Núcleo enzimático de COX. La subunidad I posee un centro binuclear hemo a_3 -Cu_B y hemo a. La subunidad II posee un centro Cu_A, aceptor primario de los electrones provenientes del citocromo c. La subunidad III no posee grupos prostéticos. Los canales D y K son las vías de translocación de protones (Adaptado de Schmidt y col., 2003).

1.7.1.2. Subunidades estructurales codificadas en el genoma nuclear.

El núcleo catalítico de COX está rodeado de pequeñas proteínas codificadas en el genoma nuclear, sintetizadas en el citoplasma y luego importadas a la mitocondria. Estas subunidades no son esenciales para la reducción del oxígeno molecular ni para la transferencia de protones, pero parecen estar involucradas en el ensamblado, estabilidad, protección frente a ROS y regulación de la actividad de la enzima (Tabla 1; Geier y col., 1995; Burke y Poyton, 1998; Khalimonchuk y Rödel, 2005; Fontanesi y col., 2006; Barrientos y col., 2009).

La mayoría de las subunidades codificadas en el genoma nuclear de levaduras presentan un dominio transmembrana y se encuentran firmemente unidas al núcleo de la enzima, aunque existen subunidades que no atraviesan la membrana interna (Carr y Winge, 2003, Khalimonchuk y Rödel, 2005). En mamíferos, la composición de COX es similar a la observada en levaduras excepto por la presencia de dos subunidades adicionales, Cox7b y Cox8 (Capaldi, 1990). Las subunidades Cox5a, Cox5b y Cox6b son proteínas hidrofílicas que no atraviesan la membrana interna, mientras que el resto de las subunidades codificadas en el genoma nuclear son hidrofóbicas y atraviesan la membrana una vez (Tsukihara y col., 1996). Estudios recientes mostraron que la subunidad Cox5b (Cox4p en levaduras) se localiza en la periferia del núcleo catalítico de COX, se orienta hacia la matriz de la organela, sus extremos C- y N-terminal establecen interacciones directas con las subunidades Cox1 y Cox2, respectivamente, y contiene un sitio de unión a iones cinc, aunque se desconoce la relevancia fisiológica de éste (Coyne y col., 2008; Galati y col., 2009). El contenido de Cox5b varía de acuerdo al tejido analizado y, en general, tejidos con demandas metabólicas elevadas también muestran elevados niveles de proteína. Además, esta subunidad se fosforila de manera dependiente de AMPc y condiciones de hipoxia causan una disminución significativa en los niveles de proteína, proceso acompañado de un decaimiento general en la actividad de COX. El silenciamiento del gen *Cox5b* en líneas celulares establecidas reduce dramáticamente la actividad COX y la inhabilita para formar complejos funcionales, con la consecuente reducción drástica en los niveles de respiración, disminución del potencial de membrana y aumento notorio en los niveles de ROS, avalando la idea del papel

esencial de esta subunidad para el ensamblado, estabilidad y regulación de la actividad de COX (Coyne y col., 2007; Galati y col., 2009).

En plantas, se han identificado las subunidades COX5b, 5c, 6a y 6b en base a la homología de secuencias con las contrapartes de levaduras y mamíferos (Nakagawa y col., 1990; Kadowaki y col., 1996; Ohtsu y col., 2001; Curi y col., 2003). En *Arabidopsis*, los genes *COX6b* se expresan principalmente en anteras y regiones meristemáticas y su expresión es inducida por etiolación de las plantas y por sacarosa (Mufarrege y col., 2009), mientras que los genes *COX5c* se expresan especialmente en tejido vascular y meristemático y granos de polen, siendo los niveles de expresión relativamente altos en función de la presencia de un intrón en la región 5' no codificante (Curi y col., 2005). Otras subunidades adicionales de COX, exclusivas de plantas, se reportaron en la última década (Tabla 1), desconociéndose hasta el momento el papel que desempeñan en la estructura o función del complejo (Millar y col., 2004).

1.7.1.3. Centros catalíticos de COX.

El centro Cu_A se localiza en Cox2 y constituye el receptor de electrones provenientes del citocromo *c*. Un residuo de ácido glutámico importante en proporcionar la conformación de este centro también está involucrado en la coordinación de un ión Mg^{2+} (Khalimonchuk y Rödel, 2005). En el interior de Cox1 se encuentra el hemo *a* (Stiburek y col., 2006) y el centro Cu_B , sitio de unión del oxígeno molecular (Tsukihara y col., 1995). El hemo *a* funciona como un punto de transición en la transferencia del electrón desde el centro Cu_A al centro hemo a_3-Cu_B , y la reducción de este último (fase reductiva del ciclo catalítico) es un requisito previo para la unión del oxígeno molecular y la subsecuente formación de agua (fase oxidativa del ciclo). La transferencia de electrones desde el hemo *a* al sitio catalítico se encuentra ligada a la transferencia interna de protones, iniciando el mecanismo de la bomba de protones de la enzima (Tsukihara y col., 1995; Khalimonchuk y Rödel, 2005; Belevich y col., 2006).

1.7.1.4. Otros componentes.

La enzima COX contiene, además, iones magnesio, sodio y zinc, desconociéndose aún el papel de estos metales sobre la funcionalidad de la misma. El zinc podría cumplir un papel estructural en la estabilidad del complejo (Coyne y col., 2007) y el magnesio/manganeso, cercano al sitio de formación de agua, colaborar en la estabilidad y liberación del agua producida durante la reducción del oxígeno (Schmidt y col., 2003).

1.7.2. Ensamblado de COX.

Las subunidades de COX codificadas en el genoma mitocondrial deben ser procesadas e insertadas dentro de la membrana interna de la organela, mientras que las subunidades codificadas en el genoma nuclear deben ser translocadas desde el citosol (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Luego de la sucesión de estos eventos puede ocurrir el correcto ensamblado de una COX funcional en la membrana interna de la mitocondria, proceso que involucra un gran número de proteínas accesorias (Nijtmans y col., 1998; Stiburek y col., 2005; Mick y col., 2007; Pierrel y col., 2008; Barrientos y col., 2009).

Las tres subunidades codificadas en el genoma mitocondrial son sintetizadas en ribosomas mitocondriales asociados a la membrana interna de la organela (Szyrach y col., 2003), mientras que las subunidades codificadas en el núcleo son importadas de la misma manera que otras proteínas de origen nuclear (véase punto 1.6.1), es decir, atraviesan la membrana externa a través del complejo TOM y, una vez en el espacio intermembrana, interactúan con el complejo TIM17:23, procesos asistidos por numerosas chaperonas moleculares (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Algunas proteínas maduras pueden arrestarse en el complejo TIM17:23 durante el proceso de inserción en la membrana interna y moverse lateralmente hacia el sitio de ensamblado de COX (mecanismo denominado “transferencia detenida”), mientras que otras proteínas, generalmente con péptido señal, son incorporadas mediante un “mecanismo conservativo”, es decir, la inserción de la proteína desde la matriz, involucrando un paso de exportación adicional dependiente, a veces, del clivaje por parte de MPP (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

1.7.2.1. Ensamblado de COX en levaduras.

La membrana interna mitocondrial posee una serie de activadores traduccionales específicos encargados de reclutar los mensajeros correspondientes a las subunidades de codificación mitocondrial, interaccionando con la región 5' no codificante del transcripto. Las proteínas Mss51p y Pet309p activan la traducción de Cox1p (Manthey y McEwen, 1995; Pérez-Martínez y col., 2003), Pet111p la de Cox2p (Mulero y Fox, 1993) y Pet54p, Pet122p y Pet494p la de Cox3p (Costanzo y Fox, 1988; Brown y col., 1994). La traducción de estas subunidades también requiere la participación de Oxa1p (Hell y col., 2001). Los extremos N- y C-terminales de Cox2p son translocados con la colaboración de Oxa1p, Cox18p, Pnt1p y Mss2p (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Aparentemente, Mba1p también podría estar involucrada en la translocación de las tres subunidades y

representaría una vía independiente de Oxa1p para la inserción de proteínas en la membrana interna (Preuss y col., 2001). Las proteasas Imp1p/Imp2p, localizadas en la cara externa de la membrana interna, son las encargadas de remover el péptido señal del precursor de Cox2p cuando éste emerge hacia el espacio intermembrana, proceso estabilizado por la chaperona Cox20p (Hell y col., 2000; Khalimonchuk y Rödel, 2005). La inserción de Cox1p dependería de la función de Mss51p, proteína iniciadora de la traducción y que interactúa con Cox14p y el polipéptido naciente (Glerum y col., 1995). La proteína Coa1p estabilizaría el complejo Cox1p/Mss51p/Cox14p (Pierrel y col., 2007; 2008), Shy1p catalizaría la liberación de Mss51p en un paso que involucra la inserción del grupo hemo dentro de la subunidad Cox1p (Mick y col., 2007) y Coa2p, localizada en la matriz, estabilizaría el intermediario de Cox1p que contiene Cox5ap y Cox6p en el paso dependiente de Shy1p (Barrientos y col., 2009). La subunidad Cox2p no es necesaria para la incorporación de Cox3p en el intermediario para el ensamblado de COX (Fontanesi y col., 2008).

La importación de las subunidades de codificación nuclear, como Cox4p y Cox5ap, transcurre mediante el mecanismo de “transferencia detenida”, proceso dependiente de la actividad ATP-hidrolasa de Hsp70p (Hurt y col., 1987; Stuart y Neupert, 1996). Las subunidades Cox4p, Cox5ap, Cox6p y Cox6bp pueden ensamblarse independientemente del núcleo catalítico de COX (Carr y Winge, 2003), mientras que el complejo formado por Cox7p, Cox7ap y Cox8p podría incorporarse a la enzima a través de Pet100p, chaperona anclada a la membrana indispensable para el ensamblado de COX (Church y col., 2005). Otras chaperonas con funciones menos evidentes, como Pet117p, Pet191p y Cox16p, han sido descritas como facilitadoras del ensamblado de COX (Khalimonchuk y Rödel, 2005).

La vía de síntesis del hemo *a* involucra varios pasos y proteínas accesorias, entre las que se destacan la farnesiltransferasa Cox10p, Cox15p (sintasa de hemo *a*), Yah1p (ferredoxina mitocondrial) y la ferredoxina reductasa Arh1p (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Se postula que la inserción del hemo *a* en Cox1p se produce en etapas tempranas del ensamblado, probablemente antes de la asociación con Cox2p y Cox3p. Si bien no se han identificado proteínas específicas para la inserción del hemo *a*, Shy1p parece ser importante en este proceso (Gibney y col., 2000; Smith y col., 2005).

La incorporación de los metales durante el ensamblado de COX es un paso importante para la conformación de la enzima y su funcionalidad (Khalimonchuk y Rödel, 2005) y se han identificado varias proteínas relacionadas con este proceso, como ser Cox17p (Beers y col., 1997; Heaton y col., 2000), Sco1p (Schulze y Rödel, 1989; Beers y col., 2002), Cox11p (Tzagoloff y col., 1990), Cox19p (Nobrega y col., 2002; Cobine y col.,

2004) y Cox23p (Cobine y col., 2006). Las proteínas mencionadas poseen motivos capaces de unir cobre y se postula que Sco1p determina la formación del centro Cu_A en Cox2p (Dickinson y col., 2000) y podría actuar como un conector funcional de procesos biológicos relacionados con el metabolismo del cobre y el estado redox celular (Arenasano y col., 2005), mientras que COX11p parece estar relacionada con la incorporación de cobre en Cox1p (Khalimonchuk y col., 2008).

En resumen, el ensamblado de un complejo COX funcional involucra subunidades estructurales codificadas en dos genomas (nuclear y mitocondrial), cofactores y numerosas proteínas no estructurales adicionales (Tabla 2), demostrando la complejidad de este proceso clave para cubrir los requerimientos energéticos de una célula eucariota.

Tabla 2. Proteínas accesorias (no estructurales) involucradas en la biogénesis de COX en levaduras (Barrientos y col., 2009).

Proteína	Función
Pet309p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox1</i> .
Pet111p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox2</i> .
Pet54p	Activadores de la traducción del mensajero de <i>cox3</i> .
Pet122p	
Pet494p	
Mss51p	Traducción e inserción de Cox1p en la membrana.
Cox14p	Expresión y ensamblado de Cox1p.
Coa1p	Ensamblado de Cox1p.
Coa2p	
Pet117p	Ensamblado de COX. No se conoce el papel preciso.
Pet191p	
Oxa1p	Translocación e inserción de las subunidades codificadas en el genoma mitocondrial.
Mba1p	
Cox18p	Translocación del dominio C-terminal del precursor de Cox2p.
Pnt1p	Translocación del precursor de Cox2p.
Mss2p	
Cox10p	Farnesiltransferasa. Cataliza el primer paso de la biosíntesis del hemo <i>a</i> .
Cox15p	Hemo <i>a</i> sintasa. Cataliza el segundo paso de la biosíntesis del hemo <i>a</i> .
Yah1p	Biosíntesis del hemo <i>a</i> .
Arh1p	
Shy1p	Inserción del hemo <i>a</i> dentro de Cox1p.
Cox17p	Metalochaperona. Transferencia de cobre a COX.
Cox19p	Metalochaperona. Ensamblado de COX.
Cox23p	Ensamblado de COX. ¿Metabolismo del cobre mitocondrial?
Sco1p	Metalochaperona. Provee el cobre a Cox2p.
Sco2p	Similar a Sco1p. Puede tener una función redundante.
Cox11p	Metalochaperona. Provee cobre a Cox1p.
Mia40p	Proteína de unión a metales esencial para el transporte y ensamblado de proteínas del espacio intermembrana.
Cmc1p	Expresión de COX y Sod1p mitocondrial.

formando el núcleo enzimático del complejo. Luego de la asociación con las subunidades de codificación nuclear restantes, se forma la holoenzima y se completa la reacción de ensamblado. La formación del núcleo de COX requiere la participación de Surf-1/Shy1 y Cox18/Oxa2. Pet100 participa en las reacciones finales de ensamblado. La línea de ensamblado de Cox1 (panel superior) involucra a la translocasa Oxa1, activadores traduccionales (no se muestran), el complejo Mss51/Cox14 (chaperonas involucradas en la estabilidad de Cox1 no ensamblada) y numerosas proteínas involucradas en la síntesis o transporte de los cofactores (grupo hemo a y Cu, respectivamente). La línea de ensamblado de Cox2 (panel inferior) involucra a la translocasa Oxa1, activadores traduccionales (probablemente Mba1, Mss2, Pnt1 y Cox18/Oxa2), la chaperona Cox20 (estabiliza Cox2 no ensamblada), el complejo Imp1 (maduración del precursor de Cox2) y las proteínas involucradas en el transporte del Cu a esta subunidad (Adaptado de Herrmann y Funes, 2005).

1.7.2.3. Ensamblado de COX en plantas.

La identidad y funcionalidad de las proteínas involucradas en el ensamblado de una COX funcional en plantas permanece sin dilucidarse o en etapas primarias de estudio, en la mayoría de los casos. En *Arabidopsis*, sin embargo, estudios recientes indicaron que las proteínas AtCOX11, AtCOX17, AtCOX19 y AtSco1, identificadas mediante homología de secuencia con las proteínas de levaduras, podrían desempeñar papeles similares en la homeostasis del cobre y el ensamblado de COX (Attallah y col., 2007a y b).

En esta reseña bibliográfica sobre el “estado del arte” en materia de biogénesis mitocondrial, resulta evidente que el estudio de este proceso celular tan importante se profundizó empleando modelos eucariotas “simples”, como las levaduras y, posteriormente, se centró en mamíferos debido al descubrimiento de que numerosas enfermedades que afectan a los seres humanos (y a otros eucariotas superiores) se relacionan con mutaciones localizadas en genes codificantes para distintos componentes mitocondriales o relacionados con la actividad y normal funcionamiento de esta organela. En plantas, el conocimiento de los genes y mecanismos moleculares involucrados en la biogénesis de la mitocondria permanecieron en la oscuridad durante un largo período de tiempo. Sin embargo, en los últimos 20 años numerosos grupos de investigación han dedicado sus esfuerzos a dilucidar estos mecanismos en vegetales, utilizando diversos modelos de estudio, debido a las características exclusivas de las mitocondrias de plantas y al complejo entorno celular (como ser la presencia de otra organela

semiautónoma: los cloroplastos), sumado al desarrollo de protocolos eficientes de transformación estable y numerosas técnicas moleculares de análisis de genes y proteínas. En este sentido, nuestro grupo de trabajo se ha dedicado al estudio de los mecanismos involucrados en la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa (COX) de la cadena respiratoria mitocondrial (Welchen y col., 2002 y 2004; Curi y col., 2003; Welchen y González, 2006, Attallah y col., 2009a y b; Mufarrege y col., 2009), centrando el estudio en los genes nucleares codificantes para diferentes componentes del complejo respiratorio mencionado. El presente Trabajo de Tesis se realizó empleando *Arabidopsis thaliana* como modelo y es un aporte al conocimiento de los mecanismos de regulación de la actividad de genes nucleares codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial en plantas, subunidad que en mamíferos y levaduras desempeña un papel fundamental en la estabilidad y la regulación de la actividad de COX.

Objetivos

2. OBJETIVOS PROPUESTOS

El **objetivo general** del presente Trabajo de Tesis es estudiar a nivel molecular los mecanismos de expresión de genes nucleares que codifican componentes de la cadena respiratoria mitocondrial de plantas, mediante el análisis de las regiones promotoras requeridas para la expresión y de los factores proteicos que interactúan con las mismas. Se utilizará el modelo de estudio en vegetales, *Arabidopsis thaliana*, dado que posee un genoma relativamente sencillo y existen protocolos establecidos de transformación.

Los **objetivos específicos** son:

1. Estudiar las regiones promotoras de los dos genes que codifican la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa de *Arabidopsis thaliana*, con el objetivo de identificar elementos regulatorios que estén involucrados en la expresión de los mismos.
2. Determinar los patrones de expresión e identificar compuestos capaces de activar/reprimir la expresión de los genes en estudio para establecer si existen vías comunes de regulación.
3. Identificar los factores proteicos que interactúan con las secuencias involucradas en la expresión de estos genes.
4. Analizar la presencia de elementos comunes de regulación tanto en los genes en estudio como en otros genes de componentes de la cadena respiratoria.
5. Avanzar en el establecimiento de un modelo de las interacciones que determinan la expresión de los distintos componentes de los complejos respiratorios en plantas.

Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas utilizadas.

3.1.1. Cepas de *Escherichia coli*.

DH5 α : F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺), λ - (Hanahan, 1983).

JM109: F' [*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZ* Δ M15] /*recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi1 hsdR17 supE44 relA1* Δ (*lac-proAB*) *mcrA* (Yanisch-Perron y col., 1985).

BL21: *hsdS gal* (λ *clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1*) (Studier y col., 1986)

BL21 CODON PLUS: BL21 F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm⁺ Tet^r gal* λ *endA Hte* [*argU ileY leuW*] Cam^R (Stratagene Cloning Systems).

BL21(DE3) ROSSETTA: F⁻ *ompT hsdS_B*(R_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]) pLysSRARE Cam^R (Stratagene Cloning Systems).

3.1.2. Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

GV2260: utiliza el sistema cointegrado de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pGV2260, el cual se obtuvo reemplazando la región ADN-T del plásmido pTiB6S3 de la cepa salvaje C58 por el plásmido pBR322. Esta cepa presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/l) (Deblaere et al., 1985).

LB 4404: utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 [el agente selectivo es la estreptomocina (300 mg/l)] en la cepa Ach5. Esta cepa posee además el plásmido pTi/pRi pTiAch5 y presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/l) (Ooms et al., 1982).

3.1.3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Y187: *MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, met⁻, gal4 Δ , gal80 Δ , URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ* (Harper y col., 1993).

aW303: *MAT α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1* (Thomas y Rothstein, 1989). Esta cepa se utilizó en los ensayos de simple híbrido (punto 3.9.1)

maV203: *MAT α* ; *leu2-3,112*; *trp1-901*; *his3 Δ 200*; *ade2-101*; *cyh2^R*; *can1^R*; *gal4 Δ* ; *gal80 Δ* ; *GAL1::lacZ*; *HIS3_{UASGAL1}::HIS3*; *SPAL10_{UASGAL1}::URA3* (Vidal y col., 1996). Esta cepa se utilizó en los ensayos de doble híbrido (punto 3.9.5).

3.2. Material vegetal utilizado.

3.2.1. Plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Heyn ecotipo Columbia (Col-O) fueron provistas por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA).

3.2.2. Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo.

Las plantas fueron crecidas en una cámara de cultivo bajo condiciones de temperatura, humedad e iluminación controladas. Las mismas simularon un fotoperíodo de “día largo” (16 horas de luz a una temperatura aproximada de 24° C y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 20 - 22° C aproximadamente). La humedad se mantuvo en un rango variable entre 40-70%. Las condiciones de iluminación se lograron con una combinación de lámparas fluorescentes blancas frías y de tipo GroLux (Silvania, Vinhedo, SP, Brasil), con una densidad de flujo de fotones fotosintética de 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.3. Vectores empleados.

3.3.1. Vectores para el clonado de fragmentos de ADN.

pCR 2.1-TOPO: Amp^R, Kan^R, P_{lac}, *lacZ α* , P_{T7}, f1(-) y pMB1 ori (Invitrogen).

pBluescript SK⁻: Amp^R, f1(-) ori, pMB1 ori, P_{lac}, *lacZ α* pBI101.3 (Stratagene Cloning Systems).

pBI 101.3: derivado del vector binario pBIN19, contiene el gen que codifica la enzima β -glucuronidasa de *E. coli* (*gus*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*nos*) clonados tras una secuencia múltiple de clonado idéntica a la del vector pUC19. Dentro de la región de movilización del ADN, necesaria para la transformación de plantas, se encuentra el gen *nptII* (confiere resistencia al antibiótico kanamicina). Incluye además el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano RK2 (Jefferson y col., 1987). Este vector se empleó para la transformación de células competentes de *A. tumefaciens* (punto 3.5.5.2), las que posteriormente se utilizaron para transformar plantas de *A. thaliana* (punto 3.6).

pBI 121: derivado del vector pBI 101.3, contiene un fragmento de 800 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) frente al gen *gus* (Jefferson y col., 1987). Este vector permitió la sobreexpresión de proteínas de interés en *A. thaliana*.

pHIS3-NX: Amp^R, *His3*, pMB1 ori, P_{HIS3} (Meijer y col., 1998). Este vector se utilizó para clonar regiones promotoras de interés frente al gen *his3* (punto 3.9.2.1).

3.3.2. Vectores para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias.

pGEX-3X y pGEX-4T-3: P_{tac}, *gst*, *lacI*^q, pBR322 ori, Amp^R (Amersham Pharmacia Biotech). Se emplearon para la expresión de proteínas recombinantes como proteínas de fusión a glutatión S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*.

pMALc-2: pBR322 ori, P_{tac}, *malE*, T_{rrnB}, Amp^R (New England Biolabs). Se empleó para la expresión de proteínas recombinantes como proteínas de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP).

3.3.3. Plásmidos empleados en estudios de interacción proteína-ADN y proteína-proteína en levaduras.

pGAD-T7: Amp^R, *LEU2*, *GAL4*₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD, P_{ADH1}, T_{T7} & ADH1, P_{T7}, NLS SV40 T-antigen, c-Myc pUC ori y 2 μ ori (Clontech; Louret y col., 1997).

pGBK-T7: Kan^R, *TRP1*, *GAL4*₍₁₋₁₄₇₎ BD, P_{ADH1(700 pb)}, T_{T7} & ADH1, P_{T7}, NLS SV40 T-antigen, c-Myc pUC ori y 2 μ ori (Clontech; Louret y col., 1997).

pINT1: Amp^R, Kan^R, *APT1*, *PDC6*, pUC ori, T_{CYC1} (Meijer y col., 1998).

pLacZi: Amp^R, P_{CYC1}, *lacZ*, *URA3*, ColE1 ori (Clontech; Luo y col., 1996).

pDEST22: Amp^R, *TRP1*, *GAL4*₍₁₇₃₄₋₁₇₅₄₎ AD, P_{ADH1}, *ADH1*, c-Myc pUC ori y 2μ ori (Invitrogen).

3.4. Medios de cultivo y soluciones empleadas.

3.4.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

Medio LB (Luria-Bertani): peptona de carne 10 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l. En los ensayos de expresión de proteínas recombinantes fusionadas a GST (punto 3.7.2.1) se incluyó glucosa 2% (p/v) en el medio de cultivo para evitar la expresión de la proteína de fusión antes de la inducción con IPTG (“goteo” de las proteínas recom-

binantes), evento que puede resultar tóxico/inhibitorio para el crecimiento de las bacterias cultivadas, afectando el rendimiento de la purificación.

Medio TB (“terrific broth”): peptona de carne 12 g/l; extracto de levadura 24 g/l; glicerol 4 ml/l; KH_2PO_4 2,31 g/l; K_2HPO_4 12,54 g/l.

En los medios sólidos se adicionó agar como agente solidificante a una concentración final de 15 g/l.

3.4.2. Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*.

Medio YPAD: peptona de carne 20 g/l; extracto de levadura 10 g/l; glucosa 20 g/l; adenina (sulfato) 0,02g/l.

Medio mínimo: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l; glucosa 20 g/l; K_2HPO_4 1 g/l; MgSO_4 0,5 g/l; NaCl 0,1 g/l; CaCl_2 0,1 g/l; inositol 0,1 g/l; piridoxina-HCl 1mg/l; ácido nicotínico 1 mg/l; tiamina-HCl 10 mg/l. En función de las auxotrofías de las cepas de *S. cerevisiae* empleadas y las transformantes a seleccionar en cada caso, el medio mínimo fue suplementado con las siguientes concentraciones finales de aminoácidos y bases: uracilo 20 mg/l; adenina (sulfato) 40 mg/l; L-histidina 20 mg/l; triptófano 40 mg/l; L-leucina 57 mg/l.

En los medios sólidos se adicionó agar como agente solidificante a una concentración final de 20 g/l.

3.4.3. Medios de cultivos para plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Medio MS (Murashige-Skoog): KNO_3 1,9 g/l; NH_4NO_3 1,65 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,44 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,37 g/l; KH_2PO_4 0,17 g/l; Na_2EDTA 37,3 mg/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27,8 mg/l; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22,3 mg/l; H_3BO_3 6,2 mg/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8,6 mg/l; KCl 0,83 mg/l; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/l. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M.

En los medios sólidos se adicionó agar como agente solidificante a una concentración final de 8 g/l. En los ensayos de crecimiento vertical de raíces se adicionó agar a una concentración final de 12 g/l.

3.5. Métodos de clonado.

3.5.1. Aislamiento y clonado de genes de *Arabidopsis thaliana*.

La región promotora de *COX5b-1* completa fue previamente aislada en nuestro laboratorio. Un fragmento de 2 kpb que comprende la región ubicada corriente arriba del codón de iniciación (ATG) del gen *COX5b-1* fue clonado en los sitios de restricción *HindIII/SalI* del plásmido pBI101.3. Se emplearon los oligonucleótidos COXB12 hacia el extremo proximal del promotor y COXB13 hacia el extremo distal del mismo para incorporar los sitios de restricción necesarios para el clonado. A partir de esta construcción se generaron deleciones sucesivas desde el extremo distal del promotor mediante reacciones de amplificación por PCR con los pares de oligonucleótidos específicos COXB12 y COXB13, COXB14, COXB15 o COXB16 (véase Anexo II). Se obtuvieron fragmentos de 609, 387, 195 y 96 pb respectivamente. Estos fragmentos, al igual que el anterior de 2 kpb, fueron clonados en los sitios *SalI* y *HindIII* del vector pBI 101.3 para generar las construcciones que se utilizaron para transformar las cepas de *A. tumefaciens* según se detalla en el punto 3.5.5.2 (Welchen y col., 2004).

Una vez acotada la zona responsable de la expresión del gen, se realizaron mutaciones puntuales y una deleción completa dentro de la misma, siguiendo la técnica descrita por Silver y colaboradores (1995). La región promotora comprendida entre las posiciones -333 y -259 desde el sitio de inicio de la traducción se delecionó en forma completa y para ello se realizaron dos amplificaciones por PCR utilizando oligonucleótidos que hibridaban a ambos lados de la región a eliminar. Los mismos se nombraron 5b1Del-F y 5b1Del-R (véase Anexo II) y fueron usados en reacciones de PCR con los oligonucleótidos COXB12 y COXB14, respectivamente, de manera de amplificar las regiones del promotor flanqueantes a la región a deleccionar. Los productos fueron purificados y mezclados en un tubo de reacción conteniendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, y 0,1 mM DTT. Esta mezcla de reacción se incubó a 95° C durante 5 min y luego se hizo descender lentamente la temperatura hasta los 24° C de modo de favorecer la hibridación entre las regiones complementarias de los dos productos de PCR generados en el paso anterior. Seguidamente, se adicionó al tubo de reacción 0,5 mM de cada dNTP y 5 unidades de la enzima Klenow ADN polimerasa I (Promega), y se realizó una incubación durante 1 h a 37° C para extender los fragmentos hibridados. Una alícuota de esta reacción fue utilizada directamente para amplificar el fragmento quimérico empleando los oligonucleótidos COXB12 y COXB14.

Siguiendo una estrategia similar se realizaron mutaciones puntuales sucesivas entre las posiciones -339 y -259 de la región promotora y en elementos regulatorios especí-

ficos dentro de otras regiones del promotor. Las secuencias de los distintos oligonucleótidos utilizados y los sitios de restricción que permiten los clonados se describen en el Anexo II y las diferentes construcciones se comentan en Resultados y Discusión.

La región promotora del gen *COX5b-2* (At1g80230) se clonó en los sitios *Bam*HI y *Hind*III del vector pBI 101.3 (Jefferson y col., 1987). Una preparación de ADN genómico de *Arabidopsis* (punto 3.5.7.3) se utilizó como molde de una reacción de PCR usando los oligonucleótidos COXB23 y COXB24 (ver Anexo II), los cuales incorporaron los sitios de restricción necesarios para el clonado. Esto permitió el aislamiento de un fragmento de 1003 pb ubicado corriente arriba del codón de inicio de la traducción. A partir de este fragmento se realizaron delecciones sucesivas del extremo distal de promotor utilizando los oligonucleótidos COXB23 hacia el extremo proximal y COX5b-670, COX5b-630, COX5b-420, COX5b-220, COX5b-140, COX5b-100 y COX5b-60 hacia el extremo distal de la región promotora (véase Anexo II). Los fragmentos resultantes contenían los sitios *Bam*HI y *Hind*III y se clonaron en los mismos sitios del vector pBI 101.3.

Además, siguiendo una estrategia similar a la empleada para el promotor de *COX5b-1*, se realizaron mutaciones puntuales en los elementos reguladores G-box (identificado en la posición -636 desde el ATG inicial), site II (dos copias, en las posiciones -172 y -146) e INR (cuatro copias en la región comprendida entre los nucleótidos -112 y -82). Se utilizaron los oligonucleótidos 5b2mutGbox F, 5b2mutGbox R, 5b2IImut F, 5b2IImut R, 5b2IIkell F, 5b2IIkell R, 5b2MutInr F y 5b2MutInr R (véase Anexo II).

3.5.2. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR.

En las reacciones de amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se usaron volúmenes de reacción de 50 μ l. Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se agregó MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM c/u, 500 ng de cada oligonucleótido específico, el ADN molde y 1,5 U de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega). Finalmente se añadió una gota de aceite mineral (Promega) y se procedió a la reacción de amplificación en el termociclador PT-100™ (MJ Research, Inc.) utilizando los programas apropiados para cada caso. La temperatura de hibridación se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C) - 5^\circ \text{C}$]. Los productos de las reacciones de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (punto 3.5.9.2)

3.5.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones de reacción recomendadas por los proveedores de cada enzima en particular. En todos los casos fueron utilizadas entre 1 y 5 U de enzima por cada μg de ADN a digerir en un volumen final que varió entre 20 y 50 μl , dependiendo de la cantidad de ADN. Cuando fue necesario, se adicionó a la reacción de corte la enzima ARNasa A (Promega) en una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.5.4. 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 y 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 de 5 a 1 respectivamente. La incubación se realizó durante toda la noche a 4° C.

3.5.5. Transformación de bacterias y levaduras.

3.5.5.1. Transformación de *E. coli* con ADN plasmídico por electroporación.

La preparación de células competentes se realizó según se indica a continuación. Las células bacterianas se cultivaron 12 h en medio LB en ausencia de antibióticos a 37° C con agitación (180 rpm). Con este cultivo saturado se realizó un repique 1/100 en medio LB fresco y se dejó crecer durante 2-3 h, hasta una $\text{DO}_{600} = 0,5$ aproximadamente. Se cosecharon las células por centrifugación a 2500 x g durante 20 min a 4° C y el sedimento se lavó con agua destilada helada. Se realizaron tres lavados y el sedimento se dejó reposar 15 min en hielo entre cada lavado. El sedimento final fue resuspendido en 2 ml de glicerol 10% y se fraccionaron alícuotas de 50 μl .

Las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene Pulser™*, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm de separación entre los electrodos (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y se incubó 1 h a 37° C. Después de centrifugar a 4000 x g durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 μl de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado. Luego de crecidas las colonias, se realizó minipreparación de ADN plasmídico (punto 3.5.7.1) y los plásmidos ob-

tenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos a -80° C en glicerol 50%.

3.5.5.2. Transformación de *A. tumefaciens* con ADN plasmídico por electroporación.

La preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* se realizó según el método descrito por Höfgen y Willmitzer (1988). Las células bacterianas se cultivaron 12 h en 20 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 mg/l y estreptomina 100 mg/l a 28° C con agitación (200 rpm). Con este cultivo saturado se inocularon 400 ml de medio LB fresco suplementado con los mismos antibióticos y se dejó crecer durante 4-5 h. Se cosecharon las células por centrifugación a 3000 x g durante 20 min a 4° C y el sedimento se lavó con solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0) dos veces y luego solución HG [(Hepes 1 mM pH 7,0; glicerol 10% (v/v)] otras dos veces. El sedimento final se resuspendió en 2 ml de solución HG y se fraccionaron alícuotas de 50 µl.

Las condiciones de electroporación empleadas en la transformación fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene Pulser™*, Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,25 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 3 h a 28° C con agitación. Después de centrifugar a 4000 x g durante 5 minutos, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri que contenían medio LB-agar suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas fueron incubadas a 28° C hasta la aparición de colonias (48 - 72 h). Luego, se realizó mini-preparación de ADN plasmídico (punto 3.5.7.1) y los plásmidos obtenidos se analizaron por PCR (punto 3.5.2). Los clones positivos se guardaron en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados, a -80° C en glicerol 50%.

3.5.5.3. Transformación de *S. cerevisiae* en presencia de acetato de litio.

La transformación de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó según el método descrito por Gietz y col. (1992) con algunas modificaciones tomadas de Ausubel y col. (1987). Las levaduras se cultivaron en 20 ml de medio líquido YPAD durante toda la noche a 30° C con agitación (200 rpm). Luego se diluyó el cultivo en 300 ml de medio fresco y se dejó crecer en las mismas condiciones hasta $DO_{600} = 0,25-0,5$ (aproximadamente 3 h). Las células se cosecharon por centrifugación a 2500 x g durante 2 min a 20° C y el precipitado celular se lavó con 50 ml de agua estéril. Luego de centrifugar las células

nuevamente se las resuspendió en 1 ml de una solución de TE 1X/LiAc (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0; LiAc 100 mM pH 7,5), preparada a partir de soluciones madres 10X. A continuación se realizó una centrifugación a 12000 rpm durante 30 segundos y el precipitado se resuspendió en 250 µl de solución TE 1X/LiAc. Se emplearon 50 µl de células competentes para cada transformación y se incubaron con 10 µl de ADN y 300 µl de solución PEG 40%/TE 1X/LiAc durante 30 min a 30° C con agitación. Posteriormente las células se sometieron a 42° C durante 15 min e inmediatamente se las centrifugó a 12000 x g durante 30 segundos. El sedimento celular se lavó con 200 µl de solución TE 1X y se resuspendió en 100 µl de TE 1X para ser sembrado en placas de Petri que contenían el medio de cultivo adecuado según el/los vector/es empleado/s.

En aquellos casos en los cuales se transformaron levaduras con construcciones que debían integrarse en el genoma se utilizó el procedimiento descrito por Meijer y col. (1998). Luego del tratamiento a 42° C las células se resuspendieron en 1 ml de medio YPAD y se transfirieron a tubos de 15 ml estériles para ser incubadas 3-6 h a 30° C con agitación. Luego de este paso de recuperación, se centrifugó a 12000 x g durante 30 segundos. Las células se resuspendieron en 100 µl de TE 1X y se sembraron en placas de Petri que contenían el medio de cultivo correspondiente. Luego de crecidas las colonias, se realizó minipreparación de ADN plasmídico (punto 3.5.7.2) y los plásmidos obtenidos se analizaron por PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido a -80° C en glicerol 33%.

3.5.6. Análisis de transformantes por hibridización en colonias.

Las colonias obtenidas en los experimentos de transformación de *E. coli* (punto 3.5.5) fueron repicadas por duplicado en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado. Se utilizó sobre la base de la placa una grilla numerada para facilitar la identificación de cada colonia. Luego del período de incubación a 37° C, una de las placas fue conservada en la heladera y sobre la otra se colocó una membrana de nylon convenientemente rotulada para identificar la posición de las colonias.

La membrana se dejó secar y luego se la colocó sobre papeles de filtro saturados con solución de desnaturalización (NaOH 0,2 N; NaCl 1,5 M), de neutralización (Tris-HCl 0,4 M pH 7,6) y finalmente con SSC 2X [SSC 1X: NaCl 0,15 M; citrato de sodio 0,015 M] durante 1 min en cada una de las soluciones. Una vez seca la membrana, el ADN plasmídico fue fijado por exposición a luz UV (310 nm) durante 5 min y la membrana fue hibridizada con la sonda adecuada como se detalla en el punto 3.5.9.7.

Las bacterias de las colonias que arrojaron un resultado positivo por hibridización se cultivaron en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados, se preparó ADN plasmídico y se analizaron por digestión con enzimas de restricción. Los clones bacterianos confirmados como positivos se cultivaron en medio LB líquido en presencia del antibiótico y se guardaron a -80°C con glicerol 50%.

3.5.7. Preparación de ácidos nucleicos.

3.5.7.1. Minipreparación de ADN plasmídico.

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas se realizaron según el protocolo de Birnboim y Dolly (1979).

Un cultivo saturado de células cultivadas 12 h en 1,5 ml de medio LB suplementado con antibióticos adecuados se centrifugó a $5000 \times g$ durante 5 min. El sedimento celular se resuspendió en 100 μl de solución de miniprep I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glucosa 50 mM y EDTA 10 mM). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 200 μl de solución de miniprep II [NaOH 0,2 N y SDS 0,1% (p/v)]. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Se agregaron 150 μl de acetato de potasio 5 M pH 5,2 y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 500 μl de una mezcla 1:1 de fenol (saturado en Tris-HCl pH 8,0) y cloroformo a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó durante 10 min a $8000 \times g$ a temperatura ambiente y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 2 h a -80°C con 2 volúmenes de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M pH 5,2. El ADN plasmídico se recuperó por centrifugación a $12000 \times g$ durante 20 min a 4°C y se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar sales. Se centrifugó en las mismas condiciones, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 μl de agua destilada estéril.

Cuando se necesitó preparar ADN plasmídico de alta calidad se utilizó el kit comercial *Wizard[®] Plus Minipreps DNA Purification System* de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.5.7.2. Minipreparación de ADN de *S. cerevisiae*.

La preparación de ADN plasmídico de levadura se realizó en base a los métodos descritos por Hoffman y Winston (1987) y Kaiser y Auer (1993).

Se inocularon 3 ml de medio de cultivo selectivo con una colonia de levadura y se incubó a 30° C con agitación (200 rpm) durante 16 horas. Luego de centrifugar 30 s a 12000 x g, las células se resuspendieron en 200 µl de solución de lisis [Tritón X-100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM]. Se agregaron 200 µl de una mezcla 1:1 de fenol saturado en Tris-HCl pH 8,0 y cloroformo y 100 mg de esferas de vidrio (212-300 µm de diámetro) estériles. A continuación, se agitó en vortex durante 2 min y se centrifugó a 12000 x g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para precipitar el ADN por agregado de 1 ml de etanol absoluto. Se centrifugó a 12000 x g durante 20 min a 4° C, se lavó el precipitado con etanol 70% y se lo resuspendió en 20 µl de una solución de ARNasa 50 µg/ml.

El ADN plasmídico aislado por este procedimiento es escaso y está contaminado con ADN genómico. En consecuencia no es adecuado para ensayos de restricción o determinación de secuencia, pero puede ser utilizado en reacciones de PCR.

3.5.7.3. Minipreparación de ADN de *A. thaliana*.

Se empleó la técnica de Li y Chory (1998). Una ó 2 hojas de la planta se disgregaron con un pilón plástico en tubo Eppendorf a temperatura ambiente durante 15 segundos. Se agregaron 700 µl de solución amortiguadora de extracción [Tris-HCl 200 mM pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5% (p/v)] y se mezcló en vortex durante 5 segundos. Se centrifugó durante 10 min a 15000 x g y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 600 µl de isopropanol frío y se centrifugó a 15000 x g durante 10 min. El precipitado de ADN se secó y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

3.5.7.4. Extracción y purificación de ARN de *A. thaliana*.

El ARN se preparó utilizando el reactivo Trizol [fenol ácido 38% (p/v); tiocianato de guanidina 0,8 M; tiocianato de amonio 0,4 M; acetato de sodio 0,1 M pH 5,0; glicerol 5% (v/v)]. Se procesaron 100 mg de muestra en mortero con N₂ líquido hasta polvo fino, el cual se transfirió a un tubo Eppendorf. Se agregó 1 ml de reactivo Trizol, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Luego de transcurrido este tiempo, las muestras se colocaron en hielo. Se agregaron 0,2 ml de cloroformo (1/5 vol respecto de reactivo Trizol), se mezcló vigorosamente en forma manual durante 15 s y se centrifugó a 12000 x g durante 15 min a 4° C. Se recuperó la fase acuosa (aproximadamente 0,75 ml) y se repitió el paso anterior con 0,75 ml de mezcla fenol/cloroformo [1:1 (v/v)]. A la fase acuosa final se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto (o un vo-

lumen de isopropanol) frío y se incubó durante 30 min a -80° C. Se recuperó el ARN por centrifugación a $12000 \times g$ durante 15 min a 4° C, se lavó el precipitado con etanol 70% (v/v), se secó y se resuspendió en $100 \mu\text{l}$ de agua destilada estéril.

3.5.8. Cuantificación de ácidos nucleicos.

La cantidad de ADN o ARN purificado se analizó por lectura espectrofotométrica a 260 nm considerando que $DO_{260} = 1$ equivale a $50 \mu\text{g/ml}$ de ADN o $40 \mu\text{g/ml}$ de ARN.

La calidad de las muestras se evaluó por corrida en geles de agarosa 1,5% en condiciones desnaturalizantes y tinción con bromuro de etidio $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ para las muestras de ARN o por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% (p/v) en presencia de bromuro de etidio $0,3 \mu\text{g/ml}$ para las muestras de ADN.

3.5.9. Análisis de ácidos nucleicos.

3.5.9.1. Determinación de la secuencia de los fragmentos de ADN clonados.

La secuencia de los fragmentos de ADN clonados se determinó empleando el servicio comercial provisto por Macrogen Inc. (Korea). Las muestras y los oligonucleótidos específicos se prepararon según las especificaciones requeridas por la empresa.

3.5.9.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Se utilizó la técnica de electroforesis de tipo submarino de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2% (p/v) de acuerdo con el tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en solución TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,0). El ADN se sembró con 1/10 vol de solución de siembra [Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v)] y se visualizó por tinción con bromuro de etidio $0,3 \mu\text{g/ml}$. Las corridas electroforéticas se realizaron en solución TAE a una intensidad de corriente constante de 70 mA y se utilizó ADN del bacteriófago λ (Promega) digerido con la enzima de restricción *HindIII* (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb) como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

3.5.9.3. Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes.

Los geles en condiciones desnaturalizantes se prepararon con agarosa 1,5% (p/v) en solución amortiguadora HEPES 200 mM pH 7,8 y formaldehído 6% (p/v) según Ausubel y col. (1987). La electroforesis se realizó en solución de HEPES 200 mM pH 7,8 en forma submarina y a intensidad de corriente constante de 40 mA. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

Se sembraron 20 μ g de ARN por calle. Las muestras a sembrar fueron previamente desnaturalizadas mezclando el ARN con 3 vol de solución de desnaturalización [formamida 66% (v/v); HEPES 250 mM; formaldehído 8% (v/v)] e incubando esta mezcla a 65° C durante 5 min. A cada muestra se le agregó 1/10 vol de solución de siembra [Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v)] y 2,5 μ g de bromuro de etidio.

3.5.9.4. Electroforesis de ADN en geles de poliacrilamida.

La electroforesis de fragmentos pequeños de ADN fue llevada a cabo en geles de poliacrilamida. En este caso se utilizó una relación 38:2 (p/p) de acrilamida:bis-acrilamida. El gel se preparó en solución TBE (Tris-HCl 89 mM pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) con una concentración de acrilamida final de 10% (p/v). El ADN se sembró con 1/10 vol de solución de siembra [Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); Ficoll 30% (v/v)] y se visualizó por tinción con bromuro de etidio 0,3 μ g/ml. Las corridas electroforéticas se realizaron en solución TBE a una intensidad de corriente constante de 10 V/cm de gel y se utilizó *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen) como marcador de tamaño de los fragmentos de ADN. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

3.5.9.5. Técnica de *southern blot*.

El análisis de hibridación por Southern blot se realizó según Ausubel y col. (1987). El ADN se separó en geles de agarosa de concentración adecuada (punto 3.5.9.2) y, luego de la corrida electroforética, los geles se expusieron a una solución de HCl 0,25 M durante 10 min. Luego de dos lavados con H₂O, se colocaron en una solución de NaOH 0,4 N durante 10 min y, transcurrido ese tiempo, se realizaron varios lavados más con H₂O. Los fragmentos de ADN fueron transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences) mediante una solución de SSC 10X (NaCl 1,5 M; citrato de sodio 0,15 M). Las membranas fueron secadas y fijadas por expo-

sición a radiación ultravioleta ($\lambda=310$ nm) durante 5 min. Luego fueron hibridizadas con las sondas apropiadas, lavadas y expuestas a películas Kodak X-AR (punto 3.5.9.7).

3.5.9.6. Técnica de *northern blot*.

Los geles de separación de ARN por electroforesis descritos en el punto 3.5.9.2 se transfirieron por capilaridad en medio SSC 6X (1X: NaCl 0,15 M; citrato de sodio 0,015 M) a membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). Las membranas fueron secadas y fijadas por exposición a radiación ultravioleta ($\lambda=310$ nm) durante 3-5 min. Luego fueron hibridizadas con las sondas apropiadas, lavadas y expuestas a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS (punto 3.5.9.7). Para analizar los niveles de ARN transferido, los filtros fueron hibridizados con una sonda de ARNr 25S de *Vicia faba* en condiciones similares a las descritas en el punto 3.5.9.7, pero a 68° C.

3.5.9.7. Transcripción reversa.

Se utilizó como molde ARN total de *A. thaliana*. En un primer paso se agregó 0,1 μ M del oligonucleótido dT_v (véase Anexo II) junto con 1 μ g de ARN total y se incubó a 65° C durante 5 min a fin de desarmar las estructuras secundarias del ARN. Inmediatamente después, la mezcla se colocó en hielo y se agregaron dNTPs (5 mM de c/u), solución amortiguadora de la enzima y 200 U de Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega) hasta un volumen final de 30 μ l. La reacción se dejó transcurrir durante 1,5 h a 42° C y luego se inactivó la enzima durante 5 min a 80° C más 30 s a 94° C. Una alícuota del ADNc obtenido fue utilizada como molde para una reacción de PCR (punto 3.5.2) con oligonucleótidos específicos. Los niveles de ARN total utilizados en cada muestra se compararon realizando en paralelo una amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de genes de actinas [Actina2 y Actina8 (Charrier y col., 2002)] denominados Actin-F y Actin-R (véase Anexo II).

A fin de obtener una medida cuantitativa de los niveles de ARN de interés, se utilizó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real. La misma fue llevada a cabo en un termociclador PTC-200TM (MJ Research, Inc.) acoplado a un detector de fluorescencia Chromo 4 (MJ Research, Inc.). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μ l conteniendo 5 μ l de SYBR Green, dNTPs 25 μ M, 20 pmoles/ μ l de cada oligonucleótido específico, MgCl₂ 3 mM, 10 μ l de una dilución del producto de la transcripción reversa previamente descrita y 0,25 U de la enzima *Taq* Platinum ADN polimerasa (Invitrogen).

3.5.9.8. Hibridización de membranas de nylon.

Las membranas de nylon a las cuales se fijaron los fragmentos de ADN o ARN (puntos 3.5.9.4 y 3.5.9.5 respectivamente) fueron prehibridizadas a 65° C en horno de hibridización durante 2 h en solución SSC 5X (1X: NaCl 0,15 M; citrato de sodio 0,015 M) suplementada con solución de Denhardt 5X [10X: polivinilpirrolidona 0,2% (p/v); BSA 0,2% (p/v); Ficoll 0,2% (p/v)] y SDS 0,2% (p/v). La hibridización se realizó durante 16 h en las mismas condiciones pero con el agregado de la sonda marcada correspondiente. Luego de la hibridización, los filtros a los que se habían transferido los ARN se lavaron 3 veces a 65° C durante 15 min con SSC 2X. Las membranas que contenían fragmentos de ADN se lavaron dos veces con SDS 0,1% (p/v) en solución SSC 2X, dos veces con SDS 0,1% (p/v) en SSC 1X, dos veces con SDS 0,1% en SSC 0,5X y una vez con SSC 0,5X. Todos los lavados se realizaron a 65° C y, luego de los mismos, los filtros se secaron y expusieron a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS según cada caso.

3.5.10. Marcación de sondas de ADN.

3.5.10.1. Purificación de fragmentos de ADN.

El fragmento de ADN específico a utilizar como sonda se purificó a partir de geles de agarosa, empleándose el equipo comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

3.5.10.2. Marcado radioactivo de los fragmentos de ADN doble hebra.

Se utilizó el método de cebado al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983). La desnaturalización del ADN doble hebra se realizó incubando aproximadamente 100 ng de ADN en un volumen final de 35 µl de agua a 100 ° C durante 3-5 min. Luego de transferir la mezcla inmediatamente a hielo, se agregaron 10 µl de solución OLB [Tris-HCl 0,25 M pH 8,0; MgCl₂ 50 mM; HEPES 1 M pH 6,6; dCTP 1mM; dGTP 1 mM; dTTP 1mM; β-mercaptoetanol 65 mM; 350 ng de hexanucleótidos de secuencia al azar (dN₆)], 2 µl de BSA 10 mg/ml; 2 µl de [α-³²P]dATP (10 µCi/µl, NEN) y 2-3 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega, Madison, WI, USA). La mezcla de reacción se incubó 1 h a 37° C, se diluyó en 200 µl finales de agua y se filtró a través de una columna de Sephadex G-50 según el método descrito por Ausubel y col. (1987) para eliminar el exceso de [α-³²P]dATP no incorporado. La sonda purificada (actividad específica de aproximadamente 10⁸ cpm/µg) se desnaturalizó a 100° C durante 3 min y se diluyó en una cantidad adecuada de solución de hibridización.

3.6. Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

3.6.1. Método de inmersión floral.

La transformación de plantas de *Arabidopsis* se realizó mediante el método de inmersión floral (“floral dip”) utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998). Se prepararon 8 macetas con tierra para cada una de las construcciones a introducir en plantas. Se sembraron alrededor de 20 semillas por pote, lo que permitió luego poder seleccionar las que mostraban un aspecto más saludable y reducir el número a 10 plantas por maceta. Las plantas se cultivaron en cámara de cultivo (punto 3.2.2) hasta la floración (aproximadamente 4 semanas). A partir de este momento, se cortaron las inflorescencias cada 3 días para aumentar el número de flores por planta a ser sometida al evento de transformación

La suspensión de transformación se preparó cultivando células de *A. tumefaciens* previamente transformadas (punto 3.5.5.2). Un inóculo en 30 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml y estreptomycin 100 µg/ml (en el caso de la cepa GV2260 se omitió el agregado de este antibiótico) se creció hasta saturación durante 24 h a 28° C y agitación de 180 rpm. Con este cultivo se inocularon erlenmeyers con 500 ml de medio LB suplementado de la misma manera que en el paso anterior, dejándose crecer los cultivos hasta llegar a la fase estacionaria (12-16 h, a 28° C, con agitación). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5000 x g durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron en 1 l de solución de infiltración [sacarosa 5% (p/v)] suplementada con 300 µl de detergente *Silwet L-77* (OSI Specialties, Inc.) al momento de hacer la transformación. Esta suspensión de *Agrobacterium* se colocó en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético de manera de lograr una agitación suave. Las plantas fueron sumergidas durante 60 s tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. Luego, los potes se ubicaron en forma horizontal en una bandeja, se taparon con nylon para conservar un ambiente húmedo y se llevaron a cámara de cultivo. A las 24-48 h se colocaron en posición vertical y se les agregó abundante agua permitiendo que las plantas se desarrollaran hasta la formación y maduración de semillas (4-5 semanas aproximadamente para las condiciones en la cámara de cultivo).

Finalmente, se recolectaron las semillas, se limpiaron de los restos de vainas y tierra y se guardaron a 4° C hasta su posterior análisis.

3.6.2. Selección de las plantas de Arabidopsis transformadas.

Una vez que las semillas estuvieron maduras, se cosecharon (o recuperaron) para proceder a la identificación de las transformantes. Una vez separadas de restos de material vegetal y tierra, se procedió al lavado con etanol 70% (v/v) durante 1 min a temperatura ambiente. Luego se desinfectaron con una solución de SDS 1% (p/v) en lavandina 5% (v/v) durante 15 min y se lavaron 7-10 veces con agua destilada estéril. Finalmente, se resuspendieron en agar 0,1% (p/v) y se sembraron en placas de Petri de 150 mm de diámetro con medio MS-agar (punto 3.4.3) suplementado con kanamicina 40 µg/ml como agente selectivo. Las placas se guardaron en heladera durante tres días y luego se pasaron a cámara de cultivo, manteniéndose de esta forma durante 12-15 días. En ese período sólo las plantas transformadas generaron hojas verdaderas muy verdes y raíces suficientemente largas. Las plantas se dejaron crecer hasta la aparición de hojas y se transplantaron a potes con tierra. Al alcanzar las rosetas un tamaño de 2 cm de diámetro, se recolectaron hojas para el análisis por PCR de las transformantes (punto 3.5.2). Las semillas maduras se recolectaron, rotularon y guardaron a 4° C.

3.6.3. Análisis de plantas de Arabidopsis transformadas.

Se procedió al análisis de la presencia del transgén por PCR (punto 3.5.2) para confirmar que las plantas resistentes al antibiótico usado para la selección de transformantes (punto 3.6.2) contengan la inserción de T-DNA y no correspondan a falsos positivos o “escapes”. Se realizó una minipreparación de ADN genómico a partir de una o dos hojas de cada planta (punto 3.5.7.3) y el ADN obtenido fue utilizado como molde en una reacción de PCR. Se utilizó el oligonucleótido GUSNH₂ (véase Anexo II) y un oligonucleótido específico, según la secuencia del fragmento analizado, para verificar la presencia de los transgenes en las plantas. Aquellas plantas que dieron resultado positivo en la reacción de PCR se dejaron crecer hasta maduración de las vainas, se colectaron las semillas y éstas se sembraron en tierra. Las semillas de estas plantas (T2) y de la generación siguiente (T3), se utilizaron para los estudios realizados.

3.6.4. Análisis de la expresión del gen reportero en plantas transformadas.

3.6.4.1. Análisis histoquímico de la actividad β-glucuronidasa.

El análisis de la actividad β-glucuronidasa en forma histoquímica en plantas transformadas se realizó en plántulas de 1 a 15 días crecidas en placas de Petri con medio MS-agar y en órganos (hojas, tallos, flores, vainas y raíces) de plantas adultas crecidas

en macetas con tierra según se describe anteriormente. En todos los ensayos se utilizaron como controles plantas transformadas con los plásmidos pBI101.3 y pBI121 (Jefferson y col., 1987).

Las plántulas/órganos seleccionados se lavaron con solución fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 durante 15 min para eliminar restos de tierra o medio de cultivo y luego se transfirieron a una solución de fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 suplementada con Tritón X-100 0,1% (v/v) y X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronido) 2 mM. A continuación, fueron sometidos a vacío durante 5 min y se incubaron a 37° C en oscuridad durante 12 h (Jefferson, y col., 1987). Luego de la incubación, se fijaron en solución de fijación [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% (v/v) para decolorar los tejidos y se guardaron en etanol 70% (v/v) a 4° C hasta ser fotografiados. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara COOLPIX995 digital de Nikon sobre microscopio óptico y se procesaron con el software Adobe Photoshop C52.

3.6.4.2. Análisis fluorométrico de la actividad β -glucuronidasa.

Los ensayos fluorométricos se realizaron en plántulas de 7-15 días crecidas en placas de Petri con medio MS-agar y en órganos (hojas, tallos, flores, vainas y raíces) de plantas adultas crecidas en macetas con tierra. En todos los ensayos se utilizaron como controles plantas transformadas con el plásmido pBI101.3 (Jefferson y col., 1987).

Se cultivaron entre 30 y 50 semillas de las líneas de plantas transformadas en placas de Petri con medio MS-agar. Las placas se dejaron 48 h a 4° C y posteriormente se mantuvieron en cámara de cultivo durante 15 días. Las plántulas/órganos de doce líneas independientes se procesaron con mortero hasta obtener un polvo fino, se agregaron luego 500 μ l de solución amortiguadora de extracción [fosfato de sodio 50 mM pH 7,0; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,1% (p/v); β -mercaptoetanol 10 mM; Tritón X-100 1% (v/v)]. La mezcla se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13000 x g durante 10 min a 4° C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se mantuvo en baño de hielo.

La reacción fluorométrica se realizó según el método de Jefferson y col. (1987). Se agregaron 10 μ l de extracto proteico a 190 μ l de una solución de reacción [solución amortiguadora de extracción suplementada con el sustrato MUG [(4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido) 1 mM y metanol 40% (v/v)] y se incubó a 37° C en baño de agua durante 15 min. La reacción enzimática se detuvo agregando 800 μ l de Na₂CO₃ 0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en

pmoles de MU (4-metilumbeliferona).min⁻¹.(mg de proteínas totales)⁻¹

de acuerdo a una curva patrón de RFU (unidades de fluorescencia relativa) vs. concentración de producto 4-MU. A fin de eliminar la actividad enzimática endógena, a cada lectura se le restó el valor correspondiente al extracto proteico proveniente de plantas no transformadas. Las medidas fluorométricas se realizaron en un equipo *VersaFluor™ Fluorometer System* de Bio-Rad (filtros EM 460/10 y EX 360/40) en cubetas de 1 ml.

3.6.5. Tratamiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* con distintos compuestos.

Se realizaron tratamientos con diferentes compuestos en plantas salvajes y en plantas transformadas. Los agentes ensayados y las concentraciones finales de los mismos en los tratamientos realizados se indican en la Tabla 3.

<i>Agente</i>	<i>Concentración final</i>
Sacarosa	3% (p/v)
Glucosa	3% (p/v)
Fructosa	3% (p/v)
Manitol (azúcar no metabolizable)	3% (p/v)
6-bencilaminopurina (citoquinina)	0,1 mM
Ácido abscísico	0,1 mM
Ácido amino-ciclopropano carboxílico (precursor de etileno)	0,1 mM
Ácido giberélico (giberelina)	0,1 mM
Ácido indolacético (auxina)	0,1 mM
Ácido jasmónico	0,1 mM
fosfato de potasio	10 mM
peróxido de hidrógeno	10 μM
Ácido salicílico	0,1 mM
cloruro de sodio	100 mM

Tabla 3: Listado de compuestos ensayados. Se indica la concentración final de los mismos en el medio de cultivo empleado.

Las plantas salvajes empleadas en los distintos tratamientos se mantuvieron durante tres semanas en cámara de cultivo y posteriormente se transfirieron a oscuridad durante 48 h. Luego del período de adaptación a oscuridad, se sometieron a los distintos tratamientos poniendo en contacto las raíces de las plantas con medio MS (punto 3.4.3) líquido suplementado con los distintos agentes químicos a ensayar durante 2 h. El efecto de la luz sobre la expresión de los genes en estudio se evaluó realizando los mismos tratamientos pero en condiciones de iluminación. En el caso del tratamiento con luz UV-B (280-320 nm), las plantas se irradiaron durante 60 min. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80° C hasta su posterior procesamiento y extracción de ARN total (punto 3.5.7.4). Finalmente, se evaluó la cantidad relativa de transcripto de los genes en estudio (*cox5b-1* y *cox5b-2*) por transcripción reversa y posterior PCR cuantitativa en tiempo real (punto 3.5.9.6).

Las plantas transformadas con las diferentes construcciones de los promotores estudiados fueron sembradas en medio MS-agar (punto 3.4.3) suplementado con el antibiótico kanamicina 50 µg/ml. Las placas se mantuvieron durante tres semanas en cámara de cultivo. Luego de transcurrido este tiempo, se humectó el medio de cultivo con agua destilada estéril y se extrajeron cuidadosamente las plantas de modo de no dañar las raíces. Se procedió de idéntica manera a lo comentado anteriormente para plantas salvajes y finalmente se realizó el análisis por medida de la expresión del gen reportero mediante técnicas fluorométricas (punto 3.6.4.2).

En todos los tratamientos se utilizaron plantas en contacto con medio MS líquido como control de niveles basales de transcriptos o de actividad β-glucuronidasa.

3.6.6. Transformación transiente de plántulas *A. thaliana*.

La transformación transiente de plántulas de *Arabidopsis* se logró mediante agroinfiltración, según el protocolo descrito por Li y col. (2009). Se utilizó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y plántulas de *Arabidopsis* de 5 a 7 días post-germinación. Los cultivos de bacterias se crecieron en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes y a 28° C hasta llegar a fase estacionaria de crecimiento. Luego se sedimentaron por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos a TA, se resuspendieron en solución MgCl₂ 10 mM suplementada con acetosiringona 150 mg/ml y se dejaron en reposo durante 3 h a TA. Transcurrido este tiempo, las plántulas se infiltraron sumergiendo las raíces en la solución de *Agrobacterium* y se dejaron durante 36 h en la cámara de cultivo y en oscuridad total. Finalmente, las plantas se lavaron con abundante agua destilada y

se midió la actividad GUS específica utilizando el sustrato MUG, según el procedimiento descrito en el punto 3.6.4.2.

