

## 4. CAPÍTULO II

“Estudio de la región promotora del gen codificante para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa (COX5b) de *Arabidopsis thaliana*”.

## CAPÍTULO II

### Estudio de la región promotora del gen codificante para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa (COX5b) de *Arabidopsis thaliana*

#### 4.1 Introducción:

##### 4.1.1 Los complejos multienzimáticos que componen la cadena respiratoria:

La fosforilación oxidativa mitocondrial es un proceso que en la mayoría de los eucariotas se produce gracias a la operación secuencial de cinco complejos proteicos denominados: complejo I (NADH deshidrogenasa), complejo II (succinato deshidrogenasa), complejo III (citocromo *c* reductasa), complejo IV (citocromo *c* oxidasa) y complejo V (ATP sintetasa). Estos complejos se encuentran presentes en prácticamente todas las mitocondrias y, en mitocondrias de plantas, existen además características especiales que las diferencian de las del resto de los eucariotas. En primer lugar, la presencia de NAD(P)H deshidrogenasas resistentes a rotenona y de una oxidasa terminal insensible a CN<sup>-</sup> (Vanlerberghe y McIntosh, 1997; Rasmusson y col., 1999; Moore y col., 2003). En segundo lugar, el genoma mitocondrial de plantas codifica una mayor cantidad de proteínas integrantes de estos complejos, en comparación con el de los eucariotas heterótrofos (Unsel y col., 1997), por lo que tienen mecanismos de ensamblado de estas proteínas en los diferentes complejos que les son particulares (Millar y col., 2004a). Por último, algunos complejos proteicos en las mitocondrias de plantas contienen subunidades adicionales que permiten que los mismos realicen otras funciones secundarias o adicionales. Por ejemplo, en las mitocondrias de plantas, las dos subunidades de la peptidasa de procesamiento mitocondrial forman parte del complejo III, y el complejo I contiene una L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa que cataliza los pasos terminales en la biosíntesis de ácido ascórbico (Millar y col., 2003). Además, existen subunidades específicas en los complejos I y IV, de función aún desconocida (Heazlewood y col., 2003a; Parisi y col., 2004).

La composición de los complejos I, III y V ha sido estudiada exhaustivamente. El complejo III de papa fue purificado mediante cromatografía de afinidad con citocromo *c* y mostró

estar formado por 10 subunidades. Todas las subunidades fueron parcialmente secuenciadas mediante degradación de Edman y se caracterizaron los genes codificantes para esas proteínas (Millar y col., 2004a). De manera similar, el complejo I fue purificado por cromatografía de afinidad en diferentes especies de plantas y el mismo fue resuelto en 30 subunidades distintas (Rasmusson y col., 1994). En este sentido, en *Arabidopsis* fueron recientemente identificadas por espectroscopía de masas 30 proteínas componentes de este complejo (Heazlewood y col., 2003a). El complejo V, por otra parte, puede ser resuelto en 10 a 15 subunidades diferentes mediante electroforesis.

Por el contrario, la composición de los complejos II y IV se encuentra menos definida en mitocondrias de plantas y todas las presunciones hechas hasta el momento están fuertemente basadas en estudios hechos en mitocondrias de levaduras y de bovinos (Capaldi y col., 1990). El complejo II ha sido caracterizado en bacterias, protozoos, hongos y animales; y en estos organismos está compuesto por cuatro subunidades: SDH1, una proteína hidrofóbica que une grupos FAD; SDH2, también hidrofóbica que une iones Fe-S; SDH3 y SDH4, dos proteínas hidrofóbicas pequeñas que unen grupos hemo. En mitocondrias de plantas, particularmente en *Arabidopsis*, han sido caracterizadas estas mismas cuatro subunidades (Figuroa y col., 2001; 2002). Sin embargo, mediante el uso de electroforesis en dos dimensiones (2D blue-native/SDS-PAGE) y de la técnica de espectrometría de masas se determinó que en *Arabidopsis* este complejo está formado por ocho subunidades (SDH1 hasta SHD8) (Eubel y col., 2003; Millar y col., 2004a). Todas las subunidades son de codificación nuclear, al igual que para el resto de los eucariotas, lo que constituye una excepción del resto de los complejos multienzimáticos que tienen componentes codificados en ambos genomas.

#### **4.1.2 Complejo IV: citocromo *c* oxidasa**

##### **4.1.2.1 Funciones del complejo citocromo *c* oxidasa:**

La enzima citocromo *c* oxidasa o complejo IV es el eslabón final en la cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial. Recibe electrones del citocromo *c* y los transfiere al oxígeno, aceptor electrónico final, que se reduce formando agua. Por cada par de electrones que se transporta a partir del complejo IV, se translocan dos protones desde la

matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, contribuyendo de esta manera a la síntesis de ATP en el complejo V (Lodish y col., 2002). La enzima citocromo oxidasa se presenta *in vivo* como un dímero, que en vegetales tiene alrededor de 160 kDa. Este dímero está unido en forma estable a la membrana interna mitocondrial y se presenta como un sistema transmembrana relacionado tanto con el citocromo *c* como con la matriz mitocondrial. El dímero citocromo oxidasa existe en dos conformaciones, una oxidada y una reducida. La transición entre estos dos estados fue asociada durante mucho tiempo a la formación de canales de protones (canales H) relacionados con el cambio conformacional de la enzima. La reducción del oxígeno a 2 moléculas de agua requiere de 4 electrones y 4 H<sup>+</sup>, y además se translocan 4 protones residuales que contribuyen a la síntesis de ATP en el complejo V (Mills y Ferguson-Miller, 2003).

#### 4.1.2.2 Subunidades que constituyen la citocromo *c* oxidasa:

Las subunidades que componen este complejo multienzimático están codificadas en ambos genomas, siendo las subunidades que constituyen el núcleo enzimático (Cox1, Cox2, y Cox3), casi siempre de codificación mitocondrial. Los componentes codificados en el genoma nuclear sólo están presentes en organismos eucariotas y se han encontrado isoformas en mamíferos, plantas y hongos. No se conocen las funciones de la mayoría de estas subunidades, pero en lo referente a la citocromo oxidasa de corazón de bovino, una de las más estudiadas, se han sugerido funciones estructurales y funcionales para algunas subunidades.

El complejo IV de bovinos está formado por 13 subunidades diferentes denominadas COXI, II, III, IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc y VIII. Esta nomenclatura refleja el descubrimiento sucesivo de estas subunidades utilizando geles de SDS-PAGE con capacidades de resolución crecientes. El "core" de este complejo está formado por las tres subunidades más grandes (COXI, COXII y COXIII), que son muy hidrofóbicas y están codificadas típicamente por el genoma mitocondrial. Las subunidades restantes (10 en total) se encuentran codificadas en el núcleo y tienen un peso molecular menor. La subunidad IV presenta un sitio de unión específica a ATP en su dominio citosólico. De la subunidad VIa existen dos isoformas (L y H) que se expresan constitutivamente o en presencia de altos niveles de ATP intramitocondrial, respectivamente. La subunidad VIb se localiza en la cara citosólica de la citocromo oxidasa y junto a las proteínas III, Vb y VIa provee un sitio de contacto al dímero enzimático. Esta

subunidad estaría involucrada en el efecto cooperativo entre los sitios de unión de los dos monómeros con el sustrato, en presencia de altas concentraciones de ATP. El dominio citosólico de la subunidad VIc participa como segunda molécula capaz de unir citocromo *c* y la subunidad VIIa es la única encontrada también en aparato de Golgi. No se han sugerido funciones específicas de las subunidades VIIa, VIIb, VIc y VIII de la citocromo oxidasa de bovinos (Kadenbach y col., 2000).

Por otra parte, en levaduras se identificaron 11 subunidades para la citocromo *c* oxidasa, 9 de las cuales presentan un alto grado de homología con las subunidades identificadas en bovinos, mientras que las dos subunidades restantes son más pequeñas y serían específicas de levaduras (ver tabla 4.1). Del total de subunidades identificadas, 8 estarían codificadas en el genoma nuclear (IV, Va, Vb, VIa, VIb, VII, VIIa y VIII) (Millar y col., 2004a). La subunidad V presenta dos isoformas 66% idénticas reguladas por oxígeno de un modo diferencial. Mientras la subunidad Va es inducida en presencia de oxígeno, los niveles de la subunidad Vb, por el contrario, se ven aumentados en condiciones de hipoxia. El efecto funcional de estas isoformas parece ser la modulación de la actividad de la holoenzima por modificación de las propiedades cinéticas. Esta actividad diferencial parece estar regulada no sólo por la presencia de O<sub>2</sub> sino por la concentración de los grupos hemo. Por otro lado, la subunidad VIa está codificada por el gen COX13 que posee una sola copia en el genoma nuclear. La proteína VIa madura contiene 120 aminoácidos, de los cuales por lo menos 41 son idénticos a los de la subunidad VIa de humanos y los primeros 9 aminoácidos del extremo N-terminal tienen características de péptido de tránsito. No parece participar del ensamblado de la enzima pero puede unir ATP y modular de esta forma la actividad enzimática (Taanman y Capaldi, 1993).

#### 4.1.2.2.1 Composición de la citocromo *c* oxidasa de plantas:

Los primeros estudios en mitocondrias de plantas fueron hechos en batata, en donde se observó, mediante electroforesis del complejo citocromo *c* oxidasa aislado previamente por cromatografía, la presencia de cinco bandas: 39 kDa (banda I), 33 kDa (banda II), 26 kDa (banda III), 20 kDa (banda IV) y 6 kDa (banda V) (Maeshima y Asahi, 1978). Las bandas I a III corresponden a las proteínas mitocondriales CoxI, CoxII y CoxIII, siendo la banda V posteriormente separada en las subunidades Va, Vb y Vc. Esta última subunidad Vc presenta

similitudes con la subunidad VIII de bovinos (Nakagawa y col., 1990). Posteriores purificaciones de complejos citocromo *c* oxidasa de arveja, maíz y trigo revelaron un patrón de bandas similar en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. En estos organismos, el complejo COX estaba conformado por las tres subunidades de codificación mitocondrial (Cox I, II y III), una subunidad en el rango de los 18 kDa, y proteínas adicionales que migraban por debajo de los 11 kDa, que no se podían resolver. En arroz se obtuvo la secuencia de un gen nuclear que codificaba para una proteína con características similares a la subunidad COXVb de bovinos (Kadowaki y col., 1996).

Con el empleo de geles nativos en dos dimensiones (2D-Blue-native SDS/PAGE) se obtuvieron notables avances en cuanto a la identificación de proteínas de bajo peso molecular, incapaces de ser resueltas hasta ese momento mediante electroforesis convencional. De esta manera se lograron separar entre 12 y 14 subunidades diferentes tanto en papa como en *Arabidopsis* (Eubel y col., 2003).

La nomenclatura para las distintas subunidades de la citocromo *c* oxidasa puede llegar a ser confusa o complicada, ya que como puede observarse en la tabla 4.1, subunidades similares reciben diferentes nombres, dependiendo del organismo del que fueron identificadas. En dicha tabla se comparan las distintas subunidades que constituyen el complejo IV en bovinos, levaduras y *Arabidopsis* (Extraído de Millar y col., 2004a).

**Tabla 4.1:** Subunidades de citocromo *c* oxidasa en bovinos, levaduras y Arabidopsis. (Extraído de Millar y col., 2004a).

| Bovinos        |         | Levaduras         |        | Arabidopsis                   |  |
|----------------|---------|-------------------|--------|-------------------------------|--|
| Cox I          | P00396  | Cox 1             | P00401 | Cox I                         | AtMg01360  |
| Cox II         | P00404  | Cox 2             | P00410 | Cox II                        | AtMg00160  |
| Cox III        | P00415  | Cox 3             | P00420 | Cox III                       | AtMg00730  |
| Cox IV         | P00423  | Cox 5A            | P00424 | -                             |  |
|                |         | Cox 5B            | P00425 | -                             |  |
| Cox Va         | P00426  | Cox 6             | P00427 | -                             |  |
| Cox Vb         | P00428  | Cox 4             | P04037 | COX 5b                        | At3g15640<br>At1g80230                           |
| Cox VIa        | P13182  | Cox 13            | P32799 | COX 6a                        | At4g37830  |
| Cox VIb        | P00429  | Cox 12            | Q01519 | COX 6b                        | At5g57815<br>At4g28060<br>At1g22450<br>At1g32710 |
| Cox VIc        | P04038  | -                 |        | COX 6c                        | At3g22210  |
| Cox VIIa       | P070470 | -                 |        | -                             |  |
| Cox VIIb       | P13183  | -                 |        | -                             |  |
| Cox VIIc       | P00430  | Cox 8             | P04039 | -                             |  |
| Cox VIII       | P10175  | -                 |        | COX 5c                        | At2g47380<br>At5g62400<br>At5g61310              |
| -              |         | Cox 7             | P10174 | -                             |  |
| -              |         | Cox 9             | P07255 | -                             |  |
| -              |         | -                 |        | COX X1                        | At5g27760<br>At3g05550                           |
| -              |         | -                 |        | COX X2                        | At4g00860<br>At1g01170                           |
| -              |         | -                 |        | COX X3                        | At1g72020  |
| -              |         | -                 |        | COX X4                        | At4g21105  |
| -              |         | -                 |        | COX X5                        | At3g43410  |
| -              |         | -                 |        | COX X6                        | At2g16460  |
| 13 subunidades |         | 11-12 subunidades |        | 8 subunidades + 6 subunidades |  |

En cada columna se especifican los nombres de las proteínas y su designación con el número de acceso correspondiente (<http://www.expasy.org/sprot/>.) Las subunidades de Arabidopsis fueron identificadas por espectroscopia de masas o mediante la búsqueda en las bases de datos de proteínas de Arabidopsis.

Algunas de estas subunidades identificadas recientemente como componentes específicos del complejo IV de Arabidopsis han sido caracterizadas previamente por otros autores. Por ejemplo, la subunidad COX X2 (At4g00860) ha sido identificada como la proteína AtOZ11, durante el estudio de genes inducibles por ozono o por patógenos (Sharma y Davis, 1995). En arroz, fue predicha una proteína de secuencia similar (Genbank AAF69008) a esta proteína de respuesta a estrés, que demostró acumularse en respuesta a especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, se observó que la componente proteica COX X1 (At5g27760) pertenece

a la familia de proteínas llamadas “proteínas de respuesta a hipoxia”, encontradas ampliamente entre los organismos eucariotas y aún en algunas eubacterias.

#### 4.1.2.3 Subunidad Vb (COX5b) de Arabidopsis:

La subunidad COX5b de plantas fue identificada por primera vez mediante homología de secuencia en arroz (Kadowaki y col., 1996). Estudios posteriores de expresión permitieron evidenciar que, en arroz, COX5b se expresa en todos los órganos y se regula en forma diferente a la subunidad mitocondrial Cox1 (Hamanaka y col., 1999). En *Arabidopsis thaliana* existen dos genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa, *cox5b-1* (At3g15640), presente en el cromosoma 3, y *cox5b-2* (At1g80230), ubicado en el cromosoma 1. El análisis de la expresión de estos genes en Arabidopsis que se detalla en el capítulo I permitió determinar que ambas isoformas de *cox5b* se expresan en todos los órganos analizados y se regulan por azúcares metabolizables y sales de amonio (Welchen y col., 2002). Además, en semillas de Arabidopsis, se observó que los niveles basales de ARNm de *cox5b* aumentaban con el progreso de la germinación y en relación directa con el aumento de la capacidad de la vía citocromo *c* dependiente (Saish y col., 2001).

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 se procedió al estudio de la región promotora del gen *cox5b-1*, uno de los dos genes codificantes para la subunidad 5b (COX5b) en *Arabidopsis thaliana*. Con este propósito, se transformaron plantas de Arabidopsis con deleciones sucesivas de la región promotora, fusionadas al gen reportero *gus*. Estas plantas transformantes fueron analizadas por técnicas fluorométricas e histoquímicas, determinándose los niveles de actividad enzimática en distintos tejidos y condiciones de cultivo a las que fueron sometidas las transformantes, así como la expresión específica de tejido. Los resultados obtenidos indican la existencia de una región del promotor, localizada entre las posiciones -387 y -193 con respecto al sitio de inicio de la traducción, que sería esencial para la actividad transcripcional del gen *cox5b-1*. Esta región contendría además los elementos regulatorios involucrados en la regulación de la expresión



específica de tejido y en la inducción de la expresión ejercida sobre este gen por hidratos de carbono y hormonas como las citoquininas. Además, se observó la existencia de posibles elementos regulatorios negativos que actuarían preferentemente en hojas, entre los nucleótidos -609 y -387.