3.7. Proteínas.

3.7.1. Cuantificación de proteínas totales.

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método descrito por Sedmak y Grossberg (1977). Las determinaciones se realizaron con 2 μ l de extracto proteico en 500 μ l de agua destilada y 500 μ l del reactivo de Bradford [Azul brillante de Coomassie G-250 1 % (p/v); etanol absoluto 5% (v/v); ácido fosfórico 10% (v/v)]. La absorbancia se determinó en espectrofotómetro a 595 nm.

3.7.2. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

3.7.2.1. Proteínas recombinantes fusionadas a glutatión S-transferasa.

Los plásmidos pGEX-3X y pGEX-4T (Amersham Pharmacia Biotech) se utilizaron para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* como productos de fusión con la proteína glutatión S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*. Esta fusión favorece la solubilidad de las proteínas recombinantes y permite purificarlas por cromatografía de afinidad empleando columnas de glutatión-agarosa.

Se empleó una estrategia de PCR con cebadores específicos que incorporaron los sitios de restricción necesarios para lograr la introducción de los insertos en fase en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI de los vectores pGEX-3X o pGEX-4T. Se llevaron a cabo reacciones de amplificación con la enzima *Taq* Polimerasa (Invitrogen) para cada construcción y se emplearon los oligonucleótidos cuya secuencia se detalla en el Anexo II. En todos los casos, la presencia del inserto esperado se comprobó mediante análisis de los productos de digestión con las enzimas indicadas (punto 3.5.3) y, posteriormente, por determinación de la secuencia de ADN (punto 3.5.9.1).

3.7.2.2. Proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa.

El plásmido pMal-c2 (New England Biolabs) se utilizó para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* como productos de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli*, lo cual favorece la solubilidad de las proteínas recombinantes y permite purificarlas por cromatografía de afinidad empleando columnas de amilosa-agarosa. Además, el vector posee el sitio múltiple de clonado entre los genes *malE* y *lacZ α* , por lo

que la inserción de la secuencia de interés interrumpe la fusión *malE-lacZ α* y permite seleccionar los plásmidos que han recibido el inserto por pérdida de α -complementación.

El fragmento de ADN codificante para la proteína AP2 (producto del gen At3g23220, véase Resultados y Discusión) se clonó en el vector pMal-c2 empleando una estrategia de PCR (punto 3.5.2). Se utilizaron los oligonucleótidos 3g23220-F y 3g23220-R (véase Anexo II), los cuales incorporaron los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI necesarios para el adecuado clonado en el vector de expresión. Las colonias transformantes de *E. coli* se eligieron por diferenciación entre colonias blancas y azules (α -complementación de la actividad β -galactosidasa de la cepa de origen). La presencia del inserto se comprobó mediante análisis de los productos de digestión con enzimas de restricción y posterior determinación de la secuencia del ADN clonado (punto 3.5.9.1).

3.7.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*.

3.7.3.1. Purificación de las proteínas de fusión con GST.

La expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a GST se llevó a cabo teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante del sistema pGEX (Amersham Pharmacia Biotech). Un cultivo saturado de células que contenían el clon de interés se repicó en una proporción de 1/100 en un volumen final de 100 ml de LB con ampicilina 100 μ g/ml y se dejó crecer 2-3 h a 37° C con agitación continua en un agitador orbital a 180 rpm. Una vez que se alcanzó una DO₆₀₀ de 0,8 aproximadamente, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. El cultivo se incubó durante tres horas a 28 ó 37° C con agitación. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación a 5000 x g y se lavaron con solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM pH 8,0). Después de centrifugar en las mismas condiciones anteriores, el sedimento celular fue resuspendido en 10 ml de TE (1/10 volúmenes con respecto al volumen de medio de cultivo procesado) con el agregado del inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 1 mM. Las células se rompieron con tres pulsos de 10 s de ultrasonido en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra-cell™ VCX-600, Sonics & Materials). Finalmente, se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación a 10000 x g durante 10 min a 4°C.

La purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a GST se llevó a cabo según el método desarrollado por Smith y Johnson (1988), con modificaciones descritas por Palena y col. (1998). El extracto proteico soluble obtenido se incubó en una columna de glutatión-agarosa (Sigma) previamente equilibrada en solución PBS (pH 7,3) (NaCl 150 mM; Na₂HPO₄ 16 mM; NaH₂PO₄ 1 mM). Se emplearon aproximadamente 500 μ l de una matriz de agarosa unida a glutatión para un volumen de medio de cultivo de partida

de 100 ml. El extracto proteico se hizo recircular por la columna mantenida a 4° C durante 2 h. Luego se lavó la columna con tres volúmenes de solución PBS y un volumen de Tris-HCl 50 mM pH 8,0. La elución de la proteína unida a la glutatión-agarosa se realizó empleando una solución de glutatión reducido (GSH) 10 mM en Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

La pureza y concentración proteica de las alícuotas obtenidas fueron estimadas en geles de poliacrilamida con SDS y tinción con azul de Coomassie (punto 3.7.4).

3.7.3.2. Purificación de las proteínas de fusión con MBP.

La expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a la MBP se realizó en las mismas condiciones descritas para las proteínas de fusión a la GST (punto 3.7.3.1), exceptuando la utilización de solución amortiguadora de columna de amilosa (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM) para la resuspensión de los precipitados celulares, de acuerdo a lo recomendado por los fabricantes del sistema pMal (New England Biolabs). El extracto proteico soluble obtenido se incubó con 500 μ l de una matriz de agarosa unida a amilosa (New England Biolabs) durante 4 h con agitación suave a 4° C. La mezcla se vertió en una columna y se lavó varias veces con solución amortiguadora de columna de amilosa. Se empleó maltosa 20 mM en la misma solución para realizar la elución. La pureza y concentración proteica de las alícuotas obtenidas fueron estimadas en geles de poliacrilamida con SDS y tinción con azul de Coomassie (punto 3.7.4).

3.7.3.3. Corte de las proteínas fusionadas a GST y a MBP.

Las proteínas de fusión a GST y a MBP purificadas se incubaron con 10 μ g de Factor Xa (New England Biolabs) por mg de proteína de fusión en solución de corte (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; CaCl₂ 1mM) a 4° C durante 4 h. La eficiencia de la digestión se comprobó en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y tinción con azul de Coomassie como se describe a continuación.

3.7.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

La electroforesis de proteínas en presencia de SDS fue llevada a cabo según el método de Laemmli (1970) empleando sistemas de geles verticales. Se utilizó una relación de acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (p/p). El gel de separación se preparó en solución Tris-HCl 375 mM pH 8,8; SDS 0,1% (p/v) con una concentración de acrilamida final

de 12-15% (p/v). El gel de concentración se preparó con acrilamida al 4,5% (p/v) en solución Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 0,1% (p/v). La separación electroforética fue llevada a cabo en solución Laemmli (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% (p/v) pH 8,3) aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel. Las muestras se desnaturalizaron por incubación durante 3 min a 100° C y se sembraron en solución de siembra de proteínas (Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 2 mM pH 8,0; SDS 2% (p/v); β-mercaptoetanol 0,5% (p/v); azul de bromofenol 0,5 mg/ml). Una vez terminada la corrida electroforética los geles fueron sumergidos en solución colorante de proteínas [Coomassie Brilliant Blue R-250 1% (p/v) en una mezcla de etanol:acético:agua 50:10:40] durante 30 minutos a 37° C. Luego se recuperó el excedente de solución colorante, se realizaron cinco lavados con agua desionizada y se sumergió el gel teñido en solución decolorante de geles de proteínas (etanol:ácido acético:agua 25:10:65) hasta que se eliminó el exceso de colorante.

3.7.5. Preparación de extractos proteicos nucleares de inflorescencias de coliflor.

La extracción de proteínas nucleares se llevó a cabo según el protocolo descrito por Maliga y col. (1995). Se emplearon inflorescencias de coliflor (obtenidas en el mercado local) como material de partida.

El material se colocó en un mortero previamente enfriado y se agregaron 5 ml de solución de homogenización [(sacarosa 250 mM; NaCl 10 mM; Pipes 25 mM pH 7,0; EDTA 5 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; β-mercaptoetanol 20 mM; Tritón X-100 0,1 % (v/v); PMSF 0,2 mM] por gramo de tejido procesado. El homogenizado se filtró a través de dos mallas de nylon (280 y 80 μm) y se centrifugó a 4225 x g durante 20 min a 4° C. El sedimento enriquecido en núcleos fue lavado cuatro veces con 20 ml de la misma solución de homogenización sometiendo la suspensión a centrifugaciones sucesivas de 10 min a 1912 x g, 10 min a 1464 x g, 8 min a 1464 x g y 6 min a 1464 x g, todas a 4° C. El sedimento nuclear se resuspendió en 1 ml de solución de almacenamiento [Hepes 50 mM pH 7,6; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; KCl 10 mM; glicerol 50% (v/v); DTT 1 mM; PMSF 0,2 mM], se congeló en N₂ líquido y se conservó a -80° C. La ruptura de los núcleos se logró agregando 182 μl de solución de lisis [NaCl 2,5 M; Hepes 50 mM pH 7,6; MgCl₂ 5 mM; KCl 10 mM; glicerol 20% (v/v); DTT 1 mM; PMSF 0,2 mM] por cada ml de suspensión y posterior agitación durante 60 min a 4° C. Luego se centrifugó a 12000 x g durante 20 min a 4° C para separar la cromatina. El sobrenadante fue dializado durante 4 h a 4° C en membranas de diálisis (Sigma) cambiando la solución de diálisis [NaCl 40 mM; Hepes 20 mM pH 7,6; EDTA 0,2 mM; glicerol 20% (v/v); DTT 1 mM; PMSF 0,2 mM] al menos 4 veces. La suspensión dializada se centrifugó a 12000 x g durante 5 min a 4° C y la fracción

soluble que contenía los extractos proteicos nucleares se conservó a -80° C hasta el momento de su utilización.

3.8. Ensayos *in vitro* de interacción ADN-proteínas.

3.8.1. Ensayos de retardo en geles.

Los ensayos de retardo en geles se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Sessa y col. (1993) con algunas modificaciones. Las reacciones de unión se realizaron en un volumen final de 18 μ l en solución amortiguadora de unión [HEPES 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM; $MgCl_2$ 2 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 1 mM; Triton X-100 0,5% (p/v); glicerol 10% (v/v), poli (dl-dC) 1,5 μ g; y BSA 22 ng/ μ l] empleando 0,2-1 μ g de proteína recombinante purificada (punto 3.7.2) o 10 μ g de extracto proteico nuclear (punto 3.7.5) y ADN doble hebra marcado (punto 3.8.1.1) correspondiente a 10000 cpm.

El tubo con la mezcla de unión se incubó durante 15 min a temperatura ambiente para la reacción con la proteína recombinante o durante 30 min en hielo para la reacción con proteínas presentes en los extractos nucleares. Luego se adicionó Ficoll 2,5% (p/v) y el contenido se sembró en geles de poli(acrilamida no desnaturalizantes [(acrilamida 5% (p/v), bis-acrilamida 0,08% (p/v), TBE 0,5X y glicerol 2,5% (v/v)] previamente corridos a voltaje constante de 100 V durante 30 min. Una vez sembradas las muestras, la electroforesis se dejó transcurrir durante 2 h a 4° C en solución amortiguadora TBE 0,5X [1X: Tris-HCl 89 mM pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0]. Una vez finalizada la corrida, el gel se secó durante 40 min a 80° C y se expuso a una placa radiográfica (Kodak MXG/Plus) con pantalla intensificadora a -80° C durante toda la noche.

3.8.2. Marcación radiactiva de fragmentos de ADN para ensayos de retardo en gel.

La marcación radiactiva de los fragmentos de ADN empleados en los experimentos de retardo en geles se llevó a cabo utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Los fragmentos de ADN doble hebra se obtuvieron por amplificación por PCR (3.5.2) con los pares de oligonucleótidos adecuados según cada caso. Luego se procedió a una digestión con endonucleasas de restricción (punto 3.5.3) y el/los extremo/s cohesivos fueron rellenados en presencia de 5 μ Ci de [α - 32 P]dATP (3000Ci/mmol); dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM cada uno; solución amortiguadora suministrada por el fabricante de la enzima y 2 U de Klenow durante 60 min a 37° C. El exceso de [α - 32 P]dATP no incorporado se eliminó mediante filtración a través de una columna de Sephadex G-50 según el método descrito por Ausubel y col. (1987).

3.9. Ensayos de interacción ADN-proteínas en levaduras.

3.9.1. Sistema de simple híbrido.

El sistema de simple híbrido en levadura (Y1H) deriva del sistema de doble híbrido en levadura (Y2H, véase 3.9.2) y fue desarrollado por Li y col. (1993). En esta técnica, un fragmento de un promotor o varias copias en tándem de un elemento de ADN conocido se insertan corriente arriba de un gen reportero. Esta construcción es integrada al genoma de la levadura por recombinación homóloga y la cepa reportera obtenida es transformada a continuación con una biblioteca de expresión o con un vector que expresa una proteína en estudio fusionada al dominio de activación (AD) de GAL4. La interacción entre la proteína híbrida y la secuencia de ADN en estudio se determina mediante la detección de la expresión de un gen reportero (Figura 11). El gen reportero *HIS3* permite a la cepa de levadura que posee auxotrofia para histidina sobrevivir en un medio carente de este aminoácido, mientras que el gen reportero *LacZ* puede detectarse mediante medición de la actividad β -galactosidasa en forma cualitativa (aplicando el sustrato cromogénico X-Gal al medio de cultivo) o cuantitativa (utilizando el sustrato ONPG).

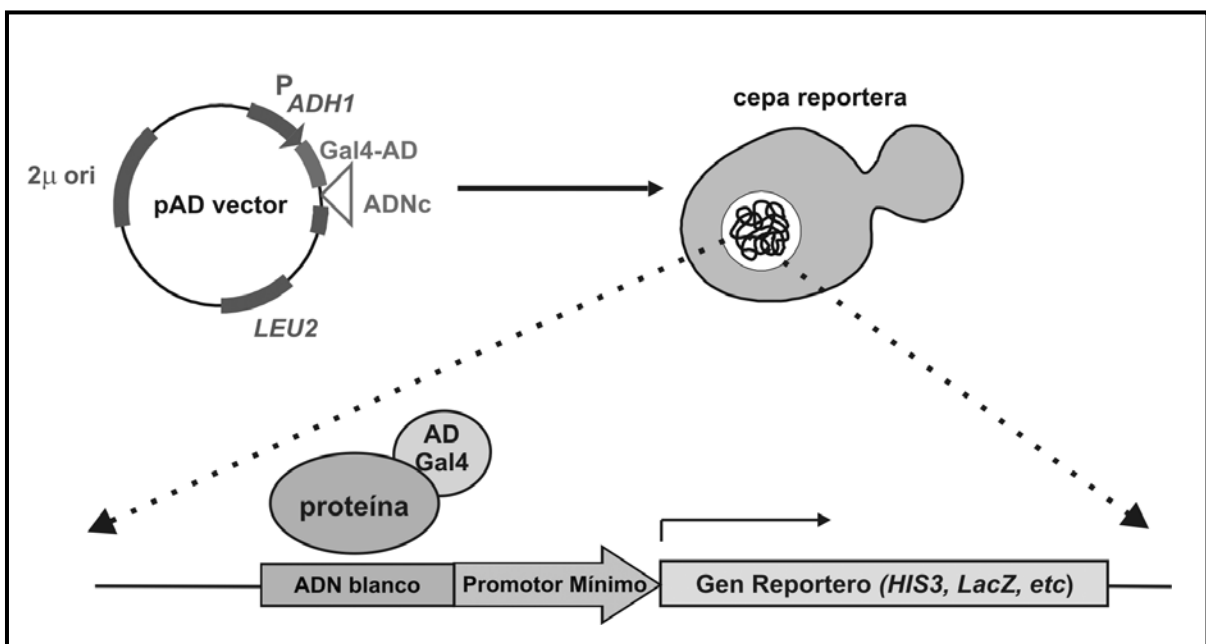


Figura 11: Esquema de la estrategia de simple híbrido en levadura (Ausubel y col., 2001).

3.9.2. Obtención de la cepa con el gen reportero.

La estrategia empleada para la obtención de las cepas de levadura con el gen reportero fusionado al fragmento de ADN a estudiar (cepa reportera) se detalla a continuación. En primer lugar se recurrió a una estrategia de PCR empleando pares de oligonucleótidos que incorporaron los sitios de restricción *Bam*HI y *Bg*II (según se indica en el nombre de los mismos) en el fragmento a estudiar. El par 5b2Gbox-Bam/5b2Gbox-Bgl se utilizó para amplificar el fragmento de promotor *cox5b-2* comprendido entre los nucleótidos -662 y -615 desde el sitio de inicio de la traducción y como ADN molde se usaron fragmentos de promotor salvaje y fragmentos que poseían mutado en forma puntual el elemento regulatorio G-box situado en la posición -636. El par 5bBam/5bBgl se utilizó para amplificar el fragmento de promotor *cox5b-1* comprendido entre los nucleótidos -259 y -196 y como ADN molde se usaron fragmentos de promotor salvaje y fragmentos que poseían mutado en forma puntual el elemento G-box situado en la posición -228. El par 5b1DEL-Bam/5b1DEL-Bgl se utilizó para amplificar el fragmento de promotor *cox5b-1* comprendido entre los nucleótidos -339 y -247 y como ADN molde se usaron fragmentos de promotor salvaje y fragmentos que poseían mutados los elementos de núcleo TCAT (cinco copias) o los elementos *distalB* (dos copias) presentes en esta región del promotor.

El fragmento amplificado se purificó a partir de un gel de poliacrilamida 12% (p/v), se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Bg*II y luego se lo utilizó en una reacción de ligación para lograr la unión en tándem de los fragmentos. Un décimo de volumen de esta reacción se utilizó como molde en una nueva PCR con los mismos cebadores y los productos amplificados se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (p/v). La banda correspondiente a un inserto que contenía tres copias del fragmento de interés se escindió y purificó del gel como se describe en el punto 3.8.2.2 y se clonó mediante ligación en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). El tamaño de los insertos clonados se determinó mediante digestión de los clones resultantes con la enzima *Eco*RI y posterior electroforesis en un gel de poliacrilamida usando como marcadores de peso molecular el fragmento simple obtenido en la primera amplificación y ADN del bacteriófago λ digerido con la enzima *Hind*III. La orientación de los oligonucleótidos dentro de los insertos se analizó mediante dos digestiones con enzimas de restricción: la primera con *Bam*HI y la segunda con *Bam*HI y *Bg*II. Esta estrategia permitió establecer la orientación del fragmento clonado dentro del plásmido pCR 2.1-TOPO y determinar la estrategia a seguir para el clonado en los vectores correspondientes, según el gen reportero a utilizar.

3.9.2.1. Gen *HIS3* como reportero.

La interacción entre las proteínas estudiadas y el ADN se determinó mediante la activación transcripcional del marcador de selección de crecimiento positivo *HIS3*. La cepa reportera se obtuvo utilizando el sistema de vectores p*HIS3*/p*INT1* (Meijer y col., 1998). Los fragmentos de ADN clonados en el vector pCR 2.1-TOPO (punto 3.9.1.1) fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI y ligados en los mismos sitios del vector p*HIS3*-NX. Luego, los fragmentos que contenían el inserto y el gen reportero *HIS3* fusionado a su propio promotor mínimo fueron transferidos a los sitios *Not*I-*Xba*I del plásmido p*INT1* (Meijer y col., 1998), el cual contiene las secuencias necesarias para su integración en el locus *PDC6* del genoma de levaduras mediante recombinación homóloga. El fragmento de ADN resultante de la digestión en el sitio *Nco*I presente en el gen *PDC6* incluyó la construcción reportera y el gen que confiere resistencia a G418 y se empleó para transformar la cepa de *S. cerevisiae* Y187 (punto 3.5.5.3). La presencia del fragmento de interés en el genoma de las levaduras se determinó por PCR con cebadores específicos.

3.9.2.2. Gen *LacZ* como reportero.

La interacción de las proteínas en estudio con el ADN se midió en forma cuantitativa determinando la actividad de la β -galactosidasa. La cepa reportera se construyó fusionando la secuencia de ADN de interés al gen *LacZ* de *E. coli* en el vector de integración p*LacZ*i (Clontech). Los fragmentos de ADN clonados en el vector pCR 2.1-TOPO (punto 3.9.1.1) fueron digeridos en los sitios de restricción *Hind*III y *Xho*I y se ligaron en los mismos sitios del vector p*LacZ*i. El plásmido fue luego digerido en el sitio *Nco*I (dentro del gen *URA3*) para ser introducido en el locus *ura* no funcional de la cepa aW303 de levadura. Las transformaciones se realizaron siguiendo la técnica descrita en el punto 3.5.5.3 y los clones fueron seleccionados cultivando las células en medio sin uracilo. La presencia de las construcciones deseadas en el genoma de las levaduras se confirmó por PCR con oligonucleótidos específicos (punto 3.5.2).

3.9.3. Ensayo de la expresión del gen reportero *HIS3*.

El gen reportero *HIS3* presenta niveles de expresión basales para algunas construcciones y permite el crecimiento de las levaduras en ausencia de histidina. Esta actividad enzimática puede reducirse si se suplementa el medio de cultivo con 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), un inhibidor competitivo de la enzima *HIS3* de levadura (Meijer y col., 1998). La concentración óptima de 3-AT para controlar el crecimiento de las cepas reporteras en un medio sin histidina se determinó sembrando las células transformadas con las

construcciones en estudio en placas de Petri conteniendo medio mínimo sin histidina (punto 3.4.2) suplementado con 0; 0,2; 0,5; 1 o 2 mM 3-AT.

Una vez establecidas las condiciones de crecimiento, las cepas reporteras fueron transformadas con las construcciones que contenían la secuencia codificante de los factores de transcripción a estudiar fusionadas al dominio AD de GAL4 en el vector pDEST22 (provisas por Jong Chan Hong, Gyeongsang National University, Korea). La presencia de los plásmidos se evaluó cultivando las células en medios carentes de triptófano y la identidad de los mismos se determinó mediante reacciones de PCR usando el ADN plasmídico de los clones obtenidos y cebadores específicos.

La capacidad de los factores de transcripción de interactuar con el ADN en las cepas reporteras se determinó sembrando diluciones seriales de los distintos clones en placas de Petri con medio selectivo en presencia y ausencia de histidina. Los clones se crecieron durante 12-16 h en 3 ml de medio selectivo adecuado a 30° C con agitación (200 rpm). Luego se determinó la DO_{600} de los cultivos y se estableció el volumen de los mismos correspondiente a una DO_{600} de 1,0. Este volumen de células se cosechó por centrifugación en un tubo estéril y el sedimento se lavó con 200 μ l de solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8). Luego de una nueva centrifugación, las células se resuspendieron en 20 μ l de solución TE y se realizaron las distintas diluciones con TE en un volumen final de 20 μ l. A continuación se sembraron 10 μ l de cada dilución en las placas correspondientes y se dejó crecer 24-48 h a 30° C.

3.9.4. Ensayo de la actividad β -galactosidasa.

La actividad de la enzima β -galactosidasa en las cepas reporteras se determinó mediante ensayos en medio líquido empleando el sustrato ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) según la metodología descrita por Ausubel y col. (1987) con algunas modificaciones. Se inocularon 3 ml de medio mínimo (suplementado e forma adecuada según el vector empleado) con cinco colonias de levadura de 2-3 mm de diámetro y se incubaron a 30° C con agitación (200 rpm) durante 12-16 h. Se utilizó 1 ml de cultivo para determinar la DO_{600} y un volumen similar se centrifugó a 12000 rpm durante 15 s. Se descartó el sobrenadante y el precipitado celular se congeló en N_2 líquido. Luego se resuspendió en 665 μ l de solución Z ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 16,1 g/l; $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 5,5 g/l; KCl 0,75 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g/l; β -mercaptoetanol 50 mM), se adicionaron 55 μ l de cloroformo y 55 μ l de SDS 0,1 % (p/v) y la suspensión se sometió a agitación en vórtex durante 60 s. Se adicionaron 160 μ l de ONPG 4 mg/ml (disuelto en solución Z) y se incubó a 30° C hasta aparición de color amarillo. La reacción se detuvo agregando 400 μ l de

Na_2CO_3 1 M y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se midió la DO_{420} . Los ensayos se realizaron en condiciones en que la DO_{420} obtenida fue de 0,02-1 para permanecer dentro del rango de linealidad. En todos los casos se calculó el valor promedio de tres ensayos independientes.

Las unidades de β -galactosidasa se definen como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de ONPG a *o*-nitrofenol y D-galactosa por minuto y se calcularon utilizando la siguiente fórmula (Miller, 1972):

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = 1000 \times \text{DO}_{420} / (t \times V \times \text{DO}_{600})$$

t: tiempo de incubación (en min); V: volumen (ml)

3.9.5. Sistema de doble híbrido.

El sistema de doble híbrido (Y2H) permite detectar *in vivo* interacciones entre proteínas utilizando la maquinaria completa de un organismo eucariota, las levaduras.

El sistema *GAL4 two-hybrid phagemid vector system*® (Stratagene) se basa en la estructura modular de los activadores transcripcionales eucariotas, característica que permite separarlos en dos dominios independientes funcionalmente: el dominio de unión al ADN (BD) y el dominio de activación transcripcional (AD). En este sistema se emplean los vectores pGBK-T7 y pGAD-T7 (punto 3.3.3), los cuales permiten el clonado de la proteína a estudiar fusionada al BD o al AD de GAL4 y el crecimiento de las levaduras transformadas en un medio sin triptófano o sin leucina, respectivamente. Una de las proteínas en estudio (X) se clona en un vector y la otra (Y) en el otro. Luego se co-transforman levaduras (punto 3.5.5.3) y se seleccionan los clones que incorporaron los dos vectores por la capacidad de las levaduras de crecer en medio mínimo sin leucina ni triptófano.

Las proteínas híbridas X-BD e Y-AD son incapaces de iniciar la transcripción específica del gen reportero en ausencia de interacción específica con la otra proteína híbrida. Al expresarse la proteína híbrida X-BD, el dominio BD_{GAL4} es capaz de unir las secuencias de ADN específicas UAS_{GAL1} o UAS_{GAL4} (Upstream Activating Sequences) en el genoma de la levadura. Estas secuencias regulan la expresión del gen reportero, pero la unión de X-BD a las UAS no es suficiente para activar la transcripción del mencionado

gen. Al expresarse la proteína Y-AD, el dominio AD_{GAL4} interacciona con otros componentes de la maquinaria de transcripción de la levadura necesarios para iniciar la transcripción del gen reportero, pero no se localiza en las UAS del gen reportero, por lo que no se inicia la transcripción del gen. Sólo cuando se produce una interacción específica entre las proteínas X e Y, los dominios BD_{GAL4} y AD_{GAL4} de las mismas se encuentran en forma simultánea en las UAS del gen reportero, evento que ocasiona la activación transcripcional del gen reportero (Figura 12).

La cepa maV203 de levaduras (punto 3.1.3) se utilizó como reportera en los ensayos de doble híbrido. Esta cepa posee el gen reportero *LacZ*, por lo que puede detectarse interacción entre dos proteínas mediante medición de la actividad β-galactosidasa en forma cuantitativa utilizando el sustrato ONPG (punto 3.9.2.2).

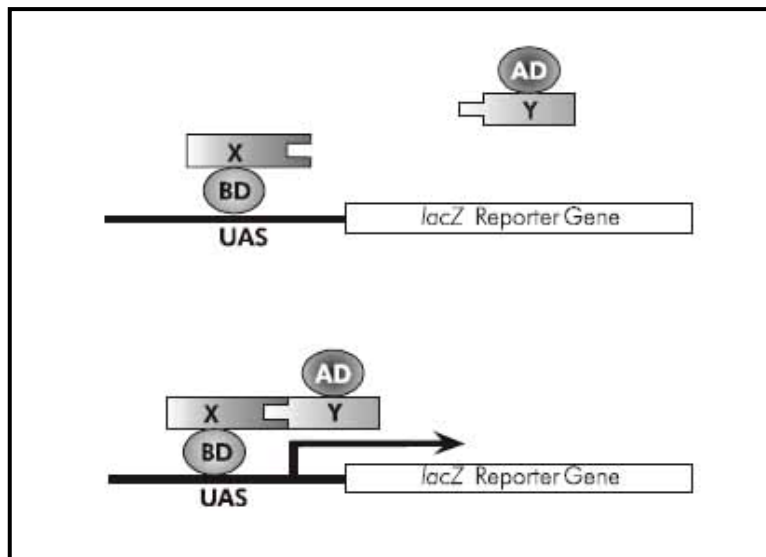


Figura 12: Sistema de doble híbrido en levaduras (adaptado de *GAL4 Two-Hybrid Phagemid Vector Kits*®, Instruction Manual, Stratagene). BD: dominio de unión al ADN. AD: dominio de activación transcripcional. X e Y: proteínas en estudio.

ANEXO I

Detalle de las características descriptivas de los vectores plasmídicos empleados.

pMB1, Col E1 y pBR322 ori: origen de replicación en *E. coli*.

2 μ ori: origen de replicación en *S. cerevisiae*.

Amp^R: resistencia a ampicilina.

Kan^R: resistencia a kanamicina.

Cam^R: resistencia a cloramfenicol.

APT1: Resistencia a G418 en levadura.

lacZ α : región 5' del gen *LacZ* que codifica para el fragmento α de la β -galactosidasa.

maltE: gen de la proteína de unión a maltosa.

His3: gen reportero en levadura.

PDC6: locus para integración en el genoma de levadura.

P_{HIS3}: promotor mínimo del gen *his3* de levadura.

P_{ADH1}: promotor constitutivo ADH1 para la expresión de la fusión proteica.

P_{T7}: promotor para transcripción y traducción *in vitro*.

P_{CYC1}: promotor mínimo del gen de citocromo *c* de levadura.

TRP1, LEU2 y URA3: marcadores de selección en levadura.

GAL4 BD: dominio de unión a DNA del activador transcripcional de levadura GAL4.

GAL4 AD: dominio de activación del activador transcripcional de levadura GAL4.

T_{T7 & ADH1}: señal de terminación de la transcripción.

C-Myc: epítoto tag para la inmunoprecipitación de las fusiones proteicas.

NLS SV40 T-antigen: señal de localización nuclear del antígeno T del virus SV40.

ANEXO II

Oligonucleótidos que hibridan sobre el gen *cox5b-1*

Nombre	Secuencia (en sentido 5' → 3')	Sitios de Restricción
COXB12	GGCGTCGACGATGATGATGAGTCAAAG	<i>SalI</i>
COXB13	CGGAAGCTTATTGTGTACGTCTTTATC	<i>HindIII</i>
COXB14	GGGAAGCTTCTTGCTTGTGCCTGTGTG	<i>HindIII</i>
COXB15	GCCAAGCTTATATCGAGATTTCCAAGT	<i>HindIII</i>
COXB16	CGCAAGCTTTTTGGGGAGTTTCTTCGC	<i>HindIII</i>
COXb17	CGGAAGCTTCATCATAATTTTCATTTTGTAGT	<i>HindIII</i>
COXb18	CGGAAGCTTGAAATGTCACACAATATAG	<i>HindIII</i>
VbmutGF	GTCCCCTGACAATGGTGTACTATGT	---
VbmutGR	ACATAGTACACCATTGTCAGGGGAC	---
5b1Del-F	TCCATTTTCATTGAAATGTCACACAATA	--
5b1Del-R	ACATTTCAATGAAATGGACATGTAAGG	--
5b1Mut1	ATCAGCCGGGACGGGGGTAGTATATGCATCATTG	--
5b1Mut1c	CTACCCCCGTCCCGGCTGATGAAATGGACATGTA	--
5b1Mut2	TTTTTGCTGCGCGTAATCATTGTATCATTATTT	--
5b1Mut2c	TGATTACGCGCAGCAAAAATGAAATTATGATGA	--
5b1Mut3	ATGCCGACGGTGCGAATTATTTCCACTTGTATC	--
5b1Mut3c	TAATTCGCACCGTCGGCATATACTACAAAATGA	--
5b1Mut4	TATCCGGCGGGAACATTGTATCACTAATTCCAC	--
5b1Mut4c	ACAATGTTCCCGCCGGATACAATGATGCATATA	--
5b1Mut5	CCACGGTGCAGACAGCATTCCACTTCAAATGTCA	--
5b1Mut5c	GAATGCTGTGCGACCGTGGAAAATAATGATACAA	--
5b1Mut6	ACTACGGAACAGGTAAATGTCACATTGAAATG	--
5b1Mut6c	ATTTACCTGTTCCGTAGTGATACAAGTGGAAA	--
5b1Mut7	GTAGTTTCACAATGACCGGTTATA	--
5b1Mut7c	TATTAACCGGTCATTGTGAAACTAC	--
5b1-350	GCCAAGCTTCCATTTTCATCATAATTTCA	<i>HindIII</i>
5b1TCA-F	GTATATGCATAACTGTATATCTATTTCCAC	--
5b1TCA-R	GTGGAAATAGATATACTGATATGCATATAC	--
5b1M3-F	TATGCATCATTGCTCATTATTTCC	--
5b1M3-R	GGAAAATAATGAGCAAATGATGCATA	--
5b1dist-F	GATTGTATCACTAATTCTGATTGAAATGTC	--
5b1dist-R	TCAGAATTAGTGATACAATCAGAAAATAATG	--

5b1SALK	GACTATGAAATGAGAGGCTA	--
5b1WT	TATCTTTTGAGTGAGCAGTA	--
5b1-real time-F	AAGTCCTTTGAATGCCCGTTT	--
5b1-real time-R	GAAAAATTTGCGGCAAGGGAGA	--
5bBam	CGGGGATCCTTGAAATGTCACACAATATAG	<i>BamHI</i>
5bBgl	GCCAGATCTCCGGTACGTGTGAAACTA	<i>BglII</i>
5b1DEL-Bam	CCCGGATCCATTTATCATAATTTTCAATTTT	<i>BamHI</i>
5b1DEL-BglII	GGGAGATCTTTTCAAGTGGATTAGTGATA	<i>BglII</i>
Prot5b1-F	CCCGGATCCCATGTGGAGAAGAATCG	<i>BamHI</i>
Prot5b1-R	GGGAATTCCAGTGGTGGTGCTCATC	<i>EcoRI</i>

Oligonucleótidos que hibridan sobre el gen *cox5b-2*

Nombre	Secuencia (en sentido 5' → 3')	Sitios de Restricción
COXB23	GGCGGATCCCGATTCTCCTCCACATAAT	<i>BamHI</i>
COXB24	GGCAAGCTTACGGCAAAATGGGGAGTA	<i>HindIII</i>
COX5b2-670	GGGAAGCTT TGTTCAAGGCAGTGTCGG	<i>HindIII</i>
COX5b2-630	CCCAAGCTTGAGCACGTTTTACCACAT	<i>HindIII</i>
COX5b2-420	CCCAAGCTTTCACCGTTTCAACATATAT	<i>HindIII</i>
COX5b2-220	GGGAAGCTTTTGATTTTGATTTTGTTC	<i>HindIII</i>
COX5b2-140	GGCAAGCTTACAGGCCGTCCCAAAAAG	<i>HindIII</i>
5b2-100	GGCAAGCTTCGTTTGAAGGAGGTAGTC	<i>HindIII</i>
5b2-60	GGCAAGCTTAGATCGGAAACGACAAAC	<i>HindIII</i>
5b2-MutInr F:	ATCTCTGATTTATCGCATGAGTTCCGTTTGA	--
5b2-MutInr R:	ATGCGATAAATCAGAGCTGGTACAAGACTTCG	--
5b2IImut-F	CATGATCCAGAAACAACAGGCCGT	--
5b2IImut-R	ACGGCCTGTTGTTTCTGGATCATG	--
5b2likelI-F	ATTAGATAATGTTACAACAAGTCG	--
5b2likelI-R	CGACTTGTTGTAACATTATCTAAT	--
5b2-mutGbox-F	GGCCAGGACAATGGTCACTTTCTT	--
5b2-mutGbox-R	AAGAAAGTGACCATTGTCCTGGCC	--
5b2Gbox-Bam	CCCGGATCCGTGTTCAAGGCAGTGTCG	<i>BamHI</i>
5b2Gbox-Bgl	GGGAGATCTTGATCGCTTTTTCATGTGGT	<i>BglII</i>
5b2-real time-F	CAAGTCTTTTGAATGCCCTGTG	--

Otros oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia (en sentido 5' → 3')	Sitios de Restricción
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	--
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	--
C2Bam	CCGGGATCCACCACTATTTAGACGCCA	<i>Bam</i> HI
C2Bgl	CCGAGATCTACACAGGCCATACGTTTT	<i>Bg</i> II
GUS-NH ₂	TTGGGGTTTTCTACAGGAC	--
PoliT-V	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV	--
Actin-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	--
Actin-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	--
attB1 (F)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	--
attB2 (R)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	--
GAD (F)	GGATGTTTAATACCACTACAATGGATG	--
pGEX-1	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	--
pGEX-2	CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG	--
GBFlike-F	GGGGGATCCTTACCATGGGTAGCAGTGAGATG	<i>Bam</i> HI
GBFlike-R	GGGGAATTCGAGCTCGTCTGACTCTACGCAACATCCTG	<i>Eco</i> RI, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I
GBF3-F	GGCACTAGTGAATTCTACCATGGGAAATAGCAGCGAG	<i>Spe</i> I, <i>Eco</i> RI
GBF3-R	GCGGAATTCGAGCTCATCAGCCTGCAGCTACTG	<i>Eco</i> RI, <i>Sac</i> I
GBF3-R2	GCGGTCTGACATCAGCCTGCAGCTACTG	<i>Sal</i> I
HLH080-F	GCGAGATCTTTACCATGCAATCCACTCATATAAGC	<i>Bg</i> II
HLH080-R	GCGGAATTCGAGCTCCATTATTGTTCTTCTTTAGGT	<i>Eco</i> RI, <i>Sac</i> I
ABF4-F	CGCGGATCCTTACCATGGGAACTCACATCAATTT	<i>Bam</i> HI
ABF4-R	GGGGAATTCTGTCTGACTTCACCATGGTCCGGTTA	<i>Eco</i> RI, <i>Sal</i> I
bZIP-GBFlike -F	GGGGGATCCTTGGAGTTGTAGTAGATGGTT	<i>Bam</i> HI
bZIP-GBF3 -F	GGCGGATCCTATTGGTTCAAGCTAGCTCAT	<i>Bam</i> HI
bZIP-ABF4 -F	GGGGGATCCTTTCACCAGTTCCGTATGTGC	<i>Bam</i> HI
ATHB21-F	GGGGGATCCTTACCATGAATAACCAGAATGTAGAT	<i>Bam</i> HI
ATHB21-R	GCGGAATTCGAGCTCCTTACATAAATTGGCTCATCC	<i>Eco</i> RI, <i>Sac</i> I
2g38250-F	GGGGGATCCTTAATATGGATGGACATCAGCAT	<i>Bam</i> HI
2g38250-R	GCGGAATTCGAGCTCTTAGAGGGAACCATCTCTA	<i>Eco</i> RI, <i>Sac</i> I
3g23220-F	GGGGGATCCTTACCATGGAACGTATAGAGTCTTA	<i>Bam</i> HI
3g23220-R	GCGGAATTCAGAGCTCCTAGCGGTTTGCGTCGT	<i>Eco</i> RI, <i>Sac</i> I
AP2pMAL-F	GGGGAATTC ACCATGGAACGTATAGAGTCTTA	<i>Eco</i> RI

Resultados y Discusión

4. CAPÍTULO I

“Estudio de la región promotora del gen *COX5b-1*, codificante para una isoforma de la subunidad 5b del complejo citocromo c oxidasa de *Arabidopsis thaliana*”

4.1. INTRODUCCIÓN

4.1.1. Complejo IV o citocromo c oxidasa.

La enzima citocromo c oxidasa (COX), el eslabón final en la cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial, se presenta *in vivo* como un dímero transmembrana relacionado tanto con el citocromo c como con la matriz mitocondrial. La enzima se encuentra en dos conformaciones, una oxidada y otra reducida. La transición entre estos dos estados está asociada a la formación de canales de protones, denominados canales H, que contribuyen a la síntesis de ATP en el complejo V (Mills y Ferguson-Miller, 2003; Khalimonchuk y Rödel, 2005).

La citocromo c oxidasa está compuesta por al menos 10 polipéptidos diferentes codificados ya sea en el genoma mitocondrial o en el genoma nuclear (Barrientos y col., 2002; Richter y Ludwing, 2003). Las tres subunidades codificadas en la organela de la mayoría de las especies estudiadas (COX1, COX2 y COX3) constituyen el centro catalítico de la enzima y son similares en secuencia y función a las subunidades presentes en COX de organismos procariontes, mientras que las subunidades codificadas en el genoma nuclear son adquisiciones más recientes de los organismos eucariotes en eventos posteriores a la endosimbiosis (Capaldi, 1990; Richter y Ludwing, 2003), encontrándose isoformas en mamíferos, plantas y hongos. La subunidad de codificación nuclear más conservada es COX5b (COX4 en levaduras), la cual contiene un sitio de unión para iones Zn^{2+} y se encuentra orientada hacia la cara matricial de la membrana interna mitocondrial (Rizzuto y col., 1991; Grossman y Lomax, 1997).

El correcto ensamblado del complejo COX requiere la expresión coordinada de los genes que codifican las diferentes subunidades o, al menos, de la mayoría de ellos. En animales, por ejemplo, se ha determinado recientemente que la expresión de todas las

subunidades COX de codificación nuclear (diez en total) está regulada en neuronas por el factor de transcripción NRF-1, el cual también regula la expresión de factores de transcripción involucrados en la expresión de genes mitocondriales (Dhar y col., 2008).

En plantas, la expresión del genoma mitocondrial no parece estar coordinada con la expresión de genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, siendo los productos de los genes nucleares los que resultan limitantes (Giegé y col., 2005). Por lo tanto, la expresión de los genes nucleares podría considerarse un importante punto de control para regular la cantidad y acumulación de cada complejo respiratorio en el interior de la célula. La evidencia actual indica que la expresión de varios genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial estaría regulada y coordinada a nivel transcripcional. Elementos regulatorios conservados, reportados en la bibliografía como *site II* (Kosugi y col., 1995; Kosugi y Ohashi, 1997), están presentes en los promotores de la mayoría de estos genes y constituyen potenciales sitios de reconocimiento para factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial (Welchen y González, 2006; González y col., 2007).

4.1.2. Subunidad COX5b de *Arabidopsis thaliana*.

La subunidad COX5b de plantas, de codificación nuclear, fue identificada por primera vez mediante homología de secuencia en arroz (Kadowaki y col., 1996) y estudios posteriores de expresión permitieron evidenciar que esta subunidad se expresa en todos los órganos y se regula en forma diferente a la subunidad de codificación mitocondrial COX1 (Hamanaka y col., 1999). En semillas de *Arabidopsis*, se observó que los niveles basales de ARNm de *COX5b* aumentan con el progreso de la germinación y en relación directa con el aumento de la capacidad de la vía dependiente de citocromo *c* (Saish y col., 2001).

El análisis de secuencias codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa en el genoma completo de *Arabidopsis* permitió identificar dos genes, localizados en los cromosomas I (At1g80230) y III (At3g15640), y un posible pseudogén ubicado en el cromosoma I. Los dos genes presentan una alta homología de secuencia con subunidades 5b de otros organismos y poseen una estructura muy conservada, con cinco intrones localizados en la misma posición dentro de la secuencia codificante. Por otra parte, el pseudogén presenta la misma estructura excepto por la ausencia de los dos primeros exones en la secuencia. El análisis de los polipéptidos codificados permitió determinar que existe un alto grado de conservación, exceptuando la región N-terminal de la proteí-

na, la cual está codificada en los primeros exones y contendría las secuencias responsables del direccionamiento e importación a la mitocondria. De forma arbitraria, se asignaron los nombres *COX5b-1* y *COX5b-2* a los genes ubicados en los cromosomas III y I, respectivamente, respetando el orden de disponibilidad de estas secuencias en el banco de datos de *A. thaliana* (Welchen y col., 2002).

4.1.2.1. Estudios previos de la región promotora del gen *COX5b-1* (At3g15640).

Estudios previos en el laboratorio indicaron que el promotor de *COX5b-1* dirige la expresión del gen en tejidos u órganos específicos. En plantas de *Arabidopsis* transformadas con un fragmento de 2 kpb correspondiente al promotor del gen *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus* se detectó actividad GUS en estadios tempranos de desarrollo, principalmente en cotiledones y en las regiones meristemáticas. Con el desarrollo de la plántula, la tinción se localizó progresivamente en la región del cilindro vascular de raíces e hipocotilo y en el tejido vascular de los cotiledones. En plantas adultas, la expresión de GUS se localizó en la vena central de las hojas, en anteras y granos de polen, y en la zona de unión entre el pedicelo y las vainas (Welchen y col., 2004).

El análisis de cuatro delecciones progresivas de las regiones distales del promotor (hasta -609, -387, -196 y -95 con respecto al codón ATG inicial) permitió determinar que elementos presentes en la región comprendida entre las posiciones -387 y -196 serían indispensables para la transcripción del gen, dado que la delección de secuencias ubicadas por arriba del nucleótido -196 eliminó completamente la expresión del gen reportero. Por otro lado, las plantas transformadas con la construcción -387 mostraron un nivel notoriamente mayor de expresión en hojas respecto de las construcciones -2000 y -609, sugiriendo la presencia de elementos reguladores negativos, activos específicamente a nivel de las hojas, entre los nucleótidos -609 y -387. Además, podría especularse acerca de la existencia de un elemento regulador positivo ubicado corriente arriba de la posición -609, ya que las plantas transformadas con esta construcción presentaron valores de actividad GUS inferiores a los de la construcción -2000 (Welchen y col., 2004).

La inclusión de azúcares metabolizables y de la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) ocasionó un aumento en los niveles de expresión en todas las construcciones que produjeron actividad GUS observable. De acuerdo a esto, los elementos implicados en la inducción se localizarían en la misma región requerida para la expresión basal del gen, comprendida entre las posiciones -387 y -196, aunque no puede excluirse la presencia de otros elementos necesarios, pero no suficientes, en la región promotora ubicada corriente abajo de la posición -196 (Welchen y col., 2004).

El promotor del gen *COX5b-1* carece de caja TATA cercana al sitio de inicio de la transcripción, evento frecuente en genes nucleares codificantes para subunidades COX en mamíferos. El sitio de inicio de la transcripción estaría ubicado en la posición -163 con respecto al codón ATG inicial. Por ende, la mayoría de los elementos en *cis* relevantes para la regulación de la transcripción estarían ubicados muy próximos al sitio de inicio de la transcripción. Por el contrario, los motivos responsables de la represión parcial de la expresión de *COX5b-1*, fundamentalmente en hojas, estarían ubicados en posiciones más alejadas (entre -387 y -609).

En el presente trabajo de Tesis se profundizó el estudio de la región promotora del gen *COX5b-1*, uno de los dos genes codificantes para la subunidad 5b en *Arabidopsis thaliana*, con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de genes nucleares codificantes para componentes del complejo citocromo c oxidasa en plantas.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. El fragmento comprendido entre las posiciones -387 y -196 de *COX5b-1* contiene dos regiones requeridas para la expresión del gen.

Estudios previos en el laboratorio determinaron que la región promotora de *COX5b-1* comprendida entre los nucleótidos -387 y -196 desde el sitio de inicio de la traducción contiene elementos esenciales para la expresión y la regulación del gen (Welchen y col., 2004). Se decidió, entonces, profundizar el estudio de esta región del promotor para identificar los elementos *cis* involucrados.

En primer lugar, se realizaron dos nuevas deleciones progresivas del extremo 5' distal del promotor, conteniendo 333 o 259 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, y se transformaron en forma estable plantas de *Arabidopsis* con los fragmentos mencionados fusionados al gen reportero *gus*. Luego, se obtuvo una deleción de la región comprendida entre los nucleótidos -333 y -259 en el contexto del fragmento -387 del promotor (Figura 13) y se procedió de idéntica manera. Entre diez y veinte líneas de cada construcción, correspondientes a eventos independientes de integración en el genoma de las plantas, se seleccionaron y se analizaron mediante seguimiento histoquímico de la expresión GUS en distintos estadios de desarrollo. La actividad específica GUS se de-

terminó en extractos proteicos preparados a partir de plántulas y órganos separados de cinco líneas independientes de cada construcción o a partir de *pools* de plantas u órganos correspondientes a una combinación de líneas del total de las analizadas.

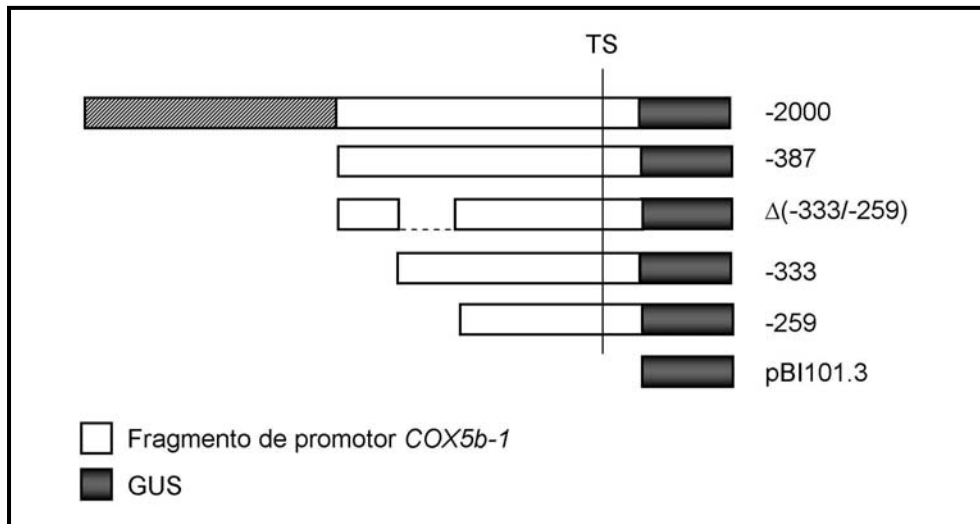


Figura 13. Representación esquemática de las construcciones del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus* empleadas para transformar plantas de *Arabidopsis*. El nombre de cada construcción indica la posición del último nucleótido presente en el fragmento de promotor respecto al sitio de inicio de la traducción. Todos los fragmentos del promotor se extienden hasta el nucleótido -1. “TS” indica el sitio probable de inicio de la transcripción de acuerdo a la secuencia de ADNc más larga disponible en las bases de datos. “ $\Delta(-333/-259)$ ” indica la construcción en la cual se eliminó la región -333/-259 en el contexto del fragmento -387 del promotor de *COX5b-1*. El vector pBI 101.3 contiene la secuencia codificante para la β -glucuronidasa sin promotor.

El análisis de la tinción histoquímica en plántulas de 4 a 15 días post-germinación correspondientes a líneas transformadas con la construcción -387 permitió observar expresión de GUS en cotiledones, raíz, hipocotilo (principalmente en el haz vascular), meristema de la raíz y meristema apical del vástago, mientras que no se detectó actividad del gen reportero en los primordios de hojas. El mismo análisis realizado en plantas adultas reveló expresión de GUS en hojas (tanto en el cilindro vascular como en el tejido parenquimático), raíces y flores, principalmente en anteras, estigma y en la unión de las flores con el pedicelo (Figura 14A). La delección de regiones ubicadas por arriba del nucleótido -333 del promotor ocasionó un descenso marcado en los niveles de expresión de

GUS en todos los órganos y tejidos analizados, siendo el efecto más evidente a nivel de las hojas, donde sólo se observó tinción en el ápice. La delección por encima del nucleótido -259 tuvo efectos más severos, observándose actividad GUS solamente en el meristema apical del vástago y en flores (Figura 14A). En ninguna de las construcciones se detectó expresión de GUS en regiones adicionales respecto al patrón observado para el fragmento -387 del promotor de *COX5b-1*.

El análisis de la actividad enzimática específica en extractos proteicos totales preparados a partir de plántulas y órganos aislados permitió determinar que las plantas transformadas con el fragmento de 387 pb fusionado al gen reportero mostraban una actividad GUS más elevada respecto a los valores obtenidos para plantas transformadas con el fragmento completo (2000 pb) del promotor, tanto al analizar hojas como plántulas de 4 o 15 días (Figura 14B-D). Estos resultados son coincidentes con los descriptos en estudios previos (Welchen y col., 2004). El análisis de plántulas de 4 y 15 días y de flores de líneas transformadas con la primera delección (-333) mostró niveles de actividad GUS cercanos al 50% de los detectados en plantas transformadas con el fragmento -387, mientras que la delección hasta el nucleótido -259 originó una reducción aún mayor (Figura 14B,C). En hojas, la disminución de actividad observada fue significativamente mayor, ya que con la delección hasta -333 se obtuvieron valores correspondientes a un 25% de los valores obtenidos para el fragmento -387 (Figura 14D).

La delección de la región comprendida entre los nucleótidos -333 y -259 en el contexto del fragmento -387 del promotor [$\Delta(-333/-259)$ en las Figuras 1 y 2] originó plantas con niveles y patrones de expresión GUS similares a los de plantas transformadas con la construcción -259 (Figura 14), sugiriendo que los elementos *cis* localizados corriente arriba del nucleótido -333 serían activos sólo en presencia de la región eliminada.

Los resultados obtenidos sugieren la presencia de elementos regulatorios positivos en las regiones del promotor de *COX5b-1* comprendidas entre los nucleótidos -387/-333 y -333/-259, siendo estos últimos necesarios para que los primeros sean activos. Los elementos presentes en estas regiones podrían actuar en forma conjunta con el/los elemento/s esencial/es para la expresión del gen presente/s en la región -259/-196, según trabajos previos en los cuales la remoción de esta región originó plantas con pérdida completa de la actividad GUS (Welchen y col., 2004).

El estudio de la región promotora de *COX5b-1* se centró en las regiones comprendidas entre los nucleótidos -259/-196 y -333/-259.

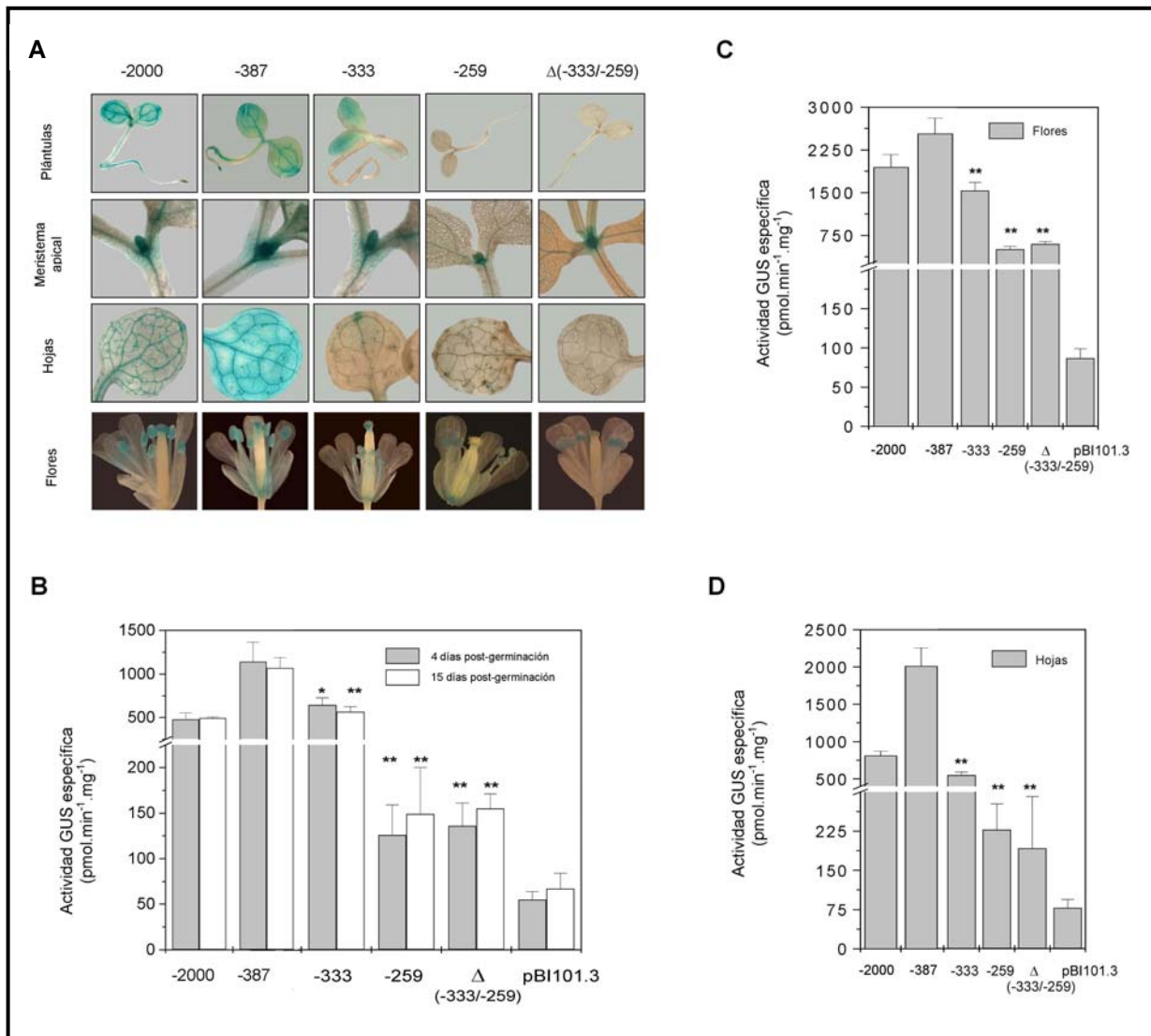


Figura 14. Análisis de actividad GUS en plantas transformadas con formas delecionadas del promotor de *COX5b-1*. **(A)** Localización histoquímica de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con diferentes construcciones del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus*. Las imágenes son representativas de 10-20 líneas analizadas para cada construcción. **(B-D)** La actividad específica GUS se determinó mediante medidas en extractos de proteínas totales preparados a partir de plântulas de 4 y 15 días (B), flores (C) y hojas (D) de plantas transformadas con las diferentes construcciones. Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor fueron utilizadas como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos luego de cada deleción se evaluó aplicando el test de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

4.2.2. La región -259/-196 del promotor de *COX5b-1* contiene un elemento G-box esencial para la expresión del gen.

Un análisis informático en la base de datos PLACE (Plant Cis-acting Elements, Higo y col., 1999) indicó que la región promotora de *COX5b-1* comprendida entre los nucleótidos -259 y -196 presenta elementos *cis* potencialmente involucrados en la expresión del gen. Esta base de datos (<http://dna.affrc.go.jp/PLACE>) contiene información referente a los elementos regulatorios identificados en plantas vasculares y a la función descrita para cada uno.

Los elementos identificados en esta región del promotor de *COX5b-1* incluyen un elemento G-box, de secuencia CACGTG (Salinas y col., 1992; Menkens y col., 1995), presente en el nucleótido -228 desde el sitio de inicio de la traducción, un motivo ACGT presente en -204, el cual contiene el núcleo del elemento G-box, y una secuencia con un núcleo similar al elemento *tel*o box (ACCCTA; Manevski y col., 2000) localizada en la posición -241. Es importante destacar que el elemento G-box y el motivo ACGT se encuentran en un arreglo similar en la región promotora del gen *Cytc-2*, siendo requeridos para la expresión del mismo (Welchen y col., 2009), mientras que el elemento *tel*o box está involucrado en la expresión del gen *Cytc-1* (Welchen y González, 2005), ambos genes codificantes para el citocromo *c* de *Arabidopsis*.

Los tres elementos mencionados anteriormente se mutaron puntualmente y en forma separada en el contexto del fragmento -387 del promotor de *COX5b-1* (Figura 15A) y se transformaron en forma estable plantas de *Arabidopsis* con las versiones mutadas del promotor fusionadas al gen reportero *gus*. El análisis de la tinción histoquímica en plantas transformadas con las construcciones mencionadas previamente indicó que la mutación en el elemento G-box (se cambió CACGTG por CAATGG) eliminó completamente la actividad GUS en todos los órganos o tejidos de la planta, mientras que la mutación de los restantes elementos no produjo cambios observables en los patrones o en los niveles de expresión (Figura 15B). En concordancia con estos datos, los niveles de actividad enzimática específica en extractos proteicos preparados a partir de plántulas o de órganos aislados de plantas transformadas con el fragmento de promotor que contenía mutado el elemento G-box fueron similares a los niveles de base obtenidos para plantas control transformadas con el vector pBI101.3, es decir con el gen reportero *gus* sin promotor (Figura 15C). Esto sugiere que la pérdida de actividad observada en la delección por encima del nucleótido -196 del promotor de *COX5b-1* (Welchen y col., 2004) se debería a la remoción del elemento G-box situado en la posición -228, el cual sería esencial para la expresión del gen *COX5b-1*.