## 4.2 Resultados:

### 4.2.1 Determinación de los patrones de expresión específicos de tejidos:

Con el objetivo de aislar la región promotora del gen *cox5b-1* se procedió a la búsqueda de un clon genómico, utilizando una biblioteca genómica de *Arabidopsis* construida en el vector  $\lambda$ ZIP. Para la identificación y el aislamiento del clon de interés se utilizó una sonda de EST (234B12T7) (ver los puntos 2.2.2.1 y 2.2.3.3 de materiales y métodos). Como resultado se obtuvo un clon genómico que comprendía una región de 2002 nucleótidos corriente arriba del codón de iniciación de la traducción, que fue clonado en el vector pBluescript SK<sup>+</sup>.

A fin de caracterizar los patrones de expresión conferidos por el promotor del gen *cox5b-1*, este fragmento de 2 kbp fue subclonado en el vector binario pBI101.3, fusionado a la región codificante del gen reportero *gus*. Este clon fue utilizado para obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis* mediante el método de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. Las plantas transformantes fueron seleccionadas por la capacidad de las mismas de crecer en presencia del antibiótico kanamicina. Además, se efectuaron reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos específicos del gen *gus* y del promotor en estudio (ver materiales y métodos 2.11.2 y 2.5.3).

#### 4.2.1.1 Análisis de la expresión del gen reportero *gus* mediante histoquímica:

Para el análisis de la expresión en distintos tejidos del gen reportero *gus* bajo el promotor en estudio, se efectuó un seguimiento de los patrones de expresión de 10 líneas transgénicas independientes. Utilizando el sustrato X-gluc se realizó un seguimiento de la

expresión GUS en distintos estadios de desarrollo. Luego de la incubación de las plantas con el sustrato de la reacción durante un período de tiempo que varió entre 3 h y toda la noche, según los niveles de expresión, las plantas fueron observadas al microscopio óptico para la visualización de la expresión GUS.

Tal como se muestra en la figura 16A, pudo observarse que en estadios tempranos de desarrollo de las plantas de *Arabidopsis* (aproximadamente 2 días post-germinación), la actividad GUS se detectaba principalmente en cotiledones y en la región del meristema de la raíz. A medida que el desarrollo de la plántula avanzaba, la tinción se localizaba progresivamente en la región del cilindro vascular de raíces e hipocotilo y en el tejido vascular de los cotiledones (16B, C). En plántulas de 5 días, la expresión seguía manteniéndose en el meristema de la raíz y comenzaba a observarse tinción en la región del meristema apical del vástago (16C, D), pero no en el primordio de las hojas (16D, E). También pudo observarse que la expresión GUS estaba relacionada con el estadio de desarrollo de este tejido fotosintético. De esta manera, la tinción no fue detectable en hojas jóvenes (16E), y sólo comenzaba a ser observable cuando las mismas alcanzaban cierto grado de madurez. En hojas adultas la expresión GUS se localizaba en el tejido vascular, principalmente en la zona de la vena central de las hojas (16F-H). En plantas adultas, la expresión fue detectada preferentemente en el tejido vascular: venas de hojas (16I), cilindro vascular de raíces primarias y secundarias (16J, L), y en anteras o más específicamente en granos de polen (16K). La expresión del gen reportero resultó evidente también a nivel de la región meristemática de la raíz (16N), en el pedicelo a nivel de la unión con las vainas (16M, O) y en la región del funículo (16O).

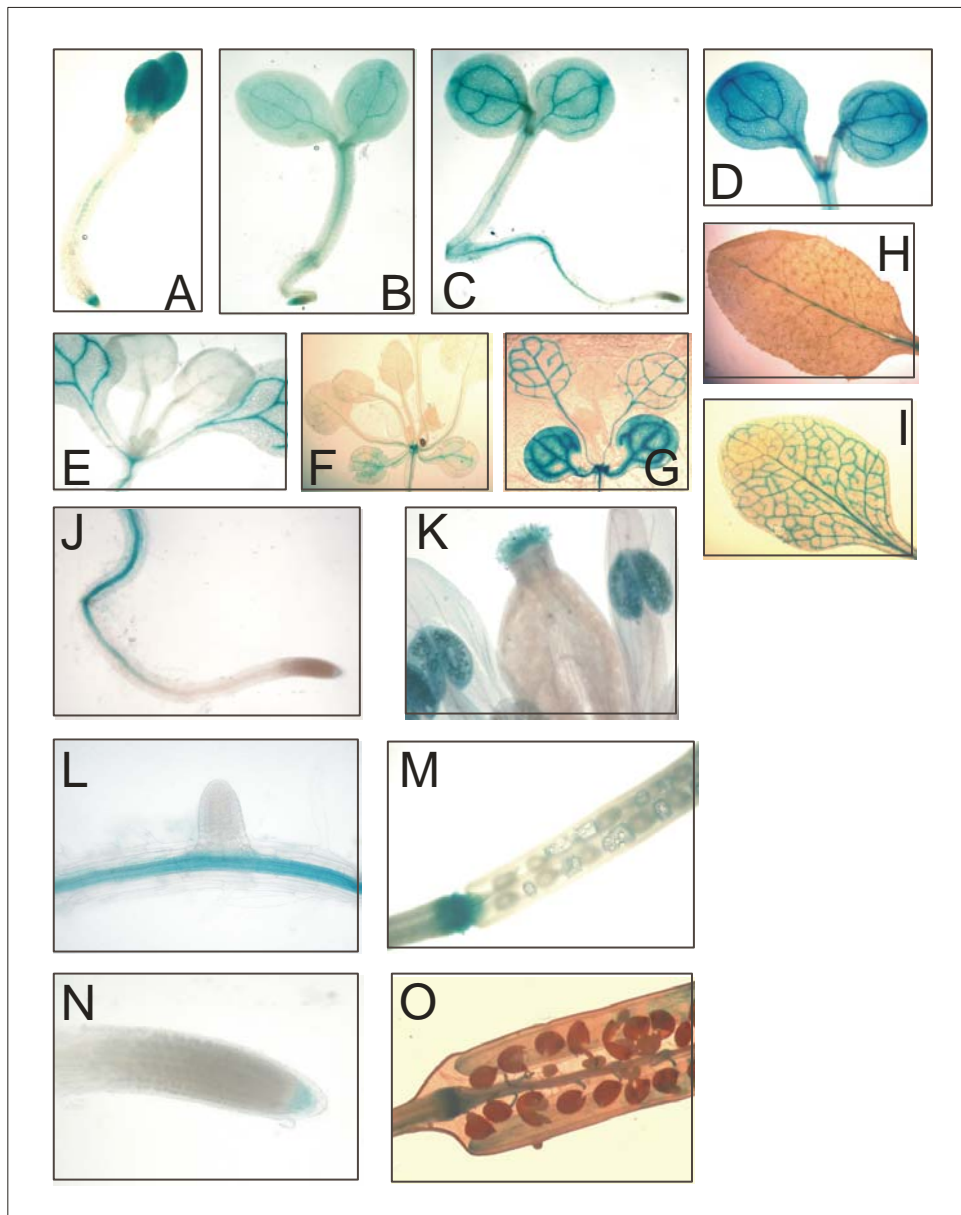


Figura 16: Localización histoquímica de actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con un fragmento de 2 kbp del promotor *cox5b-1* fusionado al gen reportero *gus*. (A-D) plántulas de 2, 3, 5 y 6 días. (E-G) plantas de 10 y 15 días. (H, I) hojas de plantas maduras. (J, L, N) raíces primarias de plantas maduras. (K) flores maduras. (M, O) Vainas en desarrollo y maduras respectivamente.

Los patrones de expresión GUS observados por tinción histoquímica sugieren que en los primeros estadios de desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis*, el promotor del gen *cox5b-1* dirigiría la expresión principalmente en los tejidos en proliferación. Podría especularse con la existencia de una estrecha relación entre la alta tasa de división celular de estos tejidos y la gran demanda metabólica que estos procesos de crecimiento y diferenciación requieren. Progresivamente con el desarrollo de las plantas, esta expresión comienza a hacerse fuertemente detectable a lo largo de todo el tejido vascular de las mismas.

#### 4.2.1.2 Análisis de la expresión del gen reportero *gus* por fluorometría:

Mediante la medición de la actividad enzimática GUS por fluorometría, fue posible cuantificar los niveles de expresión del gen reportero en extractos proteicos totales preparados de distintos órganos de las plantas transgénicas de 4 semanas. De esta manera, se vio que la actividad GUS, relacionada con la cantidad de proteínas totales del extracto, fue significativamente más alta en raíces ( $1520 \pm 270$  pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) que en el resto de los órganos en los que se midieron los niveles de actividad  $\beta$ -glucuronidasa (hojas, tallos, flores y vainas). Los valores de actividad enzimática en extractos proteicos de hojas adultas resultaron ser intermedios ( $450 \pm 120$  pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>). Estos ensayos fueron realizados con 5 líneas transgénicas independientes y los resultados fueron coincidentes en todas las repeticiones realizadas. Además, los resultados cuantitativos de actividad GUS fueron coincidentes con los datos obtenidos de la observación microscópica de distintos órganos de plantas analizadas por tinción histoquímica (punto 4.2.1.1).

#### 4.2.2 El promotor del gen *cox5b-1* es inducido por hidratos de carbono y hormonas:

##### 4.2.2.1 Inducción por sacarosa:

Resultados previos que se detallan en el capítulo I permitieron postular que los niveles de transcripto para el gen *cox5b-1* (entre otros) se regulaban por la presencia de hidratos de carbono metabolizables. A fin de dilucidar si esta regulación ocurría a un nivel transcripcional, plantas de *Arabidopsis* transformantes fueron crecidas en placas de Petri conteniendo medio MS

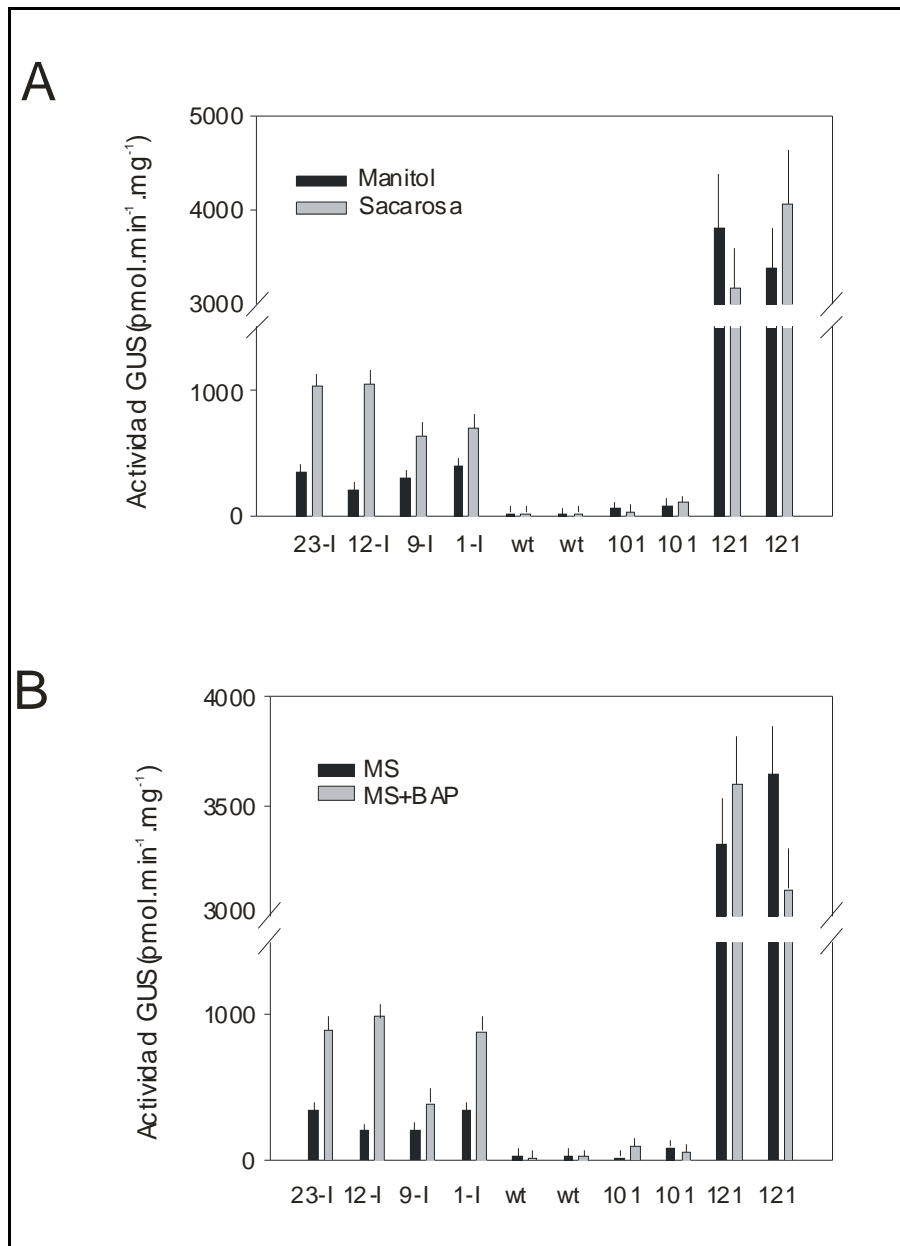
suplementado con manitol 3% (P/V), como control del efecto de la presión osmótica en la expresión del gen *gus*, o con sacarosa en una concentración final de 3% (P/V). Las plantas fueron cultivadas en estos medios de prueba durante 7 días, manteniendo las condiciones de oscuridad para reducir el aporte de los compuestos carbonados provenientes de la reacción de fotosíntesis. Además, se utilizaron como control plantas salvajes y transformantes de *Arabidopsis* con los vectores binarios pBI101.3 (control -) y pBI121 (control +).

Como puede observarse en la figura 17A, los valores de actividad GUS presentes en extractos proteicos preparados a partir de plántulas crecidas en presencia de sacarosa al 3% (P/V) fueron entre 2 y 3 veces superiores a los obtenidos con las plantas controles crecidas en manitol. Este resultado sugeriría que el efecto inductor de los azúcares metabolizables podría estar actuando a nivel transcripcional.

#### 4.2.2.2 Inducción por BAP:

Mediante análisis previos de la expresión de *cox5b-1* por ensayos de northern blot, se estableció que los niveles de transcripto de este gen aumentaban cuando las plantas eran tratadas con citoquininas como la 6-benzilaminopurina (BAP). De acuerdo con esto, se midieron los niveles de actividad GUS de las plantas transformantes de *Arabidopsis*, luego de crecerlas en presencia de BAP 50  $\mu$ M. Tanto las condiciones de crecimiento, como el período de incubación y los controles usados fueron similares a los descritos en el punto anterior, al analizar el efecto regulatorio de la sacarosa.

Como se muestra en la figura 17B, este tratamiento produjo un aumento significativo en los niveles de actividad enzimática, con respecto a los valores obtenidos con las plantas controles incubadas en medio MS. Este comportamiento se vio en distintas líneas independientes y se mantuvo en las sucesivas repeticiones. A su vez, estos niveles de inducción parecen ser levemente mayores a los observados con hidratos de carbono metabolizables como la sacarosa.



**Figura 17: Inducción del gen *cox5b-1* por sacarosa (A) y citoquininas (B).** La actividad GUS fue medida usando el sustrato fluorogénico MUG y extractos de proteínas totales preparado con plántulas de 7 días. Las plantas fueron crecidas en medio MS sólo o suplementado con (A) manitol 3%(P/V) o sacarosa 3%(P/V); (B) BAP 50  $\mu$ M. Las plantas usadas para este ensayo fueron 4 líneas independientes transformadas con una construcción conteniendo un fragmento de 2 kpb de la región promotora del gen *cox5b-1* fusionada al gen reportero *gus* (23-I, 12-I, 9-I, 1-I). Se utilizaron como controles plantas salvajes (wt) y 2 líneas de plantas transformadas con el vector utilizado para clonar los fragmentos del promotor como control negativo (pBI101.3), y con el gen *gus* fusionado al promotor 35SCaMV (pBI121). Las barras indican el valor promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes realizados.