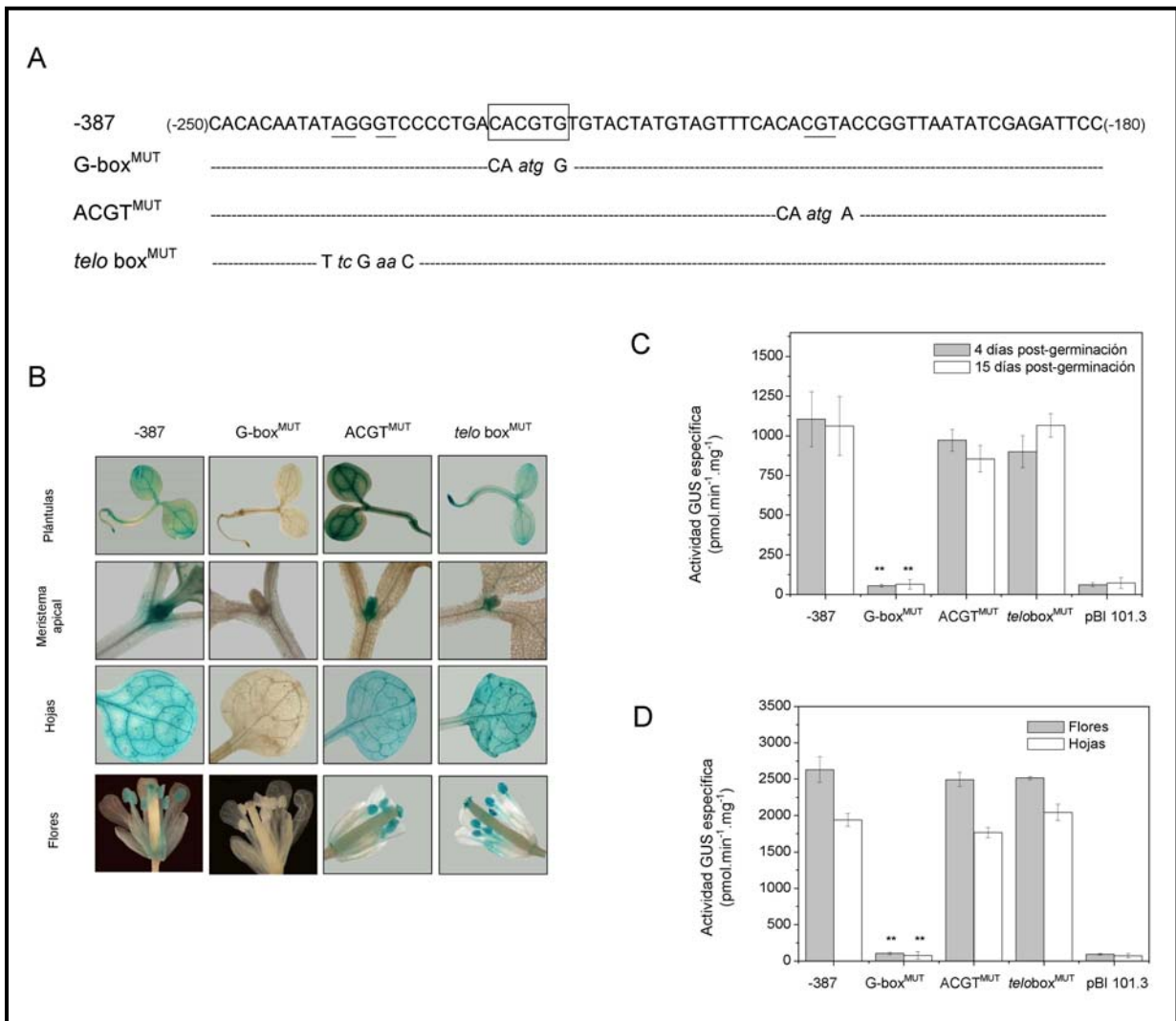


Figura 15. Análisis de la actividad GUS generada por fragmentos del promotor de *COX5b-1* con mutaciones puntuales en elementos presentes en la región -259/-196. **(A)** Representación esquemática de las construcciones empleadas para transformar plantas de *Arabidopsis*. El nombre de cada construcción indica el elemento mutado y los nucleótidos modificados mediante mutaciones puntuales se muestran en letra minúscula. **(B)** Localización histoquímica de actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con las construcciones mencionadas. Las imágenes son representativas de 10-20 líneas analizadas para cada construcción. **(C)** Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 4 y 15 días, flores y hojas de plantas transformadas. Se utilizaron como control negativo plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada mutación se evaluó aplicando el test de Student (** $P < 0,01$).

El elemento G-box se encuentra extensamente estudiado, desempeñando funciones de regulación de la expresión génica en respuesta a diversos factores, como ser anaerobiosis, luz visible y UV, metil-jasmonato, ABA y estrés hídrico entre otros (Salinas y col., 1992; Menkens y col., 1995). Por otro lado, es interesante destacar que en el gen *Cytc-2* el elemento ACGT es esencial para la actividad del gen (una mutación puntual anula por completo la expresión del gen reportero), mientras que el elemento G-box desempeña una función accesoria (una mutación puntual reduce en un 50% los valores de expresión del gen reportero), según lo reportado en Welchen y col. (2009). Esto indica que a pesar de que la ubicación del elemento G-box respecto del motivo ACGT es similar en *Cytc-2* y en *COX5b-1*, existirían diferencias en la especificidad de unión a estos elementos por parte de factores de transcripción reguladores, quizás debido a diferencias en los nucleótidos adyacentes a los mismos, lo que concuerda con observaciones efectuadas en otros sistemas (Williams y col., 1992). Este aspecto se abordará con mayor detalle en el Capítulo III del presente Trabajo de Tesis.

4.2.2.1. Proteínas nucleares son capaces de interaccionar *in vitro* con el elemento G-box identificado en la región promotora de *COX5b-1*.

La presencia de proteínas nucleares capaces de unir el fragmento del promotor de *COX5b-1* comprendido entre los nucleótidos -259 y -196, esencial para la expresión del gen, se analizó *in vitro* empleando extractos nucleares preparados a partir de inflorescencias de coliflor. Se utilizó este material como una fuente abundante de proteínas nucleares de una especie vegetal muy cercana filogenéticamente a *Arabidopsis*.

En la Figura 16 se muestran ensayos de retardo en gel (EMSA) realizados en presencia de extractos nucleares y el fragmento -259/-196 del promotor de *COX5b-1* marcado radiactivamente. Al menos tres bandas de retardo, correspondientes a diferentes complejos de unión ADN-proteínas, se observaron cuando se utilizó el fragmento de promotor con el elemento G-box intacto, mientras que todas las bandas de retardo desaparecieron o disminuyeron notoriamente su intensidad cuando se utilizó un fragmento de promotor del mismo tamaño pero con el elemento G-box mutado (Figura 16A). Estos resultados indican que en extractos nucleares de coliflor existen proteínas capaces de unir el fragmento -259/-196 del promotor sólo cuando el elemento G-box está intacto. Por otro lado, el motivo ACGT pareció incapaz de interaccionar con proteínas presentes en el extracto, en concordancia con los ensayos comentados en la sección anterior, en los cuales se observó que una mutación puntual del motivo ACGT no afectó la expresión del gen reportero *gus*.

La especificidad de unión al elemento G-box de los factores presentes en el extracto nuclear se evaluó mediante ensayos de competencia, agregando a la mezcla de unión distintos fragmentos del promotor no marcados radiactivamente, en una concentración molar de 25 a 50 veces mayor respecto del fragmento marcado. El agregado del fragmento -259/-196 del promotor de *COX5b-1* no marcado fue suficiente para competir eficientemente por la formación de los dos complejos de menor movilidad, mientras que no se observó competencia al utilizar como competidor el fragmento de promotor que tiene mutado el elemento G-box (Figura 16B). Al utilizar como competidor el fragmento no mutado en un exceso molar de 50 veces, la formación de los tres complejos de unión se compitió eficientemente (Figura 16C). La formación de los dos complejos de menor movilidad se restableció cuando se utilizó como competidor una cantidad similar del fragmento de promotor con el elemento G-box mutado. La competencia prácticamente no se afectó cuando se utilizó un fragmento de promotor con el motivo ACGT mutado como competidor (Figura 16C). Estos resultados permiten concluir que proteínas presentes en extractos nucleares de coliflor reconocen *in vitro* específicamente el elemento G-box presente en el promotor de *COX5b-1*, resultando en la formación de dos complejos de baja movilidad. Un tercer complejo, de movilidad mayor, parece originarse a partir de interacciones menos específicas.

Se mencionó previamente que el promotor del gen *Cytc-2* contiene un elemento G-box y un motivo ACGT en una disposición similar a la observada en *COX5b-1*, y estos elementos son requeridos para la expresión del gen (Welchen y col., 2009). Un fragmento que contiene esta región del promotor de *Cytc-2* también fue capaz de competir eficientemente por la unión de las proteínas presentes en el extracto nuclear al promotor de *COX5b-1*, mientras que esta competencia se perdió al utilizar el mismo fragmento con el elemento G-box mutado (Figura 16C). De acuerdo a esto, las regiones promotoras de los genes *COX5b-1* y *Cytc-2*, codificantes para componentes de la maquinaria de respiración mitocondrial, esto es citocromo *c* oxidasa y citocromo *c*, respectivamente, poseen la capacidad de interactuar *in vitro* con un grupo similar de proteínas nucleares.

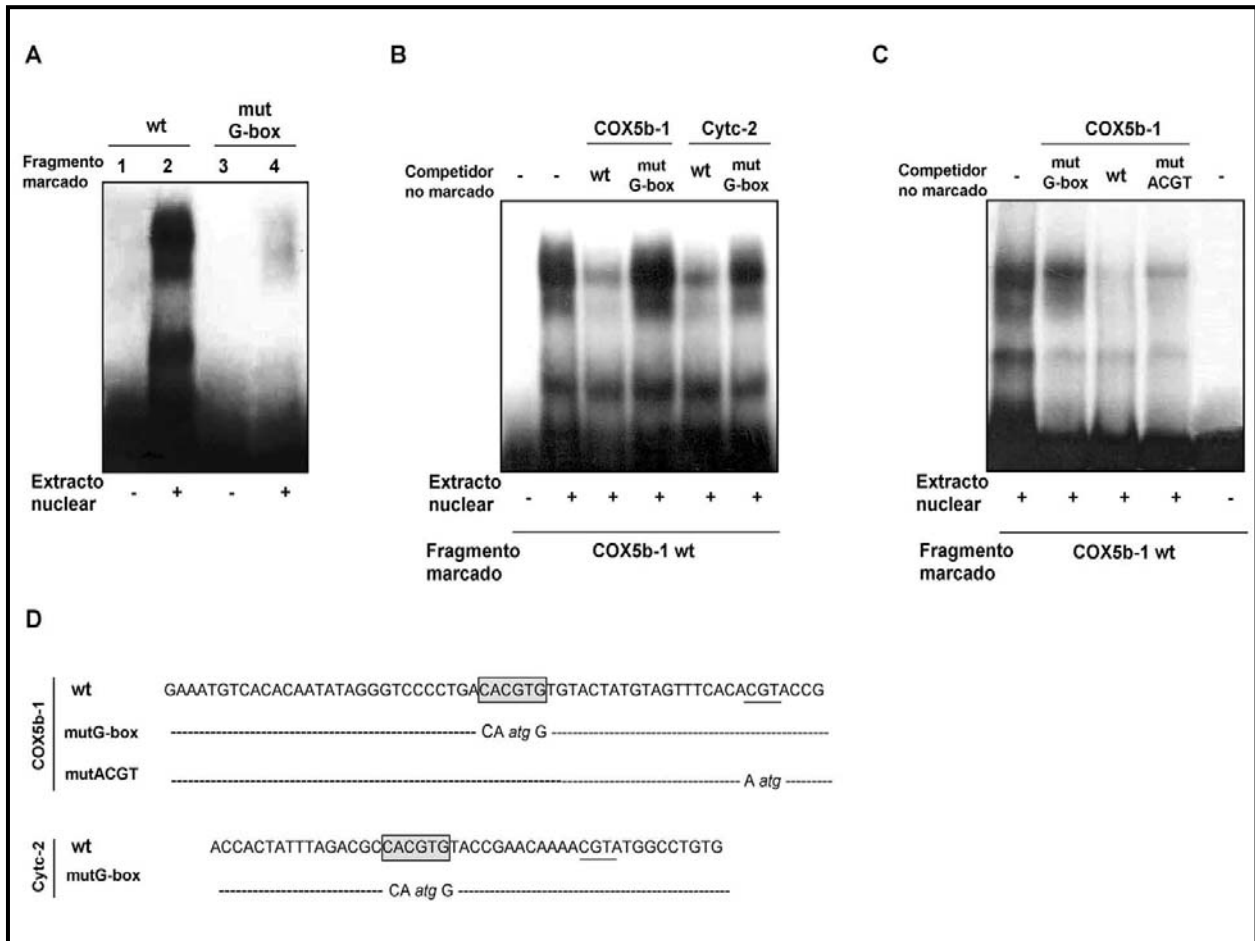


Figura 16. Proteínas nucleares son capaces de unir específicamente el elemento G-box presente en el promotor de *COX5b-1*. Se realizaron ensayos de retardo en gel (EMSA) con extractos nucleares (10 µg) y el fragmento de promotor -259/-196 marcado radiactivamente. **(A)** La unión se analizó tanto para el fragmento de promotor mencionado (wt; calles 1 y 2) como para un fragmento similar pero con el elemento G-box mutado (mut G-box; calles 3 y 4). **(B)** Ensayo de competencia utilizando el fragmento wt marcado radiactivamente y competidores no marcados en una concentración molar 25 veces superior a la concentración del fragmento marcado. Los competidores ensayados incluyen el fragmento -259/-196 de *COX5b-1* y el fragmento -189/-139 de *Cytc-2*, conteniendo el elemento G-box intacto o mutado en forma puntal. **(C)** Idéntico ensayo pero utilizando mutantes puntuales en el elemento G-box y en el motivo ACGT del promotor de *COX5b-1* como competidores en un exceso molar de 50 veces respecto del fragmento marcado. **(D)** Secuencias de los fragmento ensayados. Los elementos G-box y los motivos ACGT presentes en ambos promotores se encuentran sombreados y subrayados, respectivamente. Los nucleótidos modificados por mutaciones puntuales se muestran en letra minúscula.

4.2.3. La región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* contiene varios elementos *cis* involucrados en la expresión del gen en tejidos vegetativos.

La presencia de elementos regulatorios en la región del promotor de *COX5b-1* comprendida entre los nucleótidos -333 y -259 se evaluó analizando la expresión de un conjunto de construcciones en el contexto del fragmento -387 del promotor. En estas construcciones, denominadas M1 a M6, se mutaron en forma puntual regiones de 11-12 pb adyacentes, cubriendo en forma íntegra la región -333/-259 del promotor (Figura 17). Luego, se transformaron en forma estable plantas de *Arabidopsis* con los fragmentos mutados del promotor fusionados al gen reportero *gus*.

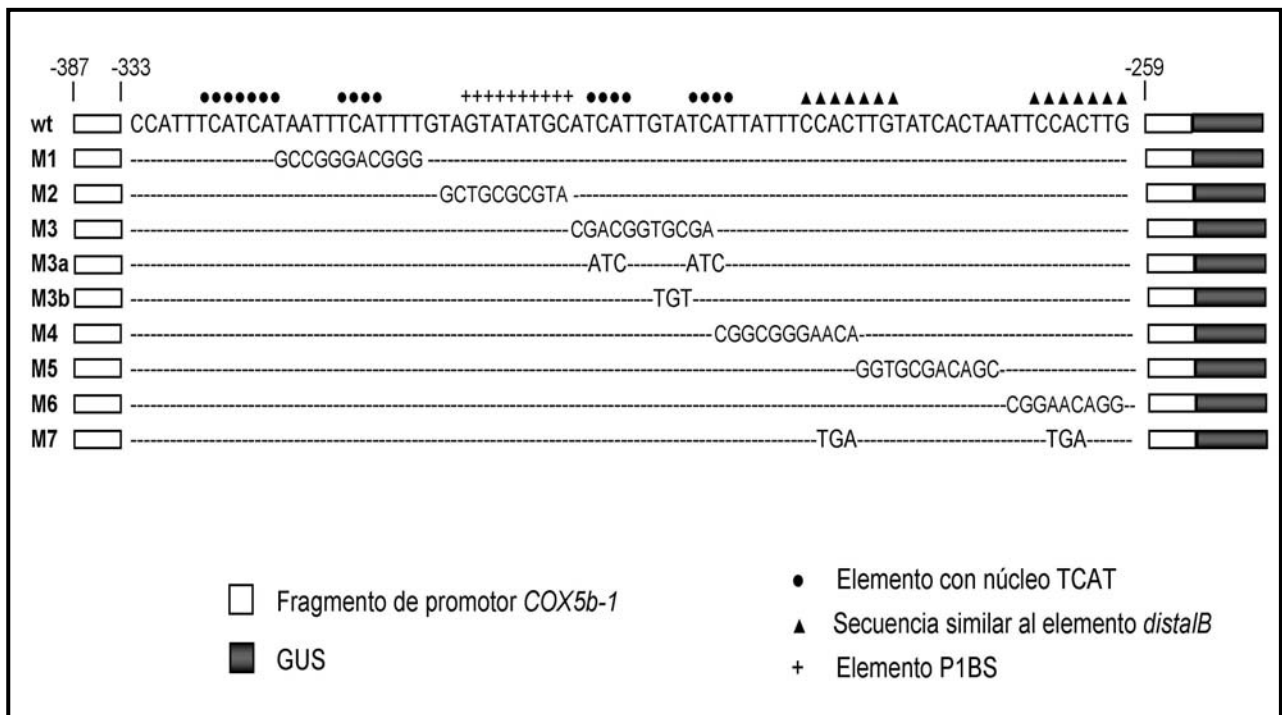


Figura 17. Secuencia de las mutaciones generadas en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* en el contexto del fragmento -387. Plantas de *Arabidopsis* se transformaron en forma estable con los fragmentos indicados fusionados al gen reportero *gus*. Se indican los nucleótidos mutados en cada construcción. Los elementos con el núcleo TCAT y las secuencias similares al elemento *distalB* se destacan arriba de la secuencia del promotor con círculos y triángulos, respectivamente, mientras que el elemento P1BS se señala con cruces.

El análisis de la tinción histoquímica de actividad GUS en las plantas transformadas reveló que la mutación denominada M3, es decir aquella que contenía mutada la región -299/-289, ocasionaba una pérdida completa de la actividad en cotiledones, raíces, hipocotilo y hojas, observándose tinción sólo en el meristema apical del vástago y anteras (Figura 18A). Este patrón fue similar al observado para la delección completa del fragmento -333/-259 y para la delección completa de la región ubicada por arriba de -259 (Figura 14A). Las mutaciones en las regiones M1, M4, M5 y M6 también ocasionaron un descenso en los niveles de expresión del gen reportero *gus*. Sin embargo, éste fue mucho menos severo que el observado para la mutación M3 (Figura 18A). En ninguno de los casos mencionados se observó una modificación de los patrones de expresión respecto a los patrones observados para el fragmento -387. Por otro lado, y en forma inesperada, se observó un incremento notorio de los niveles de actividad GUS para la mutante M2, construcción que tenía mutada la región promotora -310/-300 (Figura 18A), sugiriendo que esta región contiene un elemento regulatorio negativo de la expresión de *COX5b-1*. Ensayos de tinción histoquímica a diferentes tiempos con plántulas y hojas correspondientes a las construcciones -387 y M2 indicaron que el elemento negativo sería activo a nivel de cotiledones y, especialmente, de raíces (Figura 18B), mientras que no se observaron diferencias a nivel de las hojas (no se muestra). Este elemento no es el primer regulador negativo identificado en el promotor de *COX5b-1*, dado que en estudios previos se reportó la presencia de un regulador negativo, en este caso sólo activo a nivel de hojas, en la región -609/-387 (Welchen y col., 2004).

Las medidas de actividad específica GUS en plántulas de 4 y 15 días y en flores, en coincidencia con las observaciones realizadas en los ensayos de tinción histoquímica, indicaron que la mutación de la región M3 produce una disminución de los niveles de expresión similar a la observada para la delección de la región -333/-259 (Figura 18C,D). La expresión en flores, en cambio, fue afectada más profundamente por la delección del fragmento -333/-259 que por la mutación M3. El resto de las mutaciones analizadas, con excepción de M2, produjeron una reducción parcial pero estadísticamente significativa de la expresión, mientras que la mutación M2 originó un aumento de 6 a 10 veces en los niveles de actividad GUS con respecto a los observados para el fragmento no mutado del promotor (Figura 18C,D).

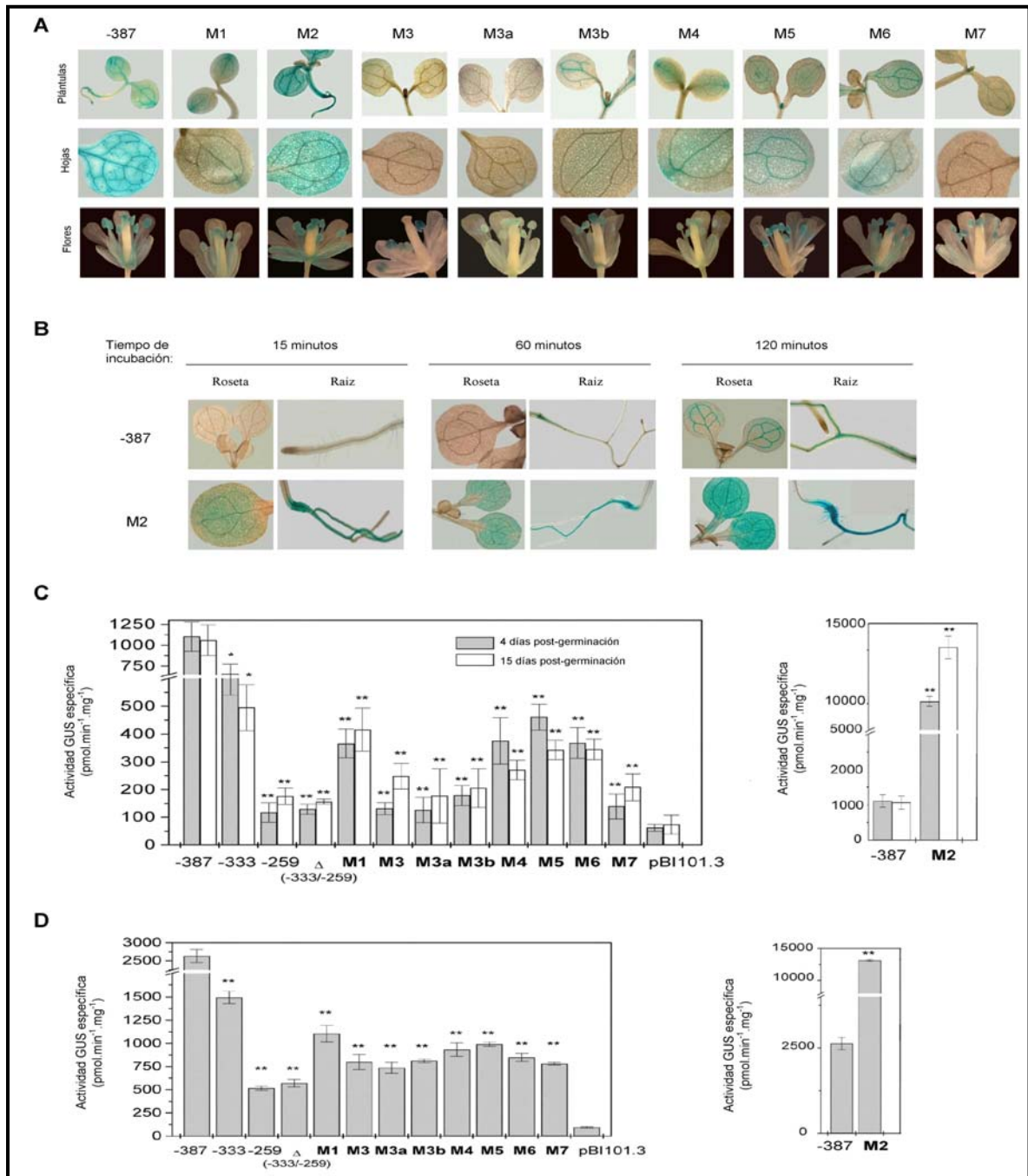


Figura 18. Análisis de la actividad GUS generada por fragmentos del promotor de *COX5b-1* con mutaciones puntuales en la región -333/-259. **(A)** Localización histoquímica de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con las construcciones mencionadas. Las imágenes son representativas de 10-20 líneas analizadas para cada construcción. **(B)** Ensayos histoquímicos a diferentes tiempos de incubación con la solución de tinción utilizando plântulas de 15 días correspondientes a las construcciones -387 y M2. **(C, D)** Medida de actividad específica GUS en plântulas de 4 y 15 días (C) y en flores (D) de plantas transformadas. Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de 5 líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada mutación se evaluó aplicando el test de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

El análisis de la región M2 evidenció la presencia de un elemento P1BS, de secuencia GTATATGC, descrito en la bibliografía como elemento de unión del factor de transcripción PHR1, involucrado en la respuesta adaptativa a la privación de fosfato (Rubio y col., 2001). Sin embargo, la incubación de plantas bajo condiciones de privación de fosfato no evidenció cambio alguno en los niveles de expresión del gen *COX5b-1* (no se muestra), sugiriendo que el elemento mencionado tendría un papel diferente en este gen. Quizás otros factores de transcripción diferentes a PHR1 reconozcan esta secuencia en el promotor de *COX5b-1*, o bien interacciones de tipo proteína-proteína modulen la actividad de PHR1 en respuesta a otros factores.

En cuanto a las otras mutaciones, el hecho de que varias de ellas afectaban los niveles de actividad GUS sugirió que las regiones analizadas contendrían varios elementos regulatorios positivos involucrados en la expresión del gen. La inspección de la secuencia del fragmento estudiado reveló la presencia de regiones repetidas que podrían justificar las observaciones efectuadas. Se detectaron dos repeticiones de las secuencias CATCATNNTNTCATT y TCANTANTTCCACTTG, comprendidas entre las regiones M1, M3 y M4 o M4 a M6, respectivamente (Figura 17).

Una de las repeticiones de la primera secuencia mencionada se encuentra severamente afectada en la mutación M3 (once de quince nucleótidos), la misma que anula la expresión en tejidos vegetativos. Además, cabe destacar que la secuencia mutada en M3 contiene dos repeticiones en tándem parcialmente superpuestas (tres nucleótidos superpuestos) de la secuencia TG(C/T)ATCATT(G/A)T. La importancia de estas secuencias en la regulación de la expresión de *COX5b-1* se evaluó construyendo dos nuevas mutantes en el contexto del fragmento -387 del promotor de *COX5b-1*, una de ellas con los dos núcleos TCA de las secuencias repetidas mutados en forma puntual (se cambió TCA por ATC; denominada M3a), y la otra mutante con los tres nucleótidos ubicados entre los núcleos TCA mutados (denominada M3b; Figura 17). El análisis histoquímico de las plantas transformadas con estas nuevas construcciones fusionadas al gen reportero *gus* permitió determinar que las plantas con la mutación M3a sólo mostraban expresión en flores, al igual que lo observado en las plantas con la mutación M3, mientras que las plantas transformadas con la construcción M3b aún mantenían actividad GUS observable en tejidos vegetativos, aunque en niveles muy inferiores a los observados para las plantas transformadas con el fragmento no mutado (Figura 18A). Estos resultados permiten concluir que las secuencias con el núcleo ATCATT presentes en el fragmento de promotor comprendido entre los nucleótidos -333 y -259 estarían involucradas en potenciar o incrementar la expresión de *COX5b-1*. Estos elementos no se encuentran reportados en la bibliografía ni en las bases de datos de elementos *cis* regulatorios.

Los ensayos de actividad específica GUS en extractos proteicos de plántulas y órganos de plantas transformadas con las nuevas construcciones mencionadas anteriormente indicaron que las mutaciones dentro de las dos secuencias ATCATT producen una reducción significativa de los niveles de expresión, similar a la observada para la delección de la región -333/-259 (Figura 18C,D). Por otro lado, la reducción en los niveles de expresión observada en la mutante M1 podría ser debida a la mutación de elementos similares a la secuencia ATCATT presente en la región M3 (Figura 17). En flores, la mutación de la secuencia ATCATT también ocasionó una reducción de la actividad del gen reportero, aunque el efecto fue mucho menos pronunciado que en tejidos vegetativos (Figura 18D), sugiriendo que otros elementos presentes en la región -333/-259 podrían sostener la expresión en tejidos reproductivos.

La segunda de las secuencias repetidas presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* contiene la secuencia CCACTTG, la cual constituye el núcleo de un elemento reportado en la bibliografía, el elemento *distalB* (GCCACTTGTC). Este elemento está presente en el promotor del gen *napA* de *Brassica napus* (nabo), donde participa en la inducción por la hormona ABA (Ezcurra y col., 1999). Se decidió entonces evaluar la funcionalidad de estas secuencias construyendo una nueva mutante en el contexto del fragmento -387 del promotor de *COX5b-1*, mutando en forma puntual los nucleótidos CAC del núcleo de las mismas. Esta mutante se denominó M7 (Figura 17). Plantas adultas que contenían este fragmento fusionado al gen reportero *gus* mostraron actividad sólo en flores, no detectándose actividad GUS en hojas o en plántulas de 4 y 15 días (Figura 18A), patrón idéntico al observado para la construcción M3. Es de destacar que las mutaciones M4, M5 y M6, las cuales afectan la integridad de sólo una de las secuencias similares al elemento *distalB*, no ocasionaron la pérdida completa de la expresión del gen reportero en los tejidos vegetativos (Figura 18A), lo cual podría deberse a que las dos secuencias similares al elemento *distalB* tendrían un efecto aditivo sobre la expresión de *COX5b-1*.

La mutación de las dos secuencias ATCATT en M3 (y en la respectiva mutante puntual M3a) o la mutación de las dos secuencias similares al elemento *distalB* en M7 ocasionaron la pérdida completa de la expresión del gen reportero en plántulas y en tejidos vegetativos de plantas adultas, exceptuando el meristema apical del vástago. En concordancia con estos resultados, medidas de actividad GUS específica en extractos proteicos de plántulas mostraron que la mutación de las dos secuencias similares al elemento *distalB* produjo un efecto similar al observado para la mutación de las dos secuencias ATCATT o para la delección completa de la región del promotor de *COX5b-1* comprendida entre -333 y -259 (Figura 18C). En flores, en cambio, las mutaciones de las dos

secuencias similares al elemento *distalB* o de las dos secuencias ATCATT ocasionaron una caída menor en actividad respecto de lo observado para la delección completa de la región -333/-259 (Figura 18D). Esto estaría indicando que las secuencias ATCATT y las secuencias similares al elemento *distalB* tendrían un efecto aditivo en la expresión del gen *COX5b-1* en flores. Se podría especular, también; acerca de la presencia de un tercer grupo de proteínas, capaces de interactuar tanto con las proteínas que reconocerían las secuencias similares al elemento *distalB* como con las proteínas que unirían las secuencias ATCATT. Este tercer grupo de proteínas sólo se expresaría en tejidos vegetativos y la acción de los tres grupos mencionados ocasionaría un aumento de la expresión de *COX5b-1* mayor al originado por las proteínas que reconocerían las secuencias similares al elemento *distalB* y las secuencias ATCATT (Figura 19).

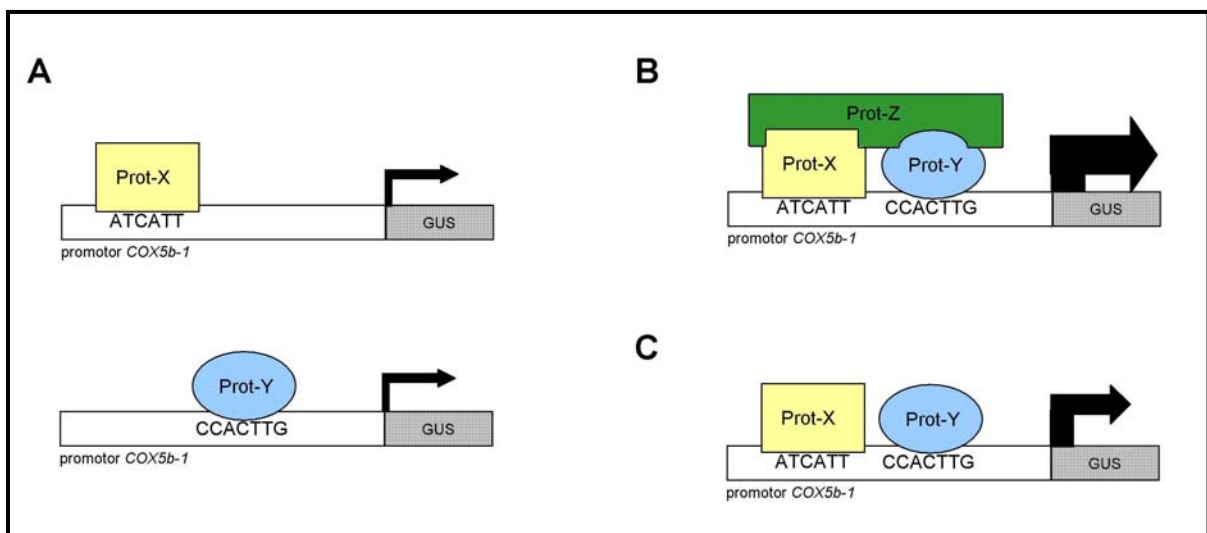


Figura 19. Representación esquemática del modelo propuesto de interacción de proteínas con los elementos *cis* presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*. **(A)** Las proteínas que unen las secuencias ATCATT (prot-X) y las que reconocen las secuencias similares al elemento *distalB* (prot-Y) serían capaces de aumentar la expresión del gen en forma independiente entre sí. **(B)** En tejidos vegetativos, el efecto activador sería máximo debido a la acción de un hipotético tercer grupo de proteínas (prot-Z), las cuales unirían en forma simultánea a las prot-X y prot-Y. **(C)** En flores no se expresarían las prot-Z, por lo que el efecto activador se debería a la suma de los efectos individuales de las prot-X y las prot-Y.

4.2.3.1. Proteínas nucleares son capaces de interactuar *in vitro* con los elementos identificados en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*.

La presencia de proteínas capaces de unir la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* se evaluó mediante ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares

preparados a partir de inflorescencias de coliflor. En la Figura 20 se puede observar que el fragmento de promotor marcado radiactivamente originó tres complejos de unión de diferente movilidad (denominados A, B y C) en presencia de extractos nucleares y ante la presencia de un exceso de competidor inespecífico no marcado. Se realizaron ensayos de competencia usando fragmentos de promotor no marcado radiactivamente para evaluar y delimitar las regiones necesarias para la formación de los diferentes complejos. La formación de todos los complejos de unión se compitió eficientemente por un exceso molar de 25 veces de fragmento no marcado con respecto a la cantidad utilizada de promotor marcado (Figure 8, calles 2 y 3). Al utilizar como competidores los fragmentos que poseían las mutaciones puntuales en regiones adyacentes entre los nucleótidos -333 y -289 (mutaciones M1, M2 y M3) o un fragmento de promotor comprendido entre -284 y -237 (denominado #2), se observó una reducción en la competencia, principalmente a nivel del complejo con movilidad intermedia (complejo B). En cambio, cuando se utilizaron como competidores el fragmento con las dos secuencias similares al elemento *distalB* mutadas (mutación M7) o un fragmento de promotor comprendido entre -333 y -285 (denominado #1), que no contenía estas secuencias pero sí todas las secuencias de núcleo TCAT, se observó una reducción en la competencia a nivel del complejo de mayor movilidad, esto es, del complejo C (Figura 20). Estos resultados indican que el complejo C estaría formado por proteínas capaces de interactuar con las secuencias similares al elemento *distalB*, mientras que el complejo B estaría formado por proteínas capaces de interactuar con las secuencias ATCATT, dado que la competencia se reduce cuando se utilizan fragmentos que no tienen estas secuencias como competidores. Una observación llamativa fue la competencia observada cuando se utilizó el fragmento M2 (el cual posee mutado el elemento P1BS), dado que este fragmento no tiene afectadas las secuencias ATCATT. La mutación M2 se localiza entre las secuencias ATCATT de la región M3 y las secuencias de núcleo TCAT de la región M1, por lo que podría especularse que ocurre una modificación del entorno cercano a las secuencias de núcleo TCAT, lo cual podría afectar la unión de las proteínas a estas secuencias. Sin embargo, esto también podría indicar que grupos diferentes de proteínas podrían unirse en forma mutuamente excluyente a esta región del promotor, ya sea a los elementos de núcleo TCAT o al elemento P1BS, originando complejos de movilidad similar, siendo imposible distinguirlos en las condiciones del ensayo. El complejo A, de movilidad menor, podría estar formado por la interacción de proteínas tanto con las secuencias de núcleo TCAT como con las secuencias similares al elemento *distalB*, debido a que la competencia se ve afectada en forma similar cuando se utilizan como competidores los diferentes fragmentos mutados o deletados. Estos resultados son consistentes con el modelo propuesto en la Figura 19. Finalmente, el fragmento -260/-237 del promotor (denominado #3), localizado por fuera de

la región que contiene las secuencias ATCATT y las secuencias similares al elemento *distalB*, fue incapaz de competir por la formación de los complejos observados, sugiriendo que la unión de las proteínas a la región de promotor estudiada fue específica.

Los resultados obtenidos indicaron que diferentes proteínas (o grupos de ellas) presentes en extractos nucleares son capaces de interactuar *in vitro* y en forma específica con las secuencias ATCATT y las secuencias similares al elemento *distalB* identificadas en la región del promotor de *COX5b-1* comprendida entre -333 y -259.

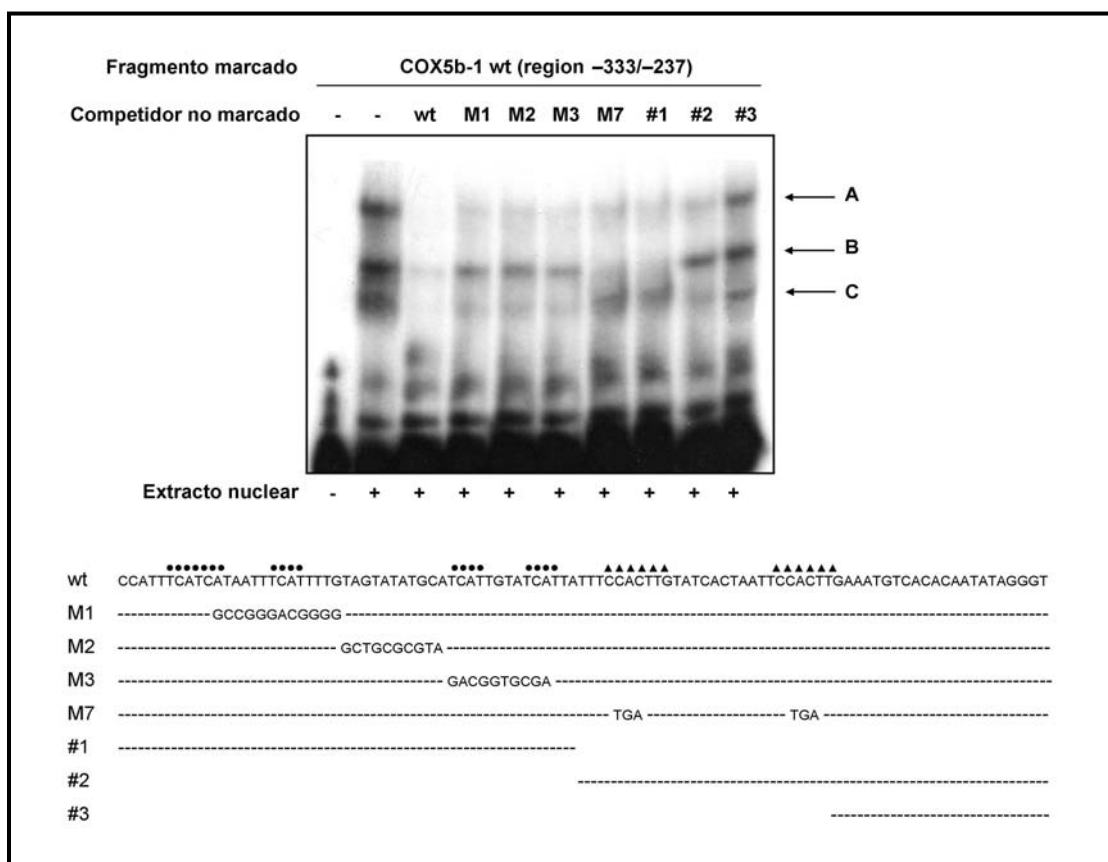


Figura 20. Proteínas nucleares son capaces de unir la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*. Ensayos de retardo en gel con extractos nucleares (10 µg) y el fragmento -333/-237 del promotor marcado radiactivamente. Los complejos de unión se indican como A, B y C. La unión se analizó con y sin la adición de competidores no marcados en una concentración molar 25 veces mayor a la del fragmento marcado. La secuencia de los fragmentos utilizados como competidores se muestra debajo de la imagen (sólo se indican los nucleótidos mutados en cada caso). La ubicación de los núcleos TCAT y de las secuencias similares al elemento *distalB* se destaca con círculos y triángulos, respectivamente, arriba de la secuencia del promotor de *COX5b-1*.

4.2.4. El gen *COX5b-1* se induce por sacarosa, ABA y otros factores.

Estudios previos realizados en el laboratorio mostraron que el promotor de *COX5b-1* permite la inducción del gen reportero *gus* en presencia de sacarosa y citoquininas, encontrándose las secuencias responsables de estas respuestas corriente abajo del nucleótido -387 (Welchen y col., 2004).

En el presente trabajo se analizó el efecto de incubar plantas transformadas con varios compuestos y bajo diferentes condiciones (ver punto 3.6.5), determinando los niveles de expresión del gen reportero *gus* bajo el control del fragmento de 2 kpb del promotor de *COX5b-1*. Además de la sacarosa y la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP), se observó que el promotor de *COX5b-1* se induce por el tratamiento de plantas con las hormonas ácido abscísico (ABA) y ácido giberélico (GA) y el precursor de etileno, ácido amino-1-ciclopropano carboxílico (ACC). También se observó una inducción significativa con fosfato de potasio y H₂O₂ (Figura 21A), mientras que la incubación con auxinas, metiljasmonato, ácido salicílico, cloruro de sodio o la irradiación con luz UV-B no produjeron cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión del gen reportero (no se muestra). Todos los ensayos se realizaron en medio líquido, sumergiendo las raíces de las plantas en medio MS conteniendo los factores a ensayar.

Dentro de los compuestos analizados, se demostró previamente que los carbohidratos producían un incremento en los niveles endógenos de transcritos de *COX5b-1*, según los resultados obtenidos por ensayos de *northern blot* (Welchen y col., 2002). En este trabajo, se intentó determinar si los restantes efectores del promotor de *COX5b-1* identificados mediante el análisis de actividad GUS en plantas transformadas también eran capaces de inducir la expresión del gen endógeno. Para ello, se determinaron los niveles relativos de transcritos de *COX5b-1* en plantas no transformadas luego de la incubación con los diferentes efectores y en las mismas condiciones generales, utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados de estos ensayos mostraron que todos los tratamientos que aumentaban la expresión del gen reportero *gus* en plantas transformadas también ocasionaban un incremento en los niveles de transcritos de *COX5b-1* en plantas no transformadas (Figura 21B), sugiriendo que, realmente, estos compuestos regulan la expresión del gen.

El paso posterior fue determinar las regiones mínimas del promotor de *COX5b-1* requeridas para estas respuestas, analizando el conjunto de delecciones y mutantes descritas en las secciones anteriores de este Capítulo.

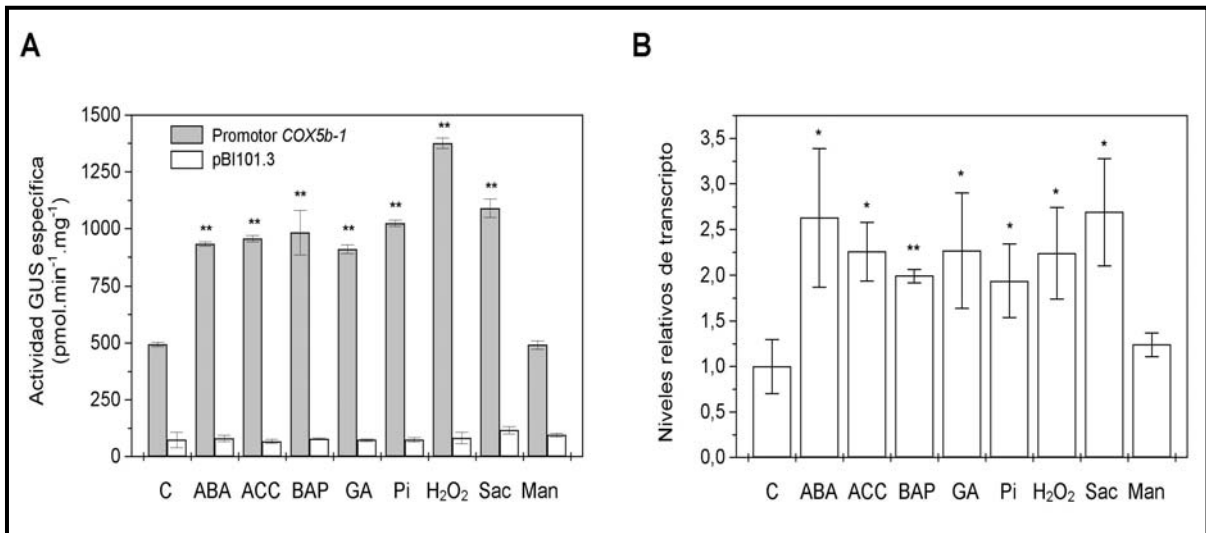


Figura 21. El promotor de *COX5b-1* responde a diferentes compuestos. **(A)** Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 21 días que contenían el fragmento de 2 kpb del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus*. Durante el experimento, las raíces de las plantas se sumergieron en medio MS sólo (C) o suplementado con sacarosa (Sac) 3% (p/v), manitol (Man) 3% (p/v), 6-bencilaminopurina (BAP) 0,1 mM, ácido abscísico (ABA) 0,1 mM, ácido amino-1-ciclopropano carboxílico (ACC) 0,1 mM, ácido giberélico (GA) 0,1 mM, fosfato de potasio (Pi) 10 mM o H₂O₂ 10 μM, como se indica. Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (±SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. **(B)** Niveles relativos de transcritos de *COX5b-1* en plantas no transformadas luego de los mismos tratamientos descritos en A. Las muestras de ARN total se analizaron mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando la expresión de los genes *ACT2* y *ACT8* como valor de normalización entre las muestras control y las tratadas. Los resultados indican el promedio (±SD) de tres experimentos independientes. En **(A y B)**, la significancia de los cambios producidos por cada tratamiento respecto al control se evaluó aplicando el test de Student (*P < 0,05; **P < 0,01).

4.2.5 Identificación de las regiones mínimas del promotor de *COX5b-1* necesarias para la respuesta a diferentes compuestos.

Las plantas transformadas con diferentes construcciones del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus* fueron incubadas con los efectores mencionados anteriormente (sección 4.2.4). La medición de los niveles de actividad GUS permitió determinar qué regiones del promotor eran requeridas para las respuestas observadas.

La delección de secuencias situadas corriente arriba del nucleótido -609 anuló la inducción del promotor por giberelinas y fosfato (Figura 22A,B), indicando que los ele-

mentos *cis* involucrados en estas respuestas se sitúan en regiones relativamente alejadas del sitio de inicio de la transcripción. Existen varias secuencias correspondientes a elementos de respuesta a giberelinas (GAREs en la bibliografía) en la región -2000/-609 del promotor de *COX5b-1*. Esta región no fue investigada en mayor detalle.

El efecto del ACC, precursor de etileno, se anuló delecionando la región situada corriente arriba de -387 (Figura 22C), indicando que el/los elemento/s involucrados en la respuesta a etileno se encontraría/n en la misma región del promotor de *COX5b-1* en la cual se sitúa el elemento regulador negativo de la expresión en hojas, según lo reportado previamente (Welchen y col., 2004). El análisis de bases de datos de elementos *cis* regulatorios indicó la presencia de la secuencia ACTTCAA en la región -609/-387 del promotor, más precisamente en el nucleótido -449. Esta secuencia es idéntica al elemento de respuesta a etileno (ERE) reportado para varios genes de *Lycopersicon esculentum* (tomate) involucrados en el proceso de maduración de frutos (Tapia y col., 2005). Además, se encontraron dos secuencias AACCAA, localizadas en los nucleótidos -401 y -474, idénticas a un elemento presente en la región promotora del gen *Lhcb21* de *Lemna gibba* (lenteja de agua) y reconocido por la proteína REalpha, la cual se detecta en grandes cantidades en hojas de plantas etioladas respecto a hojas de plantas verdes (Degenhardt y Tobin, 1996).

La inducción por H₂O₂ se conservó aún en el fragmento con la deleción hasta -259 (Figura 22E), el fragmento más pequeño con actividad GUS detectable. El promotor de *COX5b-1* posee la secuencia AGTGACCAATTC localizada en el nucleótido -169 (subrayado se destaca el sitio de inicio de la transcripción, localizado en -163), la cual puede descomponerse en dos secuencias parcialmente superpuestas: el elemento *CAAT-box*, presente en la región 5' no codificante de numerosos genes eucariotas y reportado como elemento activador de la transcripción (Haralampidis y Hatzopoulos, 2002) y la secuencia AGTGAC, la cual es idéntica al núcleo central del elemento ARE (antioxidant responsive element), identificado en la región 5' no codificante de genes codificantes para la subunidad Ya de la glutatión S-transferasa y para la NAD(P)H quinona reductasa. Este elemento, de secuencia (A/G)GTGACNNNGC, se activa en presencia de peróxido de hidrógeno y compuestos aromáticos metabolizables, y se postula que podría formar parte de las vías de transducción de señales que permiten a las células eucariotas detectar el aumento de especies reactivas del oxígeno y responder al estrés oxidativo (Rushmore y col., 1991).

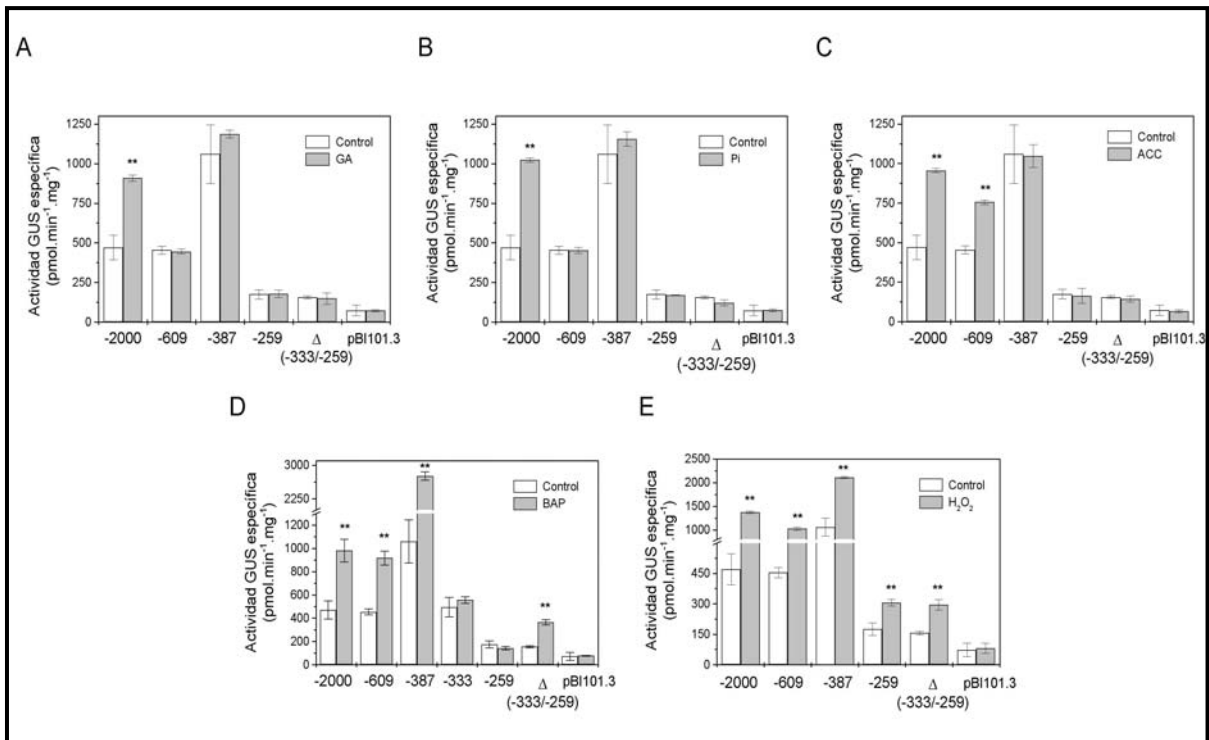


Figura 22. Regiones mínimas del promotor de *COX5b-1* requeridas para las respuestas a giberelinas, fosfato, etileno, H₂O₂ y citoquininas. Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 21 días que contenían deleciones del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus*. Las raíces de las plantas se sumergieron en medio MS sólo (C) o suplementado con ácido giberélico (GA) 0,1 mM (A), fosfato de potasio (Pi) 10 mM (B), ácido amino-1-ciclopropano carboxílico (ACC) 0,1 mM (C), 6-bencilaminopurina (BAP) 0,1 mM (D) o H₂O₂ 10 μM (E). Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (±SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada tratamiento respecto al control se evaluó aplicando el test de Student (**P < 0,01).

En el caso de los ensayos con la citoquinina BAP, la inducción se observó para la construcción -387 pero no para la deleción siguiente, hasta -333 (Figura 22D), indicando que el elemento involucrado en la respuesta a citoquininas estaría localizado en la región de 54 pb que también ocasiona una disminución moderada en la expresión basal del gen reportero cuando se delecciona, como se comentó anteriormente (Figura 14). Es interesante destacar que la inducción se observó en plantas que contenían la deleción de la región -333/-259 en el contexto del fragmento -387 del promotor, indicando que la región delecionada no es requerida para la acción de las citoquininas. El análisis de bases de

datos reveló la presencia en el nucleótido -342 de la secuencia GGATT, idéntica a un elemento presente en genes de *Oryza sativa* (arroz), el cual es reconocido por el factor de transcripción ARR1, activador transcripcional dependiente de citoquininas (Ross y col., 2004). En ensayos de retardo en gel (EMSA) con extractos nucleares preparados a partir de inflorescencias de coliflor se observó que el fragmento -387/-321 del promotor de *COX5b-1* fue capaz de formar un complejo de unión ADN-proteína (no se muestra), indicando que este fragmento sería reconocido *in vitro* por proteínas presentes en el extracto nuclear. Sin embargo, no se evaluó la especificidad de unión de las proteínas presentes en el extracto ni se determinó exactamente a qué secuencia se unirían debido a la ausencia de una mutante puntual en esta región del promotor.

Las respuestas a los compuestos mencionados anteriormente no se profundizaron más allá de lo descrito en este Trabajo de Tesis.

En cuanto a la inducción por sacarosa, la misma no mostró variaciones al realizar deleciones progresivas hasta el nucleótido -333, considerando los valores relativos de actividad respecto de las plantas control. La inducción se anuló para el fragmento -259 y para la deleción de la región -333/-259 en el contexto del fragmento -387 (Figura 23A), sugiriendo que los posibles elementos de respuesta a sacarosa estarían presentes en la región del promotor de *COX5b-1* comprendida entre los nucleótidos -333 y -259. Esta es la región involucrada en maximizar la expresión del gen en tejidos vegetativos a través de secuencias de núcleo ATCATT y secuencias similares al elemento *distalB* (véase punto 4.3.2). Por otra parte, no se observó inducción al tratar las plantas con medio MS con manitol 3% (p/v), indicando que la inducción no es el resultado de un aumento en la presión osmótica. Se evaluó también el efecto de la glucosa y la fructosa en forma individual y combinada para determinar si la inducción generada por la sacarosa se debe a la acción del disacárido *per se* o a la acción individual y/o sinérgica de los monosacáridos que componen la sacarosa. En la Figura 23B se observa que tanto la glucosa como la fructosa, o la combinación de ambas, fueron capaces de inducir el promotor de *COX5b-1*, pero en niveles inferiores a los observados para la sacarosa, indicando que el promotor de *COX5b-1* es capaz de responder a diversas fuentes de carbono, pero el efecto máximo se observa en presencia de sacarosa. Estos resultados son consistentes con numerosos reportes en la bibliografía sobre la función de la sacarosa como molécula de señalización intracelular propiamente dicha (Sheen y col., 1999; Rook y col., 2001).

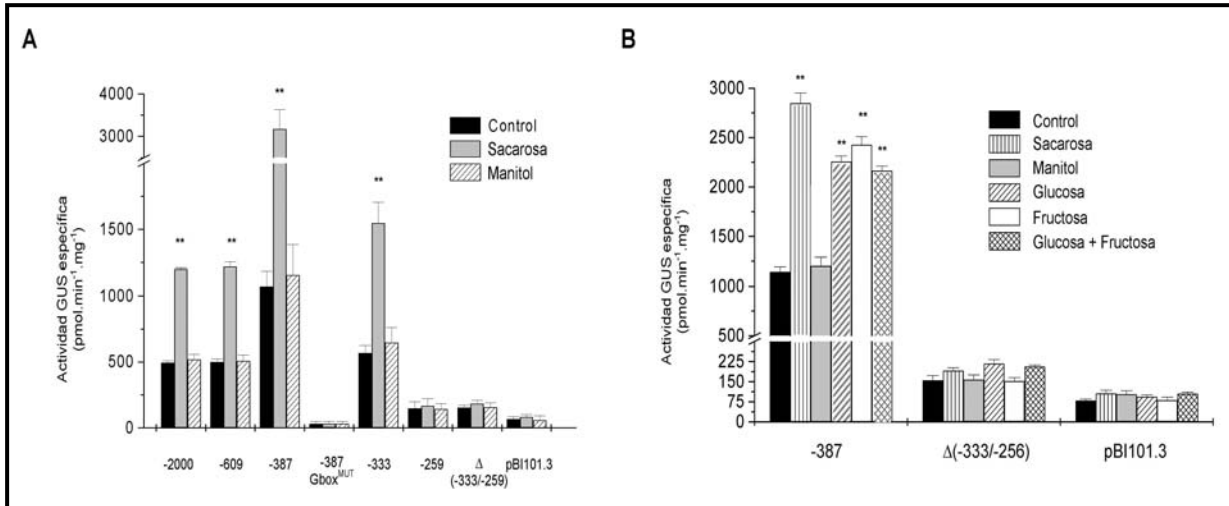


Figura 23. Identificación de la región mínima del promotor de *COX5b-1* requerida para la respuesta a sacarosa. Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 21 días que contenían deleciones del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus*. Las raíces de las plantas se sumergieron en medio MS sólo (Control) o suplementado con sacarosa, manitol, glucosa, fructosa o una mezcla de estas últimas. En todos los casos, incluso para la mezcla de glucosa + fructosa, se utilizó 3% (p/v) de cada azúcar. Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada tratamiento respecto al control se evaluó aplicando el test de Student (**P < 0,01).

La inducción observada en plantas tratadas con la hormona ABA se mantuvo en todas las construcciones que producen actividad GUS. Sin embargo, la deleción de la región -333/-259 originó una reducción notoria en los niveles de inducción, similar a la observada para la deleción de nucleótidos corriente arriba de -259 (Figura 24A), sugiriendo que en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* existen elementos necesarios para incrementar la respuesta a ABA, probablemente en combinación con algún elemento localizado corriente abajo.

Existen vías de señalización comunes entre la hormona ABA y los azúcares, y se han reportado efectos sinérgicos entre estos compuestos, según estudios en los cuales se observó que el efecto combinado fue largamente superior al correspondiente a la simple sumatoria de los efectos individuales (Gazzarrini y McCourt, 2001; Rook y col., 2001; Cakir y col., 2003; Acevedo-Hernández y col., 2005). Se decidió, entonces, evaluar si existen efectos sinérgicos entre sacarosa y ABA en la inducción de *COX5b-1*, midiendo los niveles de actividad específica GUS en plántulas incubadas en forma simultánea con ambos compuestos. En la Figura 24B se muestran los valores de las medidas correspon-

dientes, los cuales indicaron que el efecto combinado en la activación del gen reportero fue similar a la sumatoria de los efectos individuales producidos por cada compuesto, sugiriendo que el ABA y la sacarosa intervienen en cascadas independientes de transducción de señales destinadas a activar la expresión del gen *COX5b-1*.

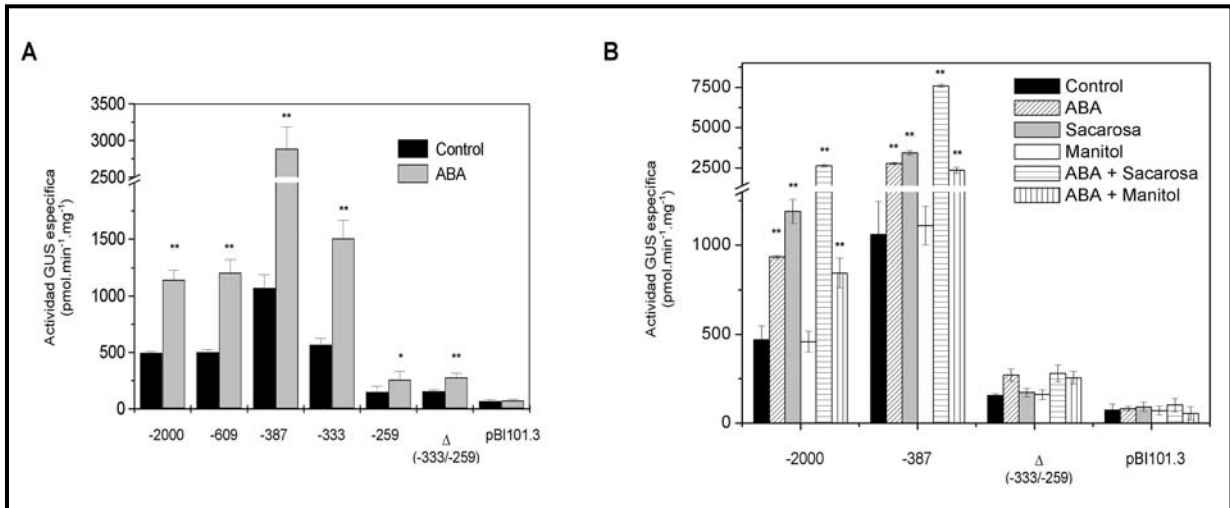


Figura 24. Identificación de la región mínima del promotor de *COX5b-1* requerida para la respuesta a ABA. Medida de la actividad GUS en plántulas de 21 días que contenían delecciones del promotor fusionado al gen reportero *gus*. Las raíces de las plantas se sumergieron en medio MS sólo (Control) o suplementado con ácido abscísico (ABA) 0,1 mM (A) o con ABA 0,1 mM y sacarosa 3% (p/v) simultáneamente (B). Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor (pBI101.3) se utilizaron como control negativo. Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada tratamiento respecto al control se evaluó aplicando el test de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

En conclusión, la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* posee elementos involucrados en la respuesta a sacarosa y ABA, los cuales parecen actuar en forma independiente. La disponibilidad de una gran cantidad de mutantes puntuales en esta región del promotor, comentadas con anterioridad en este Trabajo, permitió evaluar con más detalle estas respuestas.

4.2.5.1. Las secuencias ATCATT presentes en la región promotora -333/-259 de *COX5b-1* son responsables de la respuesta a sacarosa.

Analizando la inducción por sacarosa en plantas con diferentes mutaciones en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus*, se observó

que se perdía la inducción en la mutante M3, aquella que tenía mutada la región -299/-289 en el contexto del fragmento -387 del promotor (Figura 25). Esta región contiene las secuencias ATCATT necesarias para la máxima expresión del gen. Además, las mutaciones puntuales en los núcleos TCA de las dos secuencias ATCATT incluidas en la región M3 (mutante M3a) también anularon la inducción por sacarosa, indicando que las secuencias ATCATT presentes en el promotor de *COX5b-1* formarían parte de elementos de respuesta a sacarosa y, probablemente, a carbohidratos en general. Es notorio destacar que, aún manteniendo una pequeña inducción respecto de las plantas sin tratar, el efecto de la sacarosa se redujo de manera importante en las mutantes M1 y M3b (Figura 25), las cuales tienen afectadas secuencias muy similares a las secuencias ATCATT (mutante M1) o nucleótidos adyacentes a estas secuencias (mutante M3b).