El efecto combinado de la sacarosa y la BAP también fue analizado. Los resultados obtenidos (no mostrados) sugerirían que ambos compuestos ejercerían su efecto inductor a nivel de la transcripción de *cox5b-1*, a través de componentes o elementos regulatorios comunes. Esto es así ya que los valores de actividad GUS medidos por fluorimetría en extractos de plantas tratadas con ambos compuestos resultaron similares a los niveles obtenidos con plantas crecidas en presencia de BAP.

#### 4.2.3 Estudio de regiones acotadas del promotor *cox5b-1*:

Con el objetivo de definir la región mínima responsable de dirigir la expresión de manera específica en los tejidos observados, e identificar los elementos involucrados en las respuestas a carbohidratos y hormonas, se realizaron una serie de deleciones sucesivas de la región promotora *cox5b-1*. A partir del fragmento de 2 kpb utilizado para el análisis descrito en los puntos anteriores, se obtuvieron diferentes fragmentos acotados mediante reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos. Estos fragmentos fueron clonados en el vector binario pBI101.3 y las diferentes construcciones se introdujeron en plantas de *Arabidopsis* mediante transformación con *Agrobacterium*. En la figura 18 se esquematizan las construcciones generadas para el análisis preliminar del promotor *cox5b-1*.

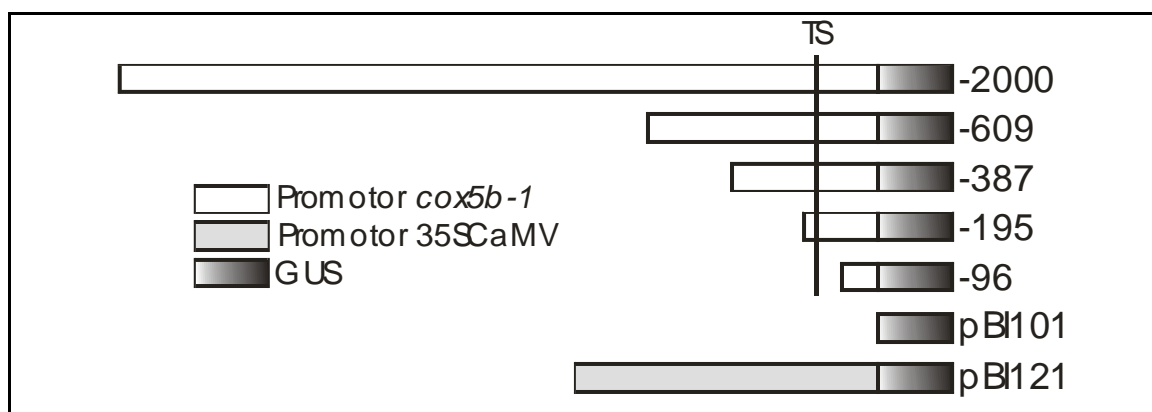


Figura 18: Construcciones generadas para el análisis de la región promotora del gen *cox5b-1*. Los números indican la posición del nucleótido superior del fragmento del promotor usado, con respecto al codón de iniciación de la traducción. TS indica el sitio putativo de inicio de la transcripción. Además, se utilizaron plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (pBI101.3) o con el gen reportero *gus* bajo el control del promotor 35SCaMV (pBI121).

#### 4.2.3.1 Análisis de la actividad GUS en plantas transformadas con las diferentes deleciones generadas:

Con las plantas transformantes de *Arabidopsis* se realizó, en primer lugar, una medida de la actividad enzimática GUS en extractos proteicos totales preparados a partir de tejido aéreo de plantas de 3 semanas. Los valores de actividad GUS obtenidos por la técnica fluorométrica se muestran en la figura 19. Pudo observarse que los elementos presentes en la región comprendida entre las posiciones -387 y -195 con respecto al codón de iniciación serían indispensables para la transcripción de *cox5b-1*. Esto se debe a que en las plantas transformadas con la construcción que lleva el fragmento proximal de 195 bp fusionado al gen *gus* no fue posible detectar actividad  $\beta$ -glucuronidasa ni por visualización directa mediante la técnica histoquímica ni por fluorimetría. Un resultado similar se obtuvo al analizar plantas transformadas con la construcción que contiene un fragmento del promotor hasta la posición -96 con respecto al codón de iniciación de la traducción.



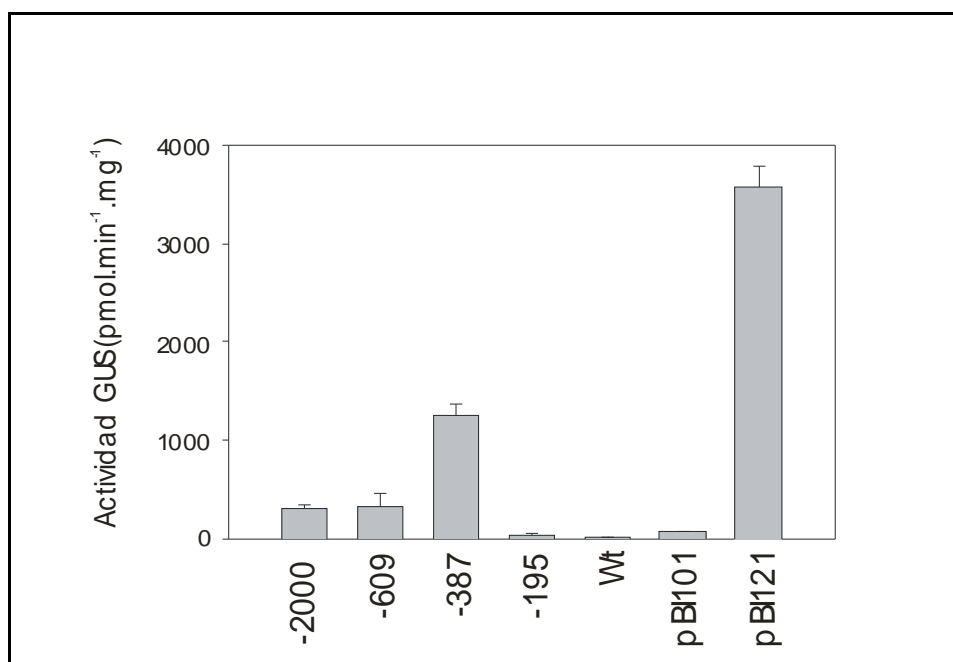


Figura 19: Niveles de expresión GUS en plantas transformadas con las distintas construcciones del promotor *cox5b-1*. La actividad específica GUS fue determinada usando extractos de proteínas totales preparados con plantas transformadas con las distintas construcciones obtenidas a partir de deleciones sucesivas del promotor *cox5b-1* esquematizadas en la figura 18. Los resultados están representados como el promedio de los valores obtenidos en tres experimentos diferentes, utilizando cinco líneas transformantes independientes. Los números ubicados debajo de cada barra indican las respectivas construcciones. La actividad GUS también fue medida en plantas salvajes (wt) utilizadas como control.

Por otra parte, es destacable que las plantas transformadas con la construcción -387 mostraron valores de actividad GUS considerablemente superiores a los observados en plantas que llevan construcciones con fragmentos del promotor más grandes. Esto podría sugerir la existencia de elementos reguladores con actividad negativa que estarían localizados corriente arriba de la posición -387 en el promotor *cox5b-1*.

#### 4.2.4 El promotor *cox5b-1* contiene elementos regulatorios positivos y negativos:

Utilizando las plantas de *Arabidopsis* transformadas con las sucesivas deleciones del promotor *cox5b-1* se realizó un análisis exhaustivo de la expresión GUS en los distintos órganos, tanto por histoquímica como por fluorimetría. Los ensayos se efectuaron con 5 líneas

transgénicas independientes para cada construcción y los mismos fueron repetidos un mínimo de tres veces, siendo los resultados coincidentes en todos los casos.

Al analizar los valores de actividad enzimática en los distintos órganos (figura 20A) pudo observarse que la construcción -387 presentaba valores de actividad GUS en hojas muy superiores a los obtenidos en el resto de las construcciones. Contrariamente, las plantas transformadas con las construcciones -2000 y -609 mostraron valores de actividad enzimática mayores en raíces que en hojas, invirtiéndose la relación observada con la delección -387, tal como se observa en la figura 20B. Este resultado sugeriría que el efecto represor sobre la expresión GUS actuaría regulando en forma negativa la expresión del gen, específicamente a nivel de las hojas. Además, podría especularse acerca de la existencia de un elemento regulador positivo ubicado más arriba de la posición -609. Esta hipótesis se fundamenta sobre la base de que las plantas transformadas con la construcción -2000 presentaron valores de actividad GUS superiores en todos los órganos en los que fue medida a los de la construcción -609 (figura 20A).

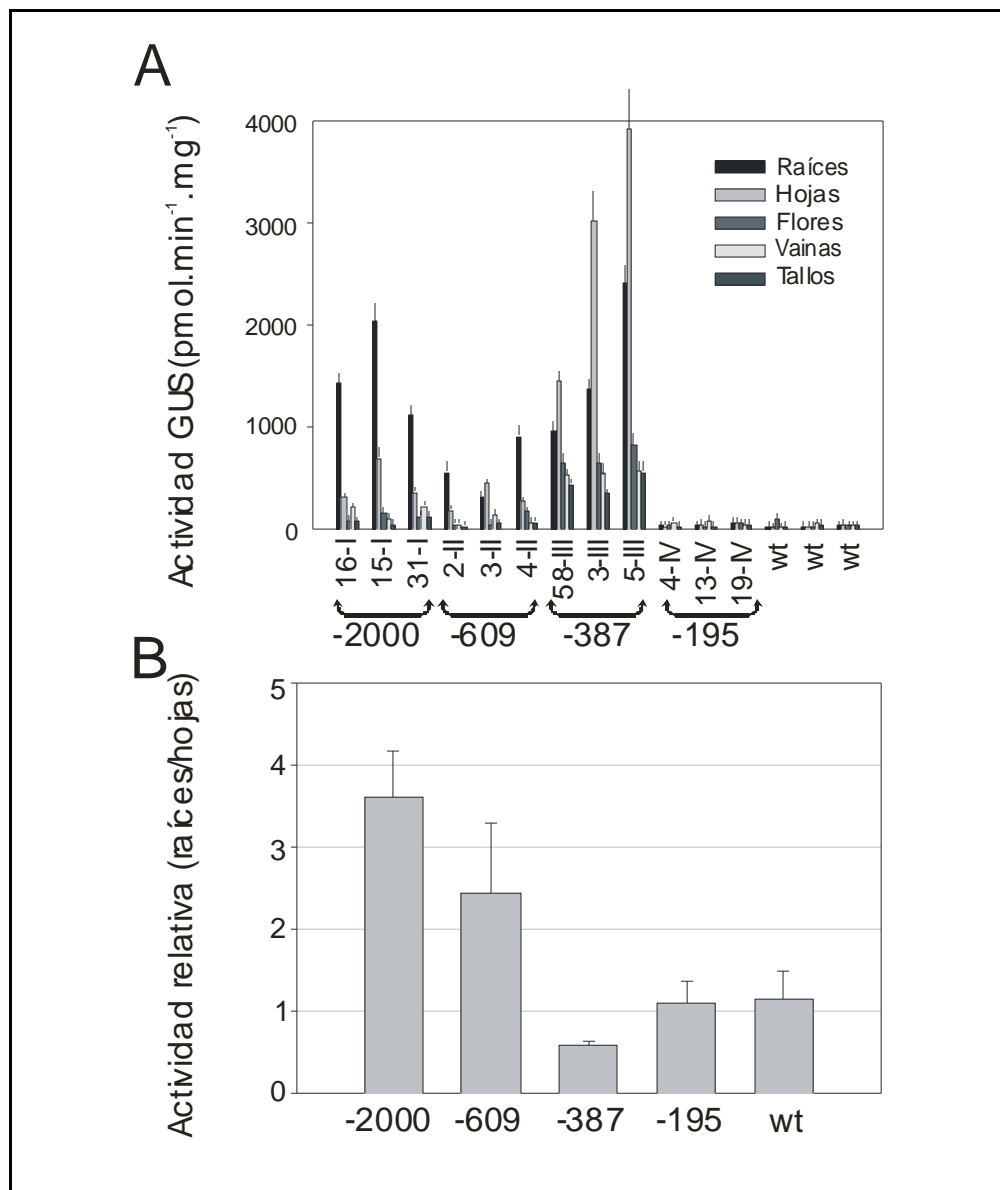


Figura 20: Análisis de la actividad GUS en extractos proteicos de diferentes órganos de plantas transformadas con las distintas construcciones del promotor *cox5b-1*. (A) Actividad específica GUS medida en extractos de proteínas totales preparados con diferentes órganos de plantas adultas transformadas con las diferentes delecciones del promotor. Las plantas utilizadas fueron 12 líneas independientes de plantas transformadas con la construcción que abarca la región de 2 kpb del promotor *cox5b-1* fusionado al gen *gus* (16-I, 15-I, 31-I), o las formas truncadas hasta la posición -609 (2-II, 3-II, 4-II), -387 (58-III, 3-III, 5-III), o -195 (4-IV, 13-IV, 9-IV). La actividad fue medida también en extractos proteicos de plantas salvajes (wt). (B) Actividad enzimática relativa de raíces con respecto a hojas. Los experimentos fueron repetidos tres veces siendo los resultados coincidentes en todos los casos (las barras representan el promedio y la desviación estándar de todas las repeticiones realizadas).

El análisis mediante histoquímica de las plantas transformadas con las sucesivas deleciones del promotor *cox5b-1* arrojó resultados coincidentes con los obtenidos por fluorometría. Las plantas transformadas con la construcción -387 mostraron una muy fuerte expresión en el tejido vascular de hojas, que pudo detectarse en períodos de incubación más cortos, en comparación con los tiempos de incubación normales para el resto de las construcciones. A nivel de las raíces, la expresión se observó en la región meristemática de plantas jóvenes y un desarrollo posterior en la región del cilindro vascular en plantas adultas. Al igual que lo observado por fluorometría, la expresión GUS en las plantas transformadas con la construcción -609 fue muy baja en todos los órganos estudiados, principalmente en hojas, en las que sólo se observó una débil expresión en la vena central de hojas maduras.

#### 4.2.5: Análisis de la regulación por azúcares y hormonas:

Para identificar los elementos responsables de la regulación por azúcares metabolizables y hormonas, se procedió a analizar los niveles de actividad  $\beta$ -glucuronidasa en plantas de *Arabidopsis* transformadas con las distintas deleciones del promotor *cox5b-1*. De esta manera, las transformantes fueron crecidas en el medio de cultivo MS suplementado con manitol 3% (P/V), sacarosa 3% (P/V) o BAP 50  $\mu$ M, según se detalla en materiales y métodos. Al medir la actividad GUS en extractos de proteínas totales de plántulas de 14 días crecidas en las distintas condiciones, se vio que las transformantes que mostraron previamente actividad GUS tanto por fluorometría como por histoquímica, también presentaron inducción por azúcares y hormonas. Además, el incremento relativo de actividad GUS obtenido con las construcciones -609 y -387 fue similar al observado previamente, al analizar el fragmento más grande de 2 kpb (fig. 21).

De la observación de la figura 21, puede concluirse que los elementos implicados en la inducción debida a la presencia de azúcares metabolizables o citoquininas se localizarían en la región requerida para la expresión basal del gen, comprendida entre las posiciones -387 y -195. Por otra parte, no puede excluirse la presencia de otros elementos necesarios, pero no suficientes, para la expresión en la región promotora que abarca hasta la posición -195.