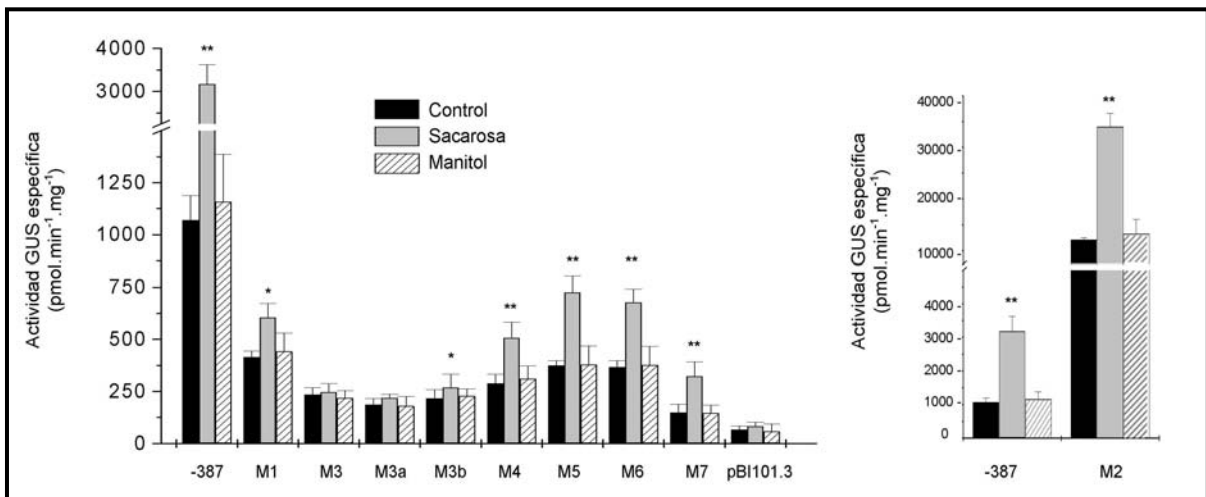


Figura 25. Las secuencias ATCATT presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* son responsables de la respuesta a sacarosa. Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 21 días que contenían diferentes construcciones del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus*. Las raíces de las plantas se sumergieron en medio MS sólo (Control) o suplementado con sacarosa 3% (p/v). Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada mutación se evaluó aplicando el test de Student (*P < 0,05; **P < 0,01).

4.2.5.2. Las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en la región promotora -333/-259 de *COX5b-1* intervienen en la respuesta a ABA

La delección completa de la región -333/-259 en el contexto del fragmento -387 del promotor de *COX5b-1* originó una reducción notoria de los niveles de inducción por la

hormona ABA. Al analizar mutantes puntuales, este comportamiento sólo se observó al mutar en forma simultánea las dos secuencias similares al elemento *distalB* (mutante M7, Figura 26), sugiriendo que estas secuencias podrían actuar como elementos potenciadores de la inducción por ABA. Según los resultados obtenidos, la presencia de una sola de las secuencias similares al elemento *distalB* sería suficiente para incrementar la respuesta a ABA, dado que las mutantes individuales en estas secuencias (mutantes M4 y M6, Figura 26) mantuvieron la respuesta a la hormona.

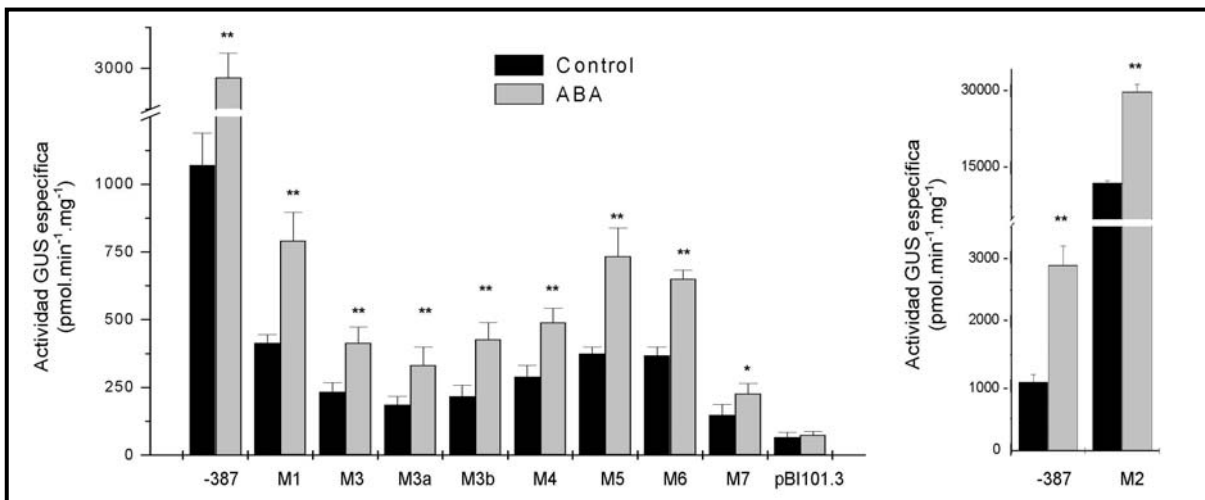


Figura 26. Las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* son necesarias para incrementar la respuesta a ABA. Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 21 días que contenían diferentes construcciones del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus*. Las raíces se sumergieron en medio MS sólo (Control) o suplementado con ABA 0,1 mM. Plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada mutación se evaluó aplicando el test de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

4.3. DISCUSIÓN

La biogénesis y el mantenimiento de las funciones mitocondriales normales requieren la expresión coordinada y el ensamblaje correcto de proteínas codificadas en dos genomas distintos, el nuclear y el mitocondrial, dado que el genoma de la organela codifica sólo para el 3% de las proteínas mitocondriales (Unselde y col., 1997). Deberían existir, entonces, mecanismos que regulen la expresión coordinada de los genes presentes en

ambos genomas a fin de asegurar la correcta biogénesis de los componentes mitocondriales y una actividad metabólica adecuada a los requerimientos de las plantas de acuerdo a su ciclo de vida y en respuesta a estímulos ambientales. Estudios previos revelaron la existencia de una regulación coordinada de la expresión de algunos componentes de los complejos respiratorios codificados en el núcleo debido a diferentes estímulos impuestos por el medio ambiente (Felitti y col., 1997; Figueroa y col., 2001; Welchen y col., 2002; Curi y col., 2003) o por inhibición o alteración del normal funcionamiento de la actividad respiratoria mitocondrial (Yu y col., 2001; Taylor y col., 2003; 2004). En el mismo sentido, Giegé y col. (2005) sugirieron que la biogénesis mitocondrial estaría regulada por cambios en la expresión de genes nucleares y por una coordinación a nivel postraduccional durante el ensamblado de los distintos componentes en la membrana interna mitocondrial, según estudios en los cuales analizaron la abundancia y los cambios en los niveles de transcritos de genes codificantes para componentes de los cinco complejos integrantes de la cadena de transporte de electrones ubicados en ambos genomas.

En plantas, la expresión de un importante grupo de genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial está coordinada bajo determinadas condiciones (González y col., 2007). Específicamente para las subunidades de la enzima citocromo *c* oxidasa (COX), se ha observado que los niveles de transcritos de los genes nucleares codificantes para las subunidades 5b, 6a y 6b se elevan cuando las plantas se incuban en presencia de carbohidratos, mientras que no ocurre lo mismo para los niveles de transcritos del gen mitocondrial COX2 (Welchen y col., 2002; Curi y col., 2003). La inducción por carbohidratos también ha sido observada para los dos genes de *Arabidopsis* codificantes para el citocromo *c*, cuya actividad está íntimamente relacionada con la función de COX (Welchen y col., 2002). La mayoría de los genes que desarrollan respuestas coordinadas presentan elementos de secuencia TGGGC(C/T), denominados *site II* (Kosugi y col., 1995; Kosugi y Ohashi, 1997) en las regiones promotoras próximas al sitio de inicio de la traducción. Este es el caso de los seis genes que codifican las diferentes isoformas de citocromo *c* y las subunidades 6a y 6b de la citocromo *c* oxidasa (Welchen y González, 2006). A pesar de que los elementos *site II* presentes en las regiones promotoras de los genes mencionados demostraron ser funcionales mediante ensayos de mutagénesis, el efecto de la mutación fue diferente para cada gen, observándose desde una pérdida completa de la expresión del gen hasta efectos marginales solamente (Welchen y González, 2005; Mufarrege y col., 2009; Welchen y col., 2009), sugiriendo la presencia de elementos *cis* específicos en cada gen que influirían en forma diferente la acción de los elementos *site II*. Por otro lado, algunos genes que participan en forma coordinada con los anteriores no poseen elementos *site II* en sus regiones promotoras,

sugiriendo que se habrían seleccionado diferentes mecanismos de expresión, pero manteniendo respuestas similares. Uno de los genes que muestra estas características es *COX5b-1*, el cual es regulado por carbohidratos en forma coordinada con otros genes codificantes para componentes de la maquinaria de respiración (Welchen y col., 2002) pero no posee elementos *site II* en su región promotora.

El conocimiento de los elementos y factores involucrados en la expresión del gen *COX5b-1* podría tener interesantes implicancias mecánicas y evolutivas. Por tal motivo, se decidió caracterizar detalladamente la región promotora del mencionado gen para determinar los elementos *cis* regulatorios involucrados en la expresión basal del gen y en la respuesta a determinados estímulos o señales fisiológicas.

Según los resultados comentados en el presente Capítulo, el elemento G-box (CACGTG) presente en el nucleótido -228 desde el sitio de inicio de la traducción de *COX5b-1* es esencial para la expresión del gen, mientras que un motivo ACGT situado corriente abajo del mencionado elemento, en un arreglo similar al observado en otros genes, no es funcional. Existen numerosos reportes en la bibliografía sobre la función de elementos G-box, los cuales desempeñan funciones de regulación de la expresión génica en respuesta a diversos factores (Schulze-Lefert y col., 1989; Donald y Cashmore, 1990; Kim y col., 1992; Salinas y col., 1992; Menkens y col., 1995; Ishige y col., 1999; Hudson y Quail, 2003). Además, una región localizada corriente arriba de este elemento, comprendida entre los nucleótidos -387 y -259, incrementa la expresión del gen, principalmente en tejidos vegetativos. En esta región también se encuentra un elemento regulador negativo, activo a nivel de raíces principalmente.

El promotor de *COX5b-1* se induce por varios compuestos. La sacarosa y otros carbohidratos podrían actuar como señales que promueven la síntesis de nuevos componentes de la maquinaria de respiración, los cuales están involucrados en su utilización (Felitti y González, 1998; Welchen y col., 2002). El efecto máximo se observa en presencia de sacarosa, resultado consistente con numerosos reportes en la bibliografía sobre la función de la sacarosa como molécula de señalización intracelular propiamente dicha (Sheen y col., 1999; Rook y col., 2001), participando en vías de transducción de señales comunes con hormonas clásicas como el ABA o el etileno (Ho y col., 2001; Acevedo-Hernández y col., 2005; Rook y col., 2006). La regulación coordinada de genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria parece ser ejercida por carbohidratos en varios sistemas analizados (Giegé y col., 2005; González y col., 2007). El entrecruzamiento entre las vías de señalización del ABA y de los azúcares ha sido reportado para la regulación de varios genes, mientras que tanto la hormona ABA como los carbohidratos son represores de la expresión de genes involucrados en los procesos fotosin-

téticos de las plantas (Rook y col., 2006). Se ha especulado también que la represión de genes fotosintéticos por ABA está relacionada con la reducción en la capacidad fotosintética de las plantas expuestas a estrés hídrico, evento que también ocasiona la acumulación de carbohidratos (Wingler y Roitsch, 2008). La expresión de *COX5b-1* parece ser antagonista respecto del comportamiento de los genes fotosintéticos en presencia de azúcares y ABA, quizás reflejando la necesidad de promover la producción de energía a través de la respiración cuando la fotosíntesis se encuentra reducida. A diferencia de la inducción por azúcares, la respuesta dependiente de ABA no ha sido reportada como una característica general de los genes codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. La inducción por citoquininas, en tanto, ha sido observada en genes codificantes para citocromo *c* (Welchen y González, 2005; Welchen y col., 2009). En este último caso, se sugirió que la inducción promovida por la mencionada hormona podría estar relacionada con el incremento en la proliferación celular, evento asociado con la síntesis de nuevos componentes celulares (Conlon y Raff, 1999). La biogénesis de mitocondrias podría ser requerida para proveer la energía necesaria para el proceso de proliferación y para mantener el número de mitocondrias en las células en rápida división. Los resultados detallados a lo largo de este Capítulo no indicaron si la expresión del gen *COX5b-1* responde directamente a la presencia de la hormona o a otros factores asociados con los efectos de las citoquininas sobre la proliferación celular o el metabolismo. La inducción por el tratamiento con H_2O_2 podría estar relacionada con el requerimiento de sintetizar nuevas subunidades para reemplazar aquellas dañadas por el estrés oxidativo. La subunidad COX5b contiene átomos de cinc asociados a su estructura, lo cual podría convertir a esta subunidad en el blanco de acción preferido de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Algunos genes codificantes para proteínas involucradas en la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa también se inducen por estrés oxidativo. Tal es el caso de las chaperonas COX17 y COX19 (Attallah y col., 2007). El significado fisiológico de la inducción por los restantes compuestos reportados en este Trabajo de Tesis es menos evidente. La multiplicidad de respuestas observadas para *COX5b-1* sugiere que este gen podría constituir el blanco de regulación preferido en los eventos de biogénesis de la citocromo *c* oxidasa, lo cual también es insinuado por el hecho de ser el blanco de acción de un miRNA, el miR398, involucrado en la regulación de la homeostasis de cobre (Yamasaki y col., 2007), aún cuando *COX5b-1* no codifica ninguna de las subunidades que unen cobre en el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

La región localizada corriente arriba del elemento G-box es requerida para la respuesta a sacarosa y para maximizar la respuesta a la hormona ABA. Esta región contiene elementos con la secuencia ATCATT y secuencias similares al elemento *distalB*. El ele-

mento *distalB* ha sido previamente descrito en la región promotora del gen *napA* de *B. napus* (nabo), donde conduce la expresión dependiente de ABA específicamente en semillas en conjunción con el elemento *proxB*, de secuencia ATCNAACAC (Ezcurra y col., 1999). Se ha sugerido que el elemento *proxB* constituye un elemento acoplado que restringe la expresión dependiente del elemento *distalB* a semillas. El elemento *proxB* no se encuentra presente en el promotor de *COX5b-1*, lo cual podría explicar que el elemento *distalB* sea funcional en tejidos vegetativos en este caso. El promotor *napA* también contiene un elemento G-box localizado corriente abajo del elemento *distalB* (Ezcurra y col., 1999). Estos datos sostienen la idea de que, al igual que para *napA*, el elemento G-box y las secuencias similares al elemento *distalB* podrían actuar en forma combinada para conducir la expresión de *COX5b-1*. El elemento G-box, además, forma parte de la secuencia ACGTGTC, reportada en la bibliografía como motivo ABRE (por ABA Responsive Element), presente en genes regulados por el ABA (Menkens y col., 1995; Hattori y col., 2002).

Los elementos que contienen la secuencia ATCATT se disponen en pares separados por cuatro nucleótidos y participan en la regulación de la actividad del gen determinando los niveles basales de expresión y la inducción de *COX5b-1* por sacarosa y otros carbohidratos. En la región promotora del gen *rbcS* de *Pisum sativum* (arveja) se encuentra un elemento *box III* (o *GT-1 box*) de secuencia ATCATTTTCACT involucrado en la activación transcripcional del gen (Villain y col., 1996). En las bases de datos de elementos regulatorios reportados no se han encontrado otros elementos que contengan la secuencia ATCATT. Por otro lado, en el promotor del gen β -*phaseolin* de *Phaseolus vulgaris* (poroto) se encuentran secuencias similares (TTCATT y ATCATC) fuertemente protegidas por proteínas presentes en semillas inmaduras de tabaco, según lo observado en estudios de *footprinting in vivo*, aunque no se profundizó en la importancia de estas secuencias en la actividad del gen (Li y Hall, 1999). En el gen *GRP1.8*, también de *P. vulgaris*, se identificó un elemento denominado RSE (Root-Specific Element), de secuencia CAAC~~T~~TTTCATAT involucrado en la expresión del gen en raíces (Elmayan y Tepfer, 1995). Este elemento contiene la secuencia TTTCAT, también observada corriente arriba de las secuencias ATCATT de *COX5b-1*.

En resumen, el gen *COX5b-1* de *Arabidopsis thaliana*, presente en el cromosoma tres, no posee elementos *site II* en su región promotora pero se regula en forma similar a otros genes nucleares codificantes para componentes del complejo citocromo *c* oxidasa en respuesta a carbohidratos. Esta respuesta observada en *COX5b-1* es conducida por elementos de secuencia ATCATT presentes en regiones promotoras proximales al sitio de inicio de la traducción, evidenciando que a lo largo de la evolución se han incorporado

nuevos elementos de respuesta a sacarosa y se han perdido los elementos *site II* ancestrales, siendo, quizás, la expresión coordinada de los genes nucleares el factor de selección de estos cambios.

A modo de síntesis de los resultados comentados a lo largo de este Capítulo, se muestra un esquema de las diferentes regiones (y las secuencias regulatorias identificadas) involucradas en la expresión y regulación de *COX5b-1* en respuesta a diferentes compuestos (Figura 27). Algunos de los factores de transcripción involucrados se analizarán en el Capítulo III del presente Trabajo de Tesis.

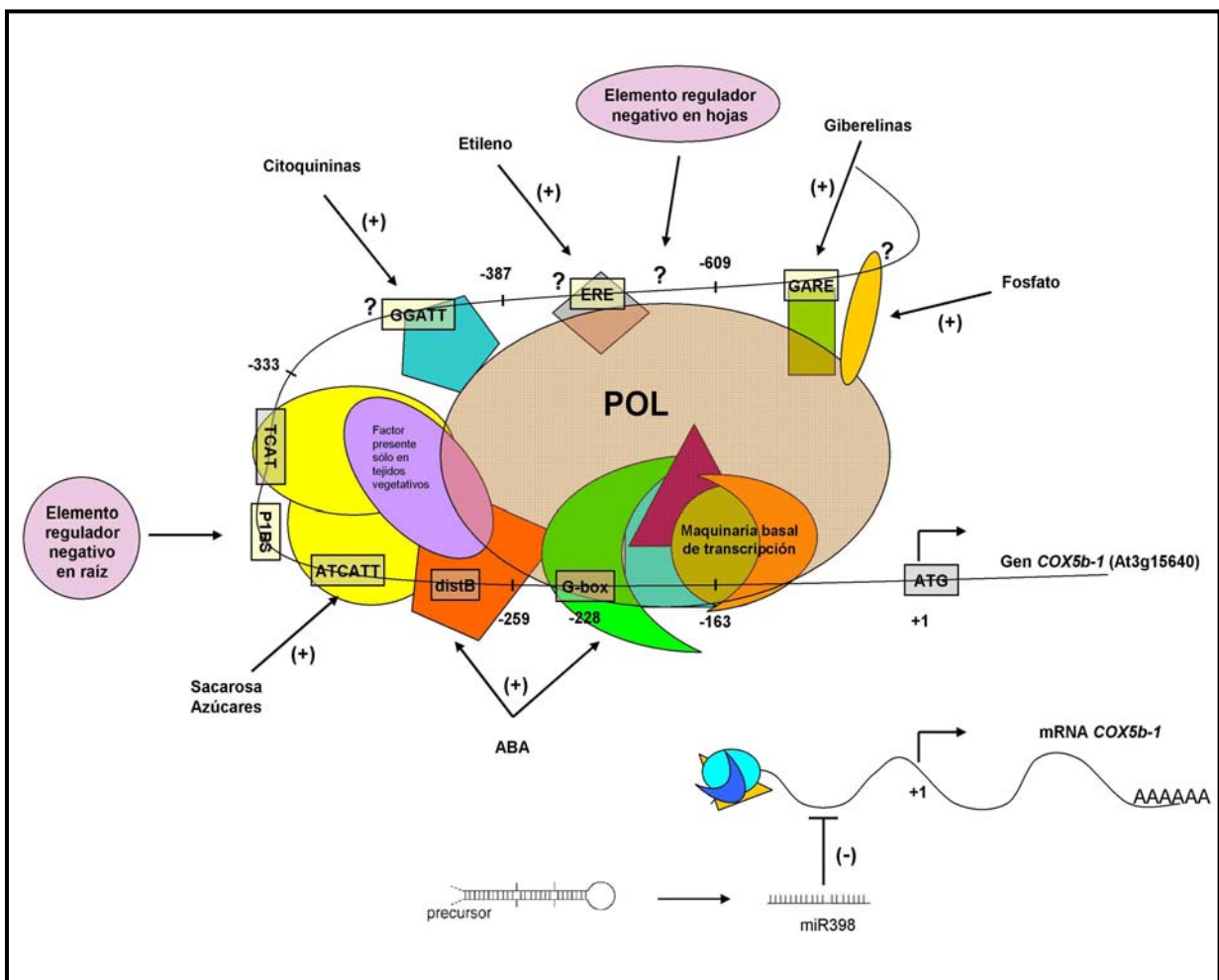


Figura 27. Representación esquemática de las regiones del promotor de *COX5b-1* y elementos *cis* responsables de la actividad y regulación del gen por diversos compuestos, según los resultados mencionados en este Capítulo. Las hipotéticas proteínas regulatorias se muestran en colores y los elementos *cis* recuadrados y en negrita. Referencias. (+): incrementa la expresión del gen; (-): inhibe la expresión; (?) elemento *cis* probable o desconocido; ERE: elemento de respuesta a etileno; GARE: elemento de respuesta a giberelinas. Se indica como +1 el sitio de inicio de la traducción. El sitio de inicio de la transcripción está localizado en la posición -163 del promotor de *COX5b-1*.

5. CAPÍTULO II

“Estudio de la región promotora del gen *COX5b-2*, codificante para otra isoforma de la subunidad 5b del complejo citocromo c oxidasa de *Arabidopsis thaliana*”

5.1. INTRODUCCIÓN

5.1.1. Biogénesis mitocondrial en plantas.

En el Capítulo anterior se comentó que la biogénesis de mitocondrias en plantas requiere la expresión tanto de genes presentes en el núcleo como de genes presentes en la organela. Sin embargo, la expresión del genoma mitocondrial no parece estar coordinada con la expresión de genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Giegé y col., 2005). Uno de estos componentes es la enzima citocromo c oxidasa (COX), la cual está compuesta por tres subunidades codificadas en el genoma mitocondrial y seis o siete subunidades (según la especie vegetal analizada) codificadas en el genoma nuclear (Jänsch y col., 1996; Barrientos y col., 2002; Millar y col., 2004). Una de las cuestiones más intrigantes acerca del proceso de biogénesis de la mencionada enzima es la identidad de las secuencias génicas regulatorias y las proteínas involucradas en la coordinación del proceso de expresión de las diferentes subunidades y el posterior ensamblado del complejo. El desarrollo de anteras y polen (Huang y col., 1994, Smart y col., 1994), así como el agregado de sacarosa en cultivos de células previamente desprovistas de nutrientes (Giegé y col., 2005), son eventos que ocasionan un incremento en la biogénesis de mitocondrias y este proceso implica necesariamente la expresión coordinada de varios genes. Se postula que la síntesis de subunidades de codificación nuclear sería el factor limitante para el correcto ensamblado de los complejos enzimáticos (Giegé y col., 2005). En concordancia con estos datos, varios genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria de respiración mitocondrial muestran expresión aumentada en anteras y se inducen por sacarosa y otros carbohidratos (Zabala y col., 1998, Elorza y col., 2004, Welchen y col., 2004, Welchen y González, 2005, González y col., 2009). La expresión de los genes nucleares estaría coordinada y regulada a nivel transcripcional y se han identificado elementos regulatorios conservados, re-

portados en la bibliografía como elementos *site II* (Kosugi y col., 1995), en las regiones promotoras proximales de la mayoría de estos genes. Estas secuencias constituyen potenciales sitios de reconocimiento para factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de los componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial codificados en el núcleo (Welchen y González, 2006; González y col., 2007).

5.1.2. Estudios sobre el gen *COX5b-2* (At1g80230)

En *Arabidopsis* se han identificado dos genes codificantes para la subunidad 5b de la enzima citocromo *c* oxidasa y un posible pseudogen. Los genes se ubican en el cromosoma III (número de acceso At3g15640) y en el cromosoma I (At1g80230), y se denominaron arbitrariamente *COX5b-1* y *COX5b-2*, respectivamente, según el orden de disponibilidad de las secuencias en las bases de datos (Welchen y col., 2002).

En el laboratorio se realizaron ensayos de *northern blot* para determinar los niveles de mensajero de los genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa (COX) en *Arabidopsis*. Los niveles de expresión de los genes *COX5b-1* y *COX5b-2* fueron elevados en flores. Sin embargo, los patrones de expresión fueron diferentes, siendo *COX5b-1* el gen que se expresó en la mayoría de los tejidos y en niveles más elevados. Además, los niveles de transcripto de los dos genes experimentaron un notorio aumento en presencia de hidratos de carbono metabolizables y sales de amonio (Welchen y col., 2002). La inducción por carbohidratos también se observó en otros genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial, en particular los genes codificantes para las subunidades 6a y 6b de la enzima COX y los dos genes codificantes para el citocromo *c* (Welchen y col., 2002; Curi y col., 2003). No se realizaron otros estudios involucrando al gen *COX5b-2*.

En el Capítulo I de este trabajo de Tesis se presentó el estudio de la región promotora del gen *COX5b-1*, señalando los elementos *cis* identificados y los agentes involucrados en la regulación de su expresión. En este Capítulo se presenta el estudio de la región promotora del gen *COX5b-2* siguiendo la misma metodología referida en el capítulo anterior. Los estudios y ensayos presentados en la siguiente sección permitieron establecer los patrones de expresión del gen *COX5b-2*, identificar algunos elementos *cis* regulatorios y los agentes implicados en el control de su expresión.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. El promotor de *COX5b-2* dirige la expresión del gen en forma específica de órgano o tejido.

El primer paso para dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la expresión y regulación del gen *COX5b-2* (At1g80230) de *Arabidopsis* fue el aislamiento de la región promotora del mismo. Un fragmento del gen *COX5b-2* de 1 kpb ubicado corriente arriba del ATG inicial se clonó delante del gen reportero *gus* y con esta construcción se transformaron en forma estable plantas de *Arabidopsis thaliana*. Entre diez y veinte líneas correspondientes a eventos independientes de integración en el genoma se seleccionaron y se analizaron mediante seguimiento histoquímico de la actividad GUS en distintos estadios de desarrollo. La actividad específica GUS se determinó mediante medida en extractos proteicos preparados a partir de plántulas y órganos separados de cinco líneas independientes.

Los ensayos de tinción histoquímica en plántulas y órganos aislados de las plantas transformadas indicaron que el promotor de *COX5b-2* dirige la expresión del gen reportero en forma específica de órgano o tejido, detectándose actividad GUS en meristema de raíz, meristema apical del vástago, ápice de cotiledones y hojas, y en anteras. La expresión también fue visible en el receptáculo y estigma de flores y vainas (Figura 28). Este patrón de expresión fue claramente diferente al observado para el promotor de *COX5b-1* (Welchen y col., 2004).

El análisis de la actividad específica GUS en extractos proteicos totales preparados a partir de plántulas de 4 y 15 días y hojas y flores aisladas de plantas transformadas permitió determinar que los niveles de expresión fueron notoriamente superiores en flores respecto a los niveles detectados en hojas o plántulas (Figura 29B-D), de manera similar a lo observado para *COX5b-1*.

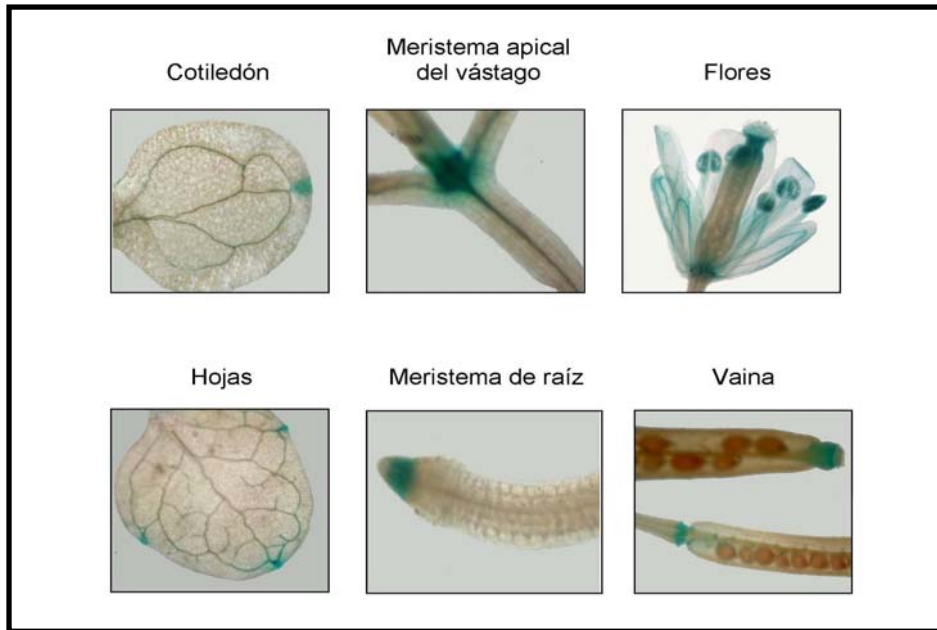


Figura 28. El promotor de *COX5b-2* dirige la expresión del gen en forma específica. Localización histoquímica de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con el promotor de *COX5b-2* fusionado al gen reportero *gus*. Imágenes representativas de 20 líneas analizadas.

5.2.2. El promotor de *COX5b-2* contiene elementos regulatorios positivos y negativos.

El estudio de la región promotora de *COX5b-2* se continuó realizando cinco deleciones progresivas a partir del extremo distal del promotor, originando fragmentos que contenían 620, 398, 199, 142 y 83 pb ubicados corriente arriba del ATG inicial. Estos fragmentos fueron fusionados al gen reportero *gus* y con ellos se transformaron en forma estable plantas de *Arabidopsis*. Entre diez y veinte líneas de cada construcción, correspondientes a eventos independientes de integración en el genoma, se seleccionaron y analizaron mediante seguimiento histoquímico de la actividad GUS en distintos estadios de desarrollo. La actividad específica GUS se determinó mediante medidas en extractos proteicos preparados a partir de plántulas y órganos separados de cinco líneas independientes de cada construcción.

Los ensayos de tinción histoquímica revelaron que la remoción de los 380 pb más distales del promotor (construcción -620) originó la aparición de expresión de GUS en la lámina de cotiledones y hojas, y en todos los tejidos de la raíz (Figura 29A), sugiriendo la presencia de uno o varios elementos regulatorios negativos de la expresión del gen en la región comprendida entre los nucleótidos -1000 y -620 desde el sitio de inicio de la traducción. La deleción de la región ubicada por encima de -398 ocasionó una reducción no-

toria en los niveles de expresión de GUS en cotiledones (Figura 29A), indicando que en la región -620/-398 se encontrarían uno o varios elementos activadores de la expresión activos a nivel de cotiledones. La actividad GUS fue anulada completamente en todos los órganos y tejidos de la planta al eliminar los nucleótidos situados por encima de -83 (Figura 29A), indicando que los elementos *cis* reconocidos por la maquinaria basal de transcripción se localizarían corriente arriba del nucleótido -83. Sin embargo, no puede excluirse la presencia de otros elementos necesarios, pero no suficientes, en la región promotora de *COX5b-2* ubicada corriente abajo de la posición -83.

Las medidas de actividad específica GUS en plántulas de 4 y 15 días y en hojas aisladas, en coincidencia con las observaciones realizadas en los ensayos de tinción histoquímica, indicaron que la remoción de la región situada por encima de -620 producía un evidente aumento de los niveles de actividad GUS respecto a los observados para el fragmento mayor de promotor (Figura 29B,C), mientras que en flores se producía un pequeño incremento en los niveles de expresión, detectable y estadísticamente significativo, pero mucho menos notorio (Figura 29D). La delección por encima de -398 ocasionó ligeras disminuciones en los niveles de expresión GUS respecto a la construcción -620, siendo más evidente esta disminución a nivel de plántulas, avalando la hipótesis mencionada anteriormente acerca de la presencia de un elemento activador en cotiledones. Las restantes delecciones del promotor ocasionaron una disminución progresiva en los niveles de actividad GUS hasta la completa eliminación de la misma sólo cuando se removieron los nucleótidos situados por encima de -83, construcción en la cual se detectaron niveles de actividad enzimática similares a los niveles de base obtenidos para plantas control transformadas con el vector pBI101.3, es decir, transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor (Figura 29B-D). Los resultados comentados sugieren la existencia de varios elementos reguladores positivos localizados en la región -398/-83 del promotor de *COX5b-2* y uno o varios elementos reguladores negativos en la región -1000/-398 del mismo.

Se decidió, entonces, profundizar el estudio de estas regiones del promotor de *COX5b-2* para determinar la identidad de los elementos *cis* involucrados en la regulación de la actividad del mencionado gen.

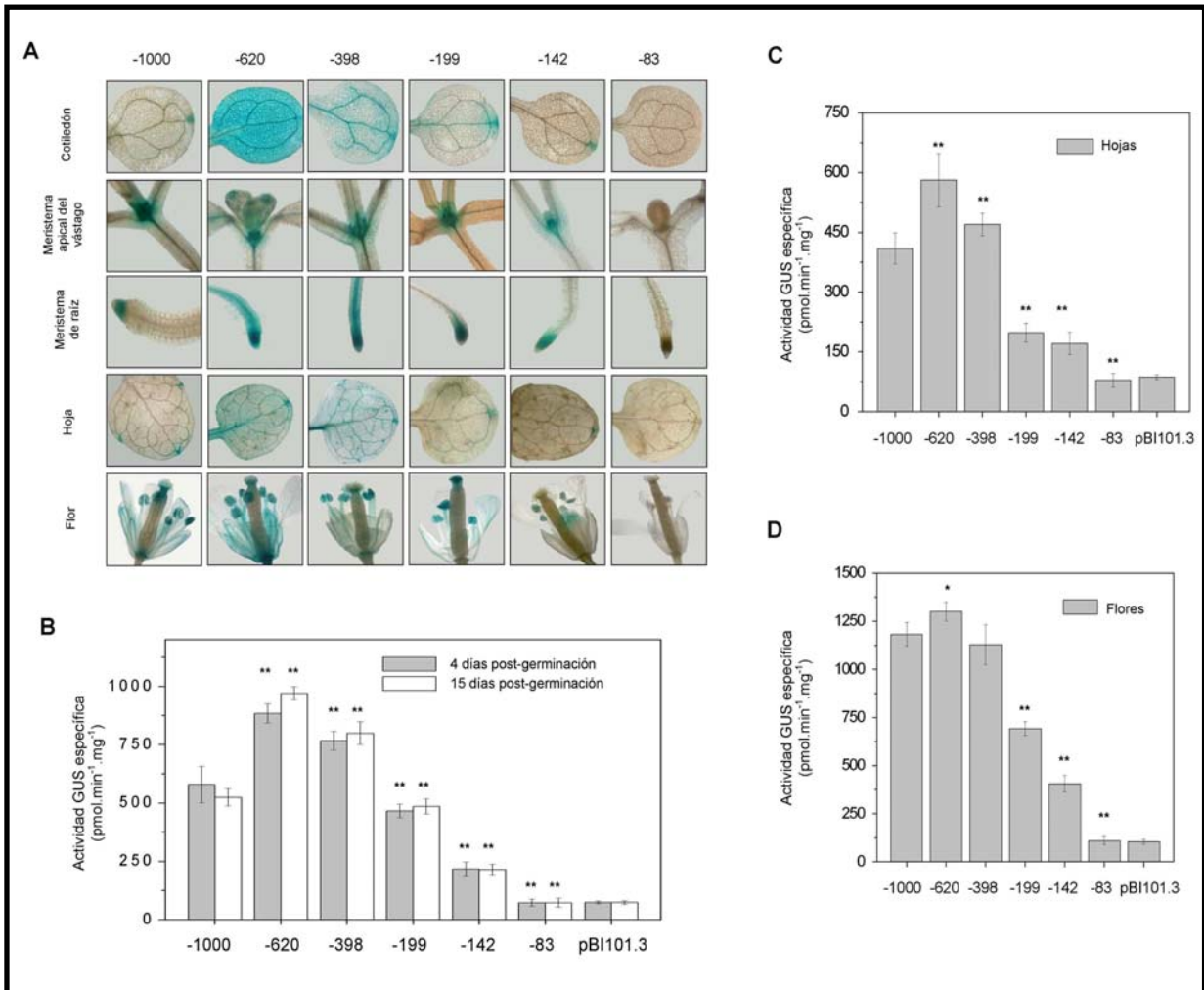


Figura 29. Análisis de actividad GUS conducida por formas deletionadas del promotor de *COX5b-2*. **(A)** Localización histoquímica de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con diferentes fragmentos del promotor de *COX5b-2* fusionados al gen reportero *gus*. Las imágenes son representativas de 10-20 líneas analizadas para cada construcción. **(B-D)** La actividad específica GUS se determinó mediante medidas en extractos de proteínas totales preparados a partir de plántulas de 4 y 15 días (B), flores (C) y hojas (D) de plantas transformadas con las diferentes construcciones. Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor fueron utilizadas como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos luego de cada deleción se evaluó aplicando el test de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

5.2.3. Un elemento G-box ubicado en la posición -636 del promotor de *COX5b-2* actúa como regulador negativo de la expresión del gen en tejidos vegetativos.

Un análisis informático empleando la base de datos PLACE (Plant Cis-acting Elements; Higo y col., 1999) fue el primer paso en la identificación de elementos *cis* que podrían estar involucrados en la regulación de *COX5b-2*.

La región promotora de *COX5b-2* comprendida entre los nucleótidos -1000 y -620 presenta dos copias de un elemento denominado *box C*, de secuencia CTCCCAC y que está presente en el gen *Asparagina sintetasa-1* de *Pisum sativum* (arveja) y en el gen *Fitocromo A-3* de *Avena sativum* (avena). Este elemento es reconocido y unido por el represor transcripcional RE1, el cual se activa en presencia de luz (Bruce y col., 1991; Ngai y col., 1997). Los elementos *box C* se localizan en las posiciones -666 y -774 de la región promotora de *COX5b-2* y podrían ser los elementos *cis* involucrados en la regulación negativa de la expresión del gen. Además, en la posición -636 se localiza un elemento G-box de secuencia CACGTG (Salinas y col., 1992; Menkens y col., 1995), mientras que en la posición -616 se encuentra un motivo ACGT, similar al elemento G-box. Estos elementos se encuentran en un arreglo similar en el promotor de *Cytc-2*, en el cual son requeridos para la máxima expresión del gen (Welchen y col., 2009), y en la región promotora de *COX5b-1*, en la cual sólo el elemento G-box es esencial para la expresión del gen (Capítulo I; Comelli y col., 2009). El elemento G-box actúa como regulador positivo de la expresión de los dos genes mencionados, ambos codificantes para componentes de la maquinaria de respiración mitocondrial. Se comentó en el Capítulo anterior que el elemento G-box se encuentra extensamente estudiado, siendo activo en la mayoría de los genes que poseen al menos una copia de este elemento y desempeñando funciones tanto de activación como de represión de los genes involucrados (Schulze-Lefert y col., 1989; Donald y Cashmore, 1990; Kim y col., 1992; Salinas y col., 1992; Menkens y col., 1995; Ishige y col., 1999; Hudson y Quail, 2003).

La participación de los elementos *box C* en la regulación de la actividad de *COX5b-2* se evaluó mediante una nueva delección del extremo distal del promotor, conteniendo 660 pb corriente arriba del ATG inicial. Esta construcción no poseía los elementos *box C*, pero sí el elemento G-box y el motivo ACGT. Como se observa en la Figura 30, la delección de la región ubicada corriente arriba de -660 no produjo cambios en la expresión del gen reportero, lo que indica que los elementos reguladores negativos se hallan ubicados entre -660 y -620. En base a esto, se analizó la participación del elemento G-box mediante la mutación puntual del referido elemento en el contexto de los fragmentos de 1000 pb y de 660 pb del promotor de *COX5b-2* (Figura 30A).

Los ensayos de tinción histoquímica de plantas transformadas con estas construcciones mostraron que la mutación puntual del elemento G-box (se cambió CACGTG por CAATGG), tanto en el contexto del fragmento mayor como en el fragmento -660, ocasionó aparición de actividad GUS en hojas, cotiledones (Figura 30B) y raíces (no se muestra), de modo semejante a lo observado para la construcción -620 (Figura 29A). En concordancia con estas observaciones, las medidas de actividad enzimática específica

indicaron que la mutación puntual del elemento G-box ocasionó un incremento notorio en los niveles de expresión en hojas y en plántulas de 15 días, mientras que en flores no se detectaron cambios estadísticamente significativos (Figura 30C).

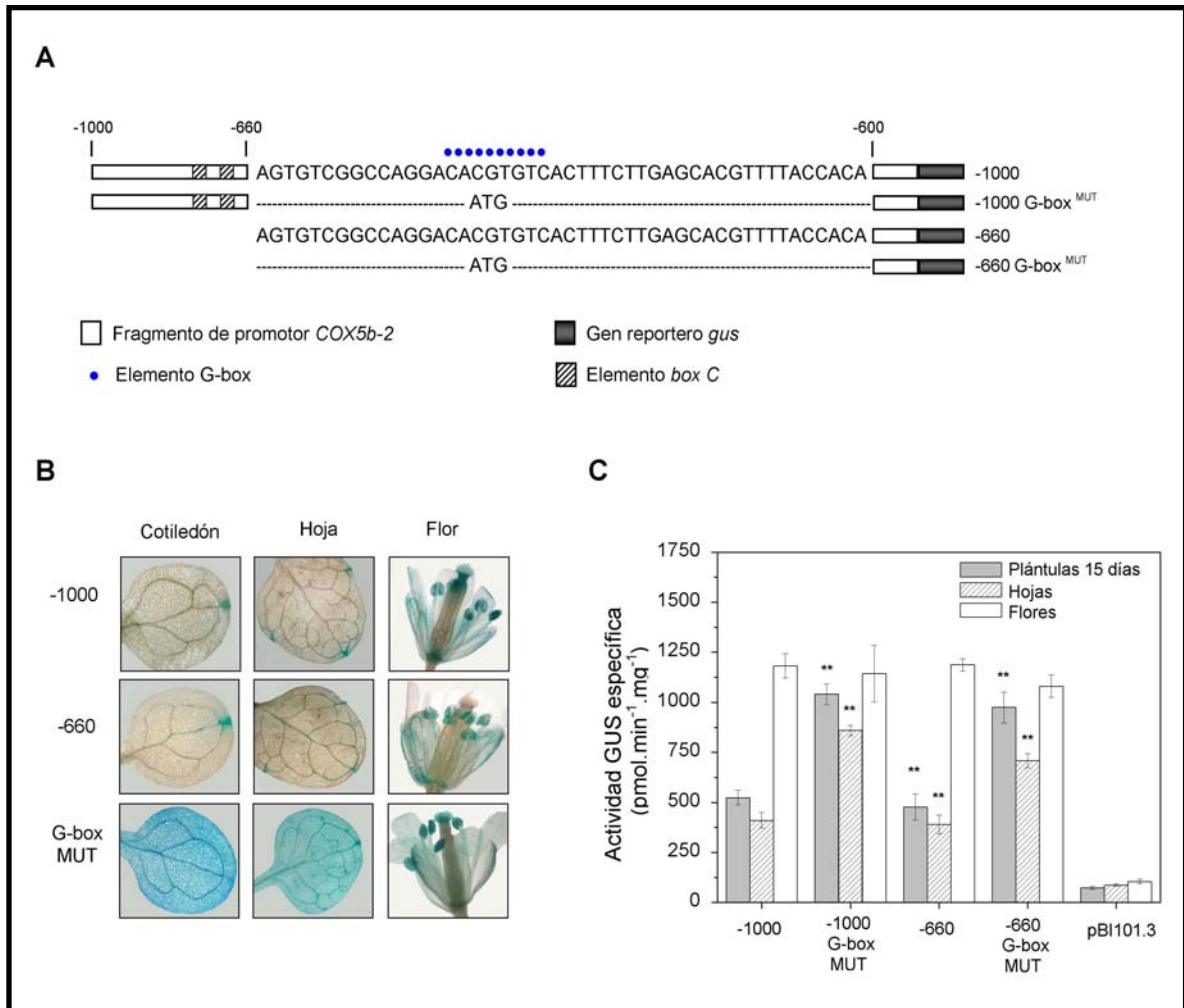


Figura 30. El elemento G-box localizado en la posición -636 del promotor de *COX5b-2* actúa como elemento regulador negativo de la expresión del gen en tejidos vegetativos. **(A)** Representación esquemática de las construcciones del promotor de *COX5b-2* empleadas para transformar plantas de *Arabidopsis*. En las mutantes puntuales sólo se muestran los nucleótidos modificados. El elemento G-box se destaca con círculos sólidos azules en la parte superior de la secuencia. **(B)** Localización histoquímica de actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con las construcciones mencionadas. Las imágenes son representativas de 10-20 líneas analizadas para cada construcción. **(C)** Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 15 días, flores y hojas de plantas transformadas. Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios se evaluó aplicando el test de Student (**P < 0,01).

Estos resultados indicaron que el elemento G-box es el elemento regulador negativo de la expresión del gen *COX5b-2*, siendo activo sólo a nivel de tejidos vegetativos, por lo que podría especularse acerca de la presencia de un factor de transcripción que se exprese en tejidos vegetativos y no esté presente o esté inactivo en tejidos reproductivos. Este potencial factor de transcripción represor sería diferente al activador que se uniría al elemento G-box presente en las regiones promotoras de *Cytc-2* y *COX5b-1*, aunque no puede descartarse el hecho de que se trate de los mismos factores de transcripción pero con diferentes interacciones proteína-proteína, siendo estos factores accesorios responsables de las diferentes respuestas. Este aspecto se abordará con mayor detalle en el Capítulo III del presente Trabajo de Tesis.

5.2.4. La región -398/-83 del promotor de *COX5b-2* contiene varios elementos *cis* requeridos para la máxima expresión del gen.

Según lo comentado anteriormente en la sección 5.2.2, en las regiones -398/-199, -199/-142 y -142/-83 del promotor de *COX5b-2* se encontrarían diversos elementos activadores. Al igual que para el estudio de la región -1000/-620, se realizó un análisis informático en la base de datos PLACE (<http://dna.affrc.go.jp/PLACE>; Higo y col., 1999).

En la región más proximal, es decir la región -142/-83, se identificaron cuatro repeticiones de un elemento de secuencia YTCANTYY (Y = C o T), reportado como elemento *Iniciador*, reconocido por la maquinaria de transcripción basal y presente en la mayoría de los genes nucleares codificantes para componentes relacionados al proceso de fotosíntesis de plantas. Estos genes carecen de caja TATA y los elementos *Iniciadores* se superponen al sitio de inicio de la transcripción, permitiendo el reclutamiento de los factores necesarios para que la ARN polimerasa actúe (Nakamura y col., 2002). En *COX5b-2*, el sitio putativo de inicio de la transcripción fue deducido a partir de los ADNc disponibles y se localizaría en la posición -102 desde el sitio de inicio de la traducción. Los elementos *Iniciadores* se localizan en -112, -105, -96 y -91, es decir, estos elementos se superponen al sitio de inicio de la transcripción de *COX5b-2*, al igual que lo reportado para otros genes (Nakamura y col., 2002; Achard y col., 2003; Noh y col., 2004), indicando que los elementos *Iniciadores* podrían participar en la transcripción de *COX5b-2*.

En la región -199/-142 se identificó un elemento *site II* típico en la posición -148 (hebra complementaria). En plantas, estos elementos, de secuencia TGGGCY (Y = C o T), son requeridos para la expresión coordinada de varios genes codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial (González y col., 2007). En estos genes, los elementos *site II* se localizan en las regiones promotoras próximas al sitio de ini-

cio de la transcripción. Tal es el caso de los seis genes que codifican las diferentes isoformas del citocromo *c* y las subunidades 6a y 6b de la citocromo *c* oxidasa (Welchen y González, 2006) y de los genes codificantes para las chaperonas COX17 y COX19, involucradas en la biogénesis de la citocromo *c* oxidasa (Attallah y col., 2007). El efecto de la mutación de los elementos *site II* fue diferente para cada gen, sugiriendo la presencia de elementos *cis* específicos en las regiones promotoras que influirían en forma diferente la acción de los mencionados elementos (Attallah y col., 2007; Mufarrege y col., 2009; Welchen y col., 2009). Los elementos *site II* generalmente se disponen en pares estrechamente relacionados (Trémousaygue y col., 2003; Welchen y González, 2006) y el promotor de *COX5b-2* no parece ser una excepción, dado que una inspección de la zona adyacente al elemento *site II* identificado por el programa PLACE permitió identificar una secuencia TGGGTC, muy similar al elemento *site II*, localizada en la posición -172 del promotor de *COX5b-2*. En adelante, se considerará a éste como a un elemento *site II* más. En la región -398/-199 del promotor de *COX5b-2* no se identificaron secuencias regulatorias relevantes, indicando que los elementos *cis* presentes en esta región del promotor no han sido reportados previamente o tienen secuencias ligeramente diferentes a otras reportadas, por lo que los programas de búsqueda resultan insuficientes para detectarlas. No se realizaron otros estudios en esta región del promotor.

Se decidió, entonces, evaluar la funcionalidad de los elementos *Iniciadores* y *site II* en la regulación de la actividad de *COX5b-2*.

5.2.5. Los elementos *Iniciadores* y *site II* localizados en la región promotora -199/-83 de *COX5b-2* son requeridos para la expresión basal del gen.

Los cuatro elementos *Iniciadores* se mutaron puntualmente en forma simultánea, mientras que los elementos *site II* se mutaron puntualmente tanto en forma individual como conjunta. Las mutaciones se realizaron en el contexto del fragmento -398 del promotor de *COX5b-2* (Figura 31A) y se transformaron en forma estable plantas de *Arabidopsis* con las versiones mutadas del promotor fusionado al gen reportero *gus*. Luego, se realizaron ensayos de tinción histoquímica en plántulas, hojas y flores aisladas, así como medidas de actividad enzimática específica en extractos proteicos.

La mutación puntual de cada uno de los elementos *site II* ocasionó una reducción notoria de la expresión del gen reportero en el contexto del fragmento -398 del promotor (Figura 31C), indicando que los dos elementos *site II*, presentes en las posiciones -148 y -172, regulan la expresión de *COX5b-2*. Además, estos elementos parecen actuar en forma concertada, dado que la mutación de uno de ellos ocasionó un efecto similar a la

mutación de los dos en forma simultánea (Figura 31C). La expresión del gen reportero no se anuló completamente (Figura 31B,C), sugiriendo la existencia de elementos adicionales capaces de sostener la expresión del gen en ausencia de elementos *site II*.

La mutación de los elementos *Iniciadores* causó un descenso en los niveles de actividad GUS similar al observado para la mutación en los elementos *site II*, excepto en hojas, donde se observó un efecto más pronunciado (Figura 31B,C), indicando que estos elementos también son funcionales en el promotor de *COX5b-2*. La función de los *Iniciadores* se relaciona con el inicio de la transcripción. Sin embargo, la mutación de estos elementos en el promotor de *COX5b-2* no anuló la expresión del gen reportero, quizás porque los *site II* serían capaces de conducir la expresión del gen en ausencia de los *Iniciadores*. La mutación combinada de los dos elementos *site II* y los cuatro elementos *Iniciadores* causó una completa pérdida de actividad GUS en todos los órganos y tejidos de la planta (Figura 31B,C). Por lo tanto, los elementos *site II* podrían ser considerados componentes del núcleo del promotor con un papel en la transcripción basal del gen. La observación de que el 5-10% de los genes de Arabidopsis contienen elementos *site II* en sus regiones promotoras proximales (Welchen y González, 2006) avala esta idea.

En plantas, no se conoce aún la identidad de las proteínas que interactúan con los elementos *site II*. Algunas líneas de evidencia sostienen que proteínas de la familia TCP, exclusivas de plantas y con un dominio de unión al ADN de tipo bHLH (Cubas y col., 1999) reconocerían los elementos *site II* (Kosugi y Ohashi, 2002; Trémousaygue y col., 2003; Welchen y col., 2009). En genes virales y de mamíferos, los elementos *Iniciadores* son reconocidos por el factor de transcripción con dedos de cinc YY (Ying-Yang), del cual existen varias isoformas y recibe su nombre por la capacidad de actuar como activador o represor según la identidad de otros factores accesorios que se unen a YY mediante interacciones de tipo proteína-proteína (Ye y col., 1996; Riquet y col., 2001; Nguyen y col., 2004). La búsqueda de proteínas homólogas a YY en el genoma de Arabidopsis resultó en la identificación de un gen no caracterizado codificante para un factor de transcripción con dedos de cinc (número de acceso At4g06634). Esta proteína presentó una identidad cercana al 45% respecto a YY de mamíferos (no se muestra), y la mayoría de los residuos conservados se ubican en el dominio de unión al ADN, sugiriendo que el gen At4g06634 podría codificar un factor de transcripción con dedos de cinc capaz de interactuar con elementos *Iniciadores* presentes en genes de Arabidopsis carentes de caja TATA en las regiones promotoras proximales. No se profundizó el estudio de este factor en este Trabajo de Tesis.

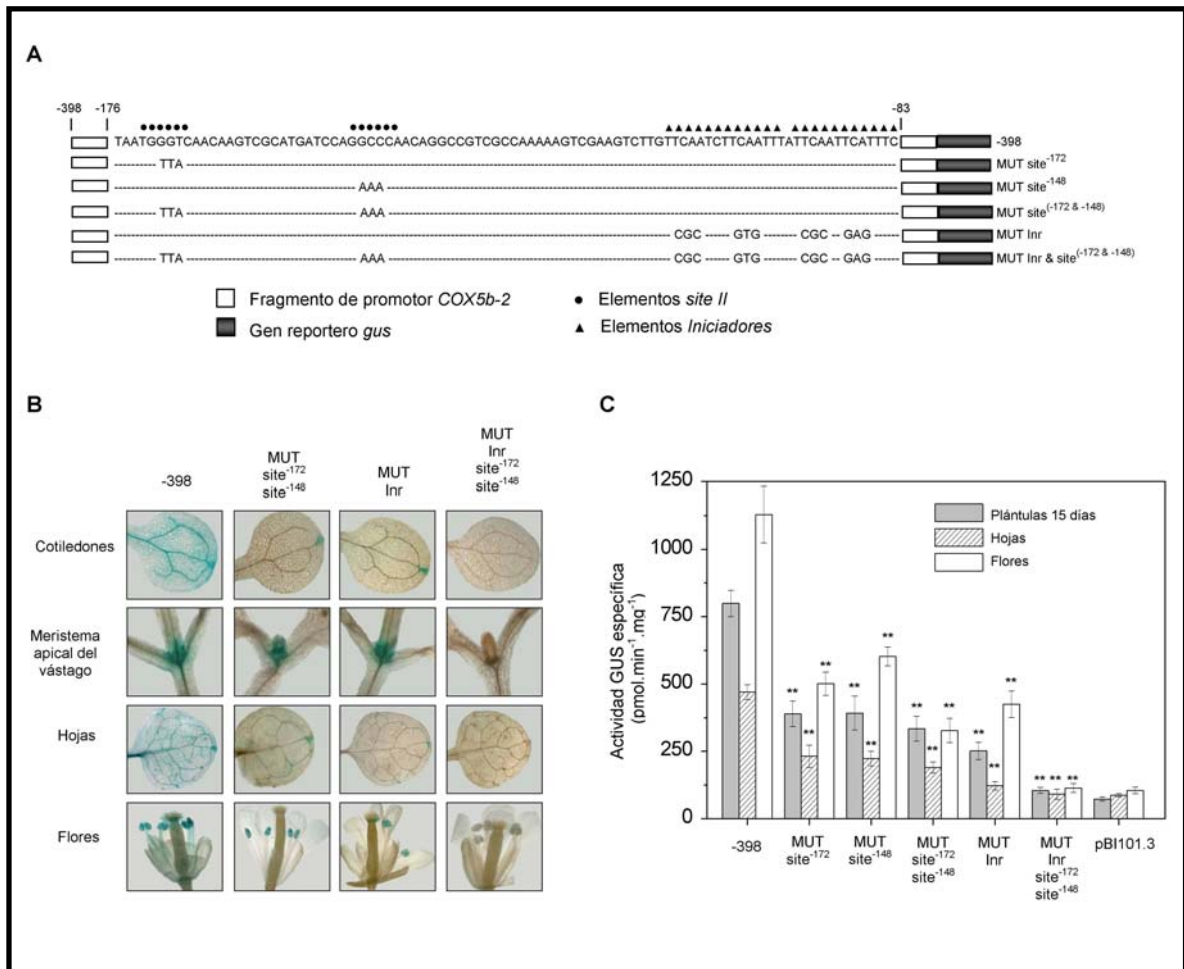


Figura 31. Los elementos *site II* e *Iniciadores* presentes en la región -199/-83 del promotor de *COX5b-2* son necesarios para la expresión basal del gen. **(A)** Representación esquemática de las construcciones del promotor de *COX5b-2* empleadas para transformar plantas de *Arabidopsis*. El nombre de cada construcción indica el/los elemento/s mutado/s en el fragmento -398 del promotor de *COX5b-2*, y se muestran sólo los nucleótidos mutados. Los elementos *site II* e *Iniciadores* se destacan con círculos y triángulos sólidos, respectivamente, en la parte superior de la secuencia. **(B)** Localización histoquímica de actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas. Las imágenes son representativas de 10-20 líneas analizadas para cada construcción. **(C)** Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 15 días, flores y hojas de plantas transformadas. Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada mutación se evaluó aplicando el test de Student (**P < 0,01).

5.2.5.1. Proteínas nucleares son capaces de interactuar *in vitro* con los elementos identificados en la región -199/-83 del promotor de *COX5b-2*.

La presencia de proteínas nucleares capaces de unir el fragmento del promotor de *COX5b-2* comprendido entre los nucleótidos -199 y -83 se analizó *in vitro* mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) empleando extractos nucleares preparados a partir de inflorescencias de coliflor.

El fragmento -199/-113 del promotor de *COX5b-2* marcado radiactivamente, el cual contiene los dos elementos *site II* intactos, originó dos bandas de retardo correspondientes a diferentes complejos de unión ADN-proteínas, mientras que las bandas de retardo desaparecieron cuando se utilizó un fragmento de promotor de tamaño similar pero con los elementos *site II* mutados en forma puntual (Figura 32A, panel izquierdo). La especificidad de unión a los mencionados elementos se evaluó mediante ensayos de competencia agregando a la mezcla de unión fragmentos de promotor no marcados radiactivamente en un exceso de concentración molar de 25 veces respecto al fragmento marcado. El agregado del fragmento -199/-113 del promotor de *COX5b-2* no marcado radiactivamente fue suficiente para competir eficientemente la formación de los dos complejos de unión, mientras que la competencia no se observó al utilizar como competidor el fragmento de promotor que tiene mutados puntualmente los elementos *site II* (Figura 32A, panel derecho). Estos resultados permiten concluir que proteínas presentes en extractos nucleares reconocen *in vitro* específicamente los elementos *site II* presentes en el promotor de *COX5b-2*, resultando en la formación de dos complejos de unión.

En forma similar, cuatro diferentes bandas de retardo se observaron al utilizar el fragmento -122/-37 del promotor de *COX5b-2* marcado radiactivamente, el cual contiene los cuatro elementos *Iniciadores* intactos (Figura 32B, panel izquierdo), mientras que las bandas de retardo desaparecieron cuando se utilizó un fragmento de promotor de tamaño similar pero con los mencionados elementos mutados en forma puntual (Figura 32B, panel derecho). La unión a los elementos *Iniciadores* también resultó ser específica, dado que el agregado a la mezcla de unión del fragmento -122/-37 de promotor no marcado en un exceso molar de 25 veces respecto al fragmento marcado fue suficiente para competir eficientemente la formación de todos los complejos de unión, mientras que la competencia no se observó al utilizar como competidor el fragmento de promotor que tiene mutados puntualmente los elementos *Iniciadores* (Figura 32B, panel derecho).