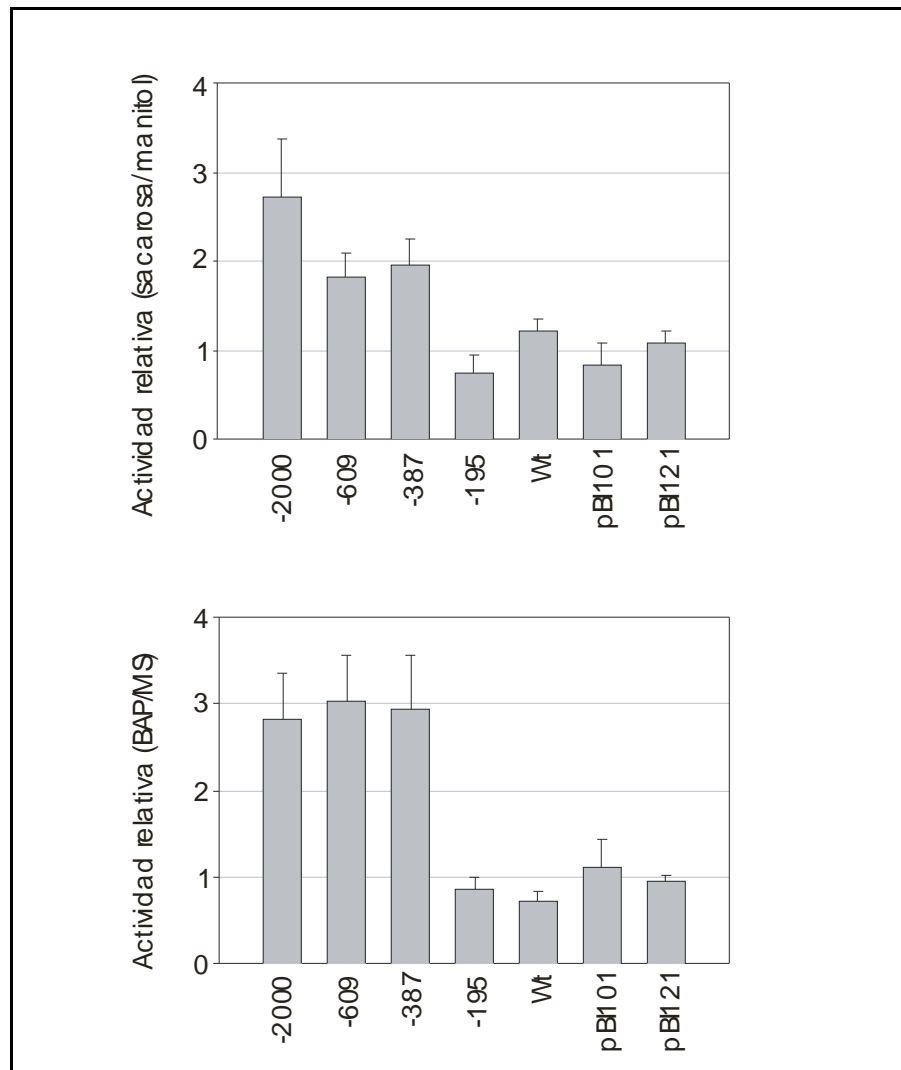


Figura 21: Aumento de la actividad GUS por sacarosa y BAP en plantas transformadas con deleciones del promotor *cox5b-1* fusionadas al gen reportero *gus*. La actividad específica GUS fue determinada utilizando extractos de proteínas totales de plántulas de *Arabidopsis* transformadas con las distintas deleciones del promotor *cox5b-1* fusionadas al gen reportero *gus*, crecidas en medio MS sólo o suplementado con manitol 3% (P/V), sacarosa 3% (P/V) o la citoquinina 6-benzilaminopurina (BAP) 50  $\mu$ M. Fueron analizadas cinco líneas independientes para cada construcción, en tres experimentos diferentes. Los números debajo de las barras (-2000, -609, -387, -195) indican el extremo superior del fragmento utilizado para generar la construcción, con respecto al sitio de inicio de la traducción. La actividad GUS también fue medida en extractos de plantas salvajes (wt) y de plantas transformadas con el vector utilizado para generar las diferentes construcciones (pBI101) o con el vector que posee el gen *gus* bajo el control del promotor 35SCaMV (pBI121). Las barras indican la actividad relativa promedio de las líneas analizadas en los tratamientos con sacarosa versus manitol y BAP respecto de plantas crecidas sólo en medio MS.

### 4.3 Análisis de los elementos regulatorios presentes en el promotor *cox5b-1*:

El control de la expresión de los genes es un proceso celular central. La regulación de la expresión de genes a nivel transcripcional se realiza mediante el control de la síntesis de los ARN mensajeros, mediante la acción de factores de transcripción específicos que actúan sobre el complejo de iniciación de la transcripción dirigido por la ARN polimerasa II. Los factores de transcripción generalmente funcionan estableciendo redes complejas, en las que una proteína regulatoria controla la expresión de otras, las que a su vez pueden actuar modulando la expresión de otros genes regulatorios o de proteínas estructurales o con actividad enzimática (Davuluri y col., 2003; <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu>). Los motivos o elementos reguladores en *cis* que interactúan con los factores de transcripción constituyen secuencias de ADN regulatorias, con un tamaño aproximado de entre 5 a 20 nucleótidos (Singh, KB., 1998). El establecimiento de la arquitectura de cada uno de los promotores, así como de los circuitos regulatorios controlados por cada factor de transcripción en particular, son requisitos fundamentales para la comprensión de los mecanismos reguladores de la expresión de genes en plantas.

Los datos experimentales descritos en este capítulo permitieron acotar grandes regiones dentro del promotor *cox5b-1* conteniendo posibles elementos reguladores de la transcripción, tanto positivos como negativos. En este sentido se determinó que las secuencias contenidas dentro de las posiciones -387 y -195 serían las requeridas para la expresión en todos los órganos. Debido a que el sitio de inicio de la transcripción putativo estaría ubicado en la posición -163 con respecto al codón ATG inicial, 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 las posiciones -387 y -609). Con el objetivo de identificar motivos probablemente relacionados con los patrones de expresión observados se realizó una búsqueda en la base de datos PLACE (Plant Cis-acting Elements) (Higo y col., 1999). Esta base de datos (<http://dna.affrc.go.jp/PLACE>) contiene información referente a los elementos regulatorios identificados en plantas vasculares y la información de la función previamente descrita para cada uno.

En primer lugar se realizó el análisis de la región comprendida entre las posiciones -387 y -1 con respecto al sitio de inicio de la traducción. Los resultados mostraron que el promotor

*cox5b-1* carece de cajas TATA regulatorias cercanas al sitio de inicio de la transcripción. Esto es frecuente en genes nucleares codificantes para subunidades COX en mamíferos (Grossman y Lomax, 1997). Además, se identificaron 10 motivos relacionados previamente con la expresión específica de genes en polen (Bate y Twell, 1998; Rogers y col., 2001), y un motivo AGGTCA (*Q-element*) también relacionado con la expresión en polen (Hamilton y col., 1998). Otros motivos identificados en esta región del promotor fueron dos elementos ACGT, ubicados entre las posiciones -200 y -230. El primero de ellos forma parte de una secuencia idéntica al elemento *G-box* (CACGTG), descrito previamente por Menkens y colaboradores como un motivo involucrado en la interacción con factores de transcripción de la familia b-ZIP (Menkens y col., 1995). También se observó que la secuencia ACGTGTC, que rodea al motivo *G-box*, constituye la secuencia consenso para el motivo *ABRE* encontrado en genes regulados por el ácido abscísico (Hattori y col., 2002). Por otra parte, el segundo de los motivos ACGT identificados forma parte de la secuencia regulatoria GTACGTG. Esta secuencia fue previamente relacionada con la regulación de la expresión del gen *glub-1*, codificante para la glutelina, una proteína del endosperma en arroz (Washida y col., 1999).

#### 4.4 Discusión:

En este capítulo se describe el estudio de la región promotora del gen *cox5b-1*, uno de los dos genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa de *Arabidopsis thaliana*. En base a resultados previos que se detallan en el capítulo I, y que proponían la existencia de mecanismos de regulación coordinados para los genes codificantes para la subunidad 5b, se planteó analizar la región promotora de uno de estos genes a fin de dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la expresión específica en órganos y las respuestas a hormonas y azúcares.

Aunque se trata de un análisis preliminar, pudo establecerse que el promotor del gen *cox5b-1* dirige una fuerte expresión del gen *gus* en anteras y granos de polen. Además, se observan distintos niveles de expresión en el tejido vegetativo, fundamentalmente en hojas y raíces.

El tratamiento con citoquininas como la BAP produjo un aumento de los niveles de transcripto del gen *cox5b-1* observados mediante experimentos de northern blot (no mostrado), y una fuerte inducción de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en las plantas de *Arabidopsis* transformadas con las distintas delecciones del promotor fusionadas al gen *gus*. Debido a que las citoquininas son hormonas responsables de la proliferación celular en plantas (D'Agostino y Kieber, 1999), es lógico asumir que la expresión de genes implicados en el metabolismo mitocondrial va a ser aumentada debido a las mayores demandas energéticas como consecuencia de una activa proliferación celular. En este sentido es importante destacar que los patrones de expresión observados por tinción histoquímica indicarían que en los primeros estadios de desarrollo, *cox5b-1* se expresaría fundamentalmente en tejidos de amplia proliferación celular. Los patrones de expresión específicos de tejido para *cox5b-1* serían consecuencia de una respuesta a factores reguladores específicos de cada tipo celular o a cambios metabólicos asociados con la proliferación celular.

Por otra parte, el efecto inductor observado por el tratamiento de las transformantes con azúcares metabolizables podría ser una consecuencia del mismo tipo de respuesta. El hecho de que la misma región dentro del promotor determine los patrones de expresión en los distintos tejidos y la respuesta a azúcares y hormonas, sugeriría la existencia de mecanismos de regulación conjuntos, actuando por las mismas vías.



Se ha demostrado que las secuencias localizadas entre las posiciones -387 y -195 serían las requeridas para la expresión en todos los órganos en los que la misma fue analizada (anteras, granos de polen, meristema y tejido vascular de raíces, meristema apical y haces vasculares de hojas maduras). Los elementos presentes por debajo de la posición -195 podrían ser necesarios para dirigir una expresión completa conjuntamente con otros elementos localizados corriente arriba, pero no existiría dentro de este fragmento ningún motivo capaz de dirigir por sí solo la expresión del gen *gus*. Por otra parte, corriente arriba de la región promotora (entre las posiciones -609 y -387) existirían posibles elementos reguladores negativos que ejercerían una represión parcial de la expresión GUS fundamentalmente en hojas.

Al analizar las regiones promotoras de otros genes nucleares de *Arabidopsis* codificantes para subunidades de la citocromo *c* oxidasa, es importante destacar la existencia de posibles elementos reguladores de la transcripción que serían comunes a muchos de ellos (ver tabla 4.2).

**Tabla 4.2: Elementos regulatorios encontrados en la región promotora del gen *cox5b-1* y de otros genes *cox*.** Para identificar los elementos regulatorios en cis reportados en la bibliografía, se tomó una región que abarcó 1 kpb corriente arriba desde el sitio de inicio de la traducción de los genes *cox5b-1*, *cox6a* y *cox6b*. Se incluyen sólo los elementos con una complejidad de seis nucleótidos o más.

| .Motivo    | Localización en <i>cox5b-1</i> | Localización en otros genes <i>cox</i>   | Nombre y función  | Referencia               |
|------------|--------------------------------|--|---|--------------------------|
| ACGTGKC    | - 223                          | <i>cox5b-2</i> - 628<br><i>cox6b-2</i> - 402<br><i>cox6b-4</i> - 88; - 109                                 | ABRE, involucrado en la respuesta al ABA.                             | Hattori y col., 2002     |
| CACGTG     | - 223                          | <i>cox5b-2</i> - 628<br><i>cox6b-4</i> - 111   | G-box, relacionado con la regulación transcripcional en varios genes. | Menkens y col., 1995     |
| CAANNNNATC | - 34; - 467                    | <i>cox5b-2</i> - 315<br><i>cox6b-1</i> - 264; - 579<br><i>cox6b-2</i> - 979<br><i>cox6b-3</i> - 102; - 777 | Relacionado con la expresión circadiana del gen <i>lhc</i> en tomate. | Piechulla y col., 1998   |
| TGAGTCA    | - 11                           | <i>cox5b-2</i> - 500<br><i>cox6b-3</i> - 394   | GCN4, relacionado con la expresión de genes en el endosperma.         | Washida y col., 1999     |
| AGGTCA     | - 56                           | <i>cox5b-2</i> - 711<br><i>cox6a</i> - 394<br><i>cox6b-2</i> - 260   | Q- element, involucrado con la expresión en polen.                    | Hamilton y col., 1998    |
| GGTTAA     | - 191                          | <i>cox6b-3</i> - 15; - 71;<br>- 153; - 168   | GT1, relacionado con la regulación transcripcional de varios genes.   | Villain y col., 1993     |
| TAACTG     | - 361                          | <i>cox6a</i> - 632<br><i>cox6b-3</i> - 173   | At-Myb2 binding site, implicado en las respuestas por estrés hídrico. | Urao y col., 1993        |
| AACCAA     | - 474; - 401                   | <i>cox6b-1</i> - 333; -478<br><i>cox6b-3</i> - 99; - 922<br><i>cox6b-4</i> - 23; - 708; - 937              | REalpha, involucrado en la regulación por fitocromos.                 | Degenhardt y Tobin, 1996 |

La biogénesis y el mantenimiento de las funciones mitocondriales normales requieren de la expresión coordinada y del ensamblaje correcto de proteínas codificadas en dos genomas distintos, nuclear y mitocondrial. Esto se debe a que el genoma organelar codifica sólo 33 de las más de 1000 proteínas que componen los complejos multienzimáticos encargados del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, entre otras funciones mitocondriales (Unsel y col., 1997). Deben 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 los estímulos impuestos por el ambiente. Aún permanecen sin dilucidar las señales que gobiernan estos procesos, pero existen estudios previos que indicarían la existencia de una regulación coordinada en 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; 1998; Figueroa y col., 2001; Welchen y col., 2002; Curi y col., 2002; 2003) o por inhibición o alteración del normal funcionamiento de la actividad respiratoria mitocondrial (Yu y col., 2001; Taylor y col., 2003; 2004). Además, un estudio reciente en el que se 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 codificados en ambos genomas, sugiere que la biogénesis mitocondrial estaría regulada por cambios en la expresión de genes nucleares y por una coordinación a nivel postraducciona, durante el ensamblado de los distintos componentes en la membrana interna mitocondrial (Giege y col., 2005).

Desde el punto de vista de la regulación de la expresión de acuerdo al tipo de tejido o al tipo celular en particular, se sabe que la esporogénesis es un proceso que ocurre en las anteras y que demanda gran cantidad de energía. En este sentido, pudo observarse que tanto el número de mitocondrias por célula como la capacidad de síntesis de ATP se ven incrementados para responder a la mayor demanda de energía existente durante este proceso (Lee and Warmke, 1979; Huang y col., 1994). Coincidentemente con este aumento en el número de mitocondrias, se han reportado aumentos en los niveles de transcritos tanto de proteínas mitocondriales (Smart y col., 1994), como de componentes codificados en el núcleo (Huang y col., 1994; Felitti y col., 1997; Zabaleta y col., 1998; Welchen y col., 2002). Una vez más, este aumento en el número de mitocondrias por célula requeriría del funcionamiento de un mecanismo para la regulación y coordinación de la expresión de genes nucleares que codifican proteínas mitocondriales. Estos

mecanismos podrían actuar a nivel transcripcional o post-transcripcional, pero sea cual fuere la etapa involucrada, permanecen aún sin dilucidar por completo.

Teniendo en cuenta los genes nucleares que codifican proteínas con destino mitocondrial, existen en la bibliografía pocos estudios en los que se analiza la expresión de los mismos en tipos celulares específicos (Smart y col., 1994; Ribichich y col., 2001; Elorza y col., 2004) o se caracterizan sus regiones promotoras a fin de profundizar en los mecanismos que regulan la expresión de los mismos a nivel molecular (Zabaleta y col., 1998; Thirkettle-Watts y col., 2003; Elorza y col., 2004; Curi y col., 2005).

Tomando como ejemplo el análisis de la región promotora de tres genes nucleares codificantes para distintas subunidades del complejo NADH deshidrogenasa o complejo I (nCI), Zabaleta y col. (1998) identificaron un motivo conservado rico en GT (TGTGGTT con algunas sustituciones puntuales), identificado previamente en genes cuya expresión aumentaba durante el proceso de maduración del polen, tanto en tomate como en otras especies de plantas (Twell y col., 1991). En el contexto de cada promotor, este elemento regularía de manera transcripcional el incremento en la expresión de estos genes nucleares en anteras, coordinando las respuestas a las demandas fisiológicas sobre la función mitocondrial durante la maduración del polen.

Otro ejemplo de la expresión de genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, y cuya expresión se ve fuertemente aumentada en meristemas florales y en granos de polen, está dado por el análisis de la expresión de las tres isoformas codificantes para la subunidad SDH2 del complejo II o succinato deshidrogenasa en *Arabidopsis* (Elorza y col., 2004). Coincidentemente con el papel de la mitocondria durante el desarrollo de las anteras, los niveles de mensajero detectados por hibridación *in situ*, así como la expresión GUS dirigida por las regiones promotoras de los tres genes analizados (*sdh2-1*, *sdh2-2* y *sdh2-3*) se ven fuertemente aumentados en polen y en órganos florales. Esto permitiría reforzar la idea acerca de la existencia de mecanismos de regulación a nivel transcripcional para estos genes nucleares involucrados en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Además, para la isoforma *sdh2-2*, cuya expresión GUS se localiza fuertemente en anteras y a nivel de la región del ápice en raíces primarias y laterales emergentes, coincidentemente con lo observado por hibridación *in situ*, se postuló la presencia de un regulador negativo localizado corriente arriba de la posición -254 dentro de la región promotora del gen. Para la isoforma *sdh2-3*, se postuló la existencia de

mensajeros inestables, incapaces de ser detectados por técnicas de hibridación o RT-PCR y la presencia de elementos reguladores en *cis* que actuarían de manera negativa sobre los mecanismos de expresión de este gen (Elorza y col., 2004).

En este sentido, otro ejemplo presente en la bibliografía de genes regulados transcripcionalmente por elementos que actuarían en forma negativa, está dado por algunos de los genes pertenecientes a la familia multigénica de isoformas codificantes para la oxidasa alternativa (AOX) en soja. Al estudiar las regiones promotoras de los genes *GmAox1* y *GmAox2b* se determinó que ambos estarían regulados por elementos negativos ubicados corriente arriba en las regiones 5', y que actuarían reprimiendo su expresión. Se postuló que como los niveles de mensajero para el gen *GmAox1* son detectados en soja sólo en condiciones de estrés, la presencia de los elementos reguladores negativos estaría relacionada con la expresión de este gen en respuesta a condiciones de estrés impuestas a las plantas (Thrikettle-Watts y col., 2003). Existen numerosos reportes de este genes relacionados con respuestas a estrés que estarían regulados por elementos negativos actuando a nivel transcripcional (Xiong y col., 1999; Kim y col., 2003). Por lo tanto, la represión de genes inducibles por estrés mediante elementos reguladores negativos dentro de las regiones promotoras parecería ser un mecanismo común en la regulación de la expresión de genes en plantas (Thrikettle-Watts y col., 2003).

En resumen, se han establecido los patrones de expresión dirigidos por el promotor *cox5b-1* de *Arabidopsis thaliana* en los distintos órganos y tejidos, y el comportamiento de distintas regiones de este promotor frente a la presencia de azúcares y hormonas en las condiciones de cultivo. Esta regulación de la expresión estaría dada por la acción conjunta de elementos reguladores actuando tanto en forma positiva, fundamentalmente en la región comprendida entre las posiciones -387 y -195, como en forma negativa, entre -609 y -387. Un análisis más detallado de las secuencias reguladoras o motivos implicados en las respuestas observadas permitirá dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de este y otros genes nucleares codificantes para componentes de la vía respiratoria dependiente del citocromo *c*.

## 5. CAPÍTULO III

“Estudio de las regiones promotoras de los genes *cytc1* y *cytc2*,  
codificantes para el citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana*”.

## CAPÍTULO III

### Estudio de las regiones promotoras de los genes *cytc1* y *cytc2*, codificantes para el citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana*

#### 5.1 Introducción:

La cadena respiratoria mitocondrial, tanto en eucariotas como en procariotas, está constituida por proteínas que contienen una gran variedad de cofactores, entre los que se incluyen iones metálicos, grupos hierro-azufre, o grupos hemo. Entre los principales componentes de la cadena de transporte de electrones que presentan estas características se encuentran las moléculas conocidas como citocromos. En la cadena respiratoria existen cinco tipos de citocromos diferentes que constituyen una familia de moléculas formadas por una proteína y un grupo hemo, en el cual hay un átomo de hierro encerrado en un anillo de porfirina. Tanto las estructuras proteicas de los citocromos como sus grupos hemo son lo suficientemente diferentes como para tener distintas afinidades por los electrones que se transportan y mantenerlos de esta forma en diferentes niveles de energía a lo largo de toda la cadena. El átomo de hierro de cada citocromo acepta y libera alternadamente un electrón, transfiriéndolo al siguiente citocromo en un nivel de energía ligeramente inferior hasta que los electrones, ya sin energía, son aceptados por el oxígeno molecular. En este proceso, conocido como fosforilación oxidativa, la energía liberada durante el pasaje de los electrones es utilizada para la formación de moléculas de ATP (Alberts y col., 2000).

En el caso de los citocromos de tipo *c*, la unión covalente del grupo hemo a la apoproteína ocurre en el mismo sitio en el que la holoproteína ejerce su función, que es diferente al sitio en el que se lleva a cabo su síntesis, por lo que deben existir mecanismos específicos que regulen la síntesis, traslocación y posterior ensamblado de los dos componentes. El paso fundamental en la biogénesis de este tipo de moléculas biológicas es la unión covalente entre los grupos vinilo del hemo y dos residuos de cisteína del apocitocromo, constituyendo el motivo Cys-Xxx-Yyy-Cis-His. Mediante análisis genéticos de distintos organismos se lograron caracterizar tres vías diferentes para la maduración de los citocromos de tipo *c* en bacterias gram-negativas (sistema I),

cloroplastos (sistema II) y mitocondrias de hongos (sistema III). En *E. coli* (sistema I) se identificaron al menos ocho genes (*ccmA* a *ccmH*) esenciales para la maduración del holocitocromo *c*. Por el contrario, en mitocondrias de levaduras (sistema III) sólo dos proteínas constituyen los elementos centrales. Este sistema III ha evolucionado específicamente en mitocondrias de hongos, invertebrados y vertebrados, e involucra a la enzima citocromo *c* hemo liasa (CCHL), la cual estaría ubicada en el espacio intermembrana (Kranz y col., 1998). De manera interesante, los genomas nucleares y mitocondriales de plantas codifican genes *ccm* (por cytochrome c maturation) ortólogos a los encontrados en bacterias. Entre los genes *ccm* identificados hasta el momento se destacan los genes *ccmB*, *ccmC* y *ccmF*, identificados en trigo, y el gen *ccmE* de *Arabidopsis* (Spielewoy y col., 2000). En este sentido, las mitocondrias de plantas seguirían un mecanismo para la biogénesis de los citocromos de tipo *c* estrechamente relacionado con sus ancestros  $\alpha$ -proteobacteriales. En bacterias se ha establecido un mecanismo en el que la proteína CcmE permanecería anclada a la membrana interna mediante sus residuos hidrofóbicos y uniría grupos hemo en presencia de la proteína CcmC, transfiriéndolos luego al apocitocromo en presencia de una o más de las proteínas CcmF, CcmG, o CcmH (Schulz, y col., 1993). Por otra parte, en trigo la proteína CcmFc, cuya secuencia sería idéntica a la región C-terminal de la proteína CcmF en bacterias, sería la responsable de la ligación del grupo hemo con la porción apoproteica y estaría integrada a un gran complejo multiproteico ubicado en la membrana interna mitocondrial (Giegé y col., 2004). Por último, la proteína CCME en *Arabidopsis* estaría implicada en la unión del grupo hemo, siendo esta función conservada a lo largo de la evolución entre las mitocondrias de plantas y las proteobacterias (Spielewoy y col., 2000).

Las mitocondrias contienen dos clases de citocromos de tipo *c*: el citocromo *c*<sub>1</sub>, que forma parte del complejo III (citocromo *c* reductasa), y la forma soluble o citocromo *c*, que permanece unida a la periferia de la membrana interna mitocondrial, de cara al espacio intermembrana, transfiriendo electrones entre los complejos respiratorios III y IV en células eucariotas. El citocromo *c* constituye uno de los citocromos mejor estudiados debido a que su estructura tridimensional ha sido determinada mediante cristalografía de rayos X (Alberts y col., 2000). Por otra parte, debido a su localización subcelular única, ha sido objeto de numerosos estudios acerca del direccionamiento de proteínas a organelas. Además, tanto sus secuencias nucleotídicas como aminoacídicas se han usado para estudios de evolución molecular debido a la existencia de un alto nivel de conservación entre las secuencias de organismos no relacionados como lo son las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), los mamíferos y las plantas (Kemmerer y col., 1991). Más



recientemente, se han realizado interesantes hallazgos que relacionan al citocromo *c* como una molécula involucrada en el desencadenamiento de los eventos de apoptosis o muerte celular programada tanto en animales (Kluck y col., 1997) como en plantas (Balk y Leaver, 2001).

Una búsqueda en bases de datos de secuencias para el citocromo *c* en plantas permitió observar la existencia de dos genes codificantes para el citocromo *c* en *Arabidopsis thaliana*. Estos genes fueron llamados *cytc-1* (n° de acceso At1g22840) y *cytc-2* (n° de acceso At4g10040) de manera arbitraria. Están localizados en los cromosomas I y IV, respectivamente, y presentan una estructura de intrones y exones conservada, que también se corresponde con la observada para la secuencia del citocromo *c* de arroz (Kemmerer y col., 1991). Mediante análisis filogenéticos se determinó que estos dos genes de *Arabidopsis* han sido generados mediante eventos de duplicación recientes.

*Arabidopsis thaliana* tiene uno de los genomas más pequeños entre los genomas de angiospermas analizados. No obstante, 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). Por otro lado, mediante 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>), se concluyó que más de dos tercios de los genes duplicados mostraban una divergencia parcial en sus características de expresión (Harberer y col., 2004). Cabe en este momento preguntar, ¿cuál sería la razón y/o el beneficio de estos fenómenos de duplicaciones de grandes fragmentos dentro de un genoma ocurridos hace 100 o 200 millones de años atrás?

Una explicación, tal vez la preferida de numerosos autores que estudian estos fenómenos, es que “la duplicación de genes constituye la materia prima sobre la cual la evolución puede trabajar” (Moore y col., 2003; Simillion y col., 2002; Prince y Pickett, 2002; Harberer y col., 2004). Estudios recientes han demostrado la presencia de un gran número de genes duplicados y de enormes familias multigénicas existentes en todos los genomas secuenciados hasta el momento. Esta tendencia revela quizás un mecanismo destinado a la conservación y el mantenimiento de los genomas a través de eventos de duplicación del ADN locales, regionales o globales (Prince y Pickett, 2002).

Para explicar la existencia de estos fenómenos de duplicación, el modelo clásico plantea distintos mecanismos probables. Dentro de estos, el proceso conocido como “desfuncionalización” plantea que un gen del par duplicado posteriormente degenera a un pseudogén o es perdido por efectos de remodelación de los cromosomas, deleción del locus o mutación puntual. La pérdida de información es posible debido a que sólo uno de los genes duplicados 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 codificante que impliquen una significativa pérdida de función a lo largo del proceso evolutivo. Otro de los posibles mecanismos, aunque extremadamente raro, tiene en cuenta un proceso de “neo-funcionalización” en el que uno de los genes del par duplicado es susceptible de sufrir mutaciones tanto en su región codificante como en las secuencias regulatorias del mismo, lo que permite obtener un nuevo gen con diferentes y útiles funciones (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 (Gu y col., 2003). En este sentido, se observó que en levaduras al menos un cuarto de las mutantes generadas no tienen fenotipo observable debido a una compensación por genes duplicados (Gu y col., 2003).

Sin embargo, este modelo clásico falla a la hora de 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, en los que la mitad de los genes han sido mantenidos (Nadeau y col., 1997), como en plantas. En *Arabidopsis*, se vio que el 17% de los genes se encuentran en arreglos en tándem que contienen más de 23 genes, y aproximadamente el 31% de los genes 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).

Para intentar explicar las discrepancias existentes entre el modelo clásico y la prevalencia de genes duplicados que aún permanecen retenidos en los genomas, surge el modelo DDC (duplicación-degeneración-complementación) (Prince and Picket, 2002). Este modelo plantea la existencia de una “sub-funcionalización” en la que ambas copias de los genes sufrieron una progresiva pérdida de funciones por cambios o mutaciones complementarias, por lo que ambos genes son requeridos para producir la totalidad de las funciones del gen ancestral. Se postula que las posibles regiones que sufrirían mutaciones más frecuentemente serían los sitios de unión de

los factores reguladores de la transcripción ya que constituyen secuencias cortas de entre 8 a 12 pb, que serían fáciles de generar o eliminar por procesos simples de mutación. Debido a la estructura modular de los mismos, otro nivel de subfuncionalización estaría dado por la presencia y acción de diferentes “enhancers” o activadores de la transcripción. Tanto las propiedades de las secuencias regulatorias como las características del evento transcripcional han conducido a numerosos autores a enfatizar 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 podrían potencialmente alterar los patrones de expresión espaciales y/o temporales de los genes del par así como la respuesta a estímulos tanto internos como externos (Harberer y col., 2004).

En el capítulo I se han descrito resultados de estudios de expresión de ambos genes codificantes para el citocromo *c* de *Arabidopsis*: (*cytc-1* (At1g22840) y *cytc-2* (At4g10040)). Mediante la semicuantificación de los niveles de mensajero en ensayos de northern blot se determinó que ambos genes presentan una alta expresión en flores (no mostrado) y experimentan un aumento de sus niveles de transcripto debido a la presencia de hidratos de carbono metabolizables y sales de amonio.

Con el objetivo de dilucidar los mecanismos moleculares responsables de regular la expresión de estos genes, se procedió al estudio de las regiones promotoras de los mismos. La finalidad del trabajo presentado en este capítulo fue establecer los patrones de expresión dirigidos por las regiones 5' de ambos genes e identificar los elementos reguladores en *cis* implicados en este control. Mediante el análisis de plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con delecciones sucesivas de las regiones promotoras de ambos genes, se intentó establecer si las hipótesis planteadas por el modelo DDC (duplicación-degeneración-complementación) permiten justificar la existencia de dos genes codificantes para el citocromo *c* en *Arabidopsis* cuyos patrones de expresión, analizados mediante experimentos de northern blot, parecerían ser al menos parcialmente redundantes.

## 5.2 Resultados:

### 5.2.1 El promotor del gen *cytc-1* dirige una expresión del gen *gus* específica de tejido:

A fin de caracterizar los patrones de expresión conferidos por la región promotora del gen *cytc-1* de Arabidopsis, se procedió al clonado de un fragmento del gen de 1236 pb comprendiendo las posiciones -1182 a +54 con respecto al codón de iniciación ATG. Este fragmento fue clonado en fase con la región codificante de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (*gus*), presente en el vector binario pBI101.3. El clon obtenido fue utilizado para obtener plantas transgénicas de Arabidopsis mediante la estrategia de agroinfiltración con *Agrobacterium tumefaciens*. Una vez seleccionadas las transformantes y analizada la presencia del T-DNA de interés mediante reacciones de PCR utilizando ADN genómico de las mismas, se seleccionaron varias líneas transgénicas independientes para su posterior análisis.

En primer lugar, se procedió al análisis de la expresión del gen reportero *gus* por tinción histoquímica, utilizando X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-GlcUA) como sustrato. Para tal fin, las líneas transgénicas fueron sembradas en placas de Petri y crecidas en medio MS 1x, suplementado con vitaminas de Gamborg y el antibiótico de selección según como se indica en el capítulo de materiales y métodos. Se realizó un seguimiento exhaustivo de la expresión del gen reportero durante el desarrollo de las plántulas. De esta manera, se observó que plántulas de tres días solamente mostraban expresión del gen reportero en la región meristemática de la raíz (fig. 22A). Con el desarrollo progresivo de las plántulas, la actividad GUS se observó además en la región del meristema apical del vástago, en las células del extremo apical de los cotiledones y en el primordio de las hojas nacientes (fig. 22 B-E). Una expresión específica fue también observada en la zona del ápice de las raíces, en las raíces secundarias nacientes y en la zona de unión entre las raíces primarias y secundarias (fig. 22 G, H, L). Al analizar la expresión en órganos de plantas adultas, la misma fue observada sólo en anteras, más específicamente en granos de polen (fig. 22 J, K). Por otra parte, no se detectó actividad GUS en hipocotilos, tallos, hojas, vainas u otros órganos florales (fig. 22 A, F, I, K) sugiriendo que la región promotora del gen *cytc-1* utilizada para dirigir la expresión del gen reportero posee motivos capaces dirigir la expresión del mismo específicamente en tejidos de intensa proliferación celular.