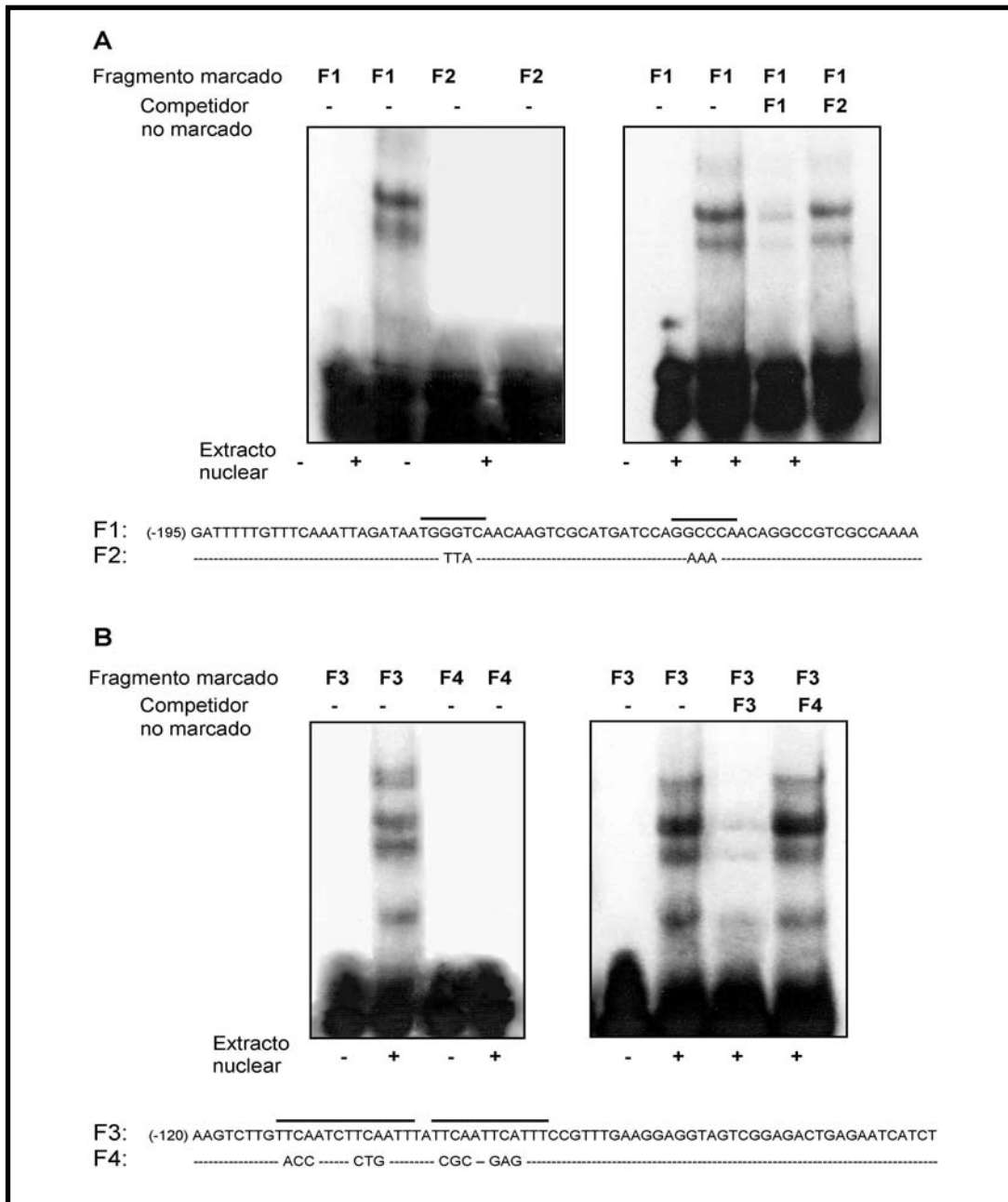


Figura 32. Proteínas nucleares son capaces de unir específicamente los elementos *Iniciadores* y *site II* presentes en el promotor de *COX5b-2*. Ensayos de retardo en gel (EMSA) con extractos nucleares (10 μ g) y los fragmentos -199/-113 y -122/-37 del promotor marcados radiactivamente. **(A)** La unión se analizó tanto para el fragmento de promotor que contiene los elementos *site II* intactos (F1) como para un fragmento similar en tamaño pero con los dos elementos mutados puntualmente (F2). Además, se realizaron ensayos de competencia utilizando el fragmento F1 marcado y los fragmentos F1 y F2 como competidores no marcados en una concentración molar 25 veces superior a la de F1 marcado. **(B)** Ensayo de unión para el fragmento de promotor que contiene los elementos *Iniciadores* intactos (F3) y un fragmento similar en tamaño pero con los *Iniciadores* mutados puntualmente (F4). Los elementos *Iniciadores* y *site II* presentes en los fragmentos del promotor de *COX5b-2* ensayados se muestran subrayados. Se muestran los nucleótidos modificados por mutaciones puntuales en F2 y F4.

Además, se evaluó la competencia cruzada entre los elementos *site II* e *Iniciadores*, no observándose modificaciones en los patrones de retardo antes mencionados (no se muestra). Esto indica que proteínas diferentes se unen a los elementos estudiados.

5.2.6. El gen *COX5b-2* se induce por sacarosa, luz UV y otros factores.

El efecto de varios compuestos y diferentes condiciones ambientales (ver punto 3.6.5) en la regulación de *COX5b-2* se evaluó determinando los niveles de expresión del gen reportero *gus* bajo el control del fragmento -1000 del promotor de *COX5b-2* mediante ensayos de medida de actividad enzimática específica en extractos proteicos preparados a partir de plántulas transformadas de 21 días sometidas a los diferentes tratamientos.

El promotor de *COX5b-2* incrementó su actividad por el tratamiento de plantas con sacarosa, fosfato de potasio, ácido amino-1-ciclopropanocarboxílico (ACC, precursor de etileno), ácido indolacético (auxina), H₂O₂ y por la irradiación durante 30 minutos con luz UV (Figura 33A), mientras que la incubación con 6-bencil-aminopurina (BAP, citoquinina), ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA), metiljasmonato, ácido salicílico o cloruro de sodio no ocasionó cambios estadísticamente significativos en los niveles de expresión del gen reportero (no se muestra). Los ensayos se realizaron en medio líquido, sumergiendo las raíces de las plantas en medio MS con los factores a ensayar.

Estudios previos en el laboratorio demostraron que la sacarosa, al igual que otros azúcares metabolizables, ocasionaba un incremento en los niveles endógenos de transcritos de *COX5b-2*, según ensayos de *northern blot* (Welchen y col., 2002). Utilizando PCR cuantitativa en tiempo real se determinaron los niveles relativos de transcritos de *COX5b-2* en plantas no transformadas de *Arabidopsis* luego de los diferentes tratamientos identificados por el análisis de actividad GUS en plantas transformadas. Los resultados de estos ensayos mostraron que todos los tratamientos que aumentaban la expresión del gen reportero *gus* en plantas transformadas también ocasionaban un incremento en los niveles de transcritos de *COX5b-2* en plantas no transformadas (Figura 33B), sugiriendo que los compuestos y tratamientos identificados eran realmente efectores del gen endógeno.

El paso posterior fue determinar las regiones mínimas de promotor requeridas para estas respuestas, analizando el conjunto de construcciones (deleciones y mutantes puntuales) obtenidas y analizadas en las secciones anteriores de este Capítulo.

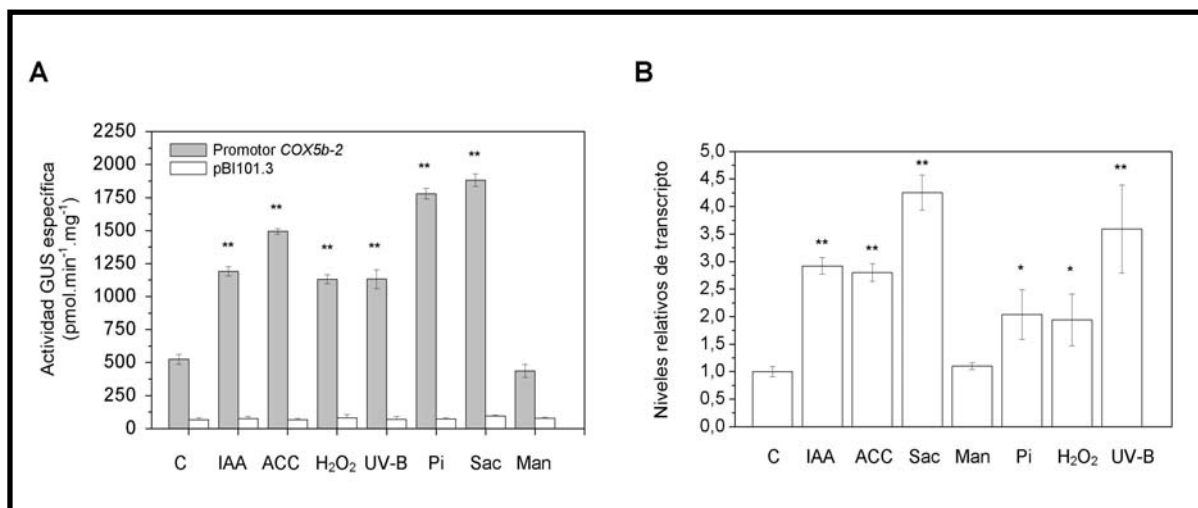


Figura 33. El promotor de *COX5b-2* responde a diferentes compuestos y tratamientos. **(A)** Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 21 días que contenían el fragmento de 1000 pb del promotor de *COX5b-2* fusionado al gen reportero *gus*. Durante el experimento, las raíces de las plantas se sumergieron en medio MS sólo (C) o suplementado con sacarosa (Sac) 3% (p/v), manitol (Man) 3% (p/v), ácido amino-1-ciclopropano carboxílico (ACC) 0,1 mM, ácido indolacético (IAA) 0,1 mM, fosfato de potasio (Pi) 10 mM o H₂O₂ 10 µM. El tratamiento con luz UV (280-320 nm) se realizó durante 30 min. Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (±SD) de cinco líneas independientes. **(B)** Niveles relativos de transcripción de *COX5b-2* en plantas no transformadas luego de los mismos tratamientos descritos en **(A)**. Las muestras de ARN total se analizaron mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando la expresión de los genes *ACT2* y *ACT8* como valor de normalización entre las muestras control y las tratadas. Los resultados indican el promedio (±SD) de tres experimentos independientes. En **(A y B)**, la significancia de los cambios producidos por cada tratamiento respecto al control se evaluó aplicando el test de Student (*P < 0,05; **P < 0,01).

5.2.7. Identificación de las regiones mínimas del promotor de *COX5b-2* necesarias para la respuesta a diferentes compuestos.

La delección de secuencias situadas corriente arriba del nucleótido -660 anuló la inducción del promotor de *COX5b-2* por auxinas y el precursor de etileno ACC (Figura 34A,B), indicando que los elementos necesarios para estas respuestas se sitúan en regiones distales del promotor. Los elementos necesarios para la respuesta a fosfato inorgánico y H₂O₂ se encontrarían en la región -620/-199 del promotor (Figura 34C,D), la misma que ocasionaba una disminución en los niveles de actividad GUS al ser removida, según se comentó en la sección 5.2.4. El análisis en bases de datos de elementos regulatorios reportados no permitió identificar posibles secuencias relacionadas con las respuestas analizadas. No se profundizó el estudio de la identidad de los elementos *cis*

puestas analizadas. No se profundizó el estudio de la identidad de los elementos *cis* involucrados en las respuestas mencionadas en este párrafo.

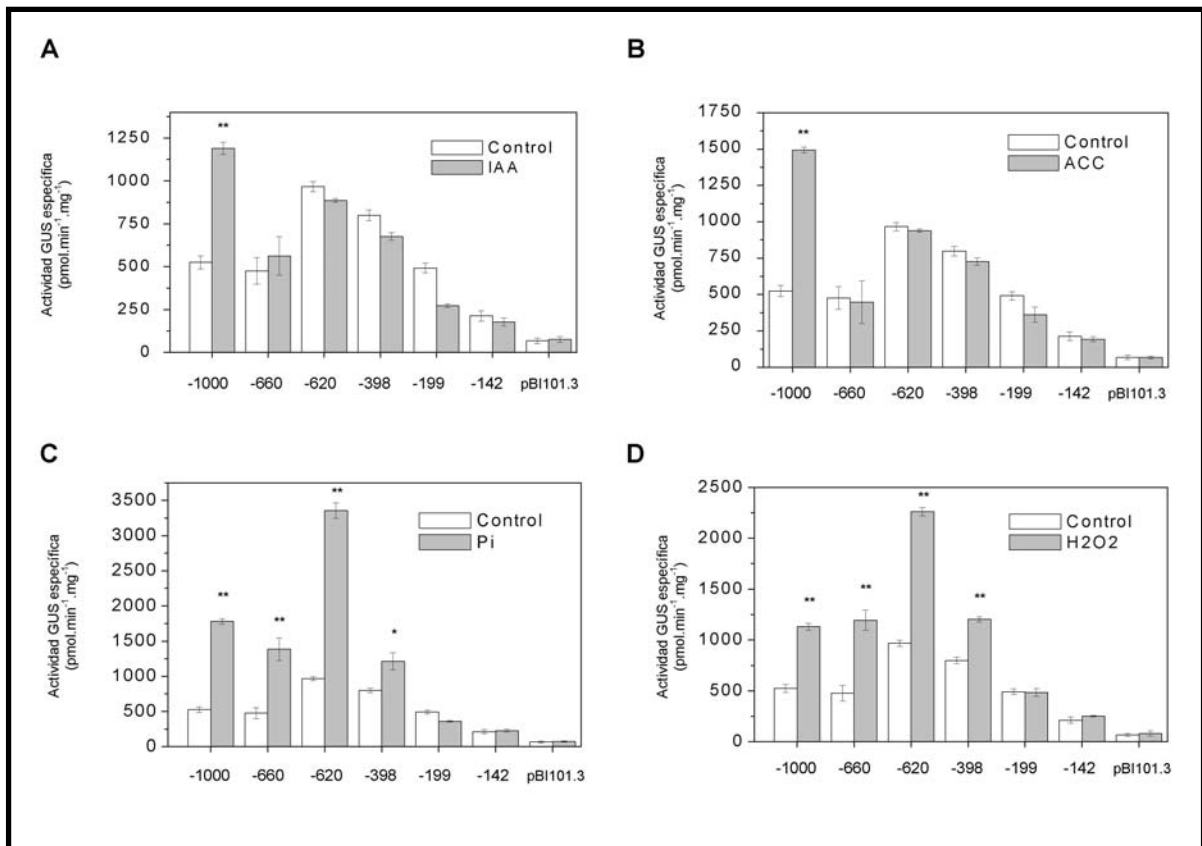


Figura 34. Regiones mínimas del promotor de *COX5b-2* requeridas para la respuesta a diferentes compuestos. Las raíces de plantas de 21 días se sumergieron en medio MS sólo (control) o suplementado con ácido indolacético (IAA) 0,1 mM **(A)**, ácido amino-1-ciclopropanocarboxílico (ACC) 0,1 mM **(B)**; fosfato de potasio (Pi) 10 mM **(C)** o H₂O₂ 10 μM **(D)**. Plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (±SD) de cinco líneas independientes por construcción. La significancia de los cambios producidos por cada tratamiento respecto al control se evaluó aplicando el test de Student (*P < 0,05; **P < 0,01).

Las respuestas observadas por la incubación con sacarosa y el tratamiento con luz UV (280-320 nm) se analizan con más detalle a continuación. En los ensayos con azúcares se sumergieron las raíces de las plantas transformadas en medio MS sólo o con sacarosa 3% (p/v) o manitol 3% (p/v), azúcar no metabolizable utilizado como control del efecto de la presión osmótica. En los ensayos con luz UV se sumergieron las raíces en medio MS solo y las plantas se irradiaron durante 30 minutos.

5.2.7.1. Los elementos *site II* presentes en el promotor de *COX5b-2* son responsables de la respuesta a sacarosa.

La inducción por sacarosa observada para las tres primeras delecciones del promotor (-660, -620 y -398) mostró niveles similares a la observada para el fragmento mayor, considerando los valores relativos a los de las respectivas plantas control, originándose valores de actividad GUS tres veces mayores respecto a los valores de las plantas sin tratar (Figura 35A). En la construcción -199, el aumento en los niveles de expresión debido a la incubación con sacarosa fue del doble respecto al control, mientras que la inducción se anuló por completo al eliminar los nucleótidos por encima de -142 (Figura 35A), sugiriendo que posibles elementos de respuesta a sacarosa estarían presentes en la región del promotor comprendida entre los nucleótidos -199 y -142, mientras que podría especularse acerca de la presencia de algún elemento necesario para maximizar esta respuesta, pero no esencial para la misma, en la región -398/-199.

En la región -199/-142 se encuentran las dos copias del elemento *site II*. Se evaluó, entonces, la funcionalidad de estos elementos en la respuesta a sacarosa debido a la disponibilidad de mutantes puntuales en los *site II* en el contexto del fragmento -398 del promotor. La mutación de los elementos *site II*, ya sea en forma individual o conjunta, ocasionó la pérdida completa de la inducción por sacarosa (Figura 35B), indicando que ambos elementos son esenciales para la respuesta mencionada, dado que ninguno de ellos fue capaz de conducir la respuesta a sacarosa en forma individual. Se podría especular acerca de la presencia de un factor de transcripción capaz de interaccionar con el promotor de *COX5b-2* sólo cuando los dos elementos *site II* se encuentran intactos. Por otro lado, la mutación de los elementos *Iniciadores* en el mismo fragmento de promotor no modificó los niveles de inducción por sacarosa (Figura 35B).

Los elementos *site II* han sido largamente mencionados en este Trabajo de Tesis. Estos se localizan en la región promotora proximal de varios genes codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial, los cuales desarrollan respuestas coordinadas a diferentes compuestos, siendo los azúcares uno de ellos (Welchen y col., 2002; González y col., 2007; Attallah y col., 2007; Comelli y col., 2009; Mufarrege y col., 2009; Welchen y col., 2009). Los resultados obtenidos con el promotor de *COX5b-2* avalan la idea de la expresión coordinada de genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial en respuesta a efectores como los azúcares y la participación de elementos *site II* como reguladores clave en la coordinación.

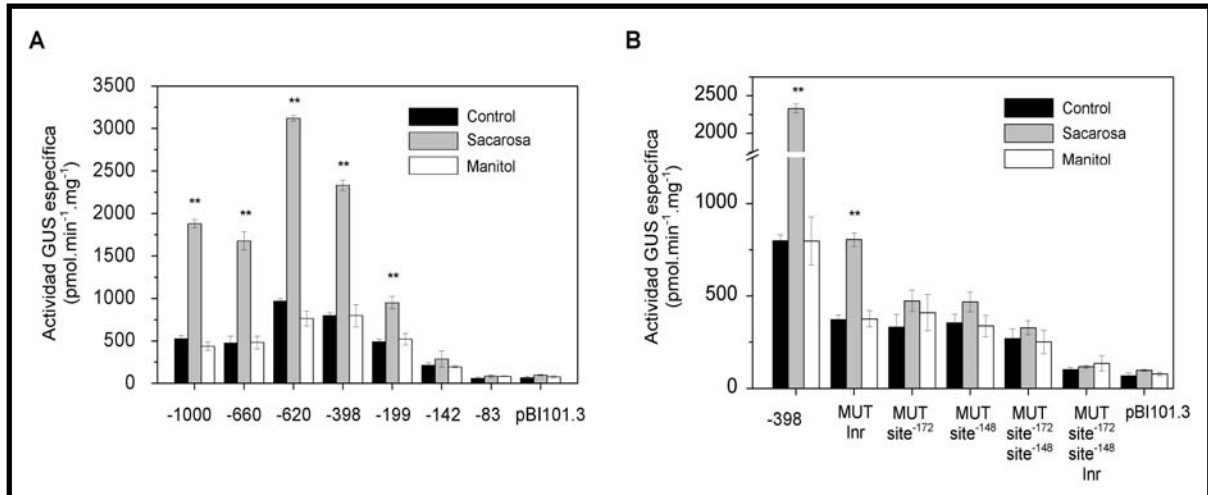


Figura 35. Los elementos *site II* presentes en el promotor de *COX5b-2* son esenciales para la respuesta a sacarosa. Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 21 que contenían deleciones del promotor de *COX5b-2* fusionado al gen reportero *gus* (A) o mutaciones puntuales en los elementos *site II* en el contexto del fragmento -398 del promotor (B). Las raíces de las plantas se sumergieron en medio MS sólo (control) o suplementado con sacarosa (Sac) 3% (p/v) o manitol (Man) 3% (p/v). Plantas transformadas con el gen reportero *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada tratamiento respecto al control se evaluó aplicando el test de Student (**P < 0,01).

5.2.7.2. El elemento G-box localizado en la posición -636 del promotor de *COX5b-2* es responsable de la respuesta a luz UV.

Las plantas transformadas con los fragmentos -1000 y -660 del promotor de *COX5b-2* mostraron niveles de actividad GUS dos veces mayores luego de ser irradiadas con luz UV (280-320 nm), mientras que la inducción se anuló por completo para la construcción -620 (Figura 36). Esto indica que el/los potencial/es elemento/s *cis* involucrado/s en la respuesta a luz UV se encontraría/n en la región promotora -660/-620. Esta región es la misma que ocasionó un notorio incremento en los niveles de expresión de GUS al ser removida, comportamiento debido a la presencia de un elemento G-box en la posición -636, el cual actúa como regulador negativo de la expresión del gen (véase punto 5.2.3.). La mutación puntual del elemento G-box en el contexto de los fragmentos -1000 y -660 del promotor de *COX5b-2* anuló por completo la inducción por luz UV (Figura 36), indicando que, en efecto, el elemento G-box es esencial para la respuesta mencionada. En plantas transformadas con fragmentos de promotor de *COX5b-2* con el elemento G-box intacto (construcciones -1000 y -660), el tratamiento con luz UV causó niveles de activi-

dad GUS similares a los observados en plantas sin tratar transformadas con fragmentos de promotor con el elemento G-box mutado (Figura 36).

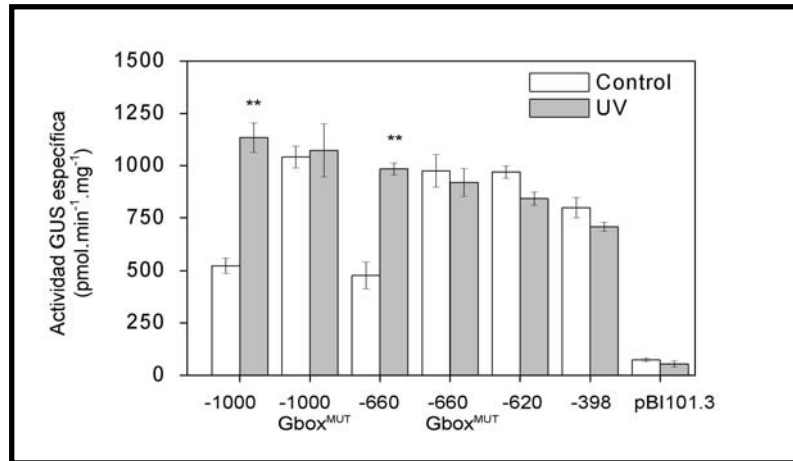


Figura 36. El elemento G-box, regulador negativo en el promotor de *COX5b-2*, es responsable de la respuesta a luz UV (280-320 nm). Medida de la actividad específica GUS en plántulas de 21 días que contenían delecciones del promotor o mutaciones puntuales en el elemento G-box en el contexto de los fragmentos -1000 y -660. Las raíces de las plantas se sumergieron en medio MS (control) y las plantas fueron tratadas con luz UV durante 30 min. Plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor se utilizaron como control negativo (pBI101.3). Los resultados indican el promedio (\pm SD) de cinco líneas independientes para cada construcción. La significancia de los cambios producidos por cada tratamiento respecto al control se evaluó aplicando el test de Student (**P < 0,01).

Los resultados presentados sugieren que la inducción por luz UV se originaría por la remoción de un factor de transcripción represor directamente unido al elemento G-box, o bien, por la remoción de un factor represor unido mediante interacciones de tipo proteína-proteína al factor de transcripción unido al elemento G-box. Existen numerosos reportes en la bibliografía que avalan este modelo. Por ejemplo, el tratamiento de plantas con luz UV incrementa los niveles de un microRNA (miR172), el cual inhibe la expresión de varios genes codificantes para factores de transcripción represores de genes involucrados en el desarrollo floral (Wu y Poething, 2006; Zhou y col., 2007), mientras que numerosos factores de transcripción actúan en forma dependiente de luz UV, aumentando o disminuyendo su capacidad de interactuar con secuencias de ADN regulatorias (Zhao y col., 2007; Park y col., 2008).

5.2.8. La región promotora de *COX5b-2* se superpone con la región codificante de un gen adyacente.

La región promotora de *COX5b-2* se localiza, sorpresivamente, parcialmente superpuesta con la región codificante del gen adyacente At1g80240, situado corriente arriba en el cromosoma I (Figura 37). Los dos genes se encuentran en la misma orientación y el elemento G-box, regulador negativo de la expresión de *COX5b-2*, se encuentra en el último exón del mencionado gen adyacente. La región 3' no codificante del gen At1g80240 comienza en el nucleótido -520 y termina en el -327 (contando desde el sitio de inicio de la traducción) de la región promotora de *COX5b-2*, según las secuencias disponibles en las bases de datos de Arabidopsis. No se ha encontrado información en la bibliografía referida a la presencia de un elemento regulatorio para un gen eucariota presente en la región codificante del gen adyacente.

La información disponible en bases de datos de expresión resultante de experimentos de microarreglos de ADN (<http://bbc.botany.utoronto.ca/>) indicó que el gen adyacente a *COX5b-2* se expresa en raíces, principalmente en la cofia, mientras que la expresión en otras partes de la planta es mínima o indetectable. Esto sugiere que no existe, o es muy pequeña, la superposición entre los patrones de expresión de *COX5b-2* y el gen At1g80240. De acuerdo a esto, la regulación de ambos genes sería independiente, idea avalada por los datos de expresión ante distintos tratamientos, dado que At1g80240 no se induce por luz UV. Además, podría especularse que la transcripción de At1g80240 y la regulación de la expresión de *COX5b-2* mediada por factores unidos a la región en torno al elemento G-box operarían en forma independiente y sin interferencias entre uno y otro proceso, dado que los mismos estarían separados espacial y temporalmente.

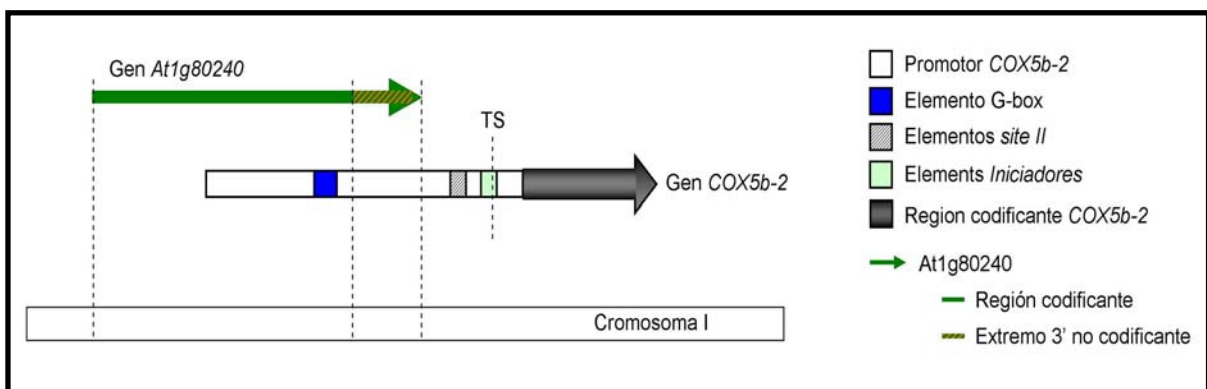


Figura 37. El promotor de *COX5b-2* se encuentra parcialmente solapado con la región codificante del gen adyacente At1g80240. Esquema de la ubicación de los genes mencionados en el cromosoma I. El elemento G-box del promotor de *COX5b-2* se destaca en azul.

La superposición de genes es un evento muy frecuente en el genoma de bacteriófagos, estrategia que permite optimizar la información genética en genomas compactos, como es el caso de los virus (Rogozin y col., 2002). En procariontas también hay numerosos ejemplos de superposición de genes y existen tres clases de genes superpuestos: *unidireccionales*, en los cuales el extremo 3' de un gen se superpone con el extremo 5' de otro gen, *convergentes*, en los cuales se solapan los extremos 3' de los dos genes adyacentes, y *divergentes*, en los cuales se solapan los extremos 5' de los dos genes (Figura 38A). El solapamiento de genes bacterianos en forma "unidireccional" es la clase más ampliamente difundida, mientras que los genes convergentes son menos comunes y los divergentes muy inusuales (Rogozin y col., 2002).

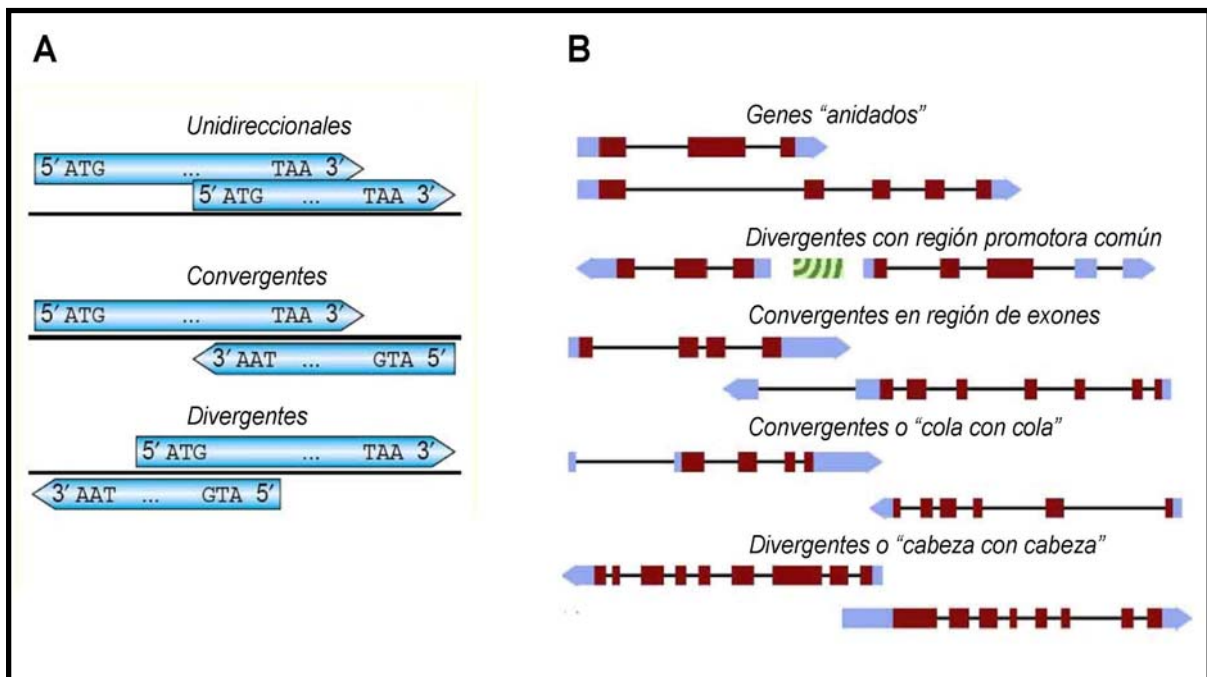


Figura 38. Representación esquemática de clases de genes superpuestos. **(A)** En organismos procariontas (adaptado de Rogozin y col., 2002). **(B)** En eucariotas. Las cajas rojas y azules representan regiones codificantes y no codificantes de exones, respectivamente, mientras que los intrones se señalan con una línea negra. La caja con rayas verdes representa la región promotora en común entre los genes señalados (adaptado de Makalowska y col., 2005).

En eucariotas, la superposición de genes es un evento inesperado. El análisis del genoma de varios vertebrados reveló que entre el 5 y el 10% de los genes nucleares se encuentran superpuestos (Makalowska y col., 2005) y los mismos han sido clasificados en diferentes grupos (Figura 38B). Nótese que ninguno de los grupos de genes eucario-

tas superpuestos se corresponde a la clase “unidireccional” de genes procariotas solapados. Los genes “anidados” en eucariotas hacen referencia a genes superpuestos localizados en el mismo *locus*, sobre la misma hebra y marco de lectura, pero resultando proteínas diferentes por un mecanismo de utilización selectiva de exones, por el cual las proteínas obtenidas poseen en su secuencia regiones idénticas y otras exclusivas (Figura 38B). En plantas existen pocos reportes de la existencia de genes nucleares solapados. Los genes codificantes para las proteínas OTC (ornitina transcarbamilasa) y AUL1 (auxilin-like 1) se disponen solapando parcialmente sus extremos 3' (Quesada y col., 1999). Esta disposición “convergente” o “cola con cola” es la más frecuente en genes nucleares solapados en plantas (Glover y col., 1998; Osato y col., 2003).

5.3 DISCUSION

El promotor de *COX5b-2* contiene una mezcla de elementos regulatorios positivos y negativos, según los efectos observados para las diferentes deleciones progresivas del extremo distal del mencionado promotor. El fragmento más grande de promotor utilizado en este estudio (-1000/-1) dirigió la expresión del gen reportero *gus* en forma específica, detectándose actividad en meristema apical del vástago y meristema de raíz, ápice de cotiledones y hojas y en anteras.

La sacarosa incrementó los niveles de expresión de *COX5b-2*, característica compartida con otros genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Welchen y col., 2002; Curi y col., 2003; González y col., 2007), avalando los numerosos reportes en la bibliografía acerca de la función de este disacárido como molécula de señalización intracelular propiamente dicha (Sheen y col., 1999; Rook y col., 2001). La sacarosa, y probablemente otros carbohidratos, podrían actuar como señales que promueven la síntesis de nuevos componentes de la maquinaria de respiración mitocondrial involucrados en su utilización (Felitti y González, 1998; Welchen y col., 2002), mientras que también actúan como represores de la expresión de genes involucrados en los procesos fotosintéticos (Rook y col., 2006), por lo que podría especularse acerca de la presencia de un mecanismo de balance de los procesos involucrados en la síntesis y utilización de los carbohidratos. Las respuestas a luz UV y H₂O₂ podrían estar relacionadas con el requerimiento de síntesis de nuevas subunidades de citocromo *c* oxidasa (COX) para reemplazar aquellas dañadas por el estrés oxidativo generado por los tratamientos mencionados. La subunidad COX5b contiene átomos de cinc asociados a su estructura,

lo cual podría convertir a esta subunidad en el blanco de acción preferido de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Es notorio que *COX5b-1*, el otro gen codificante para la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa (COX), también se induce por H₂O₂ (Capítulo I; Comelli y col., 2009) y varios genes codificantes para proteínas involucradas en la biogénesis de COX se inducen por estrés oxidativo (Attallah y col., 2007a, b). El significado fisiológico de la regulación de *COX5b-2* por los restantes compuestos reportados en este Capítulo es menos evidente. Sin embargo, es destacable que el fosfato inorgánico y el ACC (precursor de etileno) también actúan como inductores del promotor de *COX5b-1* (Capítulo I; Comelli y col., 2009), sugiriendo la presencia de participantes comunes en la regulación génica de los dos genes nucleares codificantes para la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa, aunque cabe destacar que no se identificaron elementos *cis* conservados entre los dos promotores en la regiones mínimas necesarias para las respuestas mencionadas.

El elemento G-box localizado en la posición -636 del promotor de *COX5b-2* (contando desde el sitio de inicio de la traducción) actúa como elemento regulador negativo de la expresión del gen y es activo en hojas y plántulas, pero no en flores. La presencia de reguladores negativos también se reportó para el promotor de *COX5b-1*, particularmente un elemento situado en la región -609/-398 del promotor y activo a nivel de hojas (Welchen y col., 2004) y otro situado en la región -398/-259, de secuencia GTATATGC y activo a nivel de raíces (Capítulo I; Comelli y col., 2009). El elemento G-box en el promotor de *COX5b-2* participa también en la respuesta a luz UV, estímulo que probablemente actúa removiendo el represor, evento que aumenta la expresión del gen en tejidos vegetativos. La observación de que la mutación en el elemento G-box de *COX5b-2* ocasiona un incremento en los niveles de expresión del gen en tejidos vegetativos pero no en flores sugiere que la elevada actividad del promotor en flores se debería a la ausencia, en tejidos reproductivos, del o los factores de transcripción represores responsables de interactuar con el elemento *cis* antes mencionado. Los elementos G-box, o elementos muy similares en secuencia, han sido identificados como responsables de la inducción por luz UV en *Petroselinum crispum* (perejil), en particular, en el gen *chalcona sintasa* y otros genes codificantes para enzimas involucradas en la síntesis de flavonoides, compuestos capaces de absorber luz UV (Schulze-Lefert y col., 1989; Hartmann y col., 1998; 2005). Un detalle notorio en el promotor de *COX5b-2* resulta la presencia de un motivo ACGT localizado corriente abajo del elemento G-box, separado del mismo por 14 pb. Este arreglo (G-box + ACGT) se encuentra también en los promotores de *Cytc-2* y *COX5b-1*, con una separación de 13 y 18 pb, respectivamente, pero los elementos G-box actúan como reguladores positivos de la expresión de estos genes, siendo *COX5b-1* el más afectado

por cambios en este elemento, dado que la mutación puntual del elemento G-box anula por completo la expresión de *COX5b-1* en todos los órganos y tejidos de la planta (Capítulo I; Comelli y col., 2009; Welchen y col., 2009). Los elementos G-box pueden ser reconocidos por factores de transcripción de las familias bZIP y bHLH, compuestas por 77 y 161 miembros en *Arabidopsis*, respectivamente (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB>; Sibénil y col., 2001; Jakoby y col., 2002; Heim y col., 2003; Toledo-Ortiz y col., 2003), mientras que los nucleótidos adyacentes al elemento G-box son responsables de la especificidad en la interacción con diferentes factores de transcripción (Williams y col., 1992; Ishige y col., 1999). En cuanto al motivo ACGT en el promotor de *COX5b-2*, es improbable que cumpla un rol importante en la transcripción del gen, dado que se encuentra localizado en la región -620/-398 del promotor, la cual ocasiona sólo cambios menores en los niveles de expresión del gen cuando es removida. En *COX5b-1*, el motivo ACGT también es inactivo (Capítulo I; Comelli y col., 2009), mientras que en *Cytc-2*, curiosamente, es esencial para la expresión del gen, dado que al mutar este motivo en forma puntual se afectan notoriamente los niveles de expresión del gen (Welchen y col., 2009).

La expresión basal del gen *COX5b-2* depende de los elementos *Iniciadores* y *site II* presentes en la región promotora proximal. Los elementos *site II*, definidos en la bibliografía como elementos de secuencia TGGGCY (Y = C o T), se localizan en las regiones promotoras proximales (200 pb) de la mayoría de los genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial, generalmente en más de una copia (Welchen y González, 2006). Los elementos *site II* son reconocidos *in vitro* por miembros de la familia TCP de factores de transcripción (Trémousaygue y col., 2003; Welchen y González, 2005), pero no existe evidencia definitiva acerca de la identidad de las proteínas que reconocerían estas secuencias *in vivo*. El promotor de *COX5b-2* contiene un elemento *site II* de secuencia típica en la posición -172, mientras que en la posición -148 se encuentra una secuencia muy similar (TGGGTC), la cual es activa y actúa, probablemente, como elemento *site II*, indicando que las proteínas encargadas del reconocimiento de estas secuencias son capaces de unir sólo pirimidinas, independientemente de su identidad, en las dos últimas posiciones del sitio de unión, por lo que podría redefinirse la secuencia de los elementos *site II* como TGGGYY (Y = C o T). Análisis de mutaciones puntuales indicaron que los dos elementos *site II* son responsables también de la respuesta de *COX5b-2* a sacarosa, observación similar a la realizada para los mismos elementos presentes en las regiones promotoras de los genes *Cytc-2* y *COX6b-1*, -2 y -3 de *Arabidopsis*, codificantes para el citocromo *c* y la subunidad 6b de la citocromo *c* oxidasa, respectivamente (Welchen y col., 2009; Mufarrege y col., 2009). Estos resultados avalan la idea acerca de la importancia de los elementos *site II* como transductores de

señales originadas por el incremento en la concentración de sacarosa en las plantas y, por ende, como coordinadores de la expresión de genes nucleares codificantes para componentes mitocondriales involucrados en los procesos de obtención de energía. Por otro lado, reportes en la bibliografía indican que los elementos *Iniciadores* se localizan en las regiones adyacentes al sitio de inicio de la transcripción y están involucrados en la interacción con los componentes proteicos de la maquinaria basal de transcripción, especialmente en promotores carentes de caja TATA (Smale y Baltimore, 1989). El promotor de *COX5b-2* no posee caja TATA y en la región -142/-83 se encuentran cuatro elementos *Iniciadores* superpuestos con el sitio de inicio de la transcripción, localizado en -108 según las secuencias de ADNc disponibles en bases de datos. Elementos *Iniciadores* funcionales han sido identificados en genes codificantes para proteínas ribosomales de plástidos y el componente PsaD del fotosistema I en *Spinacia oleracea* (espinaca) y *Nicotiana tabacum* (tabaco), respectivamente (Nakamura y col., 2002; Achard y col., 2003). El gen *psaD/b* contiene tres elementos *Iniciadores* consecutivos, los cuales son requeridos para la respuesta a luz (Nakamura y col., 2002). En plantas no se conoce aún la identidad de las proteínas que interaccionan con estos elementos, mientras que en genes virales y de mamíferos son reconocidos por el factor de transcripción con dedos de cinc YY (Ying-Yang), capaz de actuar como activador o represor según la identidad de otros factores accesorios que se unen a YY mediante interacciones de tipo proteína-proteína (Ye y col., 1996; Riquet y col., 2001; Nguyen y col., 2004). Finalmente, es notorio destacar que la mutación de los cuatro elementos *Iniciadores* en el promotor de *COX5b-2* no anuló completamente la transcripción del gen, aparentemente porque los elementos *site II* son capaces de conducir correctamente la expresión de *COX5b-2* en ausencia de los *Iniciadores*. La pérdida completa de expresión del gen sólo se observó cuando se mutaron puntualmente y en forma conjunta los dos elementos *site II* y los cuatro elementos *Iniciadores*, indicando que los elementos *site II* podrían ser considerados componentes del núcleo del promotor con un papel en la transcripción basal del gen.

A modo de síntesis de los resultados comentados a lo largo de este Capítulo, se muestra un esquema de las diferentes regiones (y las secuencias regulatorias identificadas) involucradas en la expresión y regulación de *COX5b-2* en respuesta a diferentes compuestos (Figura 39). Los factores de transcripción involucrados se analizarán en el Capítulo III del presente Trabajo de Tesis.

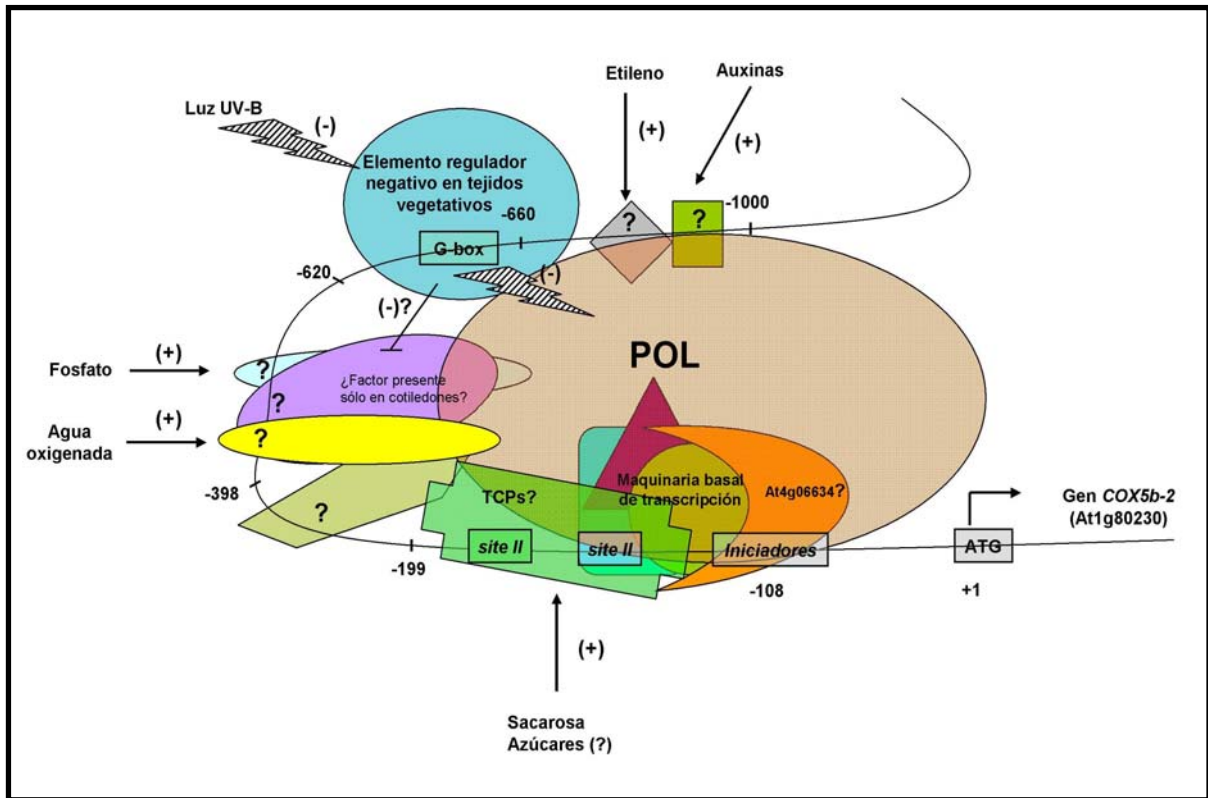


Figura 39. Representación esquemática de las regiones del promotor de *COX5b-2* y elementos *cis* responsables de la actividad y regulación del gen por diversos compuestos, según los resultados mencionados en este Capítulo. Las hipotéticas proteínas se muestran en colores y los elementos *cis* recuadrados y en negrita. *Referencias.* (+): factor que incrementa la expresión del gen; (-): factor que inhibe la expresión; (?) elemento *cis* probable o desconocido.

6. CAPÍTULO III

“Identificación de factores de transcripción involucrados en la regulación de los genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa de *Arabidopsis thaliana*”

6.1. INTRODUCCIÓN

6.1.1. Origen y organización del promotor eucariota.

La región promotora de un gen comprende secuencias de ADN involucradas en la regulación de la actividad transcripcional del mismo. La transcripción es un proceso ancestral, probablemente originado junto con el comienzo de la vida en el planeta hace aproximadamente 3500 millones de años. Los componentes básicos del aparato transcripcional y los mecanismos subyacentes de regulación génica de los organismos modernos comprenden una mezcla de configuraciones muy primitivas intercaladas con adquisiciones más recientes en términos evolutivos (Grasser y col., 2006). El estudio de genes procariotas pertenecientes al dominio *Archaea* (arqueobacterias) reveló indicios claros de un promotor eucariota prototípico (Margulis y col., 2000). En general, un “arqueo”-promotor contiene secuencias ricas en A/T, similares a la caja TATA eucariota, localizadas 25-30 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, seguidas inmediatamente por un elemento denominado BRE (TFB-Responsive Element). Estas secuencias son reconocidas por los factores de transcripción TBP (TATA-Binding Protein) y TFB, respectivamente. Este último equivale al factor eucariota TFIIB (Geiduschek y Ouhammouch, 2005). El promotor eucariota también determina la dirección de la transcripción suministrando al complejo de iniciación al menos dos puntos de contacto con el ADN (Nikolov y col., 1995). Sin embargo, posee mayor complejidad en términos de tipos y localización de elementos *cis* regulatorios (Nikolov y Burley, 1997), los cuales exhiben una considerable flexibilidad en la orientación y disposición espacial respecto a los elementos proximales del promotor. Además, giros en el ADN podrían situar elementos distales en las proximidades del núcleo del promotor, los que reclutarían o estabilizarían a los factores del complejo de iniciación a través de contactos de tipo proteína-proteína (Blackwood y Kadonaga, 1998; Bulger y Groudine, 1999). A pesar de compartir una herencia común

con todos los eucariotas, los promotores de plantas superiores poseen diferencias claras, como ser la ausencia de elementos proximales adicionales a la caja TATA (o a los elementos *Iniciadores* en genes carentes de la misma). Esto no implica que los factores TFIIIB de plantas no establezcan contactos con el núcleo del promotor, sino que estos contactos no se realizan a través del reconocimiento directo y específico del ADN (Shahmuradov y col., 2003; 2005). La mayoría de los genes de plantas codificantes para componentes del complejo de iniciación han sufrido eventos de duplicación, mientras que los metazoos y hongos poseen una única copia de estos genes (Lago y col., 2004).

6.1.2. Factores de transcripción en *Arabidopsis thaliana*.

La mayoría de los procesos fisiológicos y de desarrollo en una planta están regulados a nivel de la transcripción, incluyendo las respuestas a estímulos ambientales y diferentes tipos de estrés, control de rutas metabólicas y del proceso de fotosíntesis, o el establecimiento de relaciones simbióticas, entre otros (Doebley y Lukens, 1998; Carroll, 2000; Benfey y Weigel, 2001). Las secuencias en *cis* en los promotores son unidas por factores de transcripción específicos, los cuales establecen redes complejas de control modulando la expresión de otros genes regulatorios o de proteínas estructurales o con actividad enzimática (Davuluri y col., 2003). Los factores de transcripción son proteínas con motivos específicos de unión al ADN, capaces de activar y/o reprimir la transcripción de un determinado gen o grupo de ellos. Estas proteínas tienen una estructura modular, es decir, los dominios de unión al ADN son independientes de los involucrados en la regulación de la actividad del factor, ya sea por interacciones de tipo proteína-proteína o modificaciones post-traduccionales (Yamasaki y col., 2008). Los factores de transcripción pueden ser agrupados en diferentes familias de acuerdo a los motivos de unión al ADN (Luscombe y col., 2000). En el genoma de *Arabidopsis* se encuentran codificados alrededor de 1700 factores de transcripción, esto es, cerca del 6% de los genes codificantes para proteínas (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Plant Transcription Factor Database, 2009), los cuales se clasifican en más de cuarenta familias diferentes, algunas con un solo miembro identificado y otras con más de cien (Liu y col., 1999; Riechmann, 2002; Pérez-Rodríguez y col., 2009), mientras que varios permanecen en las bases de datos como factores de transcripción putativos de función desconocida (Haas y col., 2005). Cerca del 45% de estos factores corresponden a familias exclusivas del Reino *Plantae* (comparado con los reinos *Animalia* y *Fungi*), mientras que alrededor del 53% corresponde a familias presentes en los tres reinos. El restante grupo corresponde a factores presentes en dos de los tres reinos mencionados (Riechmann, 2002; Shiu y col., 2005). Por otro lado, algunos dominios de unión al ADN inicialmente considerados como específicos de plan-

tas están relacionados con proteínas presentes en otros organismos, en los cuales no forman parte de factores de transcripción sino de proteínas con diversas funciones metabólicas, es decir, las proteínas podrían haber evolucionado como factores de transcripción luego del evento de separación del linaje de las plantas respecto a los de animales y hongos, pero las características estructurales de estos “nuevos” dominios de unión al ADN ya se encontraban presentes en los organismos ancestrales (Ernst y col., 2004; Yamasaki y col., 2004; 2005). Las características de los principales dominios de unión al ADN presentes en los factores de transcripción de Arabidopsis se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Características estructurales de algunos dominios conservados de unión al ADN empleados para clasificar los factores de transcripción de plantas. Adaptado de Liu y col. (1999)¹.

Tipo de dominio de unión al ADN	Estructura
Dedos de cinc	Cada motivo “dedo” es mantenido por residuos de cisteína y/o histidina organizados alrededor de un ión cinc.
bZIP	Región básica (unión al ADN) adyacente a un motivo similar a un dominio cierre de leucinas (dimerización).
MYB	Región básica (unión al ADN) con una a tres repeticiones imperfectas, cada una dispuesta en forma de hélice-hélice-vuelta-hélice.
Trihélice	Región básica + región ácida + motivo rico en residuos de prolina/glutamina, cada uno de los cuales se pliega formando un dominio de tres hélices.
Homeodominio	60 aminoácidos que se pliegan en forma de un extremo N-terminal flexible seguido de tres hélices α conectadas por un rulo y una vuelta.
bHLH	Región de residuos básicos adyacente a un motivo hélice-rulo-hélice.
MADS	Aproximadamente 57 residuos que forman una larga hélice α seguida de dos hojas β plegadas.
AT-hook	Secuencia conservada R(G/P)RGRP dentro de la región RGR, la cual contacta zonas ricas en A/T en el surco menor del ADN.
Caja HMG	Tres hélices α con un ángulo de cerca de 80° entre los extremos flexibles.
AP2/EREBP	Región ácida de 68 residuos con un dominio conservado que se pliega formando una hoja β plegada seguida por una hélice α anfipática.
B3	Siete laminas β con dos hélices α intercaladas (una entre las láminas 2 y 3, la otra entre las láminas 5 y 6).

¹ Los términos “turn” y “loop” fueron traducidos como vuelta y rulo, respectivamente.

Dado que en los dos primeros capítulos de esta Tesis se analizaron las regiones promotoras de los genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa de *Arabidopsis*, identificándose varios elementos *cis* involucrados en la regulación de la expresión de los mismos, nos interesó estudiar qué factores de transcripción eran capaces de interactuar con los elementos identificados, en un intento de profundizar el conocimiento acerca de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de los genes mencionados

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Los promotores de los genes *COX5b-1*, *COX5b-2* y *Cytc-2* presentan elementos G-box cercanos a un motivo ACGT.

El promotor de *COX5b-1* (At3g15640) contiene un elemento G-box localizado en el nucleótido -228 desde el sitio de inicio de la traducción que resulta esencial para la expresión del gen, dado que una mutación puntual del mismo anula por completo la expresión en todos los órganos y tejidos de la planta (Capítulo I; Comelli y col., 2009). Por otro lado, el promotor de *COX5b-2* (At1g80230) presenta un elemento G-box localizado en la posición -636 que actúa como elemento regulador negativo de la expresión del gen en tejidos vegetativos y participa en la respuesta a luz UV (Capítulo II; Comelli y González, 2009). Los dos genes poseen, además, un motivo ACGT aparentemente no funcional situado corriente abajo del elemento G-box (Capítulos I y II; Comelli y col., 2009; Comelli y González, 2009). Resulta interesante el hecho de que los elementos mencionados se disponen en forma similar a la observada en el gen *Cytc-2* (At4g10040), que codifica una isoforma del citocromo c, proteína íntimamente relacionada con la función de la citocromo c oxidasa. (Figura 40).

En el gen *Cytc-2*, la mutación puntual del motivo ACGT anula por completo la expresión del gen, mientras que la del elemento G-box ocasiona una reducción del 50% en la expresión, indicando que este último desempeña una función no esencial (Welchen y col., 2009). Ensayos de simple híbrido en levaduras permitieron identificar seis factores de transcripción, pertenecientes a las familias bZIP y bHLH, capaces de interactuar con esta región del promotor de *Cytc-2* (Tabla 5; Welchen y col., 2009).

<i>Cytc-2</i>	(-189)	ACCACTATTTAGACGCC	CACGTGT	TACCCAGAA-----	CAAAACGTATGGCCTGTGTA
<i>COX5b-1</i>	(-246)	ATATAGGGTCCCCTGAC	CACGTGT	TGTA	CTACTATGTAGTTTCACACGTACCGGTTAATAT
<i>COX5b-2</i>	(-662)	TCAGTGTTCGGCCAGGA	CACGTGT	CTACTTTCTT----	GAGCACGTTTTACCACATGA

Figura 40. Comparación de las regiones promotoras de los genes *Cytc-2*, *COX5b-1* y *COX5b-2*, las que contienen un elemento G-box seguido de un motivo ACGT. Entre paréntesis se indica la posición del primer nucleótido mostrado en la secuencia respecto al sitio de inicio de la traducción correspondiente. Los elementos G-box y los motivos ACGT se destacan en amarillo. Las rayas en las secuencias representan espacios adicionados para lograr el perfecto alineamiento entre los elementos referidos.

Tabla 5. Factores de transcripción capaces de interactuar con la región -189/-139 del promotor de *Cytc-2*, identificados mediante ensayos de simple híbrido en levaduras. Los patrones de expresión corresponden a reportes en las bases de datos (<http://bbc.botany.utoronto.ca/>).

Nº de acceso	Nombre	Familia	Patrón de expresión	Referencias
At1g35460	bHLH080	bHLH	Cotiledones, hojas y flores (alta en pétalos y sépalos, baja en estambre y carpelos).	Hein y col., 2003; Toledo-Ortiz y col., 2003
At4g09180	bHLH081	bHLH		
At4g36730	GBF-1	bZIP	Hojas jóvenes y flores.	Schindler y col., 1992
At2g46270	GBF-3	bZIP	Cotiledones, hojas senescentes y flores.	
At1g32150	AtbZIP68	bZIP	Meristemas, hojas, cotiledones, carpelos y vainas jóvenes.	Shen y col., 2007
At3g19290	AREB2/ABF4	bZIP	Meristemas, cotiledones, hojas y flores.	Uno y col., 2000; Kang y col., 2002.

Las proteínas AREB2/ABF4, GBF-1 y AtbZIP68 fueron más efectivas en la activación del gen reportero *HIS3* bajo el control del promotor de *Cytc-2* (Figura 41A). Las medidas de actividad específica al utilizar como reportero el gen de la β-galactosidasa indicaron que AREB2/ABF4 ocasionó un incremento de diez veces en los niveles de activación.

dad respecto a la cepa control, mientras que los niveles observados para GBF-1 y AtbZIP68 fueron de tres a cuatro veces superiores (Figura 41B). En este sistema, los niveles de actividad de GBF-3, bHLH080 y bHLH081 fueron similares a los registrados para la cepa control (Figura 41B).

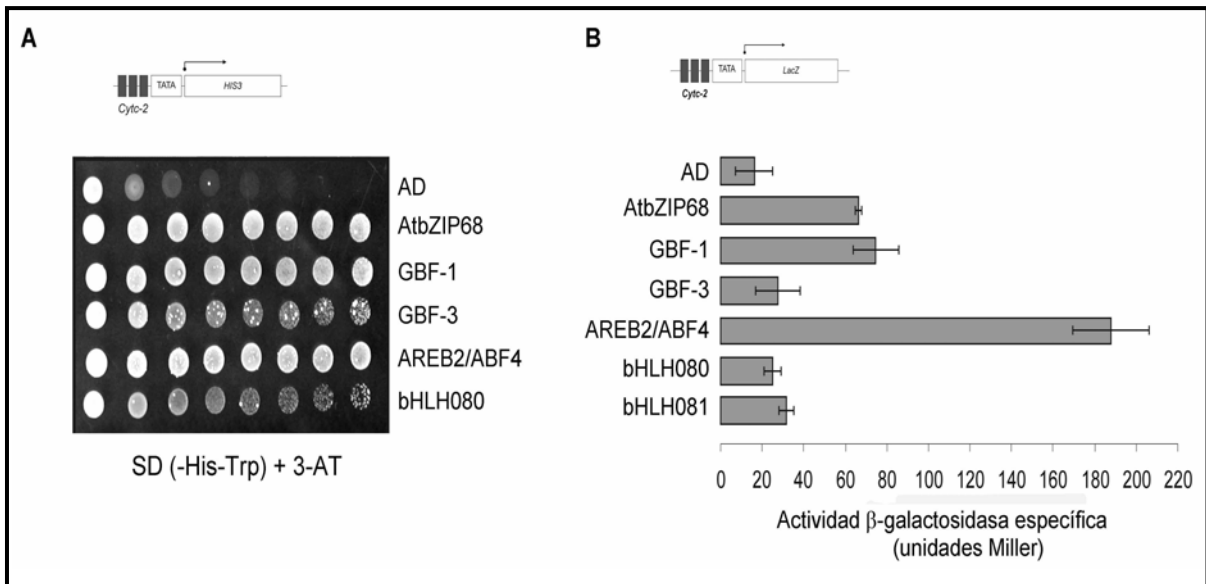


Figura 41. Identificación de factores de transcripción de *Arabidopsis* capaces de interactuar con la región -189/-139 del promotor de *Cytc-2*. Ensayos de simple híbrido en levaduras utilizando los genes *HIS3* (**A**) y *LacZ* (**B**) como reporteros. La activación del gen *HIS3* se evaluó por la capacidad de los diferentes clones de recuperar el crecimiento de las levaduras en medio mínimo sin histidina (SD-His) y con el agregado de 0,2 mM del inhibidor 3-AT utilizando diluciones seriadas de 1/10 de los correspondientes cultivos, partiendo de una $DO_{600} = 1,0$. En los ensayos de medición de la actividad β -galactosidasa específica, las barras representan el promedio de tres ensayos independientes. En todos los casos, se utilizaron levaduras transformadas con el dominio de activación de GAL4 (AD) como control negativo.

Teniendo en cuenta las similitudes y diferencias existentes entre los promotores de los genes *Cox5b* y *Cytc-2*, se decidió evaluar la capacidad de los factores de transcripción identificados para el promotor de *Cytc-2* (Tabla 5; Welchen y col., 2009) de interactuar con las regiones promotoras de *COX5b-1* y *-2* que contienen los elementos G-box.

6.2.2. El factor de transcripción AREB2/ABF4 interacciona con el elemento G-box de *COX5b-1*.

El primer paso para evaluar la capacidad de los factores de transcripción de interaccionar con el promotor de *COX5b-1* fue obtener la cepa reportera adecuada para los ensayos de simple híbrido en levaduras. Entonces, tres copias en tándem de la región -259/-196 del promotor se clonaron delante del gen *LacZ* conducido por un promotor mínimo. Esta construcción se empleó para transformar levaduras de la cepa Y187, se seleccionaron aquellas capaces de crecer en medios carentes de uracilo y esta cepa reportera, denominada "5b1G-box" (en su genoma contenía el fragmento de promotor de *COX5b-1* delante de la secuencia codificante para la β -galactosidasa), se transformó luego con los plásmidos que contenían la secuencia codificante de los factores de transcripción fusionados al dominio de activación de GAL4. La capacidad de cada factor de transcripción de interaccionar con el fragmento del promotor de *COX5b-1* se determinó mediante mediciones cuantitativas de la actividad β -galactosidasa, utilizando el sustrato ONPG. El factor de transcripción AREB2/ABF4 aumentó la expresión del gen reportero hasta valores veinte veces superiores respecto al control negativo (Figura 42). Las proteínas GBF-1 y AtbZIP68 mostraron niveles de activación de cuatro veces respecto al control, mientras que las restantes proteínas ensayadas mostraron niveles de actividad similares al control, producto de la transformación con un plásmido que expresa sólo el dominio de activación de GAL4 (Figura 42). Los resultados obtenidos indicaron que factores de transcripción pertenecientes a la familia bZIP fueron capaces de interaccionar con la región del promotor de *COX5b-1* comprendida entre -259 y -196, aquella que contiene el elemento G-box esencial para la expresión del gen (Capítulo I, Comelli y col., 2009). En particular, AREB2/ABF4 resultó un candidato interesante, teniendo en cuenta los elevados niveles de activación mostrados en los ensayos comentados y el similar patrón de expresión entre este factor de transcripción (Uno y col., 2000; Kang y col., 2000) y *COX5b-1* (Welchen y col., 2004).

La especificidad de unión del factor de transcripción AREB2/ABF4 se evaluó utilizando como reportera una cepa de levadura transformada con el fragmento del promotor de *COX5b-1* con el elemento G-box mutado en forma puntual. Los factores de transcripción fueron incapaces de activar la expresión del gen *LacZ* en esta cepa, obteniéndose valores similares a los de la cepa control (no se muestra). Esto indica que AREB2/ABF4, AtbZIP68 y GBF-1 interaccionan *in vivo* en forma específica con el elemento G-box localizado en la posición -228 del promotor de *COX5b-1*.