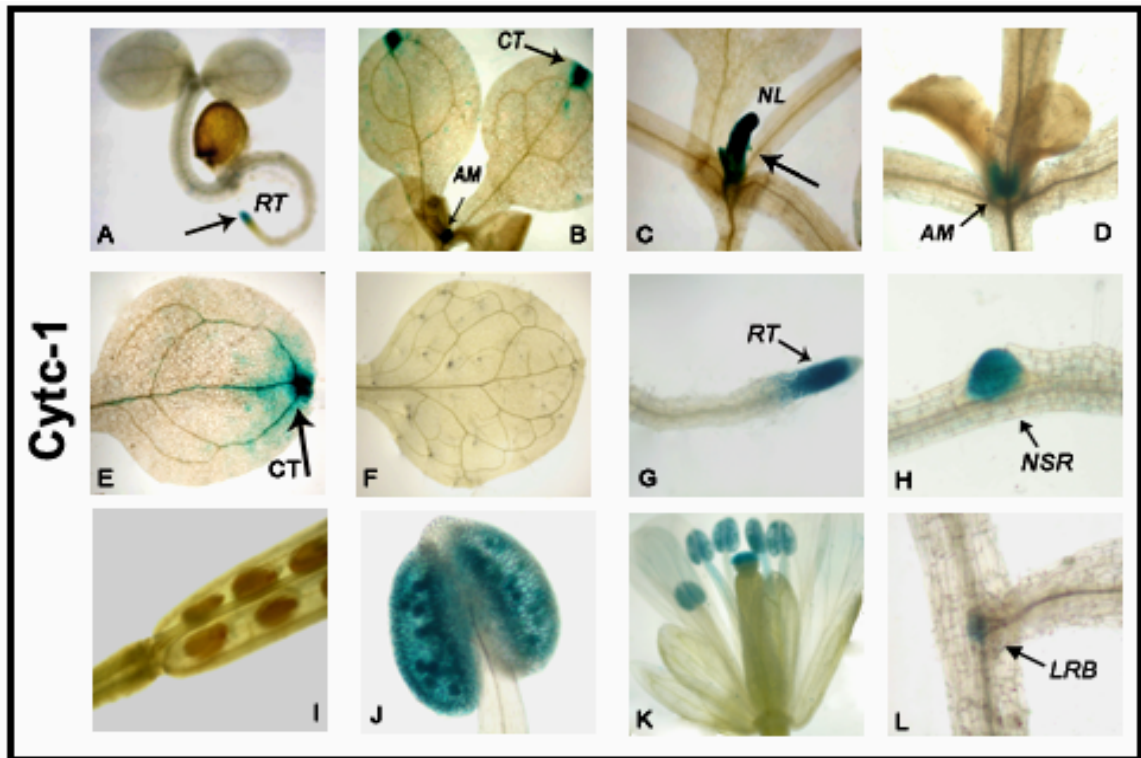


Figura 22: Localización histoquímica de actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con la región promotora del gen *cytc-1* fusionada al gen reportero *gus*.

(A) Plántula de 3 días mostrando expresión GUS en las células del meristema de la raíz (RT).

(B) Plántula de 7 días en la que se observa expresión en la región del meristema apical del vástago (AM) y en las células de la región del ápice en los cotiledones (CT).

(C y D) Plántulas de 12 y 15 días en las que se observa una fuerte expresión en la región del meristema apical (AM) y en las hojas primarias nacientes (NL).

(E y F) Cotiledón y hoja de planta de 20 días.

(G y H) Raíces primarias en las que se ve expresión en las células del ápice y en las raíces secundarias nacientes (NSR).

(I) Vaina; (J) Antera; (K) Flores; (L) Raíces laterales mostrando expresión en las células de la base de la raíz (LRB).

### 5.2.2 La región promotora de *cytc-2* dirige una expresión diferente a la observada para *cytc-1*:

La región promotora del gen *cytc-2* de Arabidopsis, comprendida entre los nucleótidos -967 y +54, fue utilizada para dirigir la expresión del gen reportero *gus* en plantas transgénicas de Arabidopsis según como se detalla en materiales y métodos.

El análisis de numerosas líneas transformantes mediante la técnica histoquímica permitió observar que el promotor del gen *cytc-2* dirige un patrón de expresión mucho más amplio. En este sentido, en la figura 23 (A-F) puede observarse que la actividad GUS fue detectada en tejidos vasculares de raíces, hipocotilos, cotiledones y hojas. Contrariamente a lo observado para el promotor *cytc-1*, no fue posible detectar expresión GUS en regiones meristemáticas, hojas primarias nacientes o en la región del nacimiento de las raíces secundarias (fig. 23C, G, H).

En órganos reproductivos, la expresión fue evidente en anteras y en granos de polen, en venas de los pétalos y en las células de la región de unión entre las flores y vainas con el pedicelo (fig. 23K). La expresión fue también detectada dentro de las vainas, específicamente en el séptum y en el funículo (fig. 23 I-K).

Podemos decir, entonces, que el patrón de expresión del gen *cytc-2* difiere del observado cuando se analiza el promotor del gen *cytc-1*, mostrando sólo superposición a nivel de los órganos reproductivos.

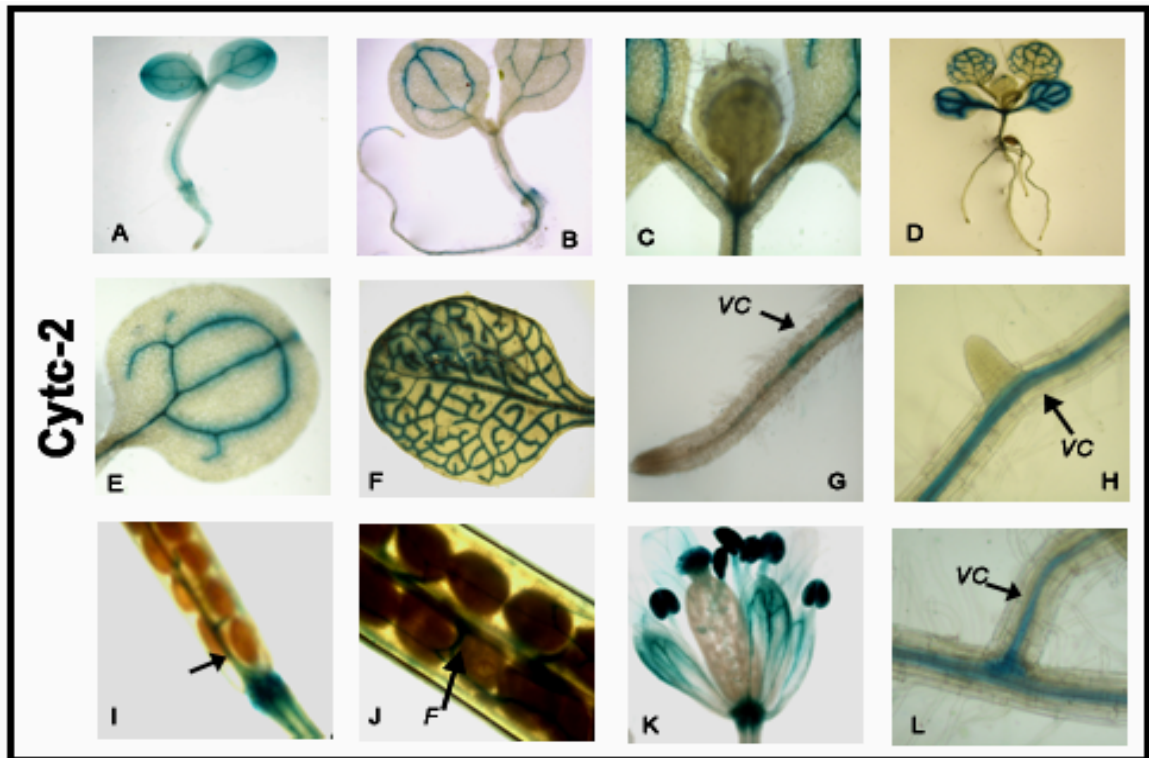


Figura 23: Localización histoquímica de actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con la región promotora del gen *cytc-2* fusionada al gen reportero *gus*.

(A - D) Plántulas en diferentes estadios de desarrollo mostrando expresión a lo largo del tejido vascular de toda la plántula.

(E y F) Cotiledón y hoja de planta de 20 días.

(G y H) Raíz primaria y raíz secundaria naciente en las que se observa tinción en el cilindro vascular (VC).

(I y J) Vainas en las que se observa expresión en las células del séptum (Flecha) y en el funículo (F).

(K) Flores; (L) Raíz lateral.

### 5.2.3 Cuantificación de los niveles de actividad GUS en distintos órganos por fluorimetría:

Los niveles de actividad enzimática GUS presentes en extractos proteicos preparados a partir de diferentes órganos de plantas transformadas con los promotores *cytc-1* o *cytc-2* fusionados al gen reportero *gus* fueron cuantificados mediante la medición de los niveles de 4-metilumbeliferona por fluorimetría. La medición de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en plántulas y hojas de roseta de plantas transformadas con el promotor *cytc-1* no arrojó niveles significativos de expresión, en comparación con los niveles de actividad de plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (vector pBI101.3). Como se observa en la figura 24, para el promotor *cytc-1* la actividad GUS fue elevada en flores, y además fue detectada en extractos de proteínas totales preparados a partir de raíces y vainas.

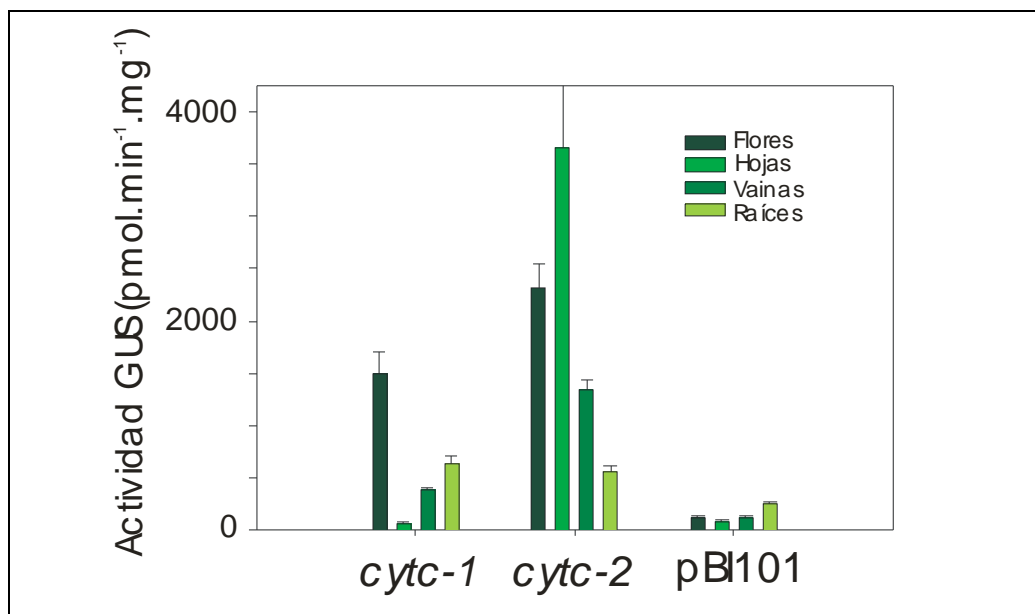


Figura 24: Análisis de la actividad GUS en extractos proteicos de diferentes órganos de plantas transformadas con fusiones al gen *gus* de los promotores *cytc-1* o *cytc-2*. Se determinó la actividad GUS usando extractos de proteínas totales preparados a partir de diferentes órganos de plantas transformadas con los promotores *cytc-1* o *cytc-2* fusionados al gen reportero *gus*. Como control se utilizaron extractos de órganos de plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (pBI101.3). Las barras indican los valores obtenidos con diferentes órganos a partir de 3 líneas de transformantes independientes para cada construcción. Las barras de error representan el error estándar (SE). Resultados similares se obtuvieron en otros experimentos, usando diferentes líneas de transformantes.



#### 5.2.4 Análisis de la región promotora del gen *cytc-1*:

Con la finalidad de acotar una región mínima dentro del promotor del gen *cytc-1* capaz de dirigir la expresión correcta del mismo, realizamos una serie de deleciones sucesivas a partir del fragmento de 1234 pb fusionado al gen *gus*. En la figura 25A puede observarse un esquema resumiendo las distintas deleciones realizadas en la región promotora, las que fueron clonadas en el vector binario pBI101.3. Las diferentes construcciones fueron introducidas en plantas de *Arabidopsis* y luego fue analizada la actividad GUS en varias líneas independientes de las distintas transformantes.

Mediante la técnica histoquímica pudo observarse que un fragmento localizado entre las posiciones -147 y -218 con respecto al codón ATG es absolutamente requerido para la transcripción del gen *cytc-1*. Esto puede concluirse ya que no fue posible detectar actividad GUS en ningún tejido o tipo celular en plantas transformadas con una construcción que comprendía el fragmento proximal de 200 bp, entre las posiciones -146 y +54, fusionado el gen *gus* (dato no mostrado).

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante la realización de ensayos de medición de actividad GUS por fluorimetría usando extractos preparados a partir de órganos de diferentes líneas transformantes son coincidentes con los resultados evidenciados por histoquímica (fig. 25B). En el caso de la construcción que no muestra actividad por histoquímica (posiciones -146 a +54 del promotor), los valores fluorométricos coinciden con los obtenidos con extractos de plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (pBI101.3). En la figura 25B puede apreciarse también que una deleción hasta la posición -218 produce plantas transformantes con niveles de expresión en flores reducidos aproximadamente en un 50%, sugiriendo la existencia de un posible elemento regulador positivo presente entre las posiciones -219 y -369 del promotor *cytc-1*.

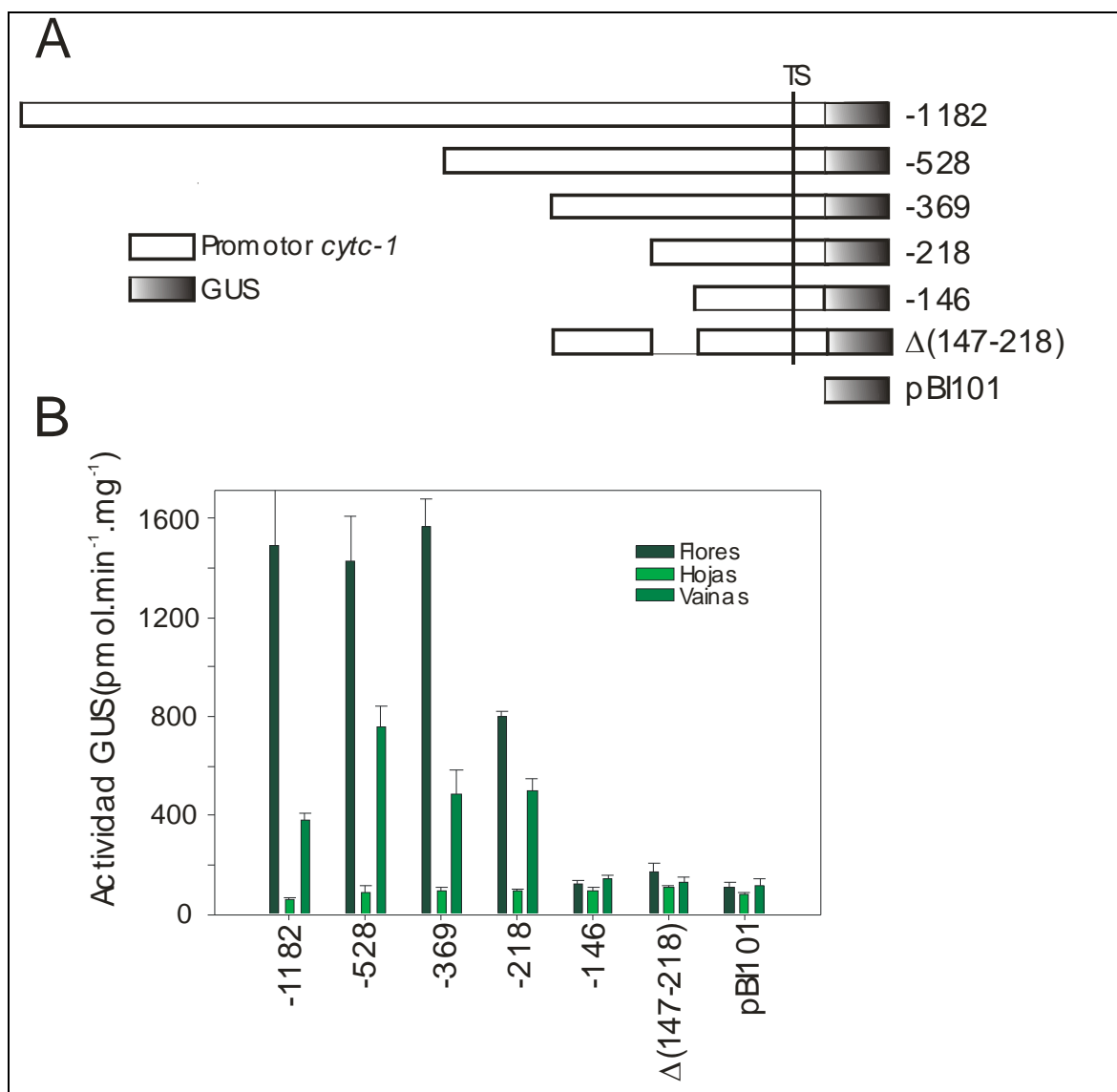


Figura 25: Análisis de la actividad GUS en distintas construcciones generadas por delección del promotor *cytc-1*.