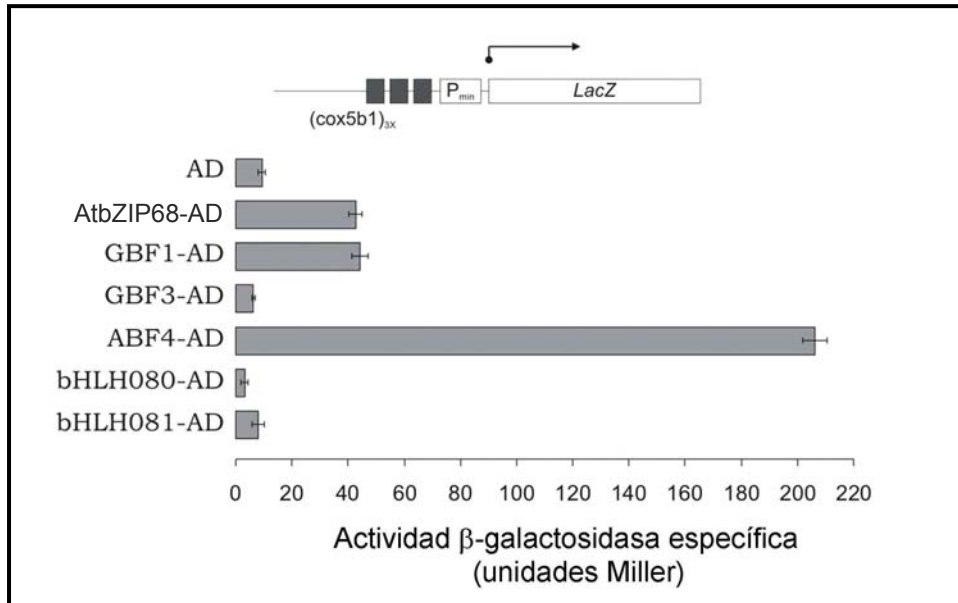


Figura 42. El factor de transcripción AREB2/ABF4, perteneciente a la familia bZIP, interacciona con la región -259/-196 del promotor de *COX5b-1*. Ensayos de simple híbrido en levaduras utilizando el gen *LacZ* como reportero. Las barras representan el promedio de tres ensayos independientes de medición de la actividad específica β-galactosidasa. Se utilizaron levaduras transformadas con el dominio de activación de GAL4 (AD) como control negativo.

6.2.2.1. El dominio bZIP de AREB2/ABF4 reconoce específicamente el elemento G-box presente en el promotor de *COX5b-1*.

Para estudiar la interacción de algunas de las proteínas mencionadas con el promotor de *COX5b-1* *in vitro*, se expresaron en *Escherichia coli* la proteína bHLH080 completa y la región correspondiente al dominio bZIP de AREB2/ABF4 (aminoácidos 331 a 410) y AtbZIP68 (aminoácidos 276 a 389) como proteínas de fusión. La especificidad de unión al promotor de *COX5b-1* se evaluó mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) empleando las proteínas recombinantes y distintas variantes del fragmento -259/-196 del promotor marcado radiactivamente. Para AREB2/ABF4, se observó una banda de retardo al utilizar fragmentos del promotor con el elemento G-box intacto (Figura 43A, calles 1 y 3), mientras que esta banda no se detectó al utilizar los fragmentos con el elemento G-box mutado en forma puntual (Figura 43A, calles 2 y 4). La mutación del motivo ACGT no afectó la interacción de la proteína con el fragmento de promotor, indicando que AREB2/ABF4 fue incapaz de unir la región -259/-196 del promotor de *COX5b-1* en ausencia del elemento G-box, aún cuando se encuentre un elemento muy relacionado en secuencia (CACACGTACC vs. GACACGTTGTG) alrededor del motivo ACGT.

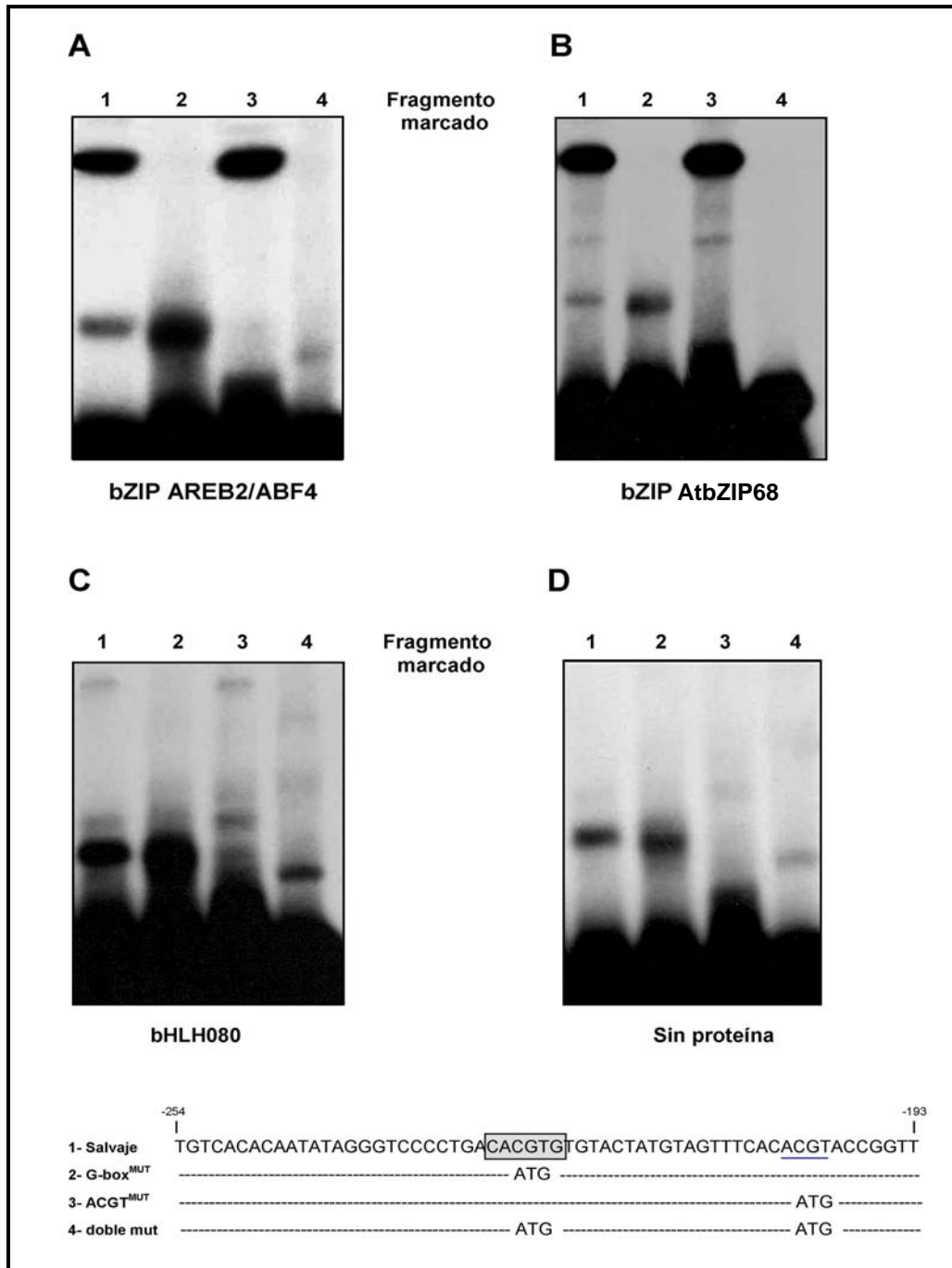


Figura 43. Los factores de transcripción AREB2/ABF4 y AtbZIP68 unen *in vitro* el elemento G-box localizado en la región -259/-196 del promotor de *COX5b-1*. Ensayos de retardo en gel (EMSA) empleando 100 ng de proteína recombinante con diferentes variantes del fragmento de promotor marcado radiactivamente. Se utilizaron los dominios bZIP de AREB2/ABF4 (**A**) y AtbZIP68 (**B**) y la proteína bHLH080 completa (**C**). Los fragmentos libres, sin agregado de proteína recombinante (**D**), se utilizaron como control. Las secuencias de los fragmentos de promotor utilizados (calles 1 a 4) se muestran en la parte inferior de la figura. En las mutantes sólo se muestran los nucleótidos modificados en forma puntual. El elemento G-box se destaca con un recuadro gris y el motivo ACGT subrayado en la parte inferior de la secuencia.

Los requisitos de unión del factor de transcripción AREB2/ABF4 se relacionan con el efecto sobre la expresión de *COX5b-1* de las mutaciones en el elemento G-box y el motivo ACGT, esto es, el elemento G-box es esencial para la expresión de *COX5b-1* (Capítulo I; Comelli y col., 2009) y fue capaz de interactuar con el factor de transcripción ensayado, mientras que el motivo ACGT no sería funcional en este gen (Capítulo I; Comelli y col., 2009) y fue incapaz de interactuar con la proteína AREB2/ABF4 recombinante. La proteína bHLH080 completa unió el promotor de *COX5b-1* con baja eficiencia (Figura 43C), avalando los ensayos de simple híbrido en los cuales este factor falló en activar la expresión del gen reportero. Por otro lado, el dominio bZIP de AtbZIP68 mostró patrones de unión e intensidad de señal similares a los observados para AREB2/ABF4 (Figura 43B). De acuerdo a esto, la diferencia en los niveles de activación entre AREB2/ABF4 y AtbZIP68 en los ensayos de simple híbrido se deberían, probablemente, a la naturaleza de los aminoácidos situados por fuera del dominio de unión al ADN y a la capacidad de éstos de establecer distintas interacciones (con residuos de la misma proteína o con otros factores) propias de cada factor de transcripción. Otra causa podría ser una diferencia en los niveles de expresión en levaduras de cada factor de transcripción ensayado. Sin embargo, esta alternativa no se sostiene ante los resultados comentados en la siguiente sección, en los cuales se observó un comportamiento opuesto entre estas proteínas al interactuar con el promotor de *COX5b-2*.

6.2.3. El factor de transcripción AtbZIP68 interactúa específicamente con el elemento G-box de *COX5b-2*.

Un estudio similar al descrito más arriba se llevó a cabo con el fragmento del promotor de *COX5b-2* que contiene un elemento G-box y un motivo ACGT. En primer lugar, tres copias en tándem de la región -659/-604 de *COX5b-2* se clonaron delante del gen *LacZ* conducido por un promotor mínimo. Se utilizó la versión salvaje del promotor, por un lado, y otra de igual tamaño pero con el elemento G-box mutado en forma puntual, por el otro. Las cepas reporteras seleccionadas se denominaron “5b2G-box” y “5b2G-box^{MUT}”, respectivamente, y se transformaron luego con los plásmidos que contenían la secuencia codificante de los factores de transcripción fusionados al dominio de activación de GAL4.

Las mediciones cuantitativas de la actividad específica β -galactosidasa utilizando el sustrato ONPG indicaron que sólo el factor de transcripción AtbZIP68 fue capaz de activar la expresión del gen reportero en la cepa que contenía en su genoma el fragmento salvaje del promotor (“5b2G-box”), observándose niveles de actividad diez veces superio-

res a los registrados para la cepa control (Figura 44A). Este mismo factor falló en activar la expresión del gen reportero *LacZ* en la cepa que contenía en su genoma el fragmento de promotor de igual tamaño pero con el elemento G-box mutado puntualmente (Figura 44B). Las proteínas AREB2/ABF4 y GBF-3 fueron incapaces de interactuar con el promotor de *COX5b-2* salvaje (Figura 44A), mientras que bHLH080 mostró pequeños niveles de activación (cerca del doble de los respectivos controles), tanto para la cepa con el fragmento salvaje como para aquella con el elemento G-box mutado (Figura 44B), indicando que este miembro de la familia bHLH establece interacciones débiles con elementos o secuencias situadas por fuera del elemento G-box. No se obtuvo evidencia de interacción de los factores de transcripción ensayados con el motivo ACGT.

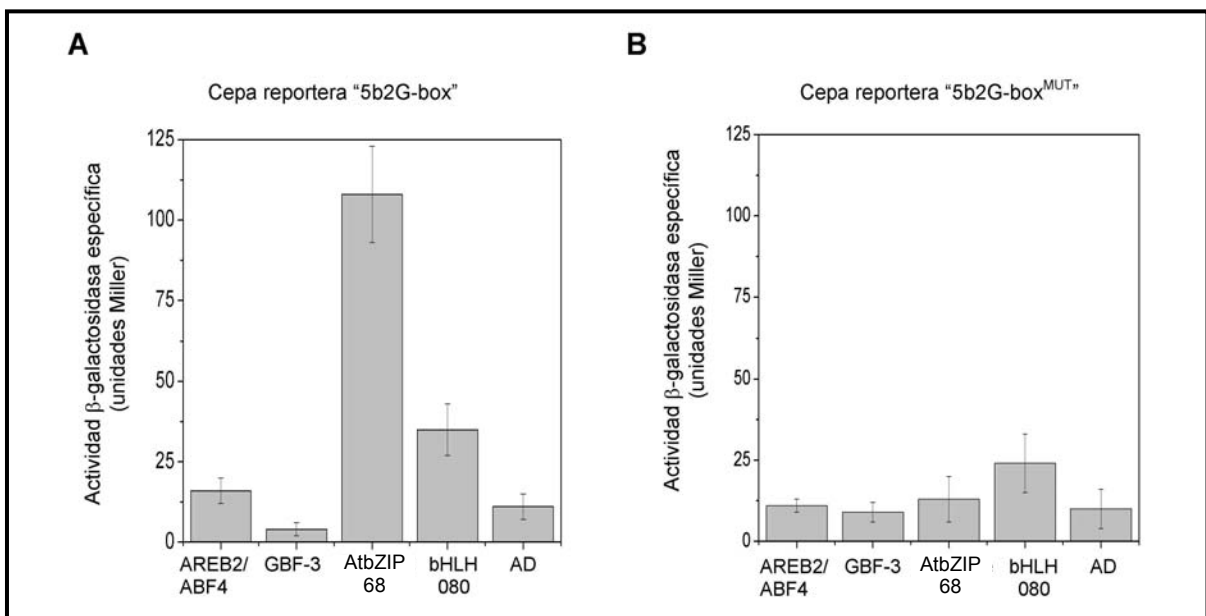


Figura 44. El factor de transcripción AtbZIP68 interactúa específicamente con el elemento G-box presente en el promotor de *COX5b-2*. Ensayos de simple híbrido en levaduras utilizando el gen *LacZ* como reportero. Las cepas "5b2G-box" (**A**) y "5b2G-box^{MUT}" (**B**) indican las reporteras que contenían el fragmento -659/-604 del promotor de *COX5b-2* con el elemento G-box intacto o mutado en forma puntual, respectivamente. Las barras representan el promedio de tres ensayos independientes de medición de la actividad específica β -galactosidasa. Se utilizaron levaduras transformadas con el dominio de activación de GAL4 (AD) como control negativo.

Los resultados obtenidos indicaron que solamente el factor de transcripción Atb-ZIP68 fue capaz de interactuar en forma específica con el elemento G-box de *COX5b-2*, comportamiento claramente diferente al observado para los genes *COX5b-1* y *Cytc-2*. Esto sugiere que distintos miembros de la misma familia de factores de transcripción interactúan con elementos regulatorios similares presentes en los distintos promotores, lo cual está de acuerdo con el hecho de que estos elementos afectan en forma diferente la actividad de los genes blanco, activando o reprimiendo, según el caso.

6.2.4. La región -333/-259 de *COX5b-1* es reconocida por factores de transcripción con dominios de unión al ADN de tipo HD, trihélice y AP2.

La región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* contiene varios elementos necesarios para la máxima expresión del gen en tejidos vegetativos. Los elementos con la secuencia ATCATT se disponen en pares separados por cuatro nucleótidos, y determinan los niveles basales de expresión y la inducción por sacarosa y otros carbohidratos. Las secuencias similares al elemento *distalB* (CCACTTG) son necesarias para potenciar la respuesta a la hormona ABA y el elemento P1BS (GTATATGC) actúa como regulador negativo de la expresión, principalmente a nivel de raíces (Capítulo I; Comelli y col., 2009). Se decidió, entonces, identificar los factores de transcripción capaces de interactuar con esta región del promotor mediante ensayos de simple híbrido en levaduras. En primer lugar, tres copias en tándem del fragmento -333/-259 de *COX5b-1* se clonaron delante del gen reportero *HIS3* conducido por un promotor mínimo y se transformaron levaduras (*S. cerevisiae*) de la cepa Y187. La construcción mencionada se integró por recombinación en el genoma de las levaduras y la cepa reportera resultante se transformó con una biblioteca de ADNc completos de factores de transcripción de Arabidopsis fusionados al dominio de activación de GAL4 (Kim y col., resultados no publicados). Se aislaron veinticuatro clones capaces de crecer en medio carente de histidina, los cuales se analizaron transformando nuevamente levaduras de la cepa reportera con los plásmidos preparados a partir de cultivos de estas veinticuatro colonias, obteniéndose idénticos resultados (no se muestra). La posterior determinación de la secuencia de ADN de los clones aislados permitió identificar seis factores de transcripción (Tabla 6), pertenecientes a las familias HD-ZIP, GT (trihélice), PHD y AP2/ERF, todas exclusivas de plantas (Liu y col., 1999; Riechmann, 2002; Plant Transcription factor Database, 2009).

Tabla 6. Factores de transcripción capaces de interactuar con la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*, identificados mediante ensayos de simple híbrido en levaduras. Los patrones de expresión corresponden a reportes en las bases de datos (<http://bbc.botany.utoronto.ca/>).

Nº de acceso	Nombre	Familia	Patrón de expresión	Referencias
At2g22430	ATHB-6	HD-ZIP	Hojas caulinares y senescentes.	Södermann y col., 1996; 1999; Lee y col., 2001; Ariel y col., 2007.
At2g18550	ATHB-21	HD-ZIP	Meristemas, cotiledones y estambres.	
At4g36740	ATHB-40	HD-ZIP	Raíz, estambres, ovarios y estigma.	
At2g38250	GT3b	GT (trihélice)	Cotiledones, sépalos y células de la guarda y del mesófilo.	Ayadi y col., 2004.
At5g20510	---	PHD	---	---
At3g23220	---	AP2/ERF	Cotiledones, hojas jóvenes, sépalos y estambres.	Gutterson y Reuber, 2004.

La eficiencia de los clones para recuperar el crecimiento de las levaduras en ausencia de histidina se analizó utilizando diluciones seriadas de los correspondientes cultivos. Las proteínas ATHB-21, ATHB-40, GT3b y AT3G23220 fueron muy efectivas en la activación del gen reportero, dado que las respectivas cepas de levaduras fueron capaces de crecer a altas diluciones, mientras que el crecimiento fue menor para AT5G20510 y nulo para ATHB-6 (Figura 45A). Una medición cuantitativa de la activación se obtuvo mediante ensayos empleando el gen de la β -galactosidasa como reportero. Para ello, se clonó la región del promotor de *COX5b-1* comentada con anterioridad (-333/-259) delante del gen reportero *LacZ*, se transformaron levaduras, se seleccionó la cepa reportera y se transformó con los plásmidos que contenían el dominio de activación de GAL4 fusionado a los factores de transcripción en estudio. Las medidas de actividad específica β -galactosidasa mostraron, en concordancia con los ensayos con el gen *HIS3* como reportero, que las proteínas ATHB-21, ATHB-40, GT3b y AT3G23220 incrementaron entre siete y ocho veces los niveles de actividad del gen reportero *LacZ* respecto a la cepa control (Figura 45B). Los niveles observados para AT5G20510 fueron dos veces superiores respecto a la cepa control, mientras que ATHB-6 fue, nuevamente, incapaz de activar la expresión del gen, al menos en las condiciones empleadas en estos sistemas (Figura 45B).

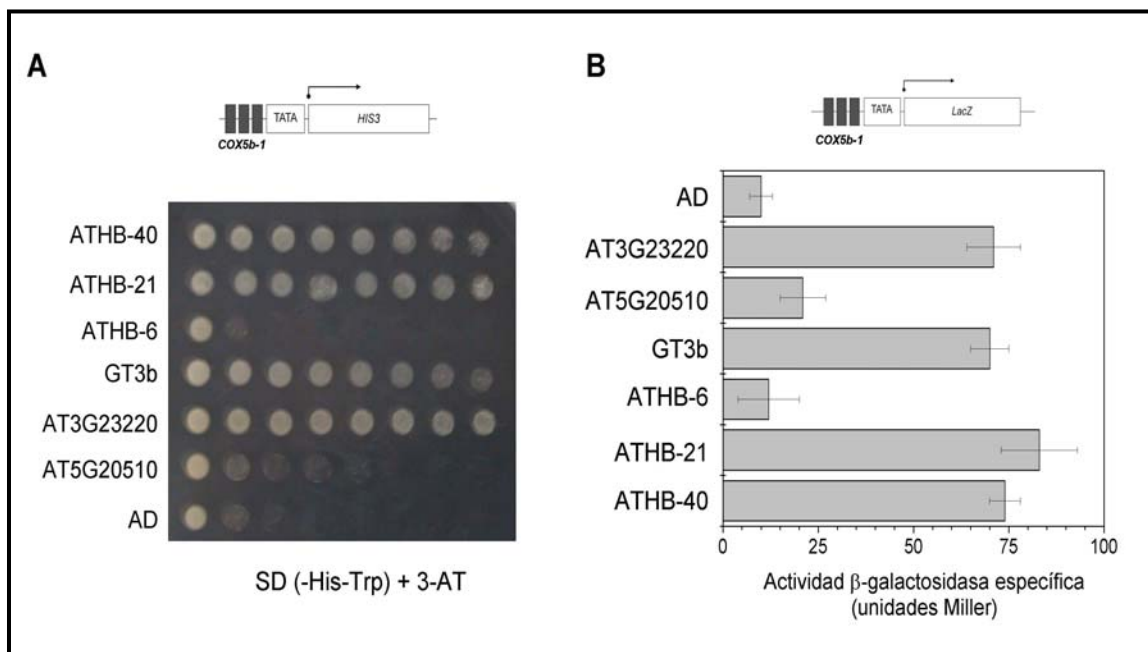


Figura 45. Aislamiento e identificación de factores de transcripción de *Arabidopsis* capaces de interactuar con la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*. Ensayos de simple híbrido en levaduras utilizando los genes *HIS3* (**A**) y *LacZ* (**B**) como reporteros. La activación del gen *HIS3* se evaluó por la capacidad de los diferentes clones de recuperar el crecimiento de las levaduras en medio mínimo sin histidina y con el agregado de 0,2 mM del inhibidor 3-AT (véase Materiales y Métodos) utilizando diluciones seriadas de 1/10 de los correspondientes cultivos, partiendo de una $DO_{600} = 1,0$. En los ensayos de medición de la actividad específica β-galactosidasa, las barras representan el promedio de tres ensayos independientes. En todos los casos, se utilizaron levaduras transformadas con el dominio de activación de GAL4 (AD) como control negativo.

La escasa o nula capacidad de AT5G20510 y ATHB-6 de activar la expresión de los genes reporteros empleados determinó que no se realizaran estudios adicionales con estos factores de transcripción. Las proteínas ATHB-21 y ATHB-40 presentan alta homología y poseen idénticos residuos en 54 de las 60 posiciones del homeodominio (dominio de unión a ADN) y todos los residuos de la hélice III o de reconocimiento, es decir, aquella que establece los contactos principales con el ADN, se encuentran conservados (Figura 46), por lo que se decidió profundizar el estudio sólo con ATHB-21.

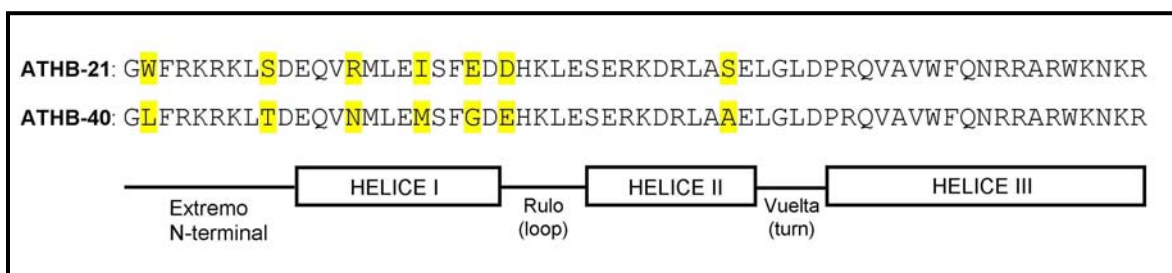


Figura 46. Alineamiento de las secuencias proteicas correspondientes a los homeodominios (HD) de ATHB-21 y ATHB-40. En amarillo se destacan los residuos no conservados entre ambos. El diagrama inferior corresponde a la estructura secundaria de un HD típico. En la interacción con el ADN participan el brazo N-terminal flexible, que establece contactos con el surco menor del ADN, y la hélice III o de reconocimiento, la que se posiciona en el surco mayor del ADN y determina la especificidad de los contactos establecidos (Kisinger y col., 1990; Li y col., 1995).

Tabla 7. Cepas reporteras de levadura obtenidas para evaluar la capacidad de los diferentes elementos *cis* presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* de interactuar con los factores de transcripción seleccionados.

Nombre	Descripción
wt	Fragmento salvaje de promotor, con los elementos de núcleo TCAT, las secuencias similares al elemento <i>distalB</i> y el elemento P1BS intactos. Esta cepa se utilizó para los ensayos comentados en la sección 6.2.4.
TCAT ^{MUT}	Los cinco elementos con núcleo TCAT mutados en forma puntual.
distB ^{MUT}	Las dos secuencias similares al elemento <i>distalB</i> mutadas en forma puntual.
P1BS ^{MUT}	El elemento P1BS mutado en forma puntual.

La disponibilidad de fragmentos correspondientes a la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* con los diferentes elementos regulatorios mutados en forma puntual (Capítulo I; Comelli y col., 2009) permitió evaluar la capacidad de esos elementos de interactuar con los factores de transcripción ATHB-21, GT3b y AT3G23220. Para ello, se obtuvieron cepas reporteras de levaduras con tres copias en tándem de las diferentes variantes mutantes de la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* delante de la secuencia codificante para la β -galactosidasa (Tabla 7). Luego, se transformaron con los plásmidos que contenían el dominio de activación de GAL4 (AD) fusionado a los factores de

transcripción mencionados, se seleccionaron aquellos clones capaces de crecer en ausencia de triptófano y uracilo, y se realizaron ensayos en medio líquido empleando el sustrato ONPG.

6.2.4.1. Los factores de transcripción ATHB-21 y GT3b reconocen las secuencias de núcleo TCAT presentes en el promotor de *COX5b-1*.

Las medidas de actividad específica β -galactosidasa indicaron que las proteínas ATHB-21 y GT3b aumentaron los niveles de expresión del gen reportero *LacZ* de manera similar en las cepas “wt”, “*distB*^{MUT}” y “*P1BS*^{MUT}”, mientras que fallaron en hacerlo en la cepa “*TCAT*^{MUT}”, en la que se obtuvieron valores idénticos o apenas superiores al control (Figura 47). Esto sugiere que los factores de transcripción mencionados serían capaces de interactuar con los elementos de núcleo TCAT presentes en el promotor de *COX5b-1*.

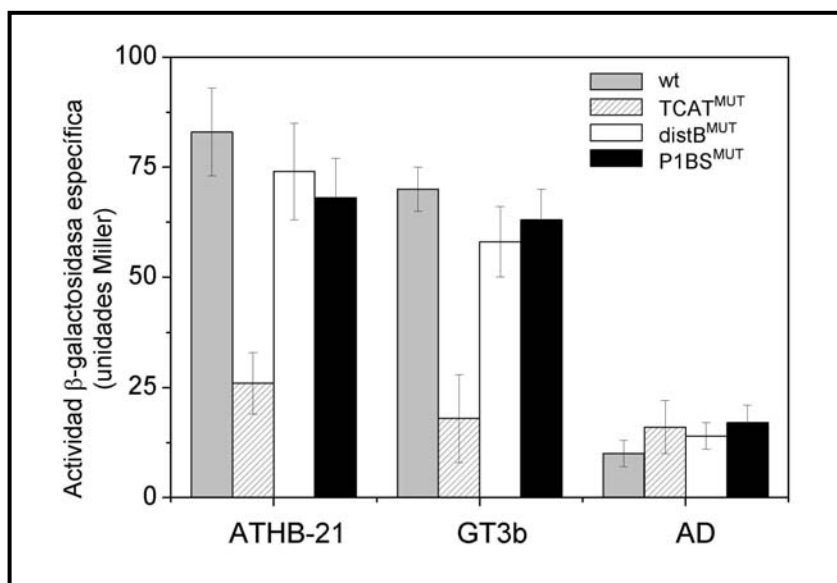


Figura 47. Los factores de transcripción ATHB-21 y GT3b interactúan con los elementos de núcleo TCAT presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*. Las barras representan el promedio de tres ensayos de medición de la actividad β -galactosidasa independientes. En todos los casos, se utilizaron levaduras transformadas con el dominio de activación de GAL4 (AD) como control negativo. Las características de cada cepa reportera se detallan en la Tabla 7.

Los factores de transcripción ATHB-21 y GT3b se expresaron completos y en forma recombinante en *Escherichia coli* como proteínas de fusión a GST (Glutación S-transferasa de *Schistosoma japonicum*) y se evaluó su capacidad de interactuar *in vitro* con las secuencias de núcleo TCAT presentes en *COX5b-1*. En la Figura 48 se muestran los ensayos de retardo en gel (EMSA) con las proteínas recombinantes y distintas variantes de la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* marcado radiactivamente. La proteína ATHB-21 fue capaz de interactuar con los fragmentos de promotor que poseían algún elemento de núcleo TCAT, mientras que las bandas de retardo desaparecieron completamente al utilizar un fragmento marcado con todos los elementos mencionados mutados en forma puntual (Figura 48A, panel izquierdo). La especificidad de unión de ATHB-21 a los núcleos TCAT se evaluó mediante ensayos de competencia, agregando a la mezcla de unión distintos fragmentos no marcados en una concentración molar veinticinco veces superior a la del fragmento salvaje marcado. Estos ensayos indicaron que los fragmentos de promotor con los cinco elementos de núcleo TCAT mutados no compitieron por la formación de los complejos de unión (Figura 48A, panel derecho, calles 4 y 8), mientras que los restantes fragmentos, con al menos dos núcleos TCAT intactos, fueron suficientes para hacer desaparecer las bandas de unión (Figura 48A, panel derecho). El comportamiento observado para la proteína GT3b fue idéntico al de ATHB-21 (Figura 48B). Sin embargo, se necesitó mayor cantidad de proteína recombinante (750 ng de GT3b vs. 100 ng de ATHB-21) para lograr similar intensidad en la señal correspondiente a los complejos de unión.

La GST de *S. japonicum* es incapaz de unir ADN (Palena y col., 1999). Sin embargo, para descartar cualquier efecto de la GST en el comportamiento de ATHB-21 o GT3b, las proteínas recombinantes fueron tratadas con el factor Xa, proteasa que permite separar la GST de las proteínas en estudio. Los resultados obtenidos con las proteínas sin GST fueron idénticos a los observados con las proteínas de fusión (no se muestra), indicando que el comportamiento observado se debe a características propias de los factores de transcripción.

Los resultados detallados en esta sección indican que las proteínas ATHB-21 y GT3b, pertenecientes a las familias HD-ZIP y GT de factores de transcripción de plantas, fueron capaces de reconocer específicamente los elementos de núcleo TCAT presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*, los mismos elementos responsables de la inducción por sacarosa y otros carbohidratos (Capítulo I; Comelli y col., 2009). Es probable que ATHB-40 se comporte de manera similar, dado que posee idénticos residuos en la hélice de reconocimiento del homeodominio respecto a ATHB-21, según lo comentado con anterioridad.

6.2.4.2. El factor de transcripción AT3G23220 interacciona con las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en el promotor de *COX5b-1*.

Las medidas de actividad β -galactosidasa específica indicaron que la proteína AT3G23220 fue capaz de aumentar de manera similar la expresión del gen reportero en las cepas “wt”, “TCAT^{MUT}” y “P1BS^{MUT}”, pero no lo hizo en la cepa “*distalB*^{MUT}” (Figura 49), sugiriendo que este factor de transcripción interacciona con las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en el promotor de *COX5b-1*, aquellas que actuarían como potenciadores de la inducción por ABA (Capítulo I; Comelli y col., 2009).

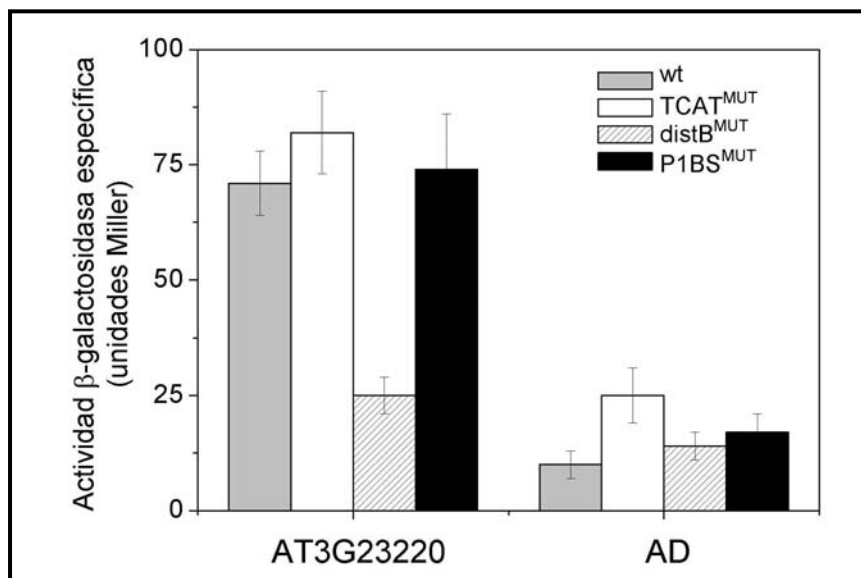


Figura 49. El factor de transcripción AT3G23220 interacciona con las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*. Ensayos de medición de la actividad específica β -galactosidasa. Las barras representan el promedio de tres ensayos independientes. Se utilizaron levaduras transformadas con el dominio de activación de GAL4 (AD) como control negativo. Las características de cada cepa reportera se detallan en la Tabla 7.

El factor de transcripción AT3G23220 se expresó completo y en forma recombinante en *E. coli* como proteína de fusión a GST o a MBP. Sin embargo, no se pudo evaluar su capacidad de interaccionar *in vitro* con las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en *COX5b-1* dado que en ensayos de retardo en gel (EMSA) fue incapaz de unir el fragmento salvaje del promotor marcado radiactivamente (no se muestra). Se incubó la proteína en diferentes condiciones de temperatura y pH y en presencia de diferentes sales, extractos fosforilantes y agentes oxidantes y reductores, pero todos los es-

fuerzas fueron infructuosos. Esto sugiere que la proteína AT3G23220 requeriría, para unir eficientemente ADN, modificaciones post-traduccionales que no ocurren en *E. coli* pero sí en levaduras o algún ión o cofactor que se perdería en el proceso de purificación de la proteína recombinante. Otra posibilidad es que la proteína no adquiriera un plegamiento correcto en la bacteria.

6.2.5. Los factores de transcripción AREB2/ABF4, ATHB-21, GT3b y AT3G23220 son reguladores positivos de la expresión del gen *COX5b-1*.

La capacidad de los factores de transcripción AREB2/ABF4, ATHB-21, GT3b y AT3G23220 de modular la expresión del gen *COX5b-1* se estudió *in planta*. Con este fin, se transformaron plantas de *Arabidopsis* con construcciones que contenían la secuencia codificante completa de los factores de transcripción mencionados bajo el control del promotor 35SCaMV, el cual permite la sobreexpresión de las proteínas de interés (Jefferson y col., 1987; véase punto 3.3.1 en Materiales y Métodos). En plantas transformadas en forma estable con las construcciones mencionadas, se observó que los niveles de transcripto de *COX5b-1* se encontraban aumentados con respecto a los de plantas no transformadas (Figura 50). En particular, la sobreexpresión de AREB2/ABF4 y de AT3G23220 ocasionó un aumento en los niveles de transcripto de cinco veces, mientras que para ATHB-21 y GT3b se observó un aumento menor (Figura 50).

Las construcciones que sobreexpresan los factores de transcripción también fueron introducidas en forma transiente en cuatro líneas de plantas que contenían distintas formas del promotor de *COX5b-1* fusionadas al gen reportero *gus* (construcciones -387, $\Delta(-333/-259)$, M3 y M7 del promotor de *COX5b-1*; véase Figura 17, Capítulo I). La determinación de actividad específica GUS en extractos de estas plantas transformadas indicó que el factor de transcripción AREB2/ABF4 es capaz de activar la expresión del gen reportero en todas las construcciones empleadas (Figura 51), resultado consistente con la presencia del elemento G-box en todas ellas. Las proteínas ATHB-21 y AT3G23220, en cambio, no produjeron un aumento de la expresión de *gus* a partir de la construcción $\Delta(-333/-259)$, en la que no se hallan presentes los sitios de unión de las mismas. Además, ATHB-21 y AT3G23220 fueron incapaces de activar la expresión del gen reportero en las construcciones M3 y M7, respectivamente, que tienen mutadas las secuencias de núcleo TCAT o aquellas similares el elemento *distalB* (Figura 51). En las condiciones de estos ensayos, el factor de transcripción GT3b fue incapaz de activar la expresión de *gus*.

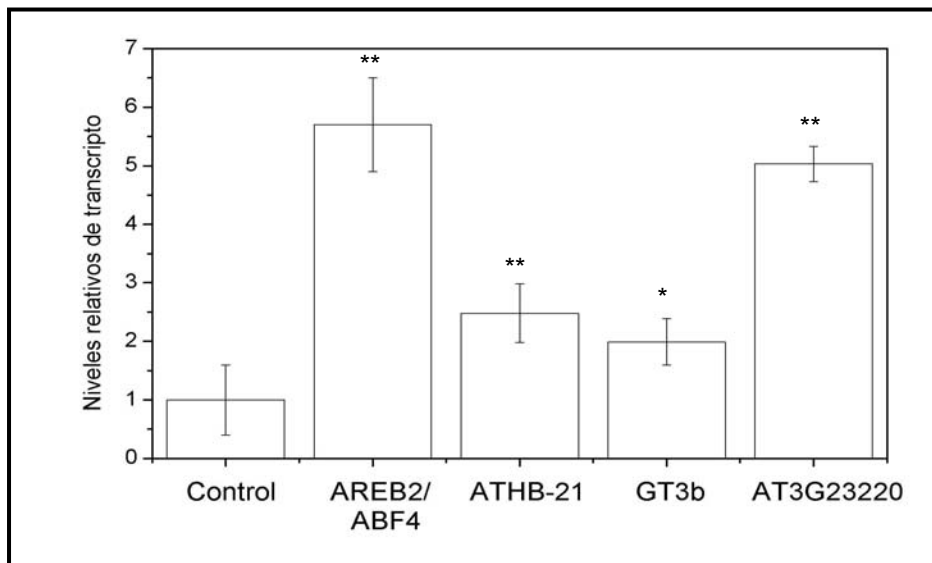


Figura 50. La sobreexpresión de AREB2/ABF4, ATHB-21, GT3b y AT3G23220 aumenta los niveles de transcripto de *COX5b-1* en plantas. Niveles relativos de transcripto de *COX5b-1* en plantas de *Arabidopsis* transformadas en forma estable con el ADNc completo de los factores de transcripción en estudio bajo el control del promotor 35SCaMV. Las muestras de ARN total se analizaron mediante transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa en tiempo real utilizando la expresión de los genes *ACT2* y *ACT8* como valor de normalización entre muestras. Los resultados indican el promedio (\pm SD) de tres mediciones. La significancia de las variaciones observadas respecto al control (plantas no transformadas) se evaluó aplicando el test de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

Los resultados comentados en esta sección indican que los factores de transcripción identificados mediante ensayos de simple híbrido en levaduras serían realmente reguladores de la actividad del gen *COX5b-1* en la planta a través de la interacción con el elemento G-box y las secuencias de núcleo TCAT y *distalB* presentes en el promotor de dicho gen.

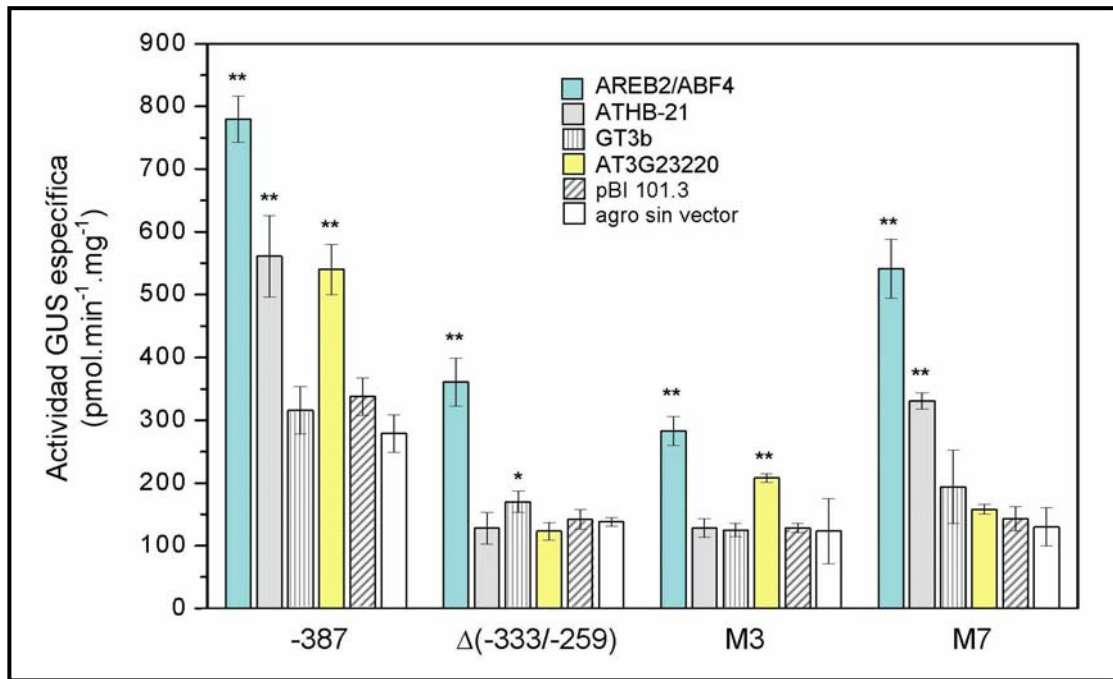


Figura 51. Los factores de transcripción AREB2/ABF4, ATHB-21 y AT3G23220 son reguladores positivos de la actividad del promotor de *COX5b-1*. Medida de la actividad específica GUS en plántulas de Arabidopsis de 7 días (líneas -387, $\Delta(-333/-259)$, M3 y M7 del promotor de *COX5b-1* fusionado al gen reportero *gus*) transformadas en forma transiente con construcciones que contenían el ADNc completo de los factores de transcripción en estudio bajo el control del promotor 35SCaMV. Cultivos de *Agrobacterium* sin vector o transformados con el vector pBI 101.3 se utilizaron como controles negativos. Los resultados indican el promedio (\pm SD) de dos ensayos independientes para cada construcción y la significancia de cada infiltración se evaluó aplicando el test de Student (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). " $\Delta(-333/-259)$ " indica la delección de la región -333/-259 en el contexto del fragmento de 387 pb del promotor de *COX5b-1*. "M3" y "M7" indican la mutación de las secuencias de núcleo TCAT o de las similares al elemento *distalB*, respectivamente.

6.2.6. Los factores de transcripción ATHB21 y AT3G23220 establecen interacciones de tipo proteína-proteína con AREB2/ABF4.

La región -333/-196 del promotor de *COX5b-1* posee secuencias regulatorias muy importantes para la actividad del gen, entre las que se identificaron un elemento G-box, varios elementos de núcleo TCAT y dos secuencias similares al elemento *distalB* (Capítulo I; Comelli y col., 2009). En este Capítulo se mencionó que los factores de transcripción AREB2/ABF4 y AT3G23220 son capaces de reconocer al elemento G-box y a las secuencias similares al elemento *distalB*, respectivamente, mientras que las proteínas ATHB-21 y GT3b interactúan con los elementos de núcleo TCAT presentes en *COX5b-1*. Se decidió, entonces, evaluar la capacidad de estas proteínas de establecer interac-

ciones de tipo proteína-proteína. Las secuencias codificantes completas de cada factor de transcripción se clonaron en los vectores pGAD-T7 y pGBK-T7, de manera de obtener fusiones a los dominios de activación (AD) o de unión a ADN (BD) de GAL4, respectivamente. Luego, se co-transformaron levaduras de la cepa MaV203 (posee en su genoma el gen *LacZ* conducido por el sitio de unión de GAL4) con las diferentes combinaciones de proteínas. Una medición cuantitativa de la capacidad de las diferentes proteínas de establecer interacciones de tipo proteína-proteína se obtuvo mediante ensayos en medio líquido empleando el sustrato ONPG. En la Figura 52 se muestran los valores de actividad específica β -galactosidasa obtenidos en los experimentos de doble híbrido en levaduras, los cuales permitieron determinar que los factores de transcripción ATHB-21 y AT3G23220 fueron capaces de establecer interacciones de tipo proteína-proteína con AREB2/ABF4. No se realizaron ensayos adicionales para determinar la naturaleza de estas interacciones o la región de cada proteína involucrada en las mismas.

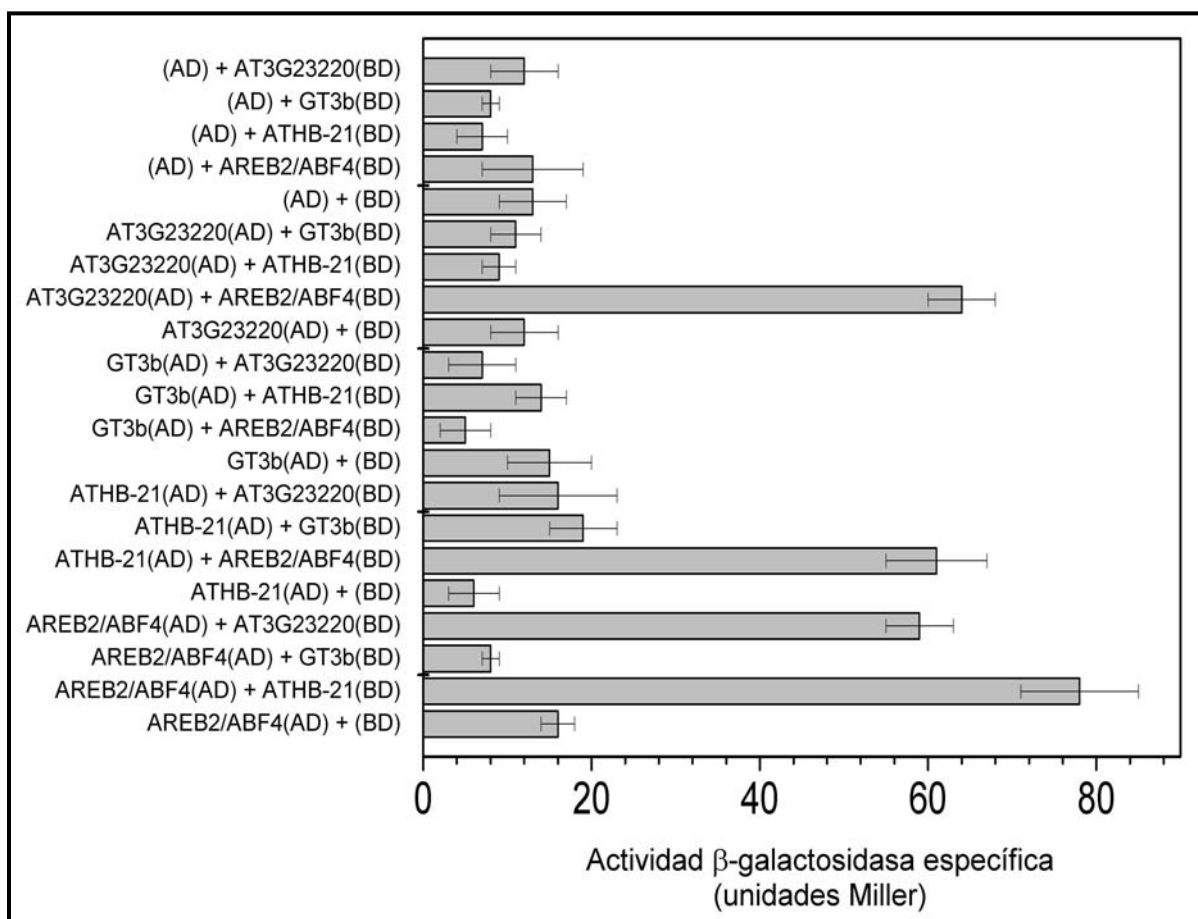


Figura 52. Los factores de transcripción ATHB-21 y AT3G23220 establecen interacciones de tipo proteína-proteína con AREB2/ABF4. Ensayos de doble híbrido en levaduras. Las barras representan el promedio de tres ensayos independientes de medida de la actividad específica β -galactosidasa. AD: dominio de activación de GAL4; BD: dominio de unión a ADN de GAL4.

6.3 DISCUSIÓN

El elemento regulatorio G-box, de secuencia CACGTG, ha sido descrito en numerosos genes de plantas, en los cuales regula la expresión en respuesta a diferentes factores, como ser luz, hormonas y condiciones ambientales, entre otros, además de conferir expresión específica de tejido (Schulze-Lefert y col., 1989; Donald y Cashmore, 1990; Kim y col., 1992; Menkens y col., 1995; Ishige y col., 1999; Hudson y Quail, 2003). Este elemento es usualmente reconocido por un grupo de proteínas con dominio de unión al ADN de tipo bZIP, denominado GBF (G-box Binding Factors; Schindler y col., 1992; Menkens y col., 1995; Sibéril y col., 2001; Shen y col., 2007) y también por proteínas pertenecientes a la familia bHLH (Heim y col., 2003; Toledo-Ortiz y col., 2003). En *Arabidopsis*, las familias bZIP y bHLH de factores de transcripción están compuestas por 77 y 161 miembros, respectivamente (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB>). Ensayos de simple híbrido en levaduras utilizando la región -189/-139 del promotor de *Cytc-2*, la cual contiene un elemento G-box y un motivo ACGT esencial para la expresión del gen (Welchen y col., 2009), permitieron identificar tres proteínas GBF (GBF-1, GBF-3 y AtbZIP68) y dos bHLH (bHLH080 y bHLH081) capaces de interactuar con la región mencionada. Además, la proteína AREB2/ABF4 (Abscisic acid Responsive Element-2/ABRE Binding Factor-4; Choi y col., 2000; Uno y col., 2000; Kang y col., 2002), con dominio de unión al ADN de tipo bZIP y descrita en la bibliografía como factor de transcripción capaz de unir al elemento ABRE (C/TACGTGGC) de respuesta a la hormona ABA, también fue identificada en los ensayos mencionados. Todas las proteínas identificadas fueron capaces de activar la expresión del gen reportero *HIS3* en levaduras, mientras que GBF-3 y las dos proteínas bHLH no produjeron activación significativa respecto a los controles cuando se utilizó el gen *LacZ* (β -galactosidasa) como reportero. Sin embargo, GBF-3 y bHLH080 fueron capaces de unir eficientemente el promotor de *Cytc-2 in vitro* y ocasionaron una activación significativa del gen *Cytc-2* en ensayos *in planta* (Welchen y col., 2009), indicando que estas proteínas podrían ser reguladores endógenos de la expresión de *Cytc-2*.

El gen *COX5b-1*, codificante para una isoforma de la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial (COX), posee un elemento G-box regulatorio esencial para la expresión del gen, situado en el nucleótido -228 desde el sitio de inicio de la traducción (Capítulo I; Comelli y col., 2009). En ensayos de retardo en gel utilizando extractos nucleares se observó competencia cruzada entre los elementos G-box de *COX5b-1* y *Cytc-2*, por lo que se decidió evaluar si las proteínas identificadas con el fragmento del promotor de *Cytc-2* también eran capaces de unir el elemento G-box de *COX5b-1*. En los ensayos de simple híbrido en levaduras sólo fueron capaces de unir el elemento G-box de *COX5b-1* y activar la expresión del gen reportero *LacZ* las proteínas AtbZIP68, GBF-1 y

AREB2/ABF4, siendo este último factor de transcripción el que produjo el aumento más notorio y definido, comportamiento similar al observado con *Cytc-2*. Ensayos de retardo en gel (EMSA) con el dominio bZIP de la proteína expresado en forma recombinante confirmaron que AREB2/ABF4 y las restantes proteínas se unen en forma específica al elemento G-box presente en *COX5b-1*. Por otro lado, el promotor de *COX5b-2*, codificante para la otra isoforma de la subunidad 5b de COX, también posee un elemento G-box, pero situado más alejado del ATG inicial (nucleótido -636). Este actúa como elemento regulador negativo de la expresión del gen en tejidos vegetativos y participa en la respuesta a luz UV (Capítulo II; Comelli y González, 2009). Los resultados obtenidos en ensayos de simple híbrido en levaduras empleando el gen reportero *LacZ* indicaron que solamente el factor de transcripción AtbZIP68 fue capaz de interactuar en forma específica con el elemento G-box de *COX5b-2*. Los reportes en las bases de datos indican que esta proteína se expresa en cotiledones, hojas y carpelos, pero no en pétalos, sépalos, estambres o granos de polen (<http://bbc.botany.utoronto.ca/>). El patrón de expresión de AtbZIP68 es coincidente con el modelo propuesto de regulación de *COX5b-2*, el cual sugería la presencia de un factor regulador negativo de la expresión del gen, activo sólo en tejidos vegetativos y capaz de interactuar específicamente con el elemento G-box, siendo removido por luz UV (Capítulo II; Comelli y González, 2009). Los resultados obtenidos permitieron identificar a los factores de transcripción AREB2/ABF4 y AtbZIP68 como partícipes en la regulación de la actividad de los genes *COX5b-1* y *-2*, respectivamente, interactuando con los elementos G-box presentes en las regiones promotoras de los mismos. Estudios *in planta* confirmaron que AREB2/ABF4 actúa como regulador de la actividad del gen *COX5b-1* endógeno. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para evaluar si otros miembros relacionados de la extensa familia bZIP regulan también la actividad de los genes mencionados.

El dispar comportamiento de los factores de transcripción frente a los diferentes elementos G-box de los tres genes citados se relaciona con reportes previos en la bibliografía, en los cuales se indica que los nucleótidos adyacentes al elemento G-box son responsables de la especificidad en la interacción con diferentes factores de transcripción (Williams y col., 1992; Ishige y col., 1999). En los casos estudiados, se observan claras diferencias al considerar los cuatro nucleótidos, dos por arriba y dos por debajo, que rodean al elemento G-box, encontrándose GC(...)AC, GA(...)GT y GA(...)CA en *Cytc-2*, *COX5b-1* y *COX5b-2*, respectivamente.

Además de la región que contiene el elemento G-box, otra de suma importancia para la actividad de *COX5b-1* es la comprendida entre los nucleótidos -333 y -259 desde el sitio de inicio de la traducción, encontrándose en la misma varios elementos regulato-

rios. Entre éstos, se destacan cinco copias de un elemento con el núcleo TCAT no reportado en la bibliografía y responsable de la respuesta del gen a sacarosa y otros carbohidratos, y dos copias de una secuencia similar al elemento *distalB*, involucradas en potenciar la respuesta a ABA (Capítulo I; Comelli y col., 2009). Ensayos de simple híbrido en levaduras utilizando esta región del promotor permitieron identificar seis factores de transcripción capaces de interactuar con la misma, denominados ATHB-21, ATHB-40, GT3b, AT3G23220, ATHB-6 y AT5G20510. Los cuatro primeros fueron capaces de activar la expresión de los genes reporteros *HIS3* y *LacZ* en levaduras, mientras que AT5G20510 mostró niveles de activación prácticamente despreciables respecto a los controles y ATHB-6 fue directamente incapaz de activar los genes reporteros, por lo que no se profundizó el estudio de estas dos últimas proteínas. Las proteínas ATHB-21 y GT3b fueron capaces de interactuar específicamente con las secuencias de núcleo TCAT, mientras que AT3G23220 reconoció en forma específica las secuencias similares al elemento *distalB*, según los resultados obtenidos en levaduras empleando el gen *LacZ* como reportero en cepas transformadas con diferentes versiones del promotor de *COX5b-1*. Además, ATHB-21 y GT3b pudieron ser expresadas completas en forma recombinante en *E. coli* y los ensayos de retardo en gel mostraron claramente que los dos factores de transcripción mencionados fueron capaces de reconocer específicamente *in vitro* los elementos con el núcleo TCAT. La proteína AT3G23220 no pudo ser expresada en forma recombinante. No se realizaron estudios con la proteína ATHB-40, pero la estrecha similitud de secuencia con ATHB-21, fundamentalmente en los residuos clave en el dominio de unión al ADN, sugiere un comportamiento similar. Finalmente, ensayos *in planta* respaldan la interacción de ATHB-21 y AT3G23220 con las secuencias mencionadas en forma previa

Las proteínas ATHB-21 y -40 pertenecen a la subfamilia HD-ZIP I de factores de transcripción con homeodominio, compuesta por diecisiete miembros (Södermann y col., 1996; Ariel y col., 2007). Estudios *in vitro* con ATHB-1 determinaron que las proteínas HD-ZIP I unen secuencias de ADN del tipo 5'-CAAT(A/T)ATTG-3' (Sessa y col., 1993; 1997), la cual puede dividirse en dos hemiseuencias 5'-T(A/T)ATTG-3' superpuestas parcialmente en forma antiparalela. La proteína ATHB-21 interactuó con los elementos de núcleo TCAT presentes en *COX5b-1*. Sin embargo, la secuencia alrededor de estos elementos no coincide con la reportada como blanco para las proteínas HD-ZIP I, y una inspección de la secuencia de ADN del promotor de *COX5b-1* entre los nucleótidos -333 y -259 tampoco permitió identificar la secuencia consenso 5'-CAAT(A/T)ATTG-3', o similares. El homeodominio de ATHB-21 posee residuos similares a los observados en otras

proteínas HD-ZIP I en las posiciones supuestamente relevantes para determinar la especificidad de unión, por lo que debería reconocer también la hemiseuencia 5'-T(A/T)ATTG-3'. Las proteínas HD-ZIP I también reconocen secuencias compuestas por la hemiseuencia 5'-T(A/T)ATTA-3'. Esto quizás se debe a que la glutamina en la posición 50 establece similares interacciones de van der Waals con los pares TG y TA (Kissinger y col., 1990; Hanes y Brent, 1991). Por ejemplo, estudios recientes con ATHB-6, una proteína HD-ZIP I, indicaron que es capaz de unir eficientemente la secuencia 5'-CAATIATTA-3' presente en su promotor (Himmelbach y col., 2002; Deng y col., 2006), esto es, la suma de las hemiseuencias 5'-TIATTA-3' y 5'-TAATTG-3' (subrayado se indica el nucleótido central de la secuencia blanco), avalando el comportamiento dual de la glutamina 50 respecto a la identidad de la sexta base de la hemiseuencia blanco. El modelo de interacción de las proteínas HD-ZIP I con la secuencia de ADN blanco se define en torno a la A₃ contactada por la asparagina 51 (Wilson y col., 1996). El alineamiento de las secuencias de los cinco elementos con el núcleo TCAT en *COX5b-1* permitió obtener una secuencia de nueve pares de bases [5'-N(T/C)ATCATTA-3'] con adeninas en la tercera posición de las hemiseuencias parcialmente superpuestas (Figura 53). Esta secuencia posee un par C/G en la posición central, que si bien es lo preferido por los miembros de la subfamilia HD-ZIP II puede ser también reconocido por proteínas HD-ZIP I (Sessa y col., 1993; Tron y col., 2005). La secuencia consenso mencionada es la suma de las hemiseuencias 5'-TCATTA-3' y 5'-TGAT(A/G)N-3', siendo la primera de éstas prácticamente idéntica a la esperada (TCATTA vs. TAATTC/A) mientras que la segunda presenta mayor flexibilidad en la identidad de los dos últimos nucleótidos. Resulta interesante que los resultados obtenidos constituyen información obtenida *in vivo* (en levaduras), mientras que la mayoría de la información disponible en la bibliografía referida a la interacción de las proteínas HD-ZIP I con el ADN se obtuvo mediante ensayos *in vitro* (Sessa y col., 1993; 1997; Palena y col., 1999; 2001; Tron y col., 2001; Comelli y González, 2007). Esto indicaría que, o bien las preferencias de unión de ATHB-21 son más flexibles que las de otros miembros de la subfamilia HD-ZIP I, o las proteínas HD-ZIP I son capaces de reconocer *in vivo* secuencias más variables. Esto último ha sido afirmado por otros autores debido a la escasa presencia de la secuencia CAAT(A/T)ATTG en el genoma de *Arabidopsis* (Söderman y col., 1996; Johannesson y col., 2001).

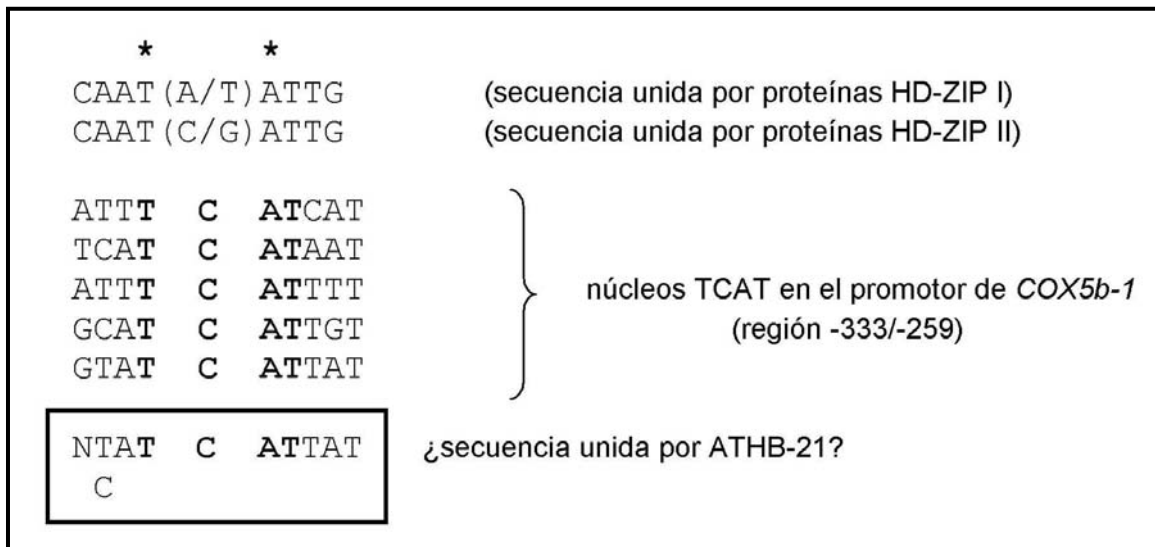


Figura 53. Alineamiento de las secuencias con el núcleo TCAT presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1* respetando el modelo de interacción de las proteínas HD-ZIP I. Las adeninas (A₃ en la hemisequencia TNATTG presente tanto en la hebra superior como en la inferior no mostrada) contactadas por las asparaginas 51 presentes en cada monómero se destacan con un asterisco en la parte superior de la secuencia blanco unida por las proteínas HD-ZIP. Los núcleos TCAT presentes en el promotor de *COX5b-1* se muestran en negrita. La potencial secuencia unida por ATHB-21 se muestra recuadrada

La proteína GT3b pertenece a la familia GT de factores de transcripción, los cuales poseen un dominio de unión al ADN de tipo trihélice. Esta familia, exclusiva de plantas, está compuesta por diecisiete miembros en *Arabidopsis*, clasificados en diferentes subgrupos en función de las preferencias de unión al ADN (Zhou y col., 1992; Villain y col., 1996). El mencionado factor de transcripción posee 53% de identidad en la secuencia de aminoácidos (78% considerando sólo el dominio trihélice) con GT3a (At5g01380), que reconoce la secuencia de ADN 5'-GTTAC-3' (Ayadi y col., 2004). Las dos proteínas muestran patrones similares de expresión y son capaces de formar homo y heterodímeros. La secuencia unida por GT3a no se encuentra presente en la región del promotor de *COX5b-1* unida por GT3b en ensayos de simple híbrido en levaduras y de retardo en gel con la proteína recombinante, indicando que GT3b tiene preferencias de unión diferentes a GT3a, o bien que, al igual que lo informado para ATHB-21, la proteína GT3b *in vivo* sería capaz de unir secuencias de ADN adicionales o con ligeras diferencias.

El gen *At3g23220* codifica una proteína perteneciente a la subfamilia B3c de factores de transcripción con dominios de unión de tipo AP2 (Gutterson y Reuber, 2004; Dietz y col., 2010). La familia AP2 es exclusiva de plantas, si bien es necesario aclarar que el dominio AP2 también se encuentra en endonucleasas de cianobacterias y ciliados, aunque en estos organismos no desempeña funciones de unión al ADN (Magnani y col., 2004; Wuitschick y col., 2004; Balaji y col., 2005), función que habría sido adquirida en plantas luego de la separación de los linajes *Plantae* y *Animalia*. Los cincuenta y cinco miembros de la familia AP2 en *Arabidopsis* se agrupan en dos subfamilias, cada una de las cuales se divide en seis grupos de acuerdo a las regiones conservadas fuera del dominio de unión a ADN (Sakuma y col., 2002). El dominio AP2 de la proteína AT3G23220 comparte una alta homología de secuencia con la proteína ABI4 (no se muestra), según los resultados obtenidos en los bancos de datos del EMBL, GenBank y SWISS PROT utilizando el grupo de programas BLAST (Altschul y col., 1997) a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La proteína ABI4 (*At2g40220*; Abscisic acid Insensitive-4), inicialmente identificada como participe en la respuesta a la hormona ABA (Finkelstein y col., 1998), actúa además como señal de comunicación retrógrada² de la mitocondria (Giraud y col., 2009) y es capaz de unir secuencias con el núcleo CCAC (Koussevitzky y col., 2007; Woodson y Chory, 2008). Los datos reportados para ABI4 son sumamente importantes para analizar el comportamiento de AT3G23220, dado que esta última interacciona con las secuencias CCACTTG presentes en el promotor de *COX5b-1* y la unión se anula por completo cuando se mutan en forma puntual los nucleótidos CAC. Además, este elemento potencia la respuesta a la hormona ABA (Capítulo I, Comelli y col., 2009), comportamiento similar al observado para ABI4 (Finkelstein y col., 1998).

² La comunicación retrógrada hace referencia a las señales enviadas por las organelas al núcleo para modular la expresión de genes nucleares, frecuentemente codificantes para productos con destino a las organelas (Leister, 2005; Liu y Butow, 2006).

Las proteínas ATHB-21 y AT3G23220 fueron capaces de establecer interacciones de tipo proteína-proteína con AREB2/ABF4, según ensayos de doble híbrido en levaduras. Estudios adicionales, como ser ensayos de “pull-down”, son necesarios para confirmar estas observaciones. De todos modos, el estudio del promotor de *COX5b-1* indicó que las secuencias similares al elemento *distalB* son necesarias para potenciar la respuesta a ABA, la cual sería conducida, probablemente, por el elemento G-box situado más abajo (Capítulo I; Comelli y col., 2009), de modo similar a lo reportado para el gen *napA* de *Brassica napus* (nabo), en el cual un elemento B-box (formado por un elemento *distalB* acoplado a un elemento *proxB* de secuencia CAAACACC) y un elemento G-box cercano actúan en forma sinérgica conduciendo la expresión del gen en forma específica de tejido y dependiente de ABA (Ezcurra y col., 1999; 2000). Además, estudios publicados recientemente reportan la interacción específica entre factores de transcripción pertenecientes a las familias bZIP y AP2 (Lee y col., 2010). En particular, mediante ensayos de doble híbrido en levaduras se demostró que las proteínas ABF2, ABF3 y AREB2/ABF4, todas pertenecientes a la subfamilia ABF/AREB de factores de transcripción con dominios de unión al ADN de tipo bZIP (Choi y col., 2000; Uno y col., 2000), establecen interacciones físicas con la proteína AtERF48/DREB2C, factor de transcripción con dominio de unión al ADN de tipo AP2, mientras que ABF2 también fue capaz de interactuar con DREB1A y DREB2A (Lee y col., 2010). Las proteínas DREB1A, DREB2A y DREB2C pertenecen a la subfamilia DREB de factores de transcripción con dominios de unión AP2/ERF, subfamilia que cuenta entre sus miembros a ABI4 (Finkelstein y col., 1998; Dietz y col., 2010), curiosamente aquella que resulta tener la mayor homología de secuencia con AT3G23220. La subfamilia DREB incluye varios factores que regulan la expresión de sus genes blanco en forma dependiente de ABA (Stockinger y col., 1997; Narusaka y col., 2003; Dietz y col., 2010). Entonces, podría suponerse que AREB2/ABF4 y AT3G23220 actuarían en forma concertada para activar la expresión de *COX5b-1* en respuesta a la hormona ABA, formando un complejo que interactúa con distintas regiones del promotor. Finalmente, dado que las respuestas a ABA y a azúcares están íntimamente relacionadas, la interacción entre ATHB-21 y AREB2/ABF4 también podría tener un significado funcional.

En resumen, se identificaron algunos factores de transcripción probablemente involucrados en la regulación de la actividad de los genes *COX5b-1* y *COX5b-2*, lo que permite profundizar el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la regulación de los genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial.

7. CAPÍTULO IV

“Análisis de la duplicación de genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria de respiración mitocondrial en *Arabidopsis thaliana*”

7.1 INTRODUCCIÓN

7.1.1 Genes duplicados. Modelo clásico y modelo DDC.

La planta modelo *Arabidopsis thaliana* tiene uno de los genomas más pequeños entre los genomas de angiospermas analizados. Sin embargo, la mayor parte del mismo se encuentra duplicado, existiendo regiones que están presentes en un número de tres o más copias (Vision y col., 2000). El análisis del genoma de *Arabidopsis* y de las características de expresión de los genes duplicados utilizando datos generados por el método MPSS (Brenner y col., 2000; <http://mpss.udel.edu/at>) permitió determinar que más de dos tercios de los genes duplicados mostraban una divergencia parcial en sus características de expresión (Harberer y col., 2004). La mayoría de los autores que estudian estos fenómenos sostienen que “*la duplicación de genes constituye la materia prima sobre la cual la evolución puede trabajar*” (Simillion y col., 2002; Moore y col., 2003; Harberer y col., 2004). Estudios en los últimos quince años demostraron la presencia de un gran número de genes duplicados y de enormes familias multigénicas existentes en todos los genomas secuenciados hasta el momento, revelando quizás un mecanismo destinado a la conservación y el mantenimiento de los genomas a través de eventos locales, regionales o globales de duplicación del ADN (Prince y Pickett, 2002; Lawton-Rauh, 2003).

El “modelo clásico” (Figura 54A) plantea distintos mecanismos probables para explicar la existencia de estos fenómenos de duplicación de genes. El proceso conocido como “desfuncionalización” plantea que un gen del par duplicado degenera posteriormente a un pseudogén o es perdido por efectos de remodelación de los cromosomas, delección del locus o mutación puntual. La pérdida de información, es decir, la pérdida de uno de los genes duplicados, es posible debido a que sólo uno de los genes es requerido para mantener la función de un único gen ancestral, conduciendo a una “purificación selectiva” del mismo, mientras el otro gen es libre de acumular mutaciones en su región codifi-

cante. Estas mutaciones ocasionan una significativa pérdida de función a lo largo del proceso evolutivo (Lawton-Rauh, 2003). Otro de los posibles mecanismos, aunque extremadamente raro, tiene en cuenta un proceso de “neo-funcionalización”, en el cual uno de los genes del par duplicado es susceptible de sufrir mutaciones tanto en su región codificante como en sus secuencias regulatorias, permitiendo obtener un nuevo gen con funciones diferentes y ventajosas (Harberer y col., 2004). Una última hipótesis tenida en cuenta por el modelo clásico plantea la conservación funcional de ambas copias de manera de incrementar la robustez del ambiente genético. En este sentido, en levaduras se observó que al menos un cuarto de las mutantes generadas no tienen fenotipo observable debido a una compensación por genes duplicados (Gu y col., 2003). El “modelo clásico” falla en explicar la existencia de los numerosos genes que permanecen aún duplicados en los genomas. La retención de genes duplicados recientemente es un fenómeno muy común, tanto en vertebrados (la mitad de los genes han sido mantenidos según estudios realizados por Nadeau y col., 1997) como en plantas. En *Arabidopsis*, el 17% de los genes se disponen en arreglos en tándem, de los cuales aproximadamente el 31% son miembros de pares duplicados que residen en regiones del genoma con alta homología en el ordenamiento entre cromosomas (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Vision y col., 2000).

El “modelo DDC” (Duplicación-Degeneración-Complementación; Figura 54B) surge para intentar explicar las discrepancias existentes entre el modelo clásico y la prevalencia de genes duplicados retenidos en los genomas (Prince y Picket, 2002; Moore y Purugganan, 2005). Este modelo plantea la existencia de una “subfuncionalización” de los genes duplicados respecto al gen ancestral, es decir, los genes duplicados sufrirían una progresiva pérdida de funciones por cambios o mutaciones complementarias, por lo que ambos serían requeridos para reproducir la totalidad de las funciones del gen ancestral. Las regiones que sufrirían mutaciones más frecuentemente serían los sitios de unión de los factores reguladores de la transcripción. Estos sitios comprenden secuencias cortas, de entre 8 y 12 pb, con mayor probabilidad de generarse o eliminarse por procesos simples de mutación. Otro nivel de subfuncionalización estaría dado por la presencia y acción de diferentes “*enhancers*” o activadores de la transcripción, debido a la estructura modular de los mismos. Las propiedades de las secuencias regulatorias y las características del evento transcripcional han inspirado a numerosos autores a postular que los cambios evolutivos importantes podrían ocurrir primariamente a nivel de la regulación de los genes antes que en la función de las proteínas (Yuh y col., 2001). Las mutaciones a nivel de las regiones regulatorias de los genes del par podrían, potencialmente, alterar los patrones

de expresión espaciales y/o temporales de estos genes así como la respuesta a estímulos, tanto internos como externos (Harberer y col., 2004; Moore y Purugganan, 2005).

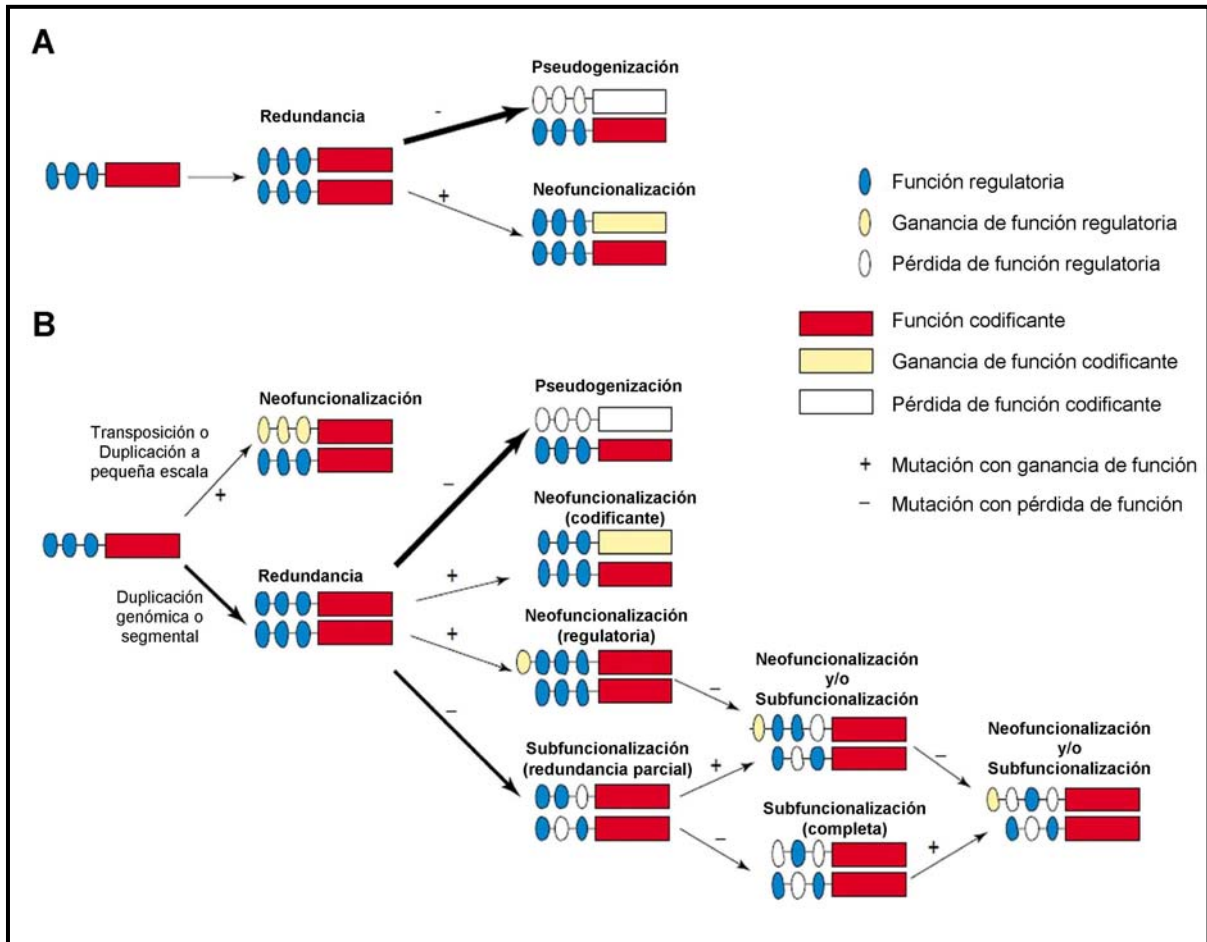


Figura 54. Mecanismos probables para explicar la duplicación de genes en eucariotas. **(A)** Modelo Clásico. **(B)** Modelo DDC. El espesor de las flechas es proporcional a la frecuencia de los eventos en los genomas eucariotas analizados (Adaptado de Moore y Purugganan, 2005).

En los Capítulos previos de este Trabajo de Tesis se comentó el análisis de las regiones promotoras de los genes nucleares *COX5b-1* y *-2*, codificantes para la subunidad 5b de la citocromo c oxidasa (COX) mitocondrial. El análisis de un árbol filogenético elaborado con las secuencias proteicas de los genes codificantes para la subunidad 5b de *Arabidopsis*, arroz, algodón y papa, indicó que la presencia de dos genes se debería a eventos de duplicación recientes en los genomas de las especies mencionadas (Welchen y col., 2002). En este Capítulo se analiza si las hipótesis planteadas por el modelo DDC permiten justificar la existencia en el genoma de *Arabidopsis* de los dos genes nucleares codificantes para la subunidad COX5b.

7.2 DISCUSION

El metabolismo energético de las plantas depende, principalmente, de procesos localizados en el interior de dos organelas adquiridas a través del proceso de endosimbiosis, los cloroplastos y las mitocondrias (Margulis, 1975; Gray y col., 1999; Lang y col., 1999). Las vías de señalización involucradas en la biogénesis de cloroplastos han sido estudiadas en mayor detalle (Larkin y col., 2008), mientras que el conocimiento acerca del proceso que modula la biogénesis de las mitocondrias en plantas es menos profundo (Díaz y Moraes, 2008; Greiner y col., 2008). En particular, la síntesis de los complejos respiratorios, responsables directos de la producción de ATP en la mitocondria, requiere la expresión de más de cien genes distribuidos entre el núcleo y la organela (Kadowaki y col., 1996; Hamanaka y col., 1999; Saish y col., 2001). La particular disposición de los componentes respiratorios en una serie de complejos y supercomplejos que operan secuencialmente conduciendo electrones de coenzimas reducidas hacia el oxígeno, inmediatamente sugiere la existencia de algún tipo de coordinación en la biogénesis de los mismos, operando en determinados pasos desde la transcripción hasta el correcto ensamblado de las subunidades o cofactores (Barrientos y col., 2002; Herrmann y Funes, 2005). Algunas señales que ejercen influencia en la síntesis de los complejos respiratorios han sido descritas, entre ellas factores metabólicos y específicos de tejido (Zabaleta y col., 1998; Curi y col., 2003; Elorza y col., 2004; González y col., 2007; Comelli y col., 2009; Welchen y col., 2009; Comelli y González, 2009). La adición de sacarosa a cultivos de células de plantas produce un incremento general de componentes de la cadena respiratoria, debido a la activación de la síntesis de componentes codificados en el núcleo, los que serían los factores limitantes para el correcto ensamblado de los complejos (Giegé y col., 2005). La evidencia actual indica que la regulación por sacarosa y otros carbohidratos opera mayoritariamente a nivel de la transcripción de los genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Welchen y col., 2002; González y col., 2007; Comelli y col., 2009; Welchen y col., 2009; Mufarrege y col., 2009; Comelli y González, 2009). Es interesante destacar que la inducción por carbohidratos es una característica compartida no sólo por los genes codificantes para diferentes componentes respiratorios, sino también por los diferentes genes codificantes para el mismo componente, como es el caso del citocromo *c* (Welchen y col., 2002; 2009) y la citocromo *c* oxidasa, en particular, las subunidades 5b (Capítulos I y II; Comelli y col., 2009; Comelli y González, 2009) y 6b (Mufarrege y col., 2009).

En los Capítulos precedentes de esta Tesis, se describe el estudio de las regiones promotoras y la identificación de varios elementos de ADN regulatorios de los dos genes nucleares codificantes para la subunidad COX5b en *Arabidopsis*, *COX5b-1* (At3g15640) y

COX5b-2 (At1g80230). Los genes mencionados mostraron patrones de expresión diferenciales y respuesta a diversos compuestos, pero compartieron la inducción por sacarosa y otros carbohidratos. La inspección de las regiones promotoras de los genes estudiados no evidenció la presencia de elementos regulatorios comunes que expliquen este comportamiento, con la sola excepción de un segmento que contiene un elemento G-box, de secuencia CACGTG (Menkens y col., 1995), y un motivo ACGT cercano. Este segmento se localiza en diferentes regiones respecto al sitio de inicio de la traducción de los genes mencionados. Notoriamente, los elementos G-box influyen la transcripción de estos genes en forma muy diferente, ninguna relacionada con la respuesta a sacarosa. El elemento G-box en *COX5b-1*, localizado en el nucleótido -228 desde el ATG inicial, es esencial para la transcripción del gen, mientras que el elemento G-box en *COX5b-2* se localiza en -636, es un regulador negativo y está involucrado en la respuesta a luz UV (Capítulos I y II; Comelli y col., 2009; Comelli y González, 2009). En concordancia con estos datos, ensayos de simple híbrido en levaduras indicaron que los dos elementos G-box tienen diferentes preferencias por factores de transcripción de la extensa familia bZIP, en particular, de las clases ABF (ABRE-Binding Eactors; Choi y col., 2000) y GBF (G-box Binding Eactors; Sibéril y col., 2001), siendo ABF4 el que une más específicamente el elemento G-box de *COX5b-1* (Capítulo III, Comelli y col., 2009) y AtbZIP68 el de *COX5b-2* (Capítulo III). Es probable que cambios sutiles en la identidad de las secuencias de ADN alrededor del elemento G-box sean responsables de las diferencias en la especificidad de unión a los factores de transcripción mencionados (Williams y col., 1992) y de las funciones regulatorias propias de cada elemento G-box en el contexto de cada gen. Los estudios de mutagénesis puntual en los promotores de los genes *COX5b-1* y *COX5b-2* mostraron que la regulación por carbohidratos requiere un análisis opuesto al realizado para el elemento G-box, esto es, los azúcares dirigen una regulación común pero a través de elementos regulatorios diferentes. En *COX5b-1*, una región ubicada corriente arriba del elemento G-box, comprendida entre -333 y -259 desde el sitio de inicio de la traducción, contiene cinco elementos de secuencia N(T/C)ATCATTAT requeridos para la respuesta a sacarosa y otros carbohidratos (Capítulo I; Comelli y col., 2009). Estos elementos son reconocidos por los factores de transcripción ATHB-21 y GT3b, pertenecientes a las familias HD-ZIP I y GT (trihélice), según resultados de simple híbrido en levaduras (Capítulo III). En *COX5b-2*, dos elementos de secuencia TGGGYC (Y = C o T), reportados en la bibliografía como *site II* (Kosugi y col., 1995; Kosugi y Ohashi, 1997), son responsables de la inducción por sacarosa (Capítulo II; Comelli y González, 2009) y éstos serían reconocidos por factores de transcripción de la familia TCP (Trémousaygue y col., 2003; Welchen y González, 2005). En conclusión, los dos genes codificantes para la subunidad COX5b en Arabidopsis han adquirido el mismo tipo de respuesta (inducción por

sacarosa) a través de la incorporación de diferentes elementos regulatorios. Estos genes se habrían originado por un evento de duplicación reciente dentro de las dicotiledóneas (Welchen y col., 2002), por lo que dos posibles escenarios surgen para explicar la incorporación de los elementos involucrados en la regulación por carbohidratos:

1) los dos tipos de elementos, de núcleo TCAT y *site II*, fueron incorporados en forma independiente en los respectivos promotores de los genes, es decir que hubo un proceso de “neofuncionalización” independiente posterior a la duplicación.

2) uno de ellos ya se encontraba presente en el gen ancestral y fue reemplazado por un elemento diferente en uno de los genes luego de la duplicación, conservando ambos la regulación coordinada por carbohidratos.

La evidencia actual sugiere que la segunda opción es, probablemente, la correcta. Esto se sustenta en el hecho de que los elementos *site II* presentes en el promotor de *COX5b-2* también se encuentran en la mayoría de los genes codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial (Welchen y González, 2006) y, al menos para algunos de ellos, se ha demostrado que están involucrados en la respuesta a carbohidratos (Welchen y col. 2002; Comelli y col., 2009; Mufarrege y col., 2009; Comelli y González, 2009). De esta manera, el camino evolutivo que probablemente originó los dos genes *COX5b* en *Arabidopsis* se esquematiza en la Figura 55 y puede analizarse en función de las hipótesis planteadas por el modelo DDC. El gen *COX5b* ancestral podría haber contado con elementos regulatorios comunes a otros genes codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial y, luego del evento de “duplicación” (DDC), cada uno de los genes habría “degenerado” (DDC), es decir, seguido su propio camino evolutivo incorporando, perdiendo y/o modificando elementos regulatorios, determinando la “complementariedad” (DDC) de funciones, esto último avalado por los patrones de expresión de los genes estudiados (Capítulos I y II; Welchen y col., 2002; Comelli y col., 2009; Comelli y González, 2009). Los elementos regulatorios comunes serían los elementos *site II*, que se habrían perdido en el gen que originaría a *COX5b-1*. A su vez, en este gen se habrían incorporado los elementos de núcleo TCAT y secuencias similares al elemento *distalB*.

Los elementos G-box también podrían analizarse desde su “neofuncionalización”, ya que el posible elemento G-box presente en el gen ancestral podría haber acumulado mutaciones en los nucleótidos ubicados alrededor del mismo, modificando la especificidad de unión por distintos factores de transcripción y originando nuevos procesos de regulación, propios de cada gen. También es posible que los elementos G-box de ambos genes hayan sido incorporados de manera independiente.

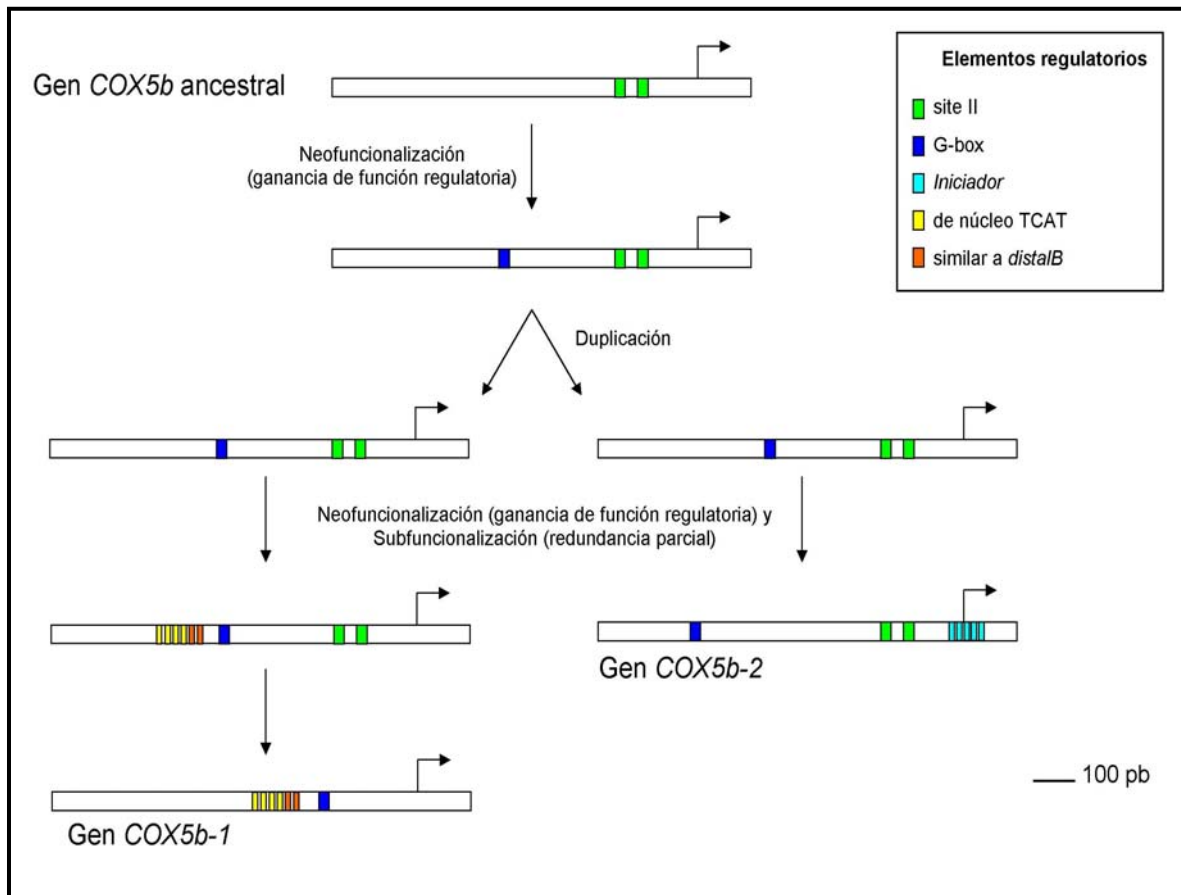


Figura 55. Modelo propuesto para la evolución de los genes *COX5b* de Arabidopsis. Ambos genes, probablemente, derivan de un gen ancestral que contenía elementos *site II* y que se duplicó durante la evolución de las dicotiledóneas. Luego del evento de duplicación, ambos genes divergieron en sus patrones de expresión y respuesta a diferentes compuestos a través de la pérdida, incorporación y/o modificación de elementos regulatorios. El ancestro de *COX5b-1* incorporó elementos con el núcleo TCAT capaces de promover la inducción por carbohidratos, lo cual, sumado a la presencia del elemento G-box involucrado en la expresión basal del gen, permitió la eliminación progresiva de los elementos *site II*. El gen *COX5b-2* mantuvo los elementos *site II* ancestrales e incorporó otros elementos, como los *Iniciadores*, reconocidos por la maquinaria de transcripción basal. Las respuestas diferenciales de los genes ante distintos compuestos serían debidas a la incorporación de otros elementos regulatorios, como las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en *COX5b-1* e involucradas en aumentar la respuesta a la hormona ABA. En el esquema planteado, la incorporación del elemento G-box se habría producido antes del proceso de duplicación génica, aunque también es posible que se diera la incorporación en ambos genes en forma independiente luego de la duplicación.

Los patrones de expresión de las isoformas codificantes para la subunidad COX5b parecerían complementarse, excepto en granos de polen, donde existe un solapamiento (Capítulos I y II; Comelli y col., 2009; Comelli y González, 2009). La expresión aumentada a nivel de las anteras es una característica común de la mayoría de los genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Huang y col., 1994; Felitti y col., 1997; Heiser y col., 1997; Zabaleta y col., 1998; Welchen y col., 2002; Thirkettle-Watts y col., 2003; Elorza y col., 2004; Curi y col., 2005; Attallah y col., 2007; Welchen y col., 2009; Mufarrege y col., 2009), lo cual está de acuerdo con el papel propuesto para las mitocondrias durante el desarrollo de las anteras y la maduración del polen (Lee y Warmke, 1979; Huang y col., 1994; Landschütze y col., 1995), mientras que la expresión en otros órganos de la planta diferiría según el gen en particular y las respuestas diferenciales podrían ser explicadas por la ganancia o pérdida de elementos regulatorios, los cuales no habrían sufrido una presión de selección tan grande como aquellos involucrados en la respuesta a carbohidratos.

El modelo planteado para la evolución de los genes *COX5b* es avalado, además, por los resultados obtenidos para los genes nucleares *Cytc-1* y *Cytc-2* de *Arabidopsis*, los cuales codifican para el citocromo *c*, proteína íntimamente relacionada con la actividad de COX. El promotor de *Cytc-1* dirige la expresión del gen en las regiones meristemáticas, ápice de cotiledones y hojas jóvenes y en anteras (Welchen y col., 2002.), patrón similar al observado para *COX5b-2*. El gen *Cytc-2* se expresa en tejido vascular de hipocotilo, cotiledones, hojas, raíces y pétalos, anteras, en la zona de unión de las flores y vainas con el pedicelo y en las células del séptum y del funículo (Welchen y col., 2009), patrón similar al observado para *COX5b-1*, con la sola excepción de las regiones meristemáticas, donde no fue posible detectar expresión de *Cytc-2*. En cuanto a los elementos regulatorios presentes en los respectivos promotores, el gen *Cytc-1* contiene dos elementos *site II* esenciales para la expresión del gen (la mutación combinada de ambos anula por completo la expresión del gen en todos los órganos y tejidos de la planta) y un elemento *telo box* (AAACCCTAA), cuya mutación anula la expresión del gen en tejidos vegetativos (Welchen y col., 2002). Por otro lado, en el gen *Cytc-2* se destaca una región con un motivo ACGT esencial (una mutación puntual anula por completo la expresión del gen en todos los órganos/tejidos de la planta) muy cercano a un elemento G-box (su mutación disminuye en un 50% los niveles de expresión) y dos elementos *site II* corriente arriba de la región mencionada, los cuales no parecen ser esenciales para este gen, dado que la mutación de ambos sólo reduce parcialmente la expresión en flores (Welchen y col., 2009). Es interesante destacar que los promotores del par génico *COX5b-1/COX5b-2* comparten características con aquellos del par *Cytc-1/Cytc-2*. Los genes *COX5b-2* y

Cytc-1 dependen de los elementos *site II* para su expresión, mientras que los otros dos genes dependen principalmente de la presencia de un elemento G-box asociado a un motivo ACGT (Welchen y González, 2005; Comelli y col., 2009; Welchen y col., 2009). En ese sentido, los promotores de *COX5b-2* y *Cytc-1* dirigen una expresión más localizada, principalmente en meristemas y anteras, mientras que los promotores de *COX5b-1* y *Cytc-2* conducen una expresión más extendida en la planta. Los cuatro genes, sin embargo, se expresan en anteras y responden a sacarosa, sugiriendo que la conservación de estas características es importante para la función de todos ellos. La conservación de la respuesta a carbohidratos en los dos productos de la duplicación génica, aún cuando hayan sufrido divergencia en otros aspectos, sugiere que esta respuesta es particularmente importante para su función. Entonces, se podría especular que la pérdida de los elementos *site II* sólo sería posible luego de la incorporación de elementos adicionales de respuesta a carbohidratos, como es el caso de los elementos con el núcleo TCAT presentes en *COX5b-1* (Capítulo I; Comelli y col., 2009). En el caso de *Cytc-2*, los elementos *site II* no desempeñan un papel esencial, pero son requeridos para una respuesta eficiente a sacarosa y otros carbohidratos. Estos elementos podrían desaparecer en el futuro, tal cual habría ocurrido en *COX5b-1*. Los niveles intracelulares de carbohidratos podrían ser usados por las células de las plantas para regular la biogénesis de complejos respiratorios y, dado que los carbohidratos también son represores de la síntesis de componentes fotosintéticos (Paul y Pellny, 2003), balancear los procesos de respiración y fotosíntesis. La conservación de la respuesta en ambos genes podría estar relacionada con la necesidad de inducción en los tejidos donde los genes son diferencialmente expresados, o con el establecimiento de un sistema genético más robusto para enfrentar posibles cambios que podrían causar alteraciones en las propiedades de expresión de uno de los miembros de la familia génica.

En conclusión, los resultados discutidos en este Trabajo de Tesis indican que la presencia en el genoma de *Arabidopsis* de dos genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial puede ser analizada en función de las hipótesis planteadas por el “modelo DDC” de duplicación de genes en plantas y destacan la importancia de los carbohidratos en la regulación coordinada de la expresión de genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial y, por ende, de la biogénesis de mitocondrias.

Conclusiones

8. CONCLUSIONES

La biogénesis y el mantenimiento de las funciones mitocondriales requieren la expresión coordinada y el ensamblaje correcto de proteínas codificadas en dos genomas distintos, el nuclear y el mitocondrial (Unselde y col., 1997). Deberían existir, entonces, mecanismos que regulen la expresión coordinada de los genes correspondientes a fin de asegurar la correcta biogénesis de los componentes mitocondriales y una actividad metabólica adecuada a los requerimientos de las plantas de acuerdo a su ciclo de vida y en respuesta a estímulos ambientales. Estudios previos revelaron la existencia de una regulación coordinada de la expresión de algunos componentes de los complejos respiratorios codificados en el núcleo frente a diferentes estímulos impuestos por el medio ambiente (Felitti y col., 1997; Figueroa y col., 2001; Welchen y col., 2002; Curi y col., 2003; Comelli y col., 2009; Mufarrege y col., 2009; Welchen y col., 2009) o por inhibición o alteración del normal funcionamiento de la actividad respiratoria mitocondrial (Yu y col., 2001; Taylor y col., 2003; 2004). En el mismo sentido, Giegé y col. (2005) sugirieron que la biogénesis mitocondrial estaría regulada por cambios en la expresión de genes nucleares y por una coordinación a nivel postraducciona l durante el ensamblado de los distintos componentes en la membrana interna mitocondrial, según estudios en los cuales analizaron la abundancia y los cambios en los niveles de transcriptos de genes codificantes para componentes de los cinco complejos integrantes de la cadena de transporte de electrones ubicados en ambos genomas.

Los complejos respiratorios representan un modelo particularmente atractivo para el estudio de los mecanismos de coordinación núcleo-mitocondria que determinan una correcta biogénesis de la organela. Esto se debe no sólo a que la mayoría de los complejos tiene componentes codificados en ambos genomas, sino también a que éstos están relacionados con la síntesis de ATP, conectando en ambos puntos el metabolismo mitocondrial con la economía celular global (Huang y col., 1994; Xiu-Qing, y col., 1996; Felitti y col., 1998; Zabaleta y col., 1998; Traven y col., 2001; Logan y col., 2001; Gomez-Casati y col., 2002; Sweetlove y col., 2002; Curi y col., 2002; 2003; Binder y Brennicke, 2003; Eubel y col., 2003; 2004; Daley y col., 2003; Goffart y Wiesner, 2003; Thirkettle-Watts y col., 2003; Millar y col., 2004; Elorza y col., 2004; Kuzmin y col., 2004; Giegé y col., 2005; 2008; Días y Moraes, 2008; Medeiros, 2008; Comelli y col., 2009; Mufarrege y col., 2009; Welchen y col., 2009; Comelli y González, 2009).

Los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Tesis representan un aporte al conocimiento y a la comprensión general de estos procesos de biogénesis de complejos respiratorios en plantas, en un intento por dilucidar diferentes aspectos de las interconexiones existentes entre el núcleo y la mitocondria en las células vegetales, y poder establecer así mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de ambos genomas. Los mismos nos permiten elaborar las siguientes conclusiones:

➤ **Análisis de la región promotora de *COX5b-1* (*At3g15640*).**

1. La región -387/-1 del promotor de *COX5b-1* conduce la expresión del gen reportero *gus* en cotiledones, hipocotilo (principalmente en el haz vascular), meristema de la raíz, meristema apical del vástago, hojas (tanto en el cilindro vascular como en el tejido parenquimático), raíces y flores (principalmente en anteras, estigma y en la unión de las flores con el pedicelo).

2. La región -387/-196 contiene elementos reguladores positivos requeridos para la máxima expresión del gen.

3. Los elementos *cis* localizados corriente arriba del nucleótido -333 serían activos sólo en presencia de la región -333/-259.

4. La región -259/-196 contiene un elemento G-box (CACGTG) esencial para la expresión del gen. La mutación puntual de este elemento, presente en -228, eliminó completamente la actividad GUS en todos los órganos o tejidos de la planta

5. La región -259/-196 también contiene un motivo ACGT (en -204) y una secuencia con un núcleo similar al elemento *tel*o box (ACCCTA, en -240), pero no se observaron cambios en los patrones o en los niveles de expresión al mutar estos elementos.

6. Proteínas nucleares son capaces de interactuar específicamente *in vitro* con el elemento G-box, según ensayos de retardo en gel realizados en presencia de extractos nucleares y el fragmento -259/-196 del promotor de *COX5b-1*.

7. Las regiones promotoras de los genes *COX5b-1* y *Cytc-2* poseen la capacidad de interactuar *in vitro* con un grupo similar de proteínas nucleares.

8. La región -333/-259 de *COX5b-1* contiene varios elementos *cis* involucrados en la expresión del gen en tejidos vegetativos.

9. Secuencias con núcleo TCAT (no reportadas en la bibliografía ni en las bases de datos de elementos *cis* regulatorios) y secuencias CCACTTG similares al elemento

distalB, presentes en -280 y -262, están involucradas en potenciar o incrementar la expresión de *COX5b-1* en tejidos vegetativos.

10. Los elementos de núcleo TCAT y las secuencias similares al elemento *distalB* tendrían un efecto aditivo en la expresión del gen en flores.

11. La región -310/-300 contiene un elemento P1BS, de secuencia GTATATGC, que actúa como regulador negativo de la expresión del gen, activo a nivel de cotiledones y, especialmente, de raíces.

12. Proteínas nucleares son capaces de interaccionar *in vitro* con la región -333/-259 del promotor, según ensayos de retardo en gel realizados en presencia de extractos nucleares y el fragmento mencionado.

13. La unión de las proteínas nucleares con los elementos de núcleo TCAT y las secuencias similares al elemento *distalB* fue específica, según ensayos de competencia con diferentes fragmentos no marcados.

14. El promotor de *COX5b-1* se induce por el tratamiento de plantas con sacarosa, 6-bencilaminopurina (citoquinina), ácido abscísico (ABA), ácido giberélico, ácido amino-1-ciclopropano carboxílico (precursor de etileno), fosfato de potasio y H₂O₂.

15. Los efectores mencionados en el punto anterior fueron capaces de inducir la expresión del gen endógeno, según mediciones de los niveles de transcripto utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

16. La delección de secuencias situadas corriente arriba del nucleótido -609 anuló la inducción del promotor por giberelinas y fosfato.

17. La región -609/-387 contiene el/los elemento/s involucrado/s en la respuesta a etileno, mientras que la región -387/-333 es requerida para la respuesta a citoquininas.

18. El promotor de *COX5b-1* es capaz de responder a diversas fuentes de carbono, pero el efecto máximo se observa en presencia de sacarosa.

19. El ABA y la sacarosa intervienen en cascadas independientes de transducción de señales.

20. Las secuencias de núcleo TCAT presentes en la región -333/-259 son responsables de la respuesta a sacarosa y, probablemente, a carbohidratos en general.

21. Las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en la región -333/-259 intervienen en la respuesta a ABA, actuando como elementos potenciadores de la misma.

➤ **Análisis de la región promotora de COX5b-2 (At1g80230).**

1. El promotor de COX5b-2 (-1000/-1) dirige la expresión del gen en forma específica de órgano o tejido, detectándose actividad GUS en meristema de raíz, meristema apical del vástago, ápice de cotiledones y hojas, anteras y en el receptáculo y estigma de flores y vainas.
2. Los niveles de expresión fueron notoriamente superiores en flores respecto a los niveles detectados en hojas o plántulas.
3. El promotor contiene elementos regulatorios positivos y negativos.
4. Los elementos *cis* reconocidos por la maquinaria basal de transcripción se localizan corriente arriba del nucleótido -83.
5. En la región -620/-398 se encontraría un elemento activador de la expresión en cotiledones.
6. La remoción de la región -1000/-620 originó la aparición de expresión de GUS en la lámina de cotiledones y hojas, y en todos los tejidos de la raíz.
7. El elemento G-box (CACGTG) ubicado en la posición -636 actúa como regulador negativo de la expresión en tejidos vegetativos. La mutación puntual del mencionado elemento ocasionó aparición de actividad GUS en hojas, cotiledones y raíces, mientras que en flores no se detectaron cambios estadísticamente significativos.
8. En la posición -616 se encuentra un motivo ACGT, similar al elemento G-box, pero el mismo no sería funcional en este promotor.
9. Las regiones -398/-199, -199/-142 y -142/-83 contienen elementos *cis* activadores requeridos para la máxima expresión del gen.
10. En la región -199/-142 se identificó un elemento *site II* típico (en -148, hebra complementaria) y una secuencia TGGGIC muy similar (en -172), la cual fue considerada como un elemento *site II* más. En plantas, estos elementos, de secuencia TGGGCY (Y = C o T), son requeridos para la expresión coordinada de varios genes codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial.
11. La mutación puntual de los dos elementos *site II* ocasionó una reducción notoria de la expresión del gen reportero. Estos elementos parecen actuar en forma concertada, dado que la mutación de uno de ellos ocasionó un efecto similar a la mutación de los dos en forma simultánea

12. En la región -142/-83 se identificaron cuatro repeticiones del elemento *Iniciador*, de secuencia YTCANTYY (Y = C o T). Estos elementos están presentes en genes carentes de caja TATA y son reconocidos por la maquinaria de transcripción basal.

13. La mutación de los elementos *Iniciadores* causó un descenso en los niveles de actividad GUS similar al observado para la mutación en los elementos *site II*, excepto en hojas, donde se observó un efecto más pronunciado

14. Los elementos *site II* podrían ser considerados componentes del núcleo del promotor con un papel en la transcripción basal del gen, dado que sólo la mutación combinada de los dos elementos *site II* y los cuatro elementos *Iniciadores* causó una completa pérdida de actividad GUS en todos los órganos y tejidos de la planta.

15. Proteínas presentes en extractos nucleares son capaces de interactuar específicamente *in vitro* con los elementos *site II* y los elementos *Iniciadores* identificados en la región -199/-83 del promotor de *COX5b-2*, resultando en la formación de dos y cuatro complejos de unión, respectivamente, en ensayos de retardo el gel.

16. No se observó competencia cruzada entre los elementos *site II* e *Iniciadores*, indicando que proteínas diferentes se unen a los elementos estudiados.

17. El promotor de *COX5b-2* incrementó su actividad por el tratamiento con sacarosa, fosfato de potasio, ácido amino-1-ciclopropanocarboxílico (precursor de etileno), ácido indolacético (auxina), H₂O₂ y por la irradiación con luz UV.

18. Los compuestos y tratamientos mencionados en el punto anterior serían efectores del gen endógeno, según ensayos de medida de los niveles de transcripto de *COX5b-2* utilizando PCR cuantitativa en tiempo real.

19. La región situada corriente arriba del nucleótido -660 es requerida para la inducción por auxinas y etileno.

20. Los elementos necesarios para la respuesta a fosfato inorgánico y H₂O₂ se encontrarían en la región -620/-199 del promotor.

21. Los dos elementos *site II* son esenciales para la respuesta a sacarosa y, probablemente, a carbohidratos en general. Ninguno de ellos fue capaz de conducir la respuesta mencionada en forma individual.

22. El elemento G-box localizado en -636, regulador negativo de la expresión en tejidos vegetativos, es responsable de la respuesta a luz UV.

23. La inducción por luz UV se originaría por la remoción de un factor de transcripción represor directamente unido al elemento G-box, o bien, por la remoción de un

factor represor unido mediante interacciones de tipo proteína-proteína al factor de transcripción unido al elemento G-box.

24. La región promotora de *COX5b-2* se localiza parcialmente superpuesta con la región codificante del gen adyacente *At1g80240*.

25. El elemento G-box de *COX5b-2* se encuentra en el último exón del gen adyacente. No se ha encontrado información en la bibliografía referida a la presencia de un elemento regulatorio para un gen eucariota presente en la región codificante del gen adyacente.

➤ **Identificación de factores de transcripción que interactúan con los promotores de *COX5b-1* y *COX5b-2*.**

1. El factor de transcripción AREB2/ABF4 (At3g19290) interactuó específicamente con el elemento G-box de *COX5b-1*, según ensayos de simple híbrido en levaduras.

2. Las proteínas GBF-1 (At4g36730) y AtbZIP68 (At1g32150) también fueron capaces de unir específicamente el elemento G-box de *COX5b-1*, aunque mostraron niveles de activación inferiores a los observados con AREB2/ABF4.

3. AREB2/ABF4 posee un patrón de expresión similar a *COX5b-1*, por lo que resultó un candidato interesante como regulador de la actividad del mencionado gen.

4. El dominio bZIP de AREB2/ABF4 reconoce específicamente *in vitro* el elemento G-box de *COX5b-1*.

5. El dominio bZIP de AtbZIP68 (aminoácidos 276 a 389) mostró patrones de unión e intensidad de señal similares a los observados para AREB2/ABF4.

6. La diferencia en los niveles de activación entre AREB2/ABF4 y AtbZIP68 en los ensayos en levaduras se debería, probablemente, a la naturaleza de los aminoácidos situados por fuera del dominio de unión al ADN y a la capacidad de éstos de establecer distintas interacciones (con residuos de la misma proteína o con otros factores) propias de cada factor de transcripción.

7. El factor de transcripción AtbZIP68 interactuó específicamente con el elemento G-box de *COX5b-2*, según ensayos de simple híbrido en levaduras.

8. La región -333/-259 de *COX5b-1* es reconocida por factores de transcripción con dominios de unión al ADN de tipo HD, trihélice y AP2, según ensayos de simple híbrido en levaduras. Las proteínas ATHB-21 (At2g18550), ATHB-40 (At4g36740), GT3b

(At2g38250) y AT3G23220 incrementaron entre siete y ocho veces los niveles de actividad del gen reportero *LacZ* respecto a la cepa control.

9. Los factores de transcripción ATHB-21 (de tipo HD-ZIP I) y GT3b (trihélice) reconocen específicamente las secuencias de núcleo TCAT presentes en el promotor de *COX5b-1* (región -333/-259), según ensayos de simple híbrido en levaduras y ensayos de retardo en gel con las proteínas recombinantes. Estas secuencias están involucradas en la respuesta a sacarosa.

10. El comportamiento observado en los ensayos de retardo en gel para la proteína GT3b fue idéntico al de ATHB-21. Sin embargo, se necesitó mayor cantidad de proteína recombinante (750 ng de GT3b vs. 100 ng de ATHB-21) para lograr similar intensidad en la señal correspondiente a los complejos de unión.

11. Es probable que ATHB-40 también pueda unir los elementos de núcleo TCAT, dado que posee idénticos residuos (respecto a ATHB-21) en la hélice de reconocimiento del homeodominio, la cual establece los contactos principales con el ADN.

12. El factor de transcripción AT3G23220 interacciona específicamente con las secuencias similares al elemento *distalB* presentes en la región -333/-259 del promotor de *COX5b-1*, según ensayos de simple híbrido en levaduras. Esta proteína presenta un dominio de unión AP2 y pertenece a la familia ERF de factores de transcripción.

13. Los factores de transcripción ATHB21 y AT3G23220 establecen interacciones fisicoquímicas de tipo proteína-proteína con AREB2/ABF4, según ensayos de doble híbrido en levaduras.

➤ **Análisis del evento de duplicación de los genes *COX5b***

1. Los genes *COX5b-1* y *COX5b-2* mostraron patrones de expresión diferenciales y complementarios.

2. Los genes mencionados también mostraron respuesta a diversos compuestos, pero compartieron la inducción por sacarosa y otros carbohidratos, característica observada en la mayoría de los genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial.

3. Los carbohidratos dirigen una regulación común pero a través de elementos regulatorios diferentes: elementos de núcleo TCAT en *COX5b-1* y elementos *site II* en *COX5b-2*.

4. Los elementos *site II* habrían estado presentes en el gen *COX5b* ancestral. Éstos se habrían perdido en *COX5b-1* luego de la duplicación y la incorporación de los elementos de núcleo TCAT, conservando los genes del par duplicado la regulación coordinada por carbohidratos.

5. El camino evolutivo que probablemente originó los dos genes *COX5b* en *Arabidopsis* puede analizarse en función de las hipótesis planteadas por el modelo DDC (Duplicación-Degeneración-Complementación).

6. En anteras existiría un solapamiento en la expresión de las isoformas codificantes para la subunidad *COX5b*, característica común de la mayoría de los genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial y que está de acuerdo con el papel propuesto para las mitocondrias durante el desarrollo de las anteras y la maduración del polen.

7. El modelo planteado para la evolución de los genes *COX5b* es avalado por resultados obtenidos para los genes nucleares *Cytc-1* y *Cytc-2* de *Arabidopsis*.

8. Los niveles intracelulares de carbohidratos podrían ser usados por las células de las plantas para regular la biogénesis de complejos respiratorios y, dado que los carbohidratos también son represores de la síntesis de componentes fotosintéticos, balancear los procesos de respiración y fotosíntesis.

Los resultados obtenidos y detallados a lo largo de este Trabajo de Tesis representan un aporte al conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes al proceso de regulación de la actividad de genes nucleares codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial. En particular, se profundizó el estudio de los dos genes nucleares codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa (COX) mitocondrial, la subunidad de codificación nuclear más conservada entre organismos eucariotas. Se identificaron elementos de ADN regulatorios presentes en las regiones promotoras de *COX5b-1* y *COX5b-2*, agentes metabólicos capaces de modificar los niveles de expresión y factores de transcripción involucrados en la regulación de la actividad de los genes mencionados. Además, se propone un modelo para la evolución de estos genes, el cual puede ser aplicado a otros componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. El rompecabezas aún no está completo, pero se cuenta con nuevas piezas para continuar el armado del mismo.

Resumen

9. RESUMEN

La biogénesis de la maquinaria respiratoria mitocondrial de plantas requiere la síntesis y el ensamblado en forma coordinada de los productos de más de cien genes localizados en el núcleo y dentro de la organela. Uno de los factores que regula la expresión de los genes nucleares es la disponibilidad de carbohidratos. La regulación de este proceso opera a nivel de la transcripción a través de elementos presentes en las regiones promotoras de los genes codificantes para componentes de la cadena respiratoria. La citocromo *c* oxidasa (COX), enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, está compuesta por al menos diez polipéptidos diferentes, tres de ellos codificados en el genoma mitocondrial y los restantes en el genoma nuclear. Entonces, es lógico asumir que el correcto ensamblado de COX requiere la expresión coordinada de los genes codificantes para las diferentes subunidades de la mencionada enzima, o al menos de la mayoría de ellos.

En este Trabajo de Tesis, se ha caracterizado la expresión de los dos genes nucleares de *Arabidopsis* codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa (*COX5b-1* y *COX5b-2*), la subunidad de codificación nuclear más conservada.

En el primer capítulo se describe el análisis de la región de promotor de *COX5b-1* (At3g15640) necesaria para su expresión e inducción por sacarosa, mediante la utilización de plantas transformadas en forma estable con fragmentos mutados de promotor fusionados al gen reportero *gus*. La expresión del promotor es absolutamente dependiente de un elemento G-box (CACGTG) situado en el nucleótido -228 desde el sitio de inicio de la traducción. Una región localizada por encima de este elemento (-333/-259) contiene secuencias con el núcleo ATCATT y secuencias similares al elemento *distalB* (CCACTTG), las cuales son requeridas para la expresión del gen en tejidos vegetativos. Estas secuencias son capaces de unir diferentes proteínas presentes en extractos nucleares y participan en la inducción por sacarosa y otros carbohidratos (secuencias ATCATT) o potencian la respuesta a la hormona ABA (secuencias similares al elemento *distalB*). Además, un elemento reportado como sitio de unión al factor de transcripción PHR1 (GTATATGC), presente en la misma región que las secuencias mencionadas con anterioridad, actúa como elemento regulador negativo de la expresión del gen principalmente en raíces. El promotor de *COX5b-1* se induce también por el tratamiento de las plantas con fosfato inorgánico, H₂O₂, citoquininas, giberelinas y ACC (precursor de etileno).

En el segundo capítulo se analizan las secuencias en el promotor de *COX5b-2* (At1g80230) requeridas para la expresión del gen, utilizando plantas transformadas en forma estable con formas mutadas o delecionadas del mencionado promotor fusionadas al gen *gus*. Un fragmento de 1000 pb del promotor dirigió la expresión del gen reportero en meristema apical del vástago, meristema de raíz, ápice de cotiledones y hojas y en anteras. El análisis de las deleciones del extremo distal del promotor indicó la presencia de elementos regulatorios positivos y negativos. Un elemento G-box regulatorio localizado entre -660 y -620 desde el ATG inicial fue identificado mediante análisis de mutación puntual. Este elemento se encuentra en la región codificante del gen adyacente en el genoma de *Arabidopsis*. La mutación del elemento G-box incrementa la expresión de *COX5b-2* en cotiledones y en la lámina de las hojas y, además, anula completamente la inducción del gen por luz UV, estímulo que probablemente opera removiendo el factor de transcripción inhibitorio capaz de unir el elemento G-box. Los elementos regulatorios positivos identificados incluyen un elemento *site II* típico (TGGGCC), un elemento de secuencia TGGGTC similar al *site II* y cuatro elementos *Iniciadores* (YTCANTYY, Y = C o T). La mutación de estos elementos en forma conjunta anuló completamente la expresión del gen *COX5b-2*. Los elementos *site II* también se encuentran involucrados en la respuesta a sacarosa. El promotor de *COX5b-2* se induce, además, por el tratamiento de las plantas con fosfato inorgánico, H₂O₂, auxinas y ACC (precursor de etileno).

En el siguiente capítulo se presentan los factores de transcripción capaces de interaccionar con algunos de los elementos regulatorios presentes en los promotores de *COX5b-1* y *-2*, identificados mediante ensayos de simple híbrido en levaduras. Los elementos G-box influyen la transcripción de los genes estudiados mediante caminos diferentes, ninguno de ellos relacionado con la respuesta a carbohidratos. Consecuentemente, estos elementos mostraron diferentes preferencias de unión por factores de transcripción pertenecientes a las familias ABF (ABRE-binding factor) y GBF (G-box binding factor) de factores con dominios de unión al ADN de tipo bZIP. En *COX5b-1*, las secuencias con el núcleo ATCATT fueron reconocidas por factores de transcripción pertenecientes a las familias HD-ZIP I y GT, mientras que las secuencias similares al elemento *distalB* fueron unidas por una proteína perteneciente a la familia AP2/ERF de factores de transcripción. Además, ensayos de doble híbrido en levaduras permitieron identificar interacciones físicas entre algunos de los factores de transcripción mencionados.

En el último capítulo se analiza la presencia en el genoma de *Arabidopsis* de los dos genes estudiados en función de las hipótesis planteadas por el modelo DDC de duplicación de genes. Los genes *COX5b-1* y *-2* mostraron diferentes patrones de expresión y respuesta a varios compuestos, pero compartieron la inducción por sacarosa y otros

carbohidratos. Los resultados comentados en los capítulos previos implican que *COX5b-2* retuvo las características de expresión presentes en la mayoría de los genes codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, pero estos mecanismos de expresión han divergido respecto a los observados en *COX5b-1*. Se propone que el promotor de este último habría adquirido nuevos mecanismos regulatorios durante la evolución posterior al evento de duplicación. Estos nuevos mecanismos habrían permitido la diversificación de los patrones de expresión, pero también la conservación de algunas respuestas que, como la inducción por sacarosa, son compartidas por *COX5b-1* y numerosos genes codificantes para componentes de la maquinaria respiratoria mitocondrial. La conservación de estas respuestas podría ser un requisito previo para la exitosa incorporación de elementos regulatorios nuevos en esta clase de genes.

ABSTRACT

The biogenesis of the plant mitochondrial respiratory chain needs the coordinated synthesis and assembly of the products of more than 100 genes located in the nucleus and within the organelle. One of the factors that regulate the expression of nuclear genes is the availability of carbohydrates. This regulation operates at the transcriptional level through elements present in the promoter regions of respiratory chain component genes. Cytochrome *c* oxidase (COX), the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, is composed of at least ten different polypeptides encoded either in the mitochondrial genome or the nuclear genome. Then, it is logical to assume that correct COX assembly requires the coordinated expression of the genes that encode its different subunits, or at least most of them.

In this thesis we have characterized the expression of the two Arabidopsis nuclear genes encoding cytochrome *c* oxidase subunit 5b (COX5b), the most conserved nuclear-encoded subunit.

In the first chapter, a promoter region required for expression and induction by sucrose of the *COX5b-1* gene (At3g15640) was analyzed using plants stably transformed with mutagenized promoter fragments fused to the *gus* reporter gene. Expression is absolutely dependent on a G-box present at -228 from the translation start site. A region located upstream of the G-box (-333/-259) contains elements with the core sequence AT-CATT and *distalB*-like sequences (CCACTTG) that are required for expression in vegetative tissues. These sequences bind different sets of proteins present in plant nuclear extracts and participate in induction by sucrose (ATCATT) and abscisic acid (*distalB*-like) of the *COX5b-1* promoter. In addition, an element described as a binding site of the PHR1 transcription factor (GTATATGC) present in the same region that contains the sequences mentioned above acts as a negative regulatory element, mainly in roots. The *COX5b-1* promoter is also induced by treatment of plants with Pi, H₂O₂ and the hormones BAP (cytokinin), GA and the ethylene precursor ACC.

In the second chapter, we analyzed the promoter sequences required for expression of the *COX5b-2* gene (At1g80230) using plants transformed with deleted and mutagenized forms of the promoter fused to *gus*. A 1000-bp promoter fragment produced expression in root and shoot meristems, leaf and cotyledon tips, and anthers. Deletion analysis indicated the presence of positive and negative regulatory elements. A regulatory element located between -660 and -620 from the translation start site was identified as a

G-box by mutagenic analysis. Mutation of the G-box, that is present within the coding region of the preceding gene in the genome, increases expression of *COX5b-2* in cotyledon and leaf lamina and abolishes induction by UV light, which presumably acts through the removal of an inhibitory factor. Identified positive regulatory elements include a *site II* element (TGGGCC), a related element with the sequence TGGGTC and four *Initiator* elements (YTCANTYY) that completely abolish expression when mutated in combination. *Site II* elements are also involved in the response to sucrose. The *COX5b-2* promoter is also induced by treatment of plants with Pi, H₂O₂ and the hormones IAA (auxin) and the ethylene precursor ACC.

In the next chapter, transcription factors able to interact with some regulatory sequences present in the *COX5b-1* and *COX5-2* promoter regions were identified using yeast one-hybrid assays. The G-boxes influence transcription of both genes but in rather different ways, none of them related with the response to carbohydrates. Accordingly, these elements have different preferences for transcription factors from the ABRE-binding factor (ABF) and G-box binding factor (GBF) classes. For *COX5b-1*, elements with the core sequence ATCATT were recognized by transcription factors from the HD-Zip and GT families, while *distalB*-like sequences (CCACTTG) were able to interact with a transcription factor from the AP2/EFR family. In addition, yeast two-hybrid assays indicated the existence of physical interactions between some of the mentioned factors.

In the last chapter, we analyzed if the presence in the Arabidopsis genome of the two *COX5b* genes could be explained by the DDC model for gene duplication. The *COX5b-1* and *COX5b-2* genes have different expression patterns and respond to several compounds, but share induction by sucrose and other carbohydrates. The results described in previous chapters imply that the *COX5b-2* gene has retained expression characteristics presented by most respiratory chain component genes, but the expression mechanisms have diverged for *COX5b-1*. We propose that the *COX5b-1* promoter has acquired novel regulatory mechanisms during evolution after gene duplication. These novel mechanisms have allowed the diversification of expression patterns, but also the conservation of some responses that, as induction by sucrose, are shared by *COX5b-1* and other genes encoding components of the mitochondrial respiratory chain. Conservation of these responses may be a pre-requisite for the successful incorporation of new regulatory elements in this class of genes.