(A) Esquema de las construcciones utilizadas para el análisis del promotor *cytc-1*. Los números indican la posición del extremo 5' del promotor presente en cada una de las construcciones, tomadas con respecto al sitio de inicio de la traducción; el extremo 3' corresponde a la posición +54 para todas las construcciones. TS indica el sitio putativo de inicio de la transcripción deducido a partir de los ADNc disponibles. La construcción  $\Delta(147-218)$  corresponde a una delección entre los nucleótidos comprendidos entre paréntesis, en el contexto de un fragmento del promotor que abarca hasta la posición -369. Como control se utilizaron plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (pBI101.3).

(B) Niveles de actividad GUS en órganos de plantas transformadas con las diferentes construcciones que se esquematizan en la parte A. Los resultados son el promedio ( $\pm$ SE) de tres líneas independientes analizadas. Los números colocados debajo de las barras indican las respectivas construcciones utilizadas. Resultados similares fueron obtenidos en otros ensayos con diferentes líneas.

La delección de un segmento localizado entre las posiciones -147 y -218 dentro del contexto de un fragmento del promotor que abarca hasta el nucleótido -369 (construcción  $\Delta(147-218)$ ) originó la desaparición completa de la expresión GUS en todos los órganos en los que fue analizada. Este resultado indicaría que secuencias presentes más arriba de esta posición no serían capaces de reemplazar la actividad presente en el segmento delecionado (fig. 25 A y B). Por otra parte, la inclusión de este fragmento esencial junto al promotor mínimo -90 35SCaMV, fue incapaz de conferir expresión alguna a las plantas transformadas (dato no mostrado). De acuerdo con este resultado, para completar la actividad promotora del fragmento delecionado serían requeridas secuencias adicionales contenidas por debajo de la posición -147. Por otro lado, debido a que el gen *cytc-1* contiene una región promotora sin una caja TATA, es posible que este segmento no funcione correctamente en el contexto del promotor 35SCaMV que sí contiene una caja TATA.

#### 5.2.5 Mutagénesis del fragmento del promotor *cytc-1* requerido para la expresión GUS:

Con la finalidad de identificar el o los elementos reguladores requeridos para la expresión del gen *cytc-1*, se realizaron mutaciones puntuales a lo largo de la región mínima de 72 pb identificada en los ensayos previos como la región estrictamente necesaria para dirigir la expresión del gen reportero *gus*. Sobre este fragmento del promotor comprendiendo las 272 pb proximales de la región promotora (-218 a +54) fueron efectuadas mutaciones puntuales cada 10 pb, entre las posiciones -147 a -218 tomadas con respecto al codón ATG. Estas mutantes puntuales fueron clonadas en el vector binario pBI101.3 (fig. 26A) y el efecto de las mismas sobre el promotor *cytc-1* fue analizado en numerosas líneas transformantes de *Arabidopsis* independientes, tanto por histoquímica como por fluorometría.

Ensayos fluorométricos utilizando extractos preparados a partir de distintos órganos de plantas transformadas con las construcciones conteniendo las diferentes mutaciones puntuales, mostraron que al modificar el fragmento en las posiciones -147 a -156 se producía un descenso brusco de los niveles de actividad GUS a niveles comparables con los obtenidos al analizar la actividad enzimática de plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (vector pBI101.3). Además, en la figura 26B se observa que una mutación en los 10 pb adyacentes, entre las posiciones -157 a -166, produjo una disminución moderada en los niveles de expresión.

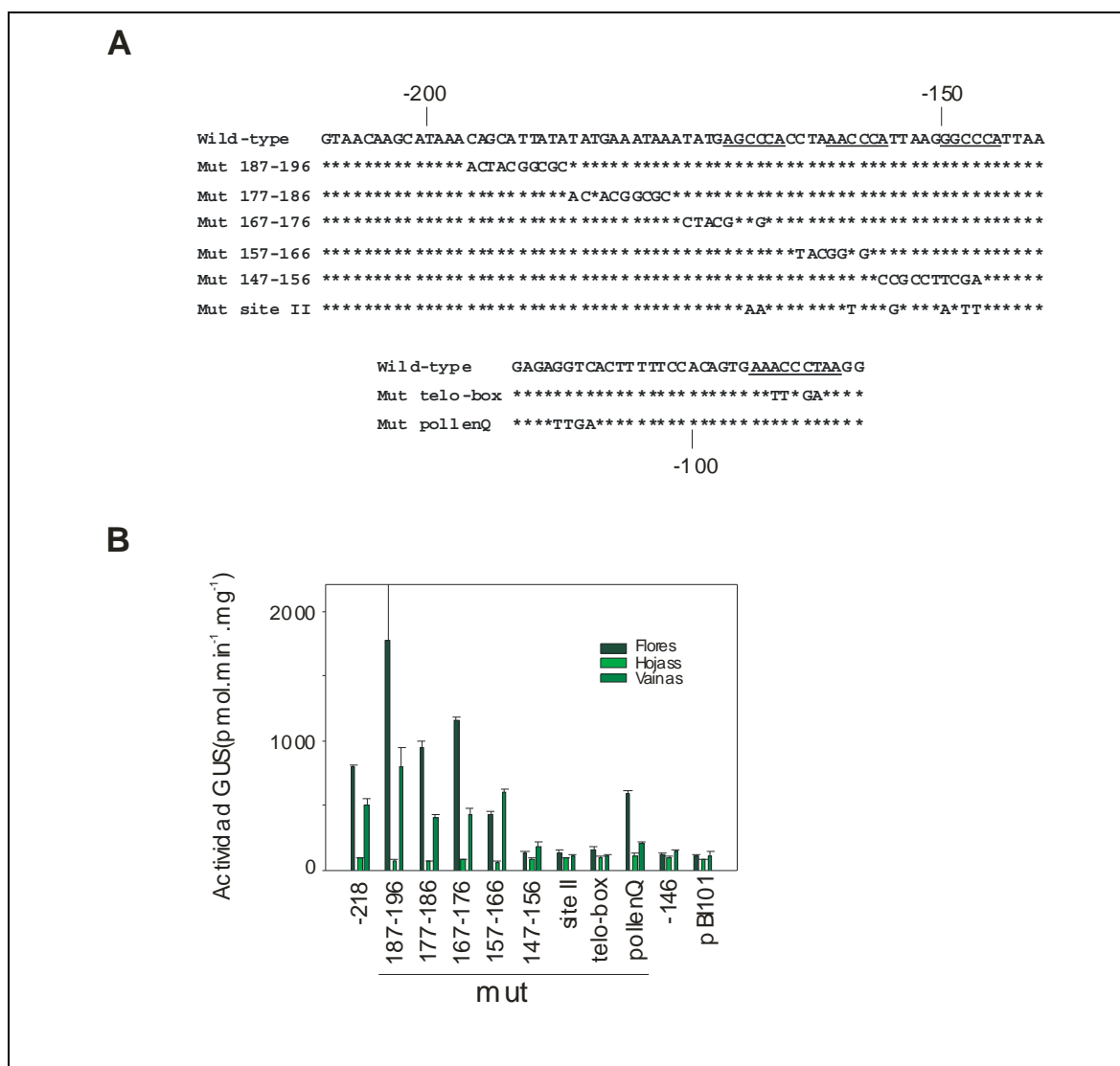


Figura 26: Análisis de mutantes puntuales en la región requerida para la expresión del promotor *cytc-1*

(A) Secuencia de la región del promotor *cytc-1* que fue analizada por mutagénesis. Las mutaciones introducidas están especificadas debajo de la secuencia normal. Los asteriscos indican posiciones ocupadas por nucleótidos idénticos. Los números indican las posiciones relativas con respecto al ATG. Los elementos *site II* y *telo box* se encuentran subrayados.

(B) La actividad GUS específica fue determinada por fluorimetría usando extractos proteicos preparados a partir de diferentes órganos. Todas las construcciones comprenden las posiciones -218 a +54 del promotor *cytc-1*. La actividad GUS fue también medida en plantas transformadas con la construcción conteniendo el fragmento -146 a +54 (-146) y con el gen *gus* sin promotor (pBI 101). Las barras representan el promedio ( $\pm$  SE) de tres líneas independientes de cada construcción. Resultados similares fueron obtenidos en otros experimentos en los que se utilizaron líneas transgénicas diferentes.

El análisis por histoquímica de estas mismas plantas transformantes arrojó resultados similares a los obtenidos por fluorimetría (comparar fig. 26B y 27). Este análisis permitió confirmar

que el segmento ubicado entre las posiciones -147 a -156 del promotor es absolutamente requerido para la expresión, debido a que una mutación en estos 10 pb originó la pérdida total de la actividad GUS en todos los tejidos en los que fue analizada (fig. 27 D, J, P y V). El resto de las mutantes analizadas mostraron actividad GUS en anteras y regiones meristemáticas, en una ubicación similar a la observada en las plantas transformadas con el fragmento no mutagenizado (fig. 27 F, L, R y X). Además, en plantas con las mutaciones entre las posiciones -157 a -166, la intensidad de la expresión fue reducida con respecto a los niveles de tinción de plantas transformadas con el mismo fragmento del promotor sin mutagenizar (wild-type).

El segmento del promotor del gen *cytc-1* de 10 pb (-147 a -156) requerido para la expresión del reportero contiene una copia del elemento regulador llamado *site II* (ver fig. 26A), el que ha sido previamente implicado en la regulación de la expresión de genes en células en activa proliferación y de genes codificantes para proteínas ribosomales (Kosugi y col., 1995; Kosugi y Ohashi, 1997; Trémousaygue y col., 2003). Este elemento tiene una secuencia consenso TGGGCC/T y está usualmente presente en más de una copia, localizadas próximas unas de otras y dentro de las posiciones -120 a -180 con respecto al codón de iniciación (Trémousaygue y col., 2003). Notoriamente, en esta región mínima de 72 pb requerida para la expresión GUS, existen dos elementos *site II*, ubicados en posiciones muy cercanas entre sí, uno en el fragmento mutado de 10 bp (-147 a -156) y otro entre las posiciones -166 a -171 (ver fig. 26A).

Con la finalidad de analizar la función de estos elementos *site II* en la expresión del gen *cytc-1*, se construyó una mutante de este promotor en la que estos dos motivos fueron mutagenizados cambiando los dos nucleótidos centrales (GG) por A o T según el caso (ver fig. 26A). Además, una secuencia relacionada y ubicada entre los elementos *site II* (TGGGTT) fue cambiada a TGGATT en la misma construcción. Mediante el análisis por histoquímica se vio que las mutaciones introducidas originaron una completa pérdida de la expresión en todos los órganos y estadios de desarrollo (fig.27, mut *siteII*, C, I, O y U). Además, los resultados de ensayos fluorométricos mostrados en la figura 26B son coincidentes con lo observado mediante histoquímica, sugiriendo que estos elementos *site II* estarían implicados y además serían esenciales para la expresión del gen *cytc-1* en Arabidopsis.

Los elementos *site II* identificados en el promotor *cytc-1* se encuentran generalmente presentes en las regiones promotoras de numerosos genes, acompañados por el motivo *telobox*

(internal telomeric repeat). La secuencia consenso de este elemento regulador *telo box* es AAACCCTAA y según datos disponibles en la bibliografía se ubica generalmente corriente abajo con respecto a la localización de los elementos *site II* (Trémousaygue y col., 1999; 2003). Del análisis de la secuencia del promotor *cytc-1*, y como puede observarse en la fig. 26A, en este promotor existe una secuencia correspondiente a la del motivo *telo box*, localizada entre las posiciones -86 y -94. Por esta razón, se decidió analizar la posible función de este elemento en la regulación de la expresión del gen *cytc-1* utilizando plantas de Arabidopsis transformadas con una fusión al gen *gus* de la región promotora (-218 a +54), en la que la secuencia de este elemento regulador *telo box* fue previamente mutagenizada. Numerosas líneas de transformantes mostraron un muy bajo nivel de actividad GUS en anteras cuando se analizaron por histoquímica, mientras que no pudo observarse tinción en otras partes de la planta (fig. 27, mut *telo box*, B, H, N, T). Mediante fluorimetría, pudo observarse que la actividad medida en anteras para esta construcción fue muy baja, con niveles comparables a los observados al medir la actividad de plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (fig. 26B). Estos resultados son coincidentes con los obtenidos cuando el motivo *telo box* es mutado en otros genes, en los que no causa una pérdida completa de la expresión, sugiriendo que este motivo actuaría como un elemento estimulador, acoplado su actividad con la de otros motivos, como por ejemplo el *site II* (Trémousaygue et al., 1999, 2003; Manevski et al., 2000).

Finalmente, una región que contiene la secuencia AGGTCA, descrita previamente en la bibliografía como un elemento cuantitativo requerido para incrementar los niveles de expresión en polen del gen *ZM13* de maíz (Hamilton y col., 1998), fue identificada entre las posiciones -109 y -114 del promotor *cytc-1* (fig. 26A, mut *pollenQ*). Considerando que el gen *cytc-1* muestra expresión en granos de polen, se analizó la relevancia de este motivo *pollenQ* dentro de la región promotora de *cytc-1*. Al analizar plantas de Arabidopsis transformadas con el promotor mutagenizado en este motivo fusionado al gen *gus*, las mismas mostraron valores algo más bajos de actividad específica  $\beta$ -glucuronidasa (fig. 26B). Esto sugeriría que este elemento regulador AGGTCA, dentro del contexto del promotor *cytc-1*, podría actuar incrementando los niveles de expresión del gen *cytc-1*, fundamentalmente en tejidos reproductivos. Por otra parte, mediante ensayos de expresión del gen *gus* por histoquímica en estas plantas transformantes, no se observó una diferencia apreciable con plantas usadas como control, transformadas con fragmentos del promotor sin mutagenizar (fig.27 E, K, Q y W), sugiriendo que la influencia de este

motivo sobre la expresión del gen *cytc-1* no es altamente significativa en las condiciones analizadas.

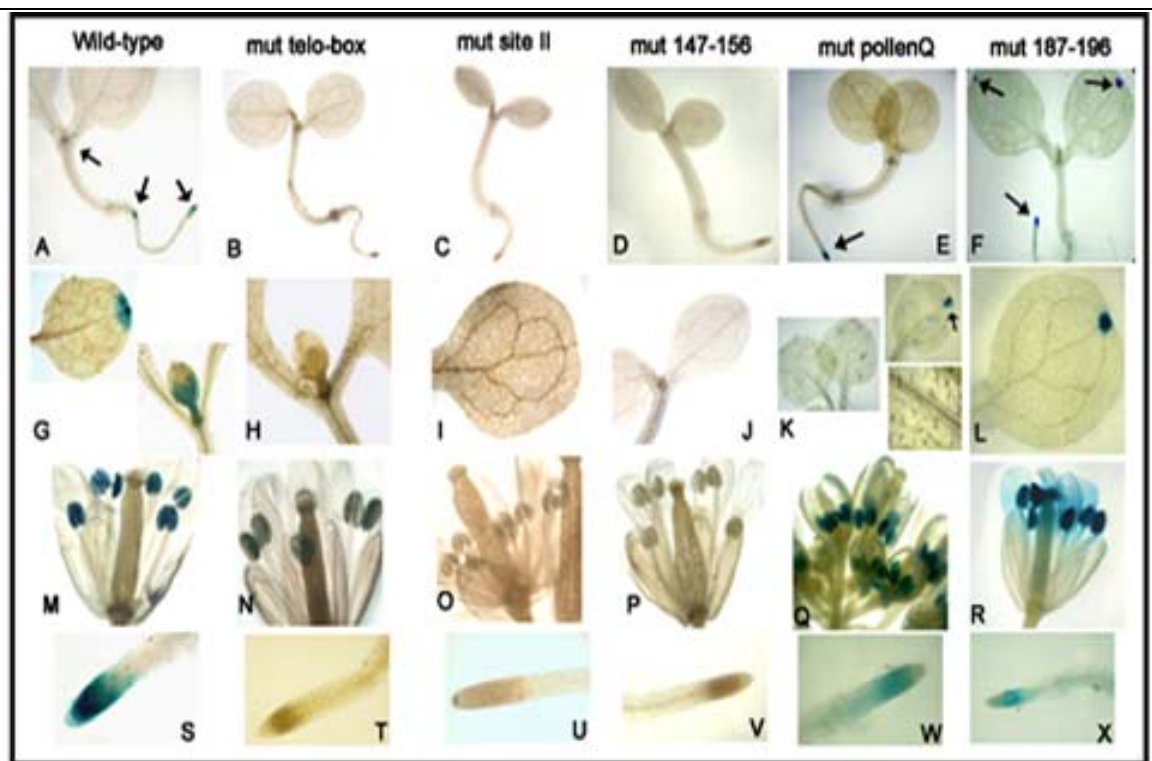


Figura 27: Análisis por histoquímica de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con fragmentos del promotor mutagenizados del promotor *cytc-1* fusionados al gen reportero *gus*.