Bibliografía

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Hernández GJ, León P and Herrera-Estrella LR (2005). Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. *Plant J.* 43(4): 506-519.
- Achard P, Lagrange T, El-Zanaty A and Mache R (2003). Architecture and transcriptional activity of the initiator element of the TATA-less *RPL21* gene *Plant J.* 35(6): 743-52.
- Adams KL, Song K, Roessler PG, Nugent JM, Doyle JL, Doyle JJ and Palmer JD (1999). Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *PNAS* 96(24): 13863-68.
- Adams KL, Daley DO, Qiu YL, Whelan J and Palmer JD (2000). Repeated recent and diverse transfers of a mitochondrial gene to the nucleus in flowering plants. *Nature* 408: 354-357.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson J (1996). *Biología Molecular de la Célula*. Ed Omega. Barcelona, España.
- Allen JF and Raven JA (1996). Free-radical-induced mutation versus redox regulation: costs and benefits of genes in organelles. *J. Mol. Evol.* 42: 482-492.
- Allen JF (2002). Photosynthesis of ATP-electrons, proton pumps, rotors and poise. *Cell* 110: 273-276.
- Allen JF (2003). The functions of genomes in bioenergetics organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 308: 19-38.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-402.
- Apel K and Hirt H (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA and Chan RL (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant. Sci.* 12: 419-26.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I and Martinelli M (2005). Ortholog search of proteins involved in copper delivery to Cytochrome *c* oxidase and functional analysis of paralogs and gene neighbors by genomic context. *J Proteome Res.* 4 (1): 63-70.
- Attallah CV, Welchen E, Pujol C, Bonnard G and Gonzalez DH (2007). Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p involved in cytochrome *c* oxidase biogenesis. *Plant Mol. Biol.* 65(3): 343-55.
- Attallah CV, Welchen E and Gonzalez DH (2007). The promoters of *Arabidopsis thaliana* genes *AtCOX17-1* and *-2* encoding a copper chaperone involved in cytochrome *c* oxidase biogenesis are preferentially active in roots and anthers and induced by biotic and abiotic stress. *Physiol. Plant.* 129(1): 123-134.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. Eds. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman JG, Smith JA and Struhl (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. Eds. John Wiley & Sons Inc., NJ: 13131-39.
- Ayadi M, Delaporte V, Li YF and Zhou DX (2004). Analysis of GT-3a identifies a distinct subgroup of trihelix DNA-binding transcription factors in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 26(562): 147-154.
- Backert S, Nielsen BL and Borner T (1997). The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends Plant Sci.* 2: 477-483.

- Balaji S, Madan-Babu M, Iyer LM and Aravind L (2005). Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Research* 33(13): 3994-4006.
- Balk J and Leaver CJ (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome *c* release. *Plant Cell* 13: 1803-1818.
- Barr CM, Neiman M and Taylor DR (2005). Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytol.* 168: 38-50.
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rötig A, Rustin P and Tzagoloff A (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286: 53-63.
- Barrientos A, Gouget K, Horn D, Soto IC and Fontanesi F (2009). Suppression mechanisms of COX assembly defects in yeast and human: Insights into the COX assembly process. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793: 97-107.
- Bartoli C, Pastori G and Foyer C (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.* 123: 335-343.
- Beers J, Glerum DM and Tzagoloff A (1997). Purification, characterization, and localization of yeast Cox17, a mitochondrial copper shuttle. *J Biol Chem.* 272: 33191-33196.
- Beers J, Glerum DM and Tzagoloff A (2002). Purification and characterization of yeast Sco1, a mitochondrial copper protein. *J. Biol. Chem.* 277: 22185-22190.
- Belevich I, Verkhovskiy MI and Wikström M (2006). Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of Cytochrome *c* oxidase. *Nature* 440: 829-832.
- Benfey PN and Weigel D (2001). Transcriptional networks controlling plant development. *Plant Physiol.* 125(1): 109-11.
- Berlett BS and Stadtman ER (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272: 20313-20316.
- Bihlmaier K, Mesecke N, Terziyska N, Bien M, Hell K and Herrmann JM (2007). The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol.* 179(3): 389-395.
- Binder S, Marchfelder A and Brennicke A (1996). Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 32: 303-314.
- Binder S and Brennicke A (2002). Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358: 181-188.
- Birnboim H and Dolly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids Res.* 7: 1513-1515.
- Blackwood EM and Kadonaga JT (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281(5373): 60-3.
- Blanchard J and Lynch M (2000). Organellar genes: why do they end up in the nucleus?. *Trends Genet.* 16(7): 315-320.
- Bogoard L (1975). Evolution of organelles and eukaryotic genomes. *Science* 188: 891-898.
- Bolender N, Sickmann A, Wagner R, Meisinger C and Pfanner N (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep.* 9: 42-49.
- Borecky J, Maia IG, Costa AD, Jezek P, Chaimovich H, de Andrade PB, Vercesi AE and Aruda P (2001). Functional reconstitution of *Arabidopsis thaliana* plant uncoupling mitochondrial protein (AtPUMP1) expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 505(2): 240-244.
- Braun HP and Schmitz UK (1999). The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta* 209: 267-274.
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M and Ewan M (2000). Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat. Biotechnol.* 18: 630-634.
- Brown NG, Costanzo MC and Fox TD (1994). Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 14(2): 1045-1053.
- Bruce WB, Deng XW and Quail PH (1991). A negatively acting DNA sequence element mediates phytochrome-directed repression of phyA gene transcription. *EMBO J.* 10: 3015-24.

- Bulger M and Groudine M (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.* 13(19): 2465-77.
- Burke PV and Poyton RO (1998). Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome *c* oxidase. *J Exp. Biol.* 201: 1163-1175.
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A and Atanassova R (2003). A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15(9): 2165-80.
- Capaldi RA (1990). Structure and Function of Cytochrome *c* Oxidase *Annu Rev Biochem* 59: 569-596.
- Carr HS and Winge DR (2003). Assembly of cytochrome *c* oxidase within the mitochondrion. *Acc. Chem. Res.* 36: 309-316.
- Carroll SB (2000) Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* 101(6): 577-80.
- Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C and Pfanner, N. (2004). Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J.* 23(19): 3735-3746.
- 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.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J and Kim SY (2000). ABFs: a Family of ABA-responsive Element Binding Factors. *J. Biol. Chem.* 275(3): 1723-1730.
- Church C, Goehring B, Forsha D, Wazny P and Poyton RO (2005). A role for Pet100p in the assembly of yeast cytochrome *c* oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a *pet100* mutant. *J Biol Chem.* 280: 1854-1863.
- Clifton SW, Minx P, Fauron CM, Gibson M, Allen JO, Thompson M, Barbazuk WB, Kanuganti S, Tayloe C, Meyer L, Wilson RK and Newton KJ (2004). Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol.* 136(3): 3486-3503.
- Clough SJ and Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16(6): 735-43.
- Cobine PA, Ojeda LD, Rigby KM and Winge DR (2004). Yeast contain a nonproteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem.* 279: 14447-14455.
- Cobine PA, Pierrel F, Bestwick ML and Winge DR (2006). Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome *c* oxidase and superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 281(48): 36552-36559.
- Comelli RN and Gonzalez DH (2007). Conserved homeodomain cysteines confer redox sensitivity and influence the DNA binding properties of plant class III HD-Zip proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467: 41-47.
- Comelli RN, Viola IL and González, DH (2009). Characterization of promoter elements required for expression and induction by sucrose of the *Arabidopsis COX5b-1* nuclear gene, encoding the zinc-binding cytochrome *c* oxidase subunit. *Plant Mol. Biol.* 69: 729-743.
- Comelli RN and González DH (2009). Identification of regulatory elements involved in expression and induction by sucrose and UV-B light of the *Arabidopsis thaliana COX5b-2* gene, encoding an isoform of cytochrome *c* oxidase subunit 5b. *Physiol. Plantarum* 137(3): 213-224.
- Comelli RN and Gonzalez DH (2009). Divergent regulatory mechanism in the response of respiratory chain component genes to carbohydrates suggests a model for gene evolution after duplication. *Plant Signaling & Behavior* 4(12): 1-3.
- Conlon I and Raff M (1999). Size control in animal development. *Cell* 96(2): 235-44.
- Considine MJ, Goodman M, Echtay KS, Laloi M, Whelan J, Brand MD and Sweetlove LJ (2003). Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J Biol Chem.* 278(25): 22298-22302.
- Cooper G (2000). *The Cell. A Molecular Approach. Second Ed., Bioenergetics and Metabolism - Mitochondria, Chloroplasts, and Peroxisomes.* Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Costanzo MC and Fox TD (1988). Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *PNAS* 85(8): 2677-2681.

- Coyne HJ, Ciofi-Baffoni S, Banci L, Bertini I, Zhang L, George GN and Winge DR (2007). The characterization and role of zinc binding in yeast Cox4. *J. Biol. Chem.* 282: 8926-8934.
- Cubas P, Lauter N, Doebley J and Coen E (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* 18: 215-222.
- Curi GC, Chan RL and Gonzalez DH (2002). Genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5c from sunflower (*Helianthus annuus* L) are regulated by nitrate and oxygen availability. *Plant Science* 123: 897-905.
- Curi GC, Welchen E, Chan RL, Gonzalez DH (2003). Nuclear and mitochondrial genes encoding cytochrome c oxidase subunits respond differently to the same metabolic factors. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 689-693.
- Curi GC, Chan RL and Gonzalez DH (2005). The leader intron of *Arabidopsis thaliana* genes encoding cytochrome c oxidase subunit 5c promotes high-level expression by increasing transcript abundance and translation efficiency. *Journal of Exp. Bot.* 56(419): 2563-2571.
- Daley DO, Adams KL, Clifton R, Qualmann S, Millar AH, Palmer JD, Pratje E and Whelan J (2002). Gene transfer from mitochondrion to nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2. *Plant J.* 30(1): 11-21.
- Daley DO, Considine MJ, Howell KA, Millar AH, Day DA and Whelan J (2003). Respiratory gene expression in soybean cotyledons during post-germinative development. *Plant Mol. Biol.* 51: 745-755.
- Das J, Miller ST and Stern DL (2004). Comparison of diverse protein sequences of the nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase suggests conservation of structure underlies evolving functional sites. *Mol Biol Evol.* 21(8): 1572-1582.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, van Montagu M, Inzé D and van Breusegem F (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 57(5): 779-795.
- Davis AJ, Alder NN, Jensen RE and Johnson AE (2008). The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import. *Mol Biol Cell.* 18(2): 475-486.
- Davuluri RV, Sun H, Palaniswamy SK, Mathews N, Molina C, Kurtz M and Grotewold E (2003). AGRIS: Arabidopsis Gene Regulatory Information Server an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. *Bioinformatics* 23(1): 25.
- Dean C and Schmidt R (1995). PLANT GENOMES: A current molecular description. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46: 395-418.
- Dean RT, Fu S, Stocker R and Davies MJ (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324: 1-18.
- Deblaere R, Bytebier B, de Greve H, Deboeck F, Schell J, van Montagu M and Leemans J (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 13(13): 4777-88.
- Dhar SS, Ongwijitwat S and Wong-Riley MT (2008). Nuclear respiratory factor 1 regulates all ten nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase in neurons. *J. Biol. Chem.* 283(6): 3120-9.
- Degenhardt J and Tobin EM (1996). A DNA binding activity for one of two closely defined phytochrome regulatory elements in an *Lhcb* promoter is more abundant in etiolated than in green plants. *Plant Cell* 8: 31-41.
- Deng X, Phillips J, Bräutigam A, Engström P, Johannesson H, Ouwerkerk PB, Ruberti I, Salinas J, Vera P, Iannaccone R, Meijer AH and Bartels D (2006). A homeodomain leucine zipper gene from *Craterostigma plantagineum* regulates abscisic acid responsive gene expression and physiological responses. *Plant Mol. Biol.* 61(3): 469-89.
- Diaz F and Moraes CT (2008). Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* 44: 24-35.
- Dickinson EK, Adams DL, Schon EA and Glerum DM (2000). A human SCO2 mutation helps define the role of *Sco1p* in the cytochrome oxidase assembly pathway. *J Biol Chem.* 275(35): 26780-26785.
- Dietz K, Vogel MO and Viehhauser A (2010). AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signaling. *Protoplasma* (doi:10.1007/s00709-010-0142-8, online article).

- Doebley J and Lukens L (1998). Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* 10(7): 1075-82.
- Donald RG, Schindler U, Batschauer A and Cashmore A (1990). The plant G-box promoter sequence activates transcription in *Saccharomyces cerevisiae* and is bound *in vitro* by a yeast activity similar to plant G-box binding factor. *The EMBO Journal* 9(6): 1727 -1735.
- Doolittle WF, Bocher Y, Nesbo CL, Douady CJ, Andersson JO and Roger AJ (2003). How big is the iceberg of which organellar genes in nuclear genomes are but the tip? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358: 39-57.
- Doudican NA, Song B, Shadel GS and Doetsch PW (2005). Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 25: 5196-5204.
- Douglas AE and Raven JA (2003). Genomes at the interface between bacteria and organelles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 358: 5-17.
- Dyall SD and Johnson P (2000). Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 3: 404-411.
- Elmayan T and Tepfer M (1995). Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rolD* promoter domain of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res.* 4(6): 388-96.
- Elorza A, León G, Gómez I, Mouras A, Holuigue L, Araya A and Jordana X (2004). Nuclear *SDH2-1* and *SDH2-2* genes encoding the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II in *Arabidopsis* have distinct cell-specific expression patterns and promoter activities. *Plant Physiol.* 136: 4072-4087.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S and von Heijne G (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 300(4): 1005-1016.
- Ernst HA, Olsen AN, Larsen S and Lo Leggio L (2004). Structure of the conserved domain of ANAC a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep.* 5(3): 297-303.
- Eubel H, Jansch L and Braun HP (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* 133: 274-286.
- Eubel H, Heinemeyer J and Braun HP (2004). Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol.* 134: 1450-1459.
- Ezcurra I, Ellerström M, Wycliffe P, Stålberg K and Rask L (1999). Interaction between composite elements in the *napA* promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol. Biol.* 40: 699-709.
- Ezcurra I, Wycliffe P, Nehlin L, Ellerström M and Rask L (2000). Transactivation of the *Brassica napus* napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different *cis*-elements: B2 mediates activation through an ABRE whereas B3 interacts with an RY/G-box. *Plant J.* 24(1): 57-66.
- Farré JC (2001). Gene expression in isolated plant mitochondria: high fidelity of transcription splicing and editing of a transgene product in electroporated organelles. *Nucleic Acids Res.* 29(12): 2484-2491.
- Felitti SA and Gonzalez DH (1998). Carbohydrates modulate the expression of the sunflower cytochrome *c* gene at the mRNA level. *Planta* 206: 410-415.
- Felitti SA, Chan RL, Gago G, Valle EM, Gonzalez DH (1997). Expression of sunflower cytochrome *c* mRNA is tissue-specific and controlled by nitrate and light. *Physiol. Plant.* 99: 342-347.
- Figueroa P, Leon G, Elorza A, Holuigue L, Jordana X (2001). Three different genes encode the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 46: 241-250.
- Figueroa P, Leon G, Elorza A, Holuigue L, Araya A and Jordana X (2002). The four subunits of mitochondrial respiratory complex II are encoded by multiple nuclear genes and targeted to mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 50: 725-734.
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S and Goodman HM (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 10(6): 1043-54.
- Finkelstein RR and Lynch TJ (2000). The *Arabidopsis* Abscisic Acid Response Gene *ABI5* Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor. *The Plant Cell* 12: 599-609.

- Finkelstein RR, Gampalaand SS and Rock CD (2002). Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. *The Plant Cell* S15-S45 (Supplement).
- Flint DH, Tuminello JF and Emptage MH (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydrolyases by superoxide. *J Biol Chem.* 268: 22369-22376.
- Fontanesi F, Soto IC and Barrientos A (2008). Cytochrome *c* oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life* 60(9): 557-568.
- Fontanesi F, Soto IC, Horn D and Barrientos A (2006). Assembly of mitochondrial cytochrome *c* oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291: 1129-1147.
- Frey TG and Mannella CA (2000). The internal structure of mitochondria. *TIBS* 25: 319-324.
- Foyer CH and Noctor G (2003). Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant.* 119: 355-364.
- Gagliardi D, Perrin R, Marechal-Drouard L, Grienenberger JM and Leaver CJ (2001). Plant mitochondrial polyadenylated mRNAs are degraded by a 3'- to 5'-exoribonuclease activity, which proceeds unimpeded by stable secondary structures. *J Biol Chem.* 276(47): 43541-43547.
- Gamborg OL, Miller RA and Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gazzarrini S and McCourt P (2001). Genetic interactions between ABA ethylene and sugar signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 387-391.
- Geiduschek EP and Ouhammouch M (2005). Archaeal transcription and its regulators. *Mol. Microbiol.* 56(6): 1397-407.
- Geier BM, Schägger H, Ortwein C, Link TA, Hagen WR, Brandt U and von Jagow G (1995). Kinetic properties and ligand binding of the eleven-subunit cytochrome *c* oxidase from *Saccharomyces cerevisiae* isolated with a novel large-scale purification method. *Eur J Biochem.* 227(1-2): 296-302.
- Gibney BR, Isogai Y, Rabanal F, Reddy KS, Grosset AM, Moser CC and Dutton PL (2000). Self-assembly of heme A and heme B in a designed four-helix bundle: implications for a cytochrome *c* oxidase maquette. *Biochemistry.* 39(36): 11041-11049.
- Giegé P, Hoffmann M, Binder S and Brennicke A (2000). RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria. *EMBO Rep.* 1: 164-170.
- Giegé P, Lee J, Sweetlove B, Cognat V and Leaver CJ (2005). Coordination of Nuclear and Mitochondrial Genome Expression during Mitochondrial Biogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 1497-1512.
- Giegé P, Grienenberger JM and Bonnard G (2008). Cytochrome *c* biogenesis in mitochondria. *Mitochondrion* 8(1): 61-73.
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20: 1425.
- Giraud E, van Aken O, Ho LH and Whelan J (2009). The transcription factor ABI4 is a regulator of mitochondrial retrograde expression of ALTERNATIVE OXIDASE1a. *Plant Physiol.* 150(3): 1286-96.
- Glaser E and Dessi P (1999). Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome *bc1* complex in plants. *J Bioenerg Biom.* 31(3): 259-274.
- Glover J, Grelon M, Chaudhury A and Dennis E (1998). Cloning and characterization of *MS5* from Arabidopsis: a gene critical in male meiosis. *The Plant Journal* 15(3): 345-356.
- Gomez-Casati DF, Busi MV, Gonzalez-Schain N, Mouras A, Zabaleta EJ and Araya A (2002). A mitochondrial dysfunction induces the expression of nuclear-encoded complex I genes in engineered male sterile *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 532: 70-74.
- Goffart S and Wiesner RJ (2003). Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp. Physiol.* 88: 33-40.
- Gomez-Casati DF, Busi MV, Gonzalez-Schain N, Mouras A, Zabaleta EJ and Araya A (2002). A mitochondrial dysfunction induces the expression of nuclear-encoded complex I genes in engineered male sterile *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 532: 70-74.
- Gonzalez DH, Welchen E, Attallah CV, Comelli RN, Mufarrege EF (2007). Transcriptional coordination of the biogenesis of the oxidative phosphorylation machinery in plants. *The Plant Journal* 51: 105-116.

- Grasser M, Lentz A and Grasser KD (2006). Regulation of Transcription in Plants. Annual Plant Reviews 29.
- Grasser M, Lentz A, Lichota J, Merkle T and Grasser KD (2006). The Arabidopsis genome encodes structurally and functionally diverse HMGB-type proteins. J. Mol. Biol. 358(3): 654-364.
- Gray MW, Hanic-Joyce PJ and Covello PS (1992). Transcription processing and editing in plant mitochondria. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43: 145-175.
- Gray MW (1999). Evolution of organelar genomes. Curr. Opin. Genet. Dev. 9: 678-687.
- Gray MW, Burger G and Lang BF (1999). Mitochondrial evolution. Science 283: 1476-81.
- Gray MW, Burger G and Lang BF (2001). The origin and early evolution of mitochondria. Genome Biology 2(6): 10181-10185.
- Greiner P, Hannappel A, Werner C and Ludwig B (2008). Biogenesis of cytochrome c oxidase *in vitro* approaches to study cofactor insertion into a bacterial subunit I. Biochim, Biophys, Acta 1777(7-8): 904-11.
- Grossman LI, Lomax MI (1997). Nuclear genes for cytochrome c oxidase. Biochim. Et Biophys. Acta 1532: 174-192.
- Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, Scarfe C, Davis RW and Li WH (2003). Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. Nature 423: 63-66.
- Gutterson N and Reuber TL (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. Curr. Opin. Plant Biol. 7(4): 465-71.
- Haas BJ, Wortman JR and Ronning CR (2005). Complete reannotation of the Arabidopsis genome: methods, tools, protocols and the final release. BMC Biology 3(1): 7.
- Hamanaka S, Ohtsu K, Kadowaki K, Nakazono M and Hirai A (1999). Identification of cDNA encoding cytochrome c oxidase subunit 5c (COX5c) from rice: comparison of its expression with nuclear-encoded ADN mitochondrial-encoded COX genes. Genes Genet. Syst. 74(3): 71-75.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Handa H (2003). The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res. 31(20): 5907-5916.
- Hanes S and Brent R (1991). A genetic model for interaction of the homeodomain recognition helix with DNA. Science 251: 426-430.
- Harberer G, Hindemitt T, Meyers BC and Mayer KFX (2004). Transcriptional similarities and conservation of *cis*-elements in duplicated genes of Arabidopsis. Plant Physiol. 136: 3009-3022.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75: 805-16.
- Hartmann U, Valentine WJ, Christie JM, Hays J, Jenkins GI and Weisshaar B (1998). Identification of UV/blue light-response elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using a homologous protoplast transient expression system. Plant Mol. Biol. 36: 741-754.
- Hartmann U, Sagasser M, Mehrstens F, Stracke R and 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.
- Hattori T, Totsuka M, Hobo T, Kagaya Y, Yamamoto-Toyoda A (2002). Experimentally determined sequence requirement of ACGT-containing abscisic acid response element. Plant and Cell Physiol. 43: 136-140.
- Heaton D, Nittis T, Srinivasan C and Winge DR (2000). Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. J Biol Chem. 275: 37582-37587.
- Heazlewood JA, Howell KA and Millar AH (2003). Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and yeast components coupled to plant-specific subunits. Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics) 1604: 159-169.

- Heazlewood JL, Tonti-Filipini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J and Millar AH (2004). Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components provides assessment of targeting prediction programs and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16: 241-256.
- Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B and Bailey PC (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* 20(5): 735-47.
- Heiser V, Brennicke A and Grohmann L (1997). The plant mitochondrial 22kDa (PSST) subunit of respiratory chain complex I is encoded by a nuclear gene with enhanced transcript levels in flowers. *Plant Mol. Biol.* 31: 1195-1204.
- Hell K, Tzagoloff A, Neupert W and Stuart RA (2000). Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J Biol Chem.* 275: 4571-4578.
- Hell K, Neupert W and Stuart RA (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *The EMBO Journal.* 20(6): 1281-88.
- Herrmann JM and Funes S (2005). Biogenesis of cytochrome oxidase-sophisticated assembly lines in the mitochondrial inner membrane. *Gene* 354: 43-52.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M and Korenaga T (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Res.* 27: 297-300.
- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Höhener B and Grill E (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J.* 21(12): 3029-38.
- Ho SL, Chao YC, Tong WF and Yu SM (2001). Sugar Coordinately and Differentially Regulates Growth- and Stress-Related Gene Expression via a Complex Signal Transduction Network and Multiple Control Mechanisms. *Plant Physiology* 125: 877-890.
- Hoefnagel MH, Atkin OK and Wiskich JT (1998). Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 235-255.
- Höfgen R and Willmitzer L (1988). Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Res.* 16: 9977.
- Hoffman CS and Winston F (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-272.
- Huang J, Struck F, Matzinger DF and Levings III CS (1994). Flower-enhanced expression of a nuclear-encoded mitochondrial respiratory protein is associated with changes in mitochondrion number. *Plant Cell* 6: 439-448.
- Hurt EC, Allison DS, Müller U and Schatz G (1987). Amino-terminal deletions in the presequence of an imported mitochondrial protein block the targeting function and proteolytic cleavage of the presequence at the carboxy terminus. *J Biol Chem.* 262(3): 1420-1424.
- Hudson ME and Quail PH (2003). Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiology* 133(4): 1605-16.
- Hull GA, Devic M (1995). The beta-glucuronidase (gus) reporter gene system. Gene fusions; spectrophotometric, fluorometric, and histochemical detection. In: Jones H (ed), *Methods in plant molecular biology*, vol 49: Plant gene transfer and expression protocols. Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp 125-141.
- Ishige F, Takaichi M, Foster R, Chua NH and Oeda K (1999). A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high-level constitutive expression in dicot and monocot plants. *The Plant Journal* 18(4): 443 - 448.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T and Parcy F (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 7(3): 106-11.
- Jan JC and Sheen J (1994). Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665-1679.
- Jansch L, Kruff V, Schmitz UK and Braun HP (1996). New insights into the composition molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant Journal* 9(3): 357-368.
- Jefferson RA (1987). Assaying Chimeric genes in Plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Reporter* 5(4) 387-405.
- Jefferson RA, Kavanagh TA and Bevan MW (1987). Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.

- Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M and Job D (2005). Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol.* 138: 790-802.
- Johannesson H, Wang Y and Engström P (2001). DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* 45: 63–73.
- Johansson E, Olsson O and Nyström T (2004). Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 279: 22204-22208.
- Kadenbach B, Hüttemann M, Arnold S, Lee I and Bender E (2000). Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome *c* oxidase. *Free Radical Biology and Medicine* 29(3/4): 211-221.
- Kadowaki KI, Kubo N, Ozawa K and Hirai A (1996). Targeting presequence acquisition after mitochondrial gene transfer to the nucleus occurs by duplication of existing targeting signals. *EMBO J.* 15: 6652-6661.
- Kaiser P and Auer B (1993). Rapid shuttle plasmid preparation from yeast cells by transfer to *E coli*. *BioTechniques* 14: 552.
- Kang JY, Choi H, Im MY and Kim SY (2002). *Arabidopsis* Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell* 14: 343–357.
- Kaslow DC (1986). A rapid biochemical method for purifying lambda DNA from phage lysates. *Nucleic Acids Res.* 14: 6767.
- Kellerman OK and Ferenci T (1982). Maltose binding protein from *E coli*. *Methods in Enzymology* 90: 459-463.
- Kercher SJ (2000). Diversity and origin of alternative NADH-ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 274-283.
- Khalimonchuk O and Roedel G (2005). Biogenesis of cytochrome *c* oxidase. *Mitochondrion* 5: 363–388.
- Khalimonchuk O, Rigby K, Bestwick M, Pierrel F, Cobine PA and Winge DR (2008). Pet191 is a cytochrome *c* oxidase assembly factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 7(8): 1427-1431.
- Kim SR, Choi JL, Costa MA and An G (1992). Identification of G-Box Sequence as an Essential Element for Methyl Jasmonate Response of Potato Proteinase Inhibitor II Promoter. *Plant Physiol.* 99(2): 627-31.
- Kissinger C, Liu B, Martin-Blanco E, Kornberg T and Pabo C (1990). Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 28 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63: 579-590.
- Koehler CM (2000). Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Letters* 476: 27-31.
- Kosugi S, Suzuka I and Ohashi Y (1995). Two of three promoter elements identified in a rice gene for proliferating cell nuclear antigen are essential for meristematic tissue-specific expression. *Plant J.* 7: 877-886.
- Kosugi S and Ohashi Y (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to *cis* elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* 9: 1607-1619.
- Kosugi S and Ohashi Y (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J.* 30: 337-348.
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R and Chory J (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316(5825): 715-9.
- Krauss S, Zhang CY and Lowell BB (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(3): 248-261.
- Kruft V, Eubel H, Jansch L, Werhahn W and Braun HP (2001). Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 127: 1694-1710.
- Kubo T and Mikami T (2007). Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome. *Physiol. Plant.* 129: 6-13.
- Kubo T, Nishizawa S, Sugawara A, Itchoda N, Estiati A and Mikami T (2000). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). *Nucleic Acids Res.* 28(13): 2571-2576.

- Kurland CG and Andersson SGE (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 786-820.
- Kuzmin EV, Karpova OV, Elthon TE and Newton KJ (2004). Mitochondrial Respiratory Deficiencies Signal Up-regulation of Genes for Heat Shock Proteins. *The journal of biological chemistry* 279 (20): 20672–20677.
- Laemli U (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lago C, Clerici E, Mizzi L, Colombo L and Kater MM (2004). TBP-associated factors in *Arabidopsis*. *Gene* 342(2): 231-41.
- Landshchüte V, Müller-Röber B and Willmitzer L (1995). Mitochondrial citrate synthase from potato: predominant expression in mature leaves and young flower buds. *Planta* 196: 756-764.
- Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux DS, Turmel M and Gray MW (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome miniature. *Nature* 387: 493-497.
- Lang BF, Gray MW and Burger G (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33: 351-397.
- Larkin RM and Ruckle ME (2008). Integration of light and plastid signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11(6): 593-9.
- Lawton-Rauh A (2003). Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 396–409.
- Lee SL and Warmke HE (1979). Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn. *Am. J. Bot.* 60: 141-148.
- Lee YH, Oh HS, Cheon CI, Hwang IT, Kim YJ and Chun JY (2001). Structure and expression of the *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *Athb-12*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284(1): 133-41.
- Lee A, Kirichenko A, Vygodina T, Siletsky SA, Das TK, Rousseau DL, Gennis R and Konstantinov AA (2002). Ca²⁺-binding site in *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry* 41(28): 8886-8898.
- Lee SJ, Kang JY, Park HJ, Kim MD, Bae MS, Choi H and Kim SY (2010). DREB2C Interacts with ABF2, a bZIP Protein Regulating Abscisic Acid-Responsive Gene Expression and Its Overexpression Affects Abscisic Acid Sensitivity. *Plant Physiol.* 153: 716–727.
- Leister D (2005). Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in *Arabidopsis*. *Gene* 354: 110-6.
- Li JF, Park E, von Arnim AG and Nebenfuhr 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: 6-10.
- Li JJ and Herskowitz I (1993). Isolation of ORC6 a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 262(5141): 1870-4.
- Li T, Stark M, Johnson A and Wolberger C (1995). Crystal structure of the MATa1/MATa2 homeodomain heterodimer bound to DNA. *Science* 270: 262-269.
- Li G and Hall TC (1999). Footprinting *in vivo* reveals changing profiles of multiple factor interactions with the β -phaseolin promoter during embryogenesis. *The Plant Journal* 18(6): 633-641.
- Li J and Chory J (1998). *Arabidopsis* Protocols: Preparation of DNA from *Arabidopsis*. *Methods in Molecular Biology* 82: 55-60.
- Lister R, Murcha MW and Whelan J (2003). The mitochondrial protein import machinery of plants (MPIMP) database. *Nucleic Acids Res.* 31: 325-327.
- Lister R, Chew O, Lee M-N, Heazlewood JL, Clifton R, Parker KL, Millar AH and Whelan J (2004). A transcriptomic and proteomic characterization of the *Arabidopsis* mitochondrial protein import apparatus and its response to mitochondrial stresses. *Plant Physiol.* 134: 777-789.
- Lister R and Whelan J (2006). Mitochondrial protein import: convergent solutions for receptor structure. *Curr. Biol.* 16: R197-199.

- Lister R, Carrie C, Duncan O, Ho LH, Howell KA, Murcha MW and Whelan J (2007). Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell* 19(11): 3739-3759.
- Liu L, White MJ and MacRae TH (1999). Transcription factors and their genes in higher plants: Functional domains evolution and regulation. *Eur. J. Biochem.* 262: 247-257.
- Liu Z and Butow RA (2006).. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu. Rev. Genet.* 40: 159-85.
- Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D and Darnell J (2002). *Biología Celular y Molecular*. Ed. Médica Panamericana (4ta edición). Madrid, España.
- Logan DC, Millar A, Sweetlove L, Hill S and Leaver C (2001). Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol.* 125: 662-672.
- Logan DC (2007). *Plant Mitochondria*. Ann. Plant Rev. vol 31. Blackwell Publishing Ltd.
- Luirink J, Samuelsson T and de Gier JW (2001). YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* 501(1): 1-5.
- Louret OF, Doignon F and Crouzet M (1997). Stable DNA binding yeast vector allowing high bait expression for use in the two-hybrid system. *BioTechniques* 23: 816-819.
- Luo Y, Vijaychyer S, Stile J and Zhu L (1996). Cloning and analysis of DNA-binding proteins by yeast one-hybrid and one-two-hybrid systems. *BioTechniques* 20: 564-568.
- Luscombe NM, Austin SE, Berman HM and Thornton JM (2000). An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol.* 1(1): rS001.
- Macasev D, Newbigin E, Whelan J and Lithgow T (2000). How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from *Arabidopsis* differ from their fungal counterparts. *Plant Physiol.* 123: 811-816.
- Macasev D, Whelan J, Newbigin E, Silva-Filho MC, Mulhern TD and Lithgow T (2004). Tom22', an 8-kDa trans-site receptor in plants and protozoans, is a conserved feature of the TOM complex that appeared early in the evolution of eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21: 1557-1564.
- Mackenzie S, Shichuan H and Lyznik A (1994). The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol.* 105: 775-780.
- Mackenzie S and McIntosh L (1999). Higher Plant Mitochondria. *Plant Cell* 11: 571-585.
- Madigan MT, Martinko JM and Parker J (2004) Brock. *Biología de los microorganismos* (10^{ma} ed). Pearson Prentice Hall. Illinois, USA.
- Magnani E, Sjölander K and Hake S (2004). From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants. *Plant Cell* 16(9): 2265-77.
- Makalowska I, Lin CF and Makalowski M (2005). Overlapping genes in vertebrate genomes. *Computational Biology and Chemistry* 29: 1-12.
- Maliga P, Klessig DF, Cashmore AR, Gruissem W and Varner JE (1995). Identification of promoter sequences that interact with DNA-binding proteins. *Methods in Plant Molecular Biology: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp233-260.
- Manevski A, Bertoni G, Bardet C, Tremousaygue D and Lescure B (2000). In synergy with various *cis*-acting elements plant interstitial telomere motifs regulate gene expression in *Arabidopsis* root meristemas. *FEBS Lett.* 483: 43-46.
- Maniatis T, Fritsch E and Sambrook J (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. Laboratory Cold Spring Harbor, New York.
- Manthey GM and McEwen JE (1995). The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14(16): 4031-4043.
- Margulis L (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 29: 21-38.
- Margulis L, Dolan MF and Guerrero R (2000). The chimeric eukaryote: origin of the nucleus from the karyomastigont in amitochondriate protists. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(13): 6954-9.
- Martin W and Herrmann RG (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much what happens and why? *Plant Physiol* 118 9-17

- Martin W and Muller M (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392(6671): 15-16.
- Medeiros DM (2008). Assessing mitochondria biogenesis. *Methods* 46: 288–294.
- Meijer AH, Ouwerkerk P and Hoge JH (1998). Vectors for transcription factor isolation and target gene identification by means of genetic selection in yeast. *Yeast* 14: 1407-1416.
- Menkens AE, Schindler U and Cashmore AR (1995). The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 506–510.
- Mesecke N, Terziyska N, Kozany C, Baumann F, Neupert W, Hell K and Herrmann JM (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*. 121(7): 1059-1069.
- Meyerowitz EM and Somerville CR (2004). *Arabidopsis*. Cold Spring Laboratory Press. New York, USA.
- Mick DU, Wagner K, van der Laan M, Frazier AE, Perschil I, Pawlas M, Meyer HE, Warscheid B and Rehling P (2007). *Shy1* couples *Cox1* translational regulation to cytochrome *c* oxidase assembly. *EMBO J*. 26: 4347-4358.
- Millar AH, Day D and Whelan J (2004). Mitochondrial biogenesis and function in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*: 1-36. En <http://www.Aspborg/publications /arabidopsis>.
- Millar AH, Eubel H, Jänsch L, Kruff V, Heazlewood JL And Braun H-P (2004a). Mitochondrial cytochrome *c* oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plan specific subunits. *Plan Mol. Biol.* 56: 77-90.
- Miller JH (1972). *Experiments in Molecular Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory
- Mills DA, Ferguson-Miller S (2003). Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome *c* oxidase: lessons from other proteins *FEBS Letters* 545 47-51
- Mittler R (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.
- Mokranjac D, Paschen SA, Kozany C, Prokisch H, Hoppins SC, Nargang FE, Neupert W and Hell K (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J*. 22(4): 816-825.
- Møller, I. M. (1997). The oxidation of cytosolic NAD(P)H by external NAD(P)H dehydrogenases in the respiratory chain of plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 100, 85-90.
- Moller IM (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 561-591.
- Moller IM (2002). A new dawn for plant mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases. *Trends Plant. Sci.* 7: 235-237.
- Møller IM and Rasmusson AG (1998). The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends Plant Sci.* 3: 21-27.
- Mooney B and Harmey M A (1996). The occurrence of hsp70 in the outer membrane of plant mitochondria. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 218: 309-313.
- Moore C, Cook-Johnson R, Rudhe C, Whelan J, Day D, Wiskich J, Soole K (2003). Identification of AtNDH an internal non-phosphorylating NAD(P)H dehydrogenase in *Arabidopsis* mitochondria *Plant Physiol* 133: 1968-1978
- Moore RC and Purugganan MD (2003). The early stages of duplicate gene evolution *PNAS* 100 (26): 15682-15687
- Moore RC and Purugganan MD (2005). The evolutionary dynamics of plant duplicate genes *Current Opinion in Plant Biology* 8:122 –128
- Mufarrege EF, Curi GC and González DH (2009). Common sets of promoter elements determine the expression characteristics of three *Arabidopsis* genes encoding isoforms of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 6b. *Plant Cell Physiol.* 50(7):1393-9.
- Mulero JJ and Fox TD (1993). Alteration of the *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111. *Mol Biol Cell.* 4(12): 1327-35.
- Müller M (1993). The hydrogenosome. *J. Gen. Micro.* 139: 2879-2889.

- Muller M and Martin W (1999). The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes. *Bioessays* 21: 377-381.
- Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murcha MW, Elhafez D, Lister R, Tonti-Filippini J, Baumgartner M, Philippar K, Carrie C, Mokranjac D, Soll J and Whelan J (2007). Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 143(1): 199-212.
- Nadeau JH and Sankoff D (1997). Comparable rates of gene loss and functional divergence after genome duplications early in vertebrate evolution. *Genetics* 147: 1259-1266.
- Nakagawa T, Maeshima M, Nakamura K and Ashahi T (1990). Molecular cloning of a cDNA for the smallest nuclear-encoded subunit of sweet potato cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.* 191: 557-561.
- Nakamura M, Tsunoda T and Obokata J (2002). Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J.* 29(1): 1-10.
- Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2003). Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis *rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* 34: 137-148.
- Neupert W (1997). Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 66: 863-917.
- Ngai N, Tsai FY and Coruzzi G (1997). Light-induced transcriptional repression of the pea *AS1* gene: identification of *cis*-elements and transactors. *Plant J.* 12: 1021-1234.
- Nguyen N, Zhang X, Olashaw N and Seto E (2004). Molecular Cloning and Functional Characterization of the Transcription Factor YY2. *J. Biol. Chem* 279(24): 25927-25934.
- Nijtmans LG, Taanman JW, Muijsers AO, Speijer D and van Den Bogert C (1998). Assembly of cytochrome c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem.* 254: 389-394.
- Nikolov DB, Chen H, Halay ED, Usheva AA, Hisatake K, Lee DK, Roeder RG and Burley SK (1995). Crystal structure of a TFIIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377(6545): 119-28.
- Nikolov DB and Burley SK (1997). RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(1): 15-22.
- Nobrega MP, Bandeira S, Beers J and Tzagoloff A (2002). Characterization of *COX19*, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial *cytochrome oxidase*. *J. Biol. Chem.* 277: 40206-40211.
- Noctor G, de Paepe R and Foyer CH (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science.* 12: 125-134.
- Nohab B, Lee SH, Kim HJ, Yi G, Shin EA, Lee M, Jung KJ, Doyle MR, Amasino RM and Noh YS (2004). Divergent Roles of a Pair of Homologous Jumonji/Zinc-Finger-Class Transcription Factor Proteins in the Regulation of Arabidopsis Flowering Time. *The Plant Cell* 16: 2601-2613.
- Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, Kubo N, Akiduki G, Nakasono M, Hirai A and Kadowaki K (2002). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet. Genomics* 268: 434-445.
- Nunnari J and Walter P (1996). Regulation of organelle biogenesis. *Cell* 84: 389-394.
- Nunes-Nesi A, Sulpice R, Gibon Y and Fernie AR (2008). The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *J Exp. Bot.* 59(7): 1675-1684.
- Oda K, Yamato K, Ohta E, Nakamura Y, Takemura M (1992). Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA: a primitive form of plant mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* 223: 1-7.
- Ohtsu K, Nakazono M, Tsutsumi N and Hirai A (2001). Characterization and expression of the genes for cytochrome c oxidase subunit VIb (*COX6b*) from rice and *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 264: 233-239.
- Ooms G, Bakker A, Molendijk L, Wullems GJ, Gordon MP, Nester EW and Schilperoort RA (1982). T-DNA organization in homogeneous and heterogeneous octopine-type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell* 30(2): 589-97.

- Osato N, Yamada H, Satoh K, Ooka H, Yamamoto M, Suzuki K, Kawai J, Carninci P, Oh-tomo Y, Murakami K, Matsubara K, Kikuchi S and Hayashizaki Y (2003). Antisense transcripts with rice full-length cDNAs. *Genome Biol.* 5(1): R5.
- Ouhammouch M and Geiduschek EP (2005). An expanding family of archaeal transcriptional activators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102(43): 15423-8.
- Palena C, González DH, Guelman S, Chan R (1998). Expression of sunflower homeodomain containing proteins in *Escherichia coli* Purification and functional studies *Protein Expr Purif* 13: 97-103
- Palena CM, Gonzalez DH and Chan RL (1999). A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain leucine-zipper protein Hahb-4 with DNA. *Biochem. J.* 341(Pt 1): 81-7.
- Palena CM, Tron AE, Bertoncini CW, Gonzalez DH and Chan RL (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(1): 39-47.
- Parisi G, Perales M, Fornasari MS, Colaneri A, Gonzalez-Schain N, Gomez-Casati D, Zimmermann S, Brennicke A, Araya A, Ferry JG, Echave J and Zabaleta E (2004). Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 55: 193-207.
- Park JS, Kim J, Cho K, Cheon C, Choung MG and Roh KH (2008). Arabidopsis R2R3-MYB transcription factor AtMYB60 functions as a transcriptional repressor of anthocyanin biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Cell Rep.* 27(6): 985-94.
- Pastore D, Trono D, Laus MN, Di Fonzo N and Flagella Z (2007). Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *J Exp. Bot.* 58(2): 195-210.
- Paul MJ and Pellny TK (2003). Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* 54(382): 539-47.
- Perez-Martinez X, Broadley SA and Fox TD (2003). Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* 22(21): 5951-5961.
- Pérez-Rodríguez P, Riaño-Pachón DM, Correa LG, Rensing SA, Kersten B and Mueller-Roeber B (2009). PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue): D822-7.
- Perry AJ, Hulett JM, Likic VA, Lithgow T and Gooley PR (2006). Convergent evolution of receptors for protein import into mitochondria. *Curr. Biol.* 16: 221-229.
- Pesaresi P, Masiero S, Eubel H, Braun HP, Bhushan S, Glaser E, Salamini F and Leister D (2006). Nuclear Photosynthetic Gene Expression Is Synergistically Modulated by Rates of Protein Synthesis in Chloroplasts and Mitochondria. *The Plant Cell.* 18: 970-991.
- Pfanner N and Geissler A (2001). Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(5): 339-349.
- Pierrel F, Bestwick ML, Cobine PA, Khalimonchuk O, Cricco JA and Winge DR (2007). Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J.* 26: 4335-4343.
- Pierrel F, Khalimonchuk O, Cobine PA, Bestwick M and Winge DR (2008). Coa2 Is an Assembly Factor for Yeast Cytochrome c Oxidase Biogenesis That Facilitates the Maturation of Cox1. *Molecular and Cellular Biology* 28(16): 4927-4939.
- Plant Transcription Factor Database 2010 (PlnTFDB, <http://plntfdbbiouni-potsdamde/v30/>)
- Poyton RO and McEwen JE (1996). Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 563-607.
- Preuss M, Leonhard K, Hell K, Stuart RA, Neupert W and Herrmann JM (2001). Mba1, a Novel Component of the Mitochondrial Protein Export Machinery of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology.* 153(5): 1085-1095.
- Prince VE and Pickett FB (2002). Splitting Pairs: The diverging fates of duplicated genes *Nature Reviews Genetics* 3: 827-836
- Quesada V, Ponce MR and Micol JL (1999). *OTC* and *AUL1* two convergent and overlapping genes in the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 461: 101-106.
- Raghavendra AS, Padmasree K and Saradadevi K (1994). Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: interactions between chloroplasts and mitochondria. *Plant Sci.* 97: 1-14.

- Raghavendra AS and Padmasree K (2003). Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci.* 8: 546-553.
- Rasmusson AG, Heiser V, Zabaleta E, Brennicke A and Grohmann L (1998). Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1364: 101-111.
- Rasmusson AG, Svensson AS, Knoop V, Grohmann L and Brennicke A (1999). Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J.* 20: 47-74.
- Raven JA and Allen JF (2003). Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants. *Genome Biology* 4: 2089-2095.
- Rehling P, Model K, Brandner K, Kovermann P, Sickmann A, Meyer HE, Kühlbrandt W, Wagner R, Truscott KN and Pfanner N (2003). Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science.* 299: 1747-1751.
- Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC and Siedow JN (2006). Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiology.* 141: 357-366.
- Richter OM and Ludwig B (2003). Cytochrome c oxidase: structure, function and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147: 47-74.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK and Yu G (1998). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes *Science* 290(5499): 2105-10
- Riechmann JL (2002). Transcriptional Regulation: a Genomic Overview. *The Arabidopsis Book.* American Society of Plant Biologists.
- Riquet FB, Tan L, Choy BK, Osaki M, Karsenty G, Osborne TF, Auron PE and Goldring MB (2001). YY1 Is a Positive Regulator of Transcription of the *Col1a1* Gene. *J. Biol. Chem.* 276(42): 38665-38672.
- Rizzuto R, Sandona D, Brini M, Capaldi R, Bisson R (1991). The most conserved nuclear-encoded polypeptide of cytochrome c oxidase is the putative zinc-binding subunit: primary structure of subunit V from the slime mold *Dictyostelium discoideum* *Biochimica et Biophysica Acta* 1129: 100-104
- Rogozin IB, Spiridonov AN, Sorokin AV, Wolf YI, Jordan IK, Tatusov RL and Koonin EV (2002). Purifying and directional selection in overlapping prokaryotic genes. *Trends in Genetics* 18(5): 228-232.
- Roldan-Arjona T, Garcia-Ortiz MV, Ruiz-Rubio M and Ariza RR (2000). cDNA cloning, expression and functional characterization of an *Arabidopsis thaliana* homologue of the *Escherichia coli* DNA repair enzyme endonuclease III. *Plant Mol Biol.* 44: 43-52.
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C and Bevan MW (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling. *The Plant Journal* 26(4): 421-433.
- Rook F, Hadingham S, Li I and Bevan MW (2006). Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell and Environment* 29: 426-434.
- Ross JM, Emily JH, Stone CG, Elowsky R, Arredondo-Peter RV, Klucas Y and Gautam S (2004). Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor ARR1. *J. Exp. Bot.* 55(403): 1721-1731.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A and Paz-Ares J (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15(16): 2122-33.
- Ruberti I, Sessa G, Lucchetti 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
- Rushmore TH, Morton MR and Pickett CB (1991). The Antioxidant Responsive Element: activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 266(18): 11632-11639 1991.
- Saish D, Nakazono M, Lee K H, Tsutsumi N, Akita S and Hirai A (2001). The gene for alternative oxidase-2 (AOX2) from *Arabidopsis thaliana* consists of five exons unlike other AOX genes and its transcribed at an early stage during germination. *Genes Genet. Syst.* 76(2): 89-97.

- Sakamoto A, Tsukamoto S, Yamamoto H, Ueda-Hashimoto M, Takahashi M, Suzuki H and Morikawa H (2003). Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. *Plant J.* 33: 841-851.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290(3): 998-1009.
- Salinas J, Oeda K and Chua NH (1992). Two G-Box-Related Sequences Confer Different Expression Patterns in Transgenic Tobacco. *The Plant Cell* 4: 1485-1493.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Satoh M, Kubo T, Nishizawa S, Estiati A, Itchoda N and Mikami T (2004). The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. *Mol Genet Genomics.* 272(3): 247-256.
- Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V and Holtgreffe S (2005). Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J Exp. Bot.* 56: 1481-1489.
- Schindler U, Terzaghi W, Beckmann H, Kadesch T and Cashmore AR (1992). DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the Arabidopsis transcription factor GBF1. *The EMBO J.* 11(4): 1275 -1289.
- Schindler U, Menkens AE, Beckmann H, Ecker JR and Cashmore AR (1992). Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expressed Arabidopsis GBF bZIP proteins. *The EMBO J.* 11(4): 1261-1273.
- Schmidt B, McCracken J and Ferguson-Miller S (2003). A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome *c* oxidase. *PNAS* 100: 15539-15542.
- Schulze M and Rödel G (1989). Accumulation of the cytochrome *c* oxidase subunits I and II in yeast requires a mitochondrial membrane-associated protein, encoded by the nuclear *SCO1* gene. *Mol Gen Genet.* 216(1): 37-43.
- Schulze-Lefert P, Dang JL, Becker-Andre M, Hahlbrock K and Schulz W (1989). Inducible *in vivo* DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley *chalcone synthase* gene. *The EMBO J.* 8(3): 651-656.
- Schuster W and Brennicke A (1994). The plant mitochondrial genome: Physical structure information content RNA editing and gene migration to the nucleus. *Plant Mol. Biol.* 45: 61-78.
- 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 HD-Zip domains homo-dimerize forming complexes of different DNA binding specificities *EMBO J* 12: 3507-3517
- Sessa G, Morelli G and Ruberti I (1997). DNA-binding Specificity of the Homeodomain-leucine Zipper Domain. *J. Mol. Biol.* 274: 303-309.
- Shahmuradov IA, Solovyev VV and Gammerman AJ (2003). Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic Acids Res.* 33(3): 1069-76.
- Sheen J, Zhou L and Jang JC (1999). Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 410-418.
- Shen H, Cao K and Wang X (2007). AtbZIP16 and AtbZIP68, two new members of GBFs, can interact with other G group bZIPs in *Arabidopsis thaliana*. *BMB Reports*: 132-138.
- Shen W, Wei Y, Dauk M, Zheng Z and Zou J (2003). Identification of a mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: Evidence for a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in plants. *FEBS Lett.* 536: 92-96.
- Shiu SH, Shih MC and Li WH (2005). Transcription factor families have much higher expansion rates in plants than in animals. *Plant Physiol.* 139(1): 18-26.
- Siberil Y, Doireau P and Gantet P (2001). Plant bZIP G-box binding factors: Modular structure and activation mechanisms. *Eur. J. Biochem.* 268: 5655-5666.
- Sicheritz-Pontén T, Kurland CG and Andersson SG (1998). A phylogenetic analysis of the cytochrome *b* and cytochrome *c* oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae. *Biochim Biophys Acta* 1365(3): 545-541.

- Siedow JN and Umbach AL (1995). Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *Plant Cell* 7: 821-831.
- Siedow JN and Umbach AL (2000). The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulation diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 432-439.
- Silver J, Limjoco T and Feinstone S (1995). Site-specific mutagenesis using the polymerase chain reaction. En *PCR Strategies* Innis MA, Gelfand DH, Snisky JJ editors Academic Press, San Diego: 179-188.
- Simillion C, Vandepoele K, van Montagu MC, Zabeau M and van de Peer Y (2002). The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 99(21): 13627-13632.
- Singh KB (1998). Transcriptional Regulation in Plants: The Importance of Combinatorial Control. *Plant Physiol.* 118: 1111-1120.
- Sirrenberg C, Bauer M, Neupert W and Brunner M (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature.* 384(6609): 582-585.
- Smale ST and Baltimore D (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57(1): 103-13.
- Smart C, Monéger F and Leaver CJ (1994). Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell* 6: 811-825.
- Smith D and 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 and Engström P (1996). The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J.* 10(2): 375-81.
- Söderman E, Hjelström M, Fahleson J and Engström P (1999). The HD-Zip gene *ATHB6* in *Arabidopsis* is expressed in developing leaves roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol. Biol.* 40(6): 1073-83.
- Stiburek L, Hansikova H, Tesarova M, Cerna L and Zeman J (2006). Biogenesis of eukaryotic cytochrome *c* oxidase. *Physiol Res.* 55: S27-41.
- Stiburek L, Vesela K, Hansikova H, Pecina P, Tesarova M, Cerna L, Houstek J and Zeman J (2005). Tissue-specific cytochrome *c* oxidase assembly defects due to mutations in *SCO2* and *SURF1*. *Biochem. J.* 392: 625-632.
- Stockinger EJ, Gilmour SJ and Thomashow MF (1997). *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and waterdeficit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 1035-1040.
- Stojanovski D, Guiard B, Kozjak-Pavlovic V, Pfanner N and Meisinger C (2007). Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of α -helical TOM proteins. *The Journal of Cell Biology.* 179(5): 881-893.
- Stuart RA and Neupert W (1996). Topogenesis of inner membrane proteins of mitochondria. *Trends Biochem Sci.* 21(7): 261-267.
- Studier FW and Moffatt BA (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Sugiyama Y, Watase Y, Nagase M, Makita N, Yagura S, Iria A and Sugiera M (2005). The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol Genet Genomics.* 272(6): 603-615.
- Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel R, Day DA, Leaver CJ and Millar AH (2002). The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J.* 32: 891-904.
- Sweetlove LJ and Foyer CH (2004). Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. In *Plant Mitochondria: From Genome to Function* (vol. 1). Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- Sweetlove LJ, Lytovchenko A, Morgan M, Nunes-Nesi A, Taylor NL, Baxter CJ, Eickmeier I and Fernie AR (2006). Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *PNAS* 103(51): 19587-19592.
- Szyrach G, Ott M, Bonnefoy N, Neupert W and Herrmann JM (2003). Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *The EMBO J.* 22(24): 6448-6457.

- Taiz L and Zeiger E (2002). Plant Physiology, Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Tanaka R and Tanaka A (2007) Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* 58: 321-346.
- Tapia G, Verdugo I, Yañez M, Ahumada I, Theoduloz C, Cordero C, Poblete F, González E and Ruiz-Lara S (2005). Involvement of ethylene in stress-induced expression of the TLC11 retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun. *Plant Physiol.* 138(4): 2075-86.
- Taylor NL, Day DA and Millar AH (2002). Environmental Stress Causes Oxidative Damage to Plant Mitochondria Leading to Inhibition of Glycine Decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 277(45): 42663-42668.
- Taylor NL, Rudhe C, Hulett JM, Lithgow T, Glaser E, Day DA, Millar AH and Whelan J (2003). Environmental stresses inhibit and stimulate different protein import pathways in plant mitochondria. *FEBS Lett* 547: 125-130.
- Taylor NL, Day DA and Millar AH (2004). Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* 55: 1-10.
- Taylor RD and Pfanner N (2004). The protein import and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *Biochim Biophys Acta* 1658(1-2): 37-43.
- Terziyska N, Lutz T, Kozany C, Mokranjac D, Mesecke N, Neupert W, Herrmann JM and Hell K (2005). Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. *FEBS Lett.* 579: 179-184.
- The Arabidopsis genome initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Thirkettle-Watts D, McCabe TC, Clifton R, Moore C, Finnegan PM, Day DA and Whelan J (2003). Analysis of the alternative oxidase promoters from soybean. *Plant Physiol.* 133: 1158-1169.
- Thomas BJ and Rothstein R (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56: 619-630.
- Timmis J, Ayliffe MA, Huang CY and Martin W (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 5: 123-135.
- Toledo-Ortiz G, Huq E and Quail PH (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15(8): 1749-70.
- Traven A, Wong JM, Xu D, Sopta M and Ingles CJ (2001). Interorganelar communication Altered nuclear gene expression profiles in yeast mitochondrial DNA mutant. *J. Biol. Chem.* 276: 4020-4027.
- Trémousaygue D, Garnier L, Bardet C, Dabos P, Hervé C and Lescure B (2003). Internal telomeric repeats and "TCP-domain" protein binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.* 33: 957-966.
- Tron AE, Bertoncini CW, Palena CM, Chan RL and Gonzalez DH (2001). Combinatorial interactions of two amino acids with a single base pair define target site specificity in plant dimeric homeodomain proteins. *Nucleic Acids Res.* 29(23): 4866-72.
- Tron AE, Comelli RN and González DH (2005). Structure of homeodomain-leucine zipper/DNA complexes studied using hydroxyl radical cleavage of DNA and methylation interference. *Biochemistry* 44(51): 16796-803.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Haka-shima R, Yaono R and Yoshikawa S (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 269: 1069-1074.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Naka-shima R, Yaono R and Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 272: 1136-1144.
- Tzagoloff A, Capitanio N, Nobrega MP and Gatti D (1990). Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of *COX11*, a homolog of the *P. denitrificans* protein encoded by ORF3. *EMBO J.* 9: 2759-2764.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(21): 11632-7.

- Unsel M, Marienfeld J R, Brandt P and Brennicke A (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366924 nucleotides. *Nat. Genet.* 15: 57-61.
- van der Laan M, Rissler M and Rehling P (2006). Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines. *FEMS Yeast Res* 6: 849-861.
- Vanlerberghe GC and McIntosh L (1994). Mitochondrial electron transport regulation of nuclear gene expression: studies with the alternative oxidase gene of tobacco. *Plant Physiol.* 105: 867-874.
- Vanlerberghe GC and McIntosh L (1996). Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria. *Plant Physiol.* 111: 589-595.
- Vanlerberghe GC and McIntosh L (1997). ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48: 703-734.
- Verniquet F, Gaillard J, Neuburger M and Douce R (1991). Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide. *Biochem J.* 276: 643-648.
- Vidal M, Brachmann RK, Fattaey A, Harlow E and Boeke JD (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(19): 10315-20.
- Villain P, Mache R and Zhou DX (1996). The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *J. Biol. Chem.* 271: 32593-32598.
- Vision TJ, Brown DG and Tanksley SD (2000). The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* 290: 2114-2116.
- Wagner AM and Moore AL (1997). Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defense mechanism. *Biosci. Rep.* 17: 319-333.
- Wagner AM and Krab K (1995). The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Physiologia Plantarum* 95: 318-325.
- Welchen E, Chan RL and González DH (2002). Metabolic regulation of genes encoding cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase subunit Vb in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* 25: 1605-1515.
- Welchen E, Chan RL and González DH (2004). The promoter of the *Arabidopsis* nuclear gene *COX5b-1* encoding subunit 5b of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase directs tissue-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements. *J. Exp. Bot.* 55 (405): 1997-2004.
- Welchen E and González DH (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(1): 88-100.
- Welchen E and González DH (2006). Overrepresentation of Elements Recognized by TCP-Domain Transcription Factors in the Upstream Regions of Nuclear Genes Encoding Components of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Machinery. *The Plant J.* 141(2): 540-5.
- Welchen E, Viola IL, Kim HJ, Prendes LP, Comelli RN, Hong JC and Gonzalez DH (2009). A segment containing a G-box and an ACGT motif confers differential expression characteristics and responses to the *Arabidopsis* *Cytc-2* gene encoding an isoform of cytochrome *c*. *J. Exp. Bot.* 60: 829-845.
- Werhahn W, Niemeyer A, Jansch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun HP (2001). Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis*. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol.* 125(2): 943-954.
- Wiedemann N, Frazier AE and Pfanner N (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol. Chem.* 279(15): 14473- 14476.
- Williams ME, Foster R and Chua NH (1992). Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding. *Plant Cell* 4: 485-496.
- Wilson D, Sheng G, Jun S and Desplan C (1996). Conservation and diversification in homeodomain-DNA interactions: A comparative genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 6886-6891.
- Wingler A and Roitsch T (2008). Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biol. (Stuttg)* 10 (1): 50-62.
- Woodson JD and Chory J (2008). Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat. Rev. Genet.* 9(5): 383-95.

- Wu G and Poething RS (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target *SPL3*. *Development* 133(18): 3539-47.
- Wuitschick JD, Lindstrom PR, Meyer AE and Karrer KM (2004). Homing endonucleases encoded by germ line-limited genes in *Tetrahymena thermophila* have APETELA2 DNA binding domains. *Eukaryot. Cell* 3(3): 685-94.
- Xiu-Qing L, Zhang M and Brown GG (1996). Cell-Specific expression of mitochondrial transcripts in maize seedlings *Plant Cell* 8: 1961-1975
- Yamamoto H, Esaki M, Kanamori T, Tamura Y, Nishikawa S and Endo T (2002). Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell*. 111: 519-528.
- Yamano K, Yatsukawa YI, Esaki M, Hobbs AE, Jensen RE and Endo T (2008). TOM20 and TOM22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* 283: 3799-3807.
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T and Pilon M (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 282(22): 16369-78.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K and Yokoyama S (2004). A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. *J. Mol. Biol.* 337(1): 49-63.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Tomo Y, Terada T, Shirouzu M, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K and Yokoyama S (2005). Solution structure of the major DNA-binding domain of *Arabidopsis thaliana ethylene-insensitive3-like3*. *J. Mol. Biol.* 348(2): 253-64.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Watanabe S, Tateno M, Seki M, Shinozaki K and Yokoyama S (2008). Structures and evolutionary origins of plant-specific transcription factor DNA-binding domains. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 394-401.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Ye J, Cippitelli M, Dorman L, Ortaldo JR and Young HA (1996). The Nuclear Factor YY1 Suppresses the Human Gamma Interferon Promoter through Two Mechanisms: Inhibition of AP1 Binding and Activation of a Silencer Element. *Mol. Cell. Biol.* 16(9) 4744-4753.
- Yu J, Nickels R, McIntosh L (2001). A genome approach to mitochondrial-nuclear communication in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 345-353.
- Yuh CH, Bolouri H and Davidson EH (2001). *Cis*-regulatory logic in the *endo16* gene: switching from a specification to a differentiation mode of control. *Development* 128: 617-629.
- Zabaleta E, Heiser V, Grohmann L and Brennicke A (1998). Promoters of nuclear-encoded respiratory chain complex I genes from *Arabidopsis thaliana* contain a region essential for anther/pollen-specific expression. *Plant J.* 15: 49-59.
- Zhao J, Zhang W, Zhao Y, Gong X, Guo L, Zhu G, Wang X, Gong Z, Schumaker KS and Guo Y (2007). SAD2, an importin-like protein, is required for UV-B response in *Arabidopsis* by mediating MYB4 nuclear trafficking. *Plant Cell* 19(11): 3805-18.
- Zhou MD, Wu Y, Kumar A and Siddiqui MA (1992). Mechanism of tissue-specific transcription: interplay between positive and negative regulatory factors. *Gene Exp.* 2(2): 127-38.
- Zhou X, Wang G and Zhang W (2007). UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* 3: 103.
- Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, de Bie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM and Shoubridge EA (1998). *SURF1*, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* 20: 337-343.