Las secuencias cambiadas en las distintas mutantes generadas se indican en la figura 17A. Plántulas (A-F), cotiledones y hojas nacientes (G-I), flores (M-R), o raíces (S-X) de plantas transformadas con el promotor salvaje (Wild-type, -218, A, G, M, S), o con el mismo promotor mutagenizado en distintas posiciones en las regiones -147 a -156 (D, J, P, V) o -187 a -196 (F, L, R, X), en el elemento *site II* (C, I, O, U), o en el motivo *telo box* (internal telomeric repeat), (B, H, N, T) fueron sometidas a tinción histoquímica según se detalla en materiales y métodos



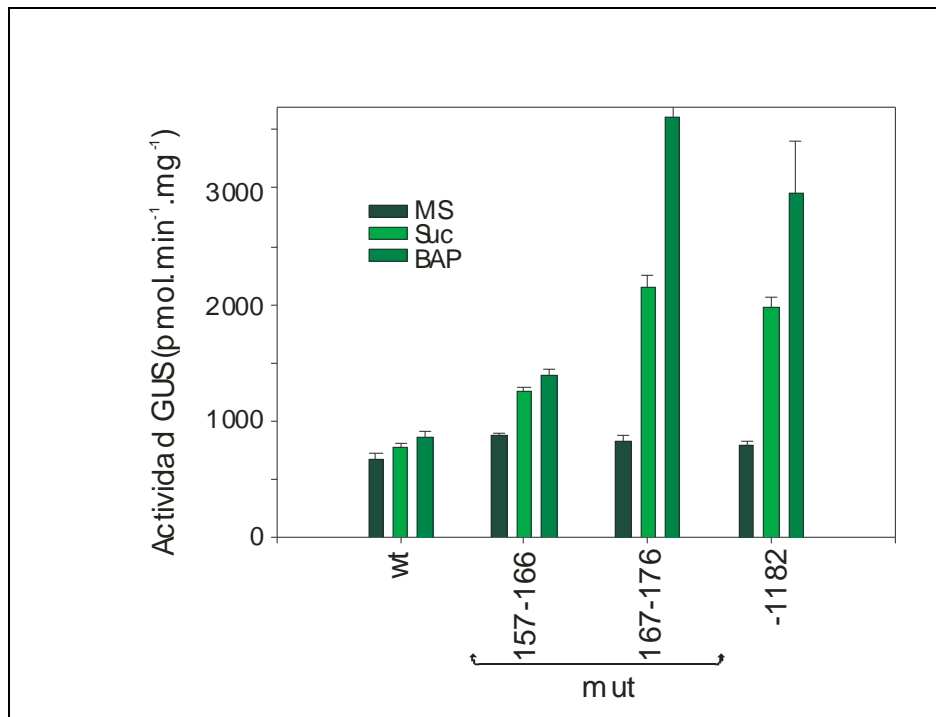
### 5.2.6 Inducción del promotor *cytc-1* por sacarosa y citoquininas:

Mediante el análisis de los niveles de transcritto del gen *cytc-1* en experimentos de northern blot, se observó que los mismos se encontraban regulados por la incubación de plantas adultas salvajes en soluciones conteniendo azúcares metabolizables (resultados descritos en el capítulo I). Para determinar si estos cambios en los niveles de mensajero se debían a modificaciones en los patrones de regulación a nivel transcripcional, se procedió a analizar el efecto de la sacarosa sobre la expresión GUS de plantas transformadas con distintas deleciones del promotor *cytc-1*.

La medición de la actividad enzimática  $\beta$ -glucuronidasa en extractos de plántulas transformadas con diferentes deleciones del promotor *cytc-1*, crecidas en un medio MS suplementado con sacarosa 3% (P/V), permitió concluir que todas las construcciones que tenían actividad GUS también mostraban inducción debido a la presencia de azúcares en el medio de cultivo. En todos los casos, los niveles de inducción medidos en las plántulas transformadas con las distintas deleciones resultaron comparables con los medidos en las plantas transformadas con el fragmento original sin deleccionar. Al analizar la actividad GUS de plántulas transformadas con el fragmento que comprendía las posiciones -218 a +54 mutagenizado en las distintas posiciones (ver fig. 26A), se vio que la mutación en las posiciones -157 a -166 disminuía notoriamente el efecto inductor de los azúcares (fig. 28). Debido a que estas plantas también mostraron niveles bajos de expresión, sobre todo en flores, se podría especular con la existencia de un mecanismo de regulación común, que involucre a los mismos elementos regulatorios presentes en esta región del promotor *cytc-1*. Bajo esta hipótesis, los mismos elementos que regularían la expresión en órganos estarían implicados en el control de los niveles de expresión debido a la presencia de azúcares metabolizables.

Por otra parte, debido a que el promotor *cytc-1* dirige una expresión preferencial en tejidos meristemáticos o con una alta tasa de proliferación, y teniendo en cuenta resultados previos obtenidos mediante experimentos de northern blot (no mostrados), se analizó el efecto de la citoquinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre los niveles de actividad GUS en plantas transformadas con las distintas deleciones y variantes mutagenizadas del promotor *cytc-1*. Los resultados obtenidos indicaron que la expresión GUS resultó aumentada en plántulas crecidas en un medio de cultivo conteniendo BAP 50  $\mu$ M (fig. 28). En todos los casos, las respuestas

obtenidas con plantas transformadas con las distintas construcciones coinciden con las observadas en el tratamiento con sacarosa, siendo los niveles de actividad GUS superiores en el caso del tratamiento con la hormona. Este resultado es coincidente con la hipótesis de que la regulación del gen *cytc-1* a nivel transcripcional se encuentra estrechamente relacionada con elementos involucrados en la expresión en etapas de activa proliferación celular.



**Figura 28: Inducción de la actividad GUS por azúcares y hormonas.** La actividad específica GUS fue medida usando el sustrato fluorogénico MUG y extractos de proteínas totales preparados a partir de plántulas de 10 días crecidas en medio MS sólo (condición control) o suplementado con sacarosa 3% (P/V) o BAP 50  $\mu$ M. El material vegetal utilizado para realizar las mediciones de actividad constituye una mezcla de cuatro líneas independientes de plantas transformadas con la construcción original (-1182), con dos mutaciones diferentes (-155/-166, -167/-176) de la construcción mínima -218 a +54, o de plantas salvajes (wt). Resultados similares fueron obtenidos en repeticiones del experimento utilizando otras líneas transgénicas independientes para el análisis.

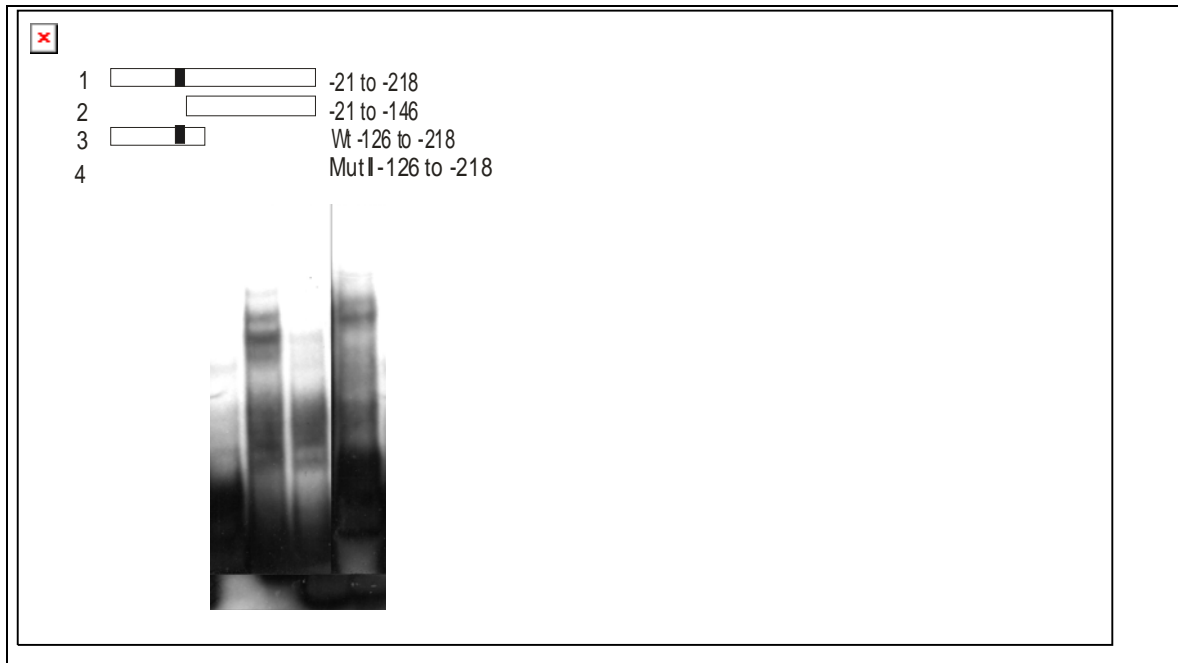
### 5.2.7 Proteínas presentes en extractos nucleares de coliflor unen específicamente regiones del promotor *cytc-1* requeridas para la transcripción:

Utilizando extractos de proteínas nucleares preparados a partir de inflorescencias de coliflor (*Brassica oleracea*), se analizó la presencia de proteínas capaces de reconocer regiones del promotor del gen *cytc-1*. El material vegetal para preparar los extractos nucleares fue elegido debido a que la coliflor constituye una rápida, fácil e importante fuente de proteínas presentes en tejidos meristemáticos. Además, presenta una cercanía filogenética con *Arabidopsis thaliana*, ya que ambas especies pertenecen a la misma familia de las brassicáceas.

En la figura 29A (calles 1 a 3) se observa un ensayo de retardo en geles en el que se enfrentaron proteínas presentes en el extracto nuclear preparado de inflorescencias y distintos fragmentos de la región promotora del gen *cytc-1*, comprendidos entre los nucleótidos -21 a -218 (calle 1), -21 a -146 (calle 2), ó -126 a -218 (calles 3 y 4). Pudo observarse que los fragmentos que contenían los elementos requeridos para la expresión del gen, identificados previamente mediante el análisis de transformantes de *Arabidopsis*, producían varios complejos de unión con un patrón similar (fig. 29A, calles 1 y 3). Además, se apreció una notoria disminución en la intensidad de las bandas de retardo en el gel cuando este fragmento, comprendido entre los nucleótidos -147 a -218, fue removido (fig. 29A, calle 2). Este resultado sugeriría que en el extracto de proteínas nucleares preparado a partir de inflorescencias de coliflor existirían proteínas con capacidad de reconocer y unir esta región del promotor *cytc-1*. Por otra parte, cuando se utilizó para el ensayo de unión un fragmento del promotor comprendiendo los nucleótidos -126 a -218 mutagenizado en los elementos *site II*, no fue posible observar la aparición de bandas de retardo en los geles. Se podría especular con la existencia de proteínas presentes en el extracto nuclear de coliflor que reconocerían y se estarían uniendo a los motivos *site II* (TGGGCC/T), esenciales para la expresión del gen *cytc-1* (fig. 29A, calle 4).

Resultados que apoyan a los observados en la figura 29A pueden apreciarse en la parte B de la misma figura. En este caso, se realizaron ensayos de competencia por la unión a las proteínas nucleares presentes en el extracto de inflorescencias de coliflor. Se utilizaron como fragmentos de ADN marcados radioactivamente tanto la forma salvaje del promotor (wild-type, WT) como la mutagenizada en el elemento *site II*. Mientras que un exceso molar de 10 ó 50 veces del fragmento sin mutagenizar produjo una fuerte disminución en la unión, no se observó ningún

efecto en la disminución de la unión cuando se usó para la competencia el fragmento mutado (fig. 29B, calles 1 a 5). Por otro lado, las débiles bandas de retardo observadas cuando se analizó la unión de proteínas nucleares con el fragmento mutado, fueron también más eficientemente competidas cuando se utilizó el fragmento del promotor con el elemento *site* // sin mutagenizar (fig 29B, calles 6 a 10). Si asumimos que en *Arabidopsis* obtendríamos la misma especificidad observada utilizando proteínas presentes en extractos nucleares de coliflor, podríamos decir que estamos ante la presencia de elementos reguladores fundamentales en la expresión del gen *cytc-1*.



**Figura 29:** Proteínas presentes en extractos nucleares de inflorescencias de coliflor unen específicamente fragmentos del promotor *cytc-1*.

**(A)** Extractos nucleares (3  $\mu\text{g}$ ) de inflorescencias de coliflor fueron analizados mediante ensayos de retardo en geles (EMSA) en busca de proteínas capaces de unir fragmentos de ADN comprendidos entre las posiciones -21 a -218 (calle 1), -21 a -146 (calle 2), o -126 a -218 (calle 3) del promotor *cytc-1*. En la calle 4 se utilizó un fragmento comprendido entre los nucleótidos -126 a -218 mutagenizado en los elementos *site II*. (WT: promotor salvaje, MUT: promotor mutagenizado).

**(B)** La unión de proteínas nucleares con el fragmento -126 a -218 marcado fue analizada en presencia de un competidor inespecífico (calle 1), o luego del agregado de 10 ó 50 veces de exceso de un competidor específico no marcado sin modificar (calles 2 y 3) o mutagenizado (calles 4 y 5). En las calles 6 a 10 se observa un experimento similar al descrito para las calles 1 a 5 pero utilizando como fragmento de ADN marcado a la forma mutagenizada del promotor.

### 5.2.8 Proteínas de la familia TCP unen la región mínima requerida para la expresión de *cytc-1*:

Se ha postulado que los elementos reguladores o motivos *site II* constituirían posibles sitios de reconocimiento y unión de un grupo de factores de transcripción que contienen una secuencia característica denominada dominio TCP (Kosugi y Ohashi, 1997; Trémousaygue y col.,

2003). Por este motivo, se analizó la capacidad de un fragmento del promotor *cytc-1* conteniendo esta secuencia, que demostró ser relevante para la expresión GUS en plantas transformantes de *Arabidopsis*, de unir proteínas pertenecientes a esta familia de factores de transcripción.

Se realizaron ensayos de unión *in vitro* y posterior análisis por corridas en geles de retardo entre secuencias contenidas dentro de la región mínima del promotor *cytc-1* y una de las proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción con motivos TCP de *Arabidopsis* (AtTCP20), expresada en forma recombinante (Trémousaygue et al., 2003). Se observaron bandas de retardo netas cuando esta proteína recombinante pura fue enfrentada a fragmentos de ADN marcados conteniendo la región del promotor entre los nucleótidos -126 a -218 (fig. 30A, calle 1). Al evaluar la unión de esta proteína a secuencias del promotor *cytc-1* mutagenizadas, como se indica en la figura 17A, pudo determinarse que: (i) las mutaciones introducidas entre las posiciones -187 a -196 o -177 a -186 (fig. 30A, calles 2 y 3) no parecen afectar el reconocimiento y la unión *in vitro* con la proteína recombinante AtTCP20; (ii) cuando es utilizado el fragmento marcado pero mutagenizado en los elementos *site II*, no fue posible observar bandas de unión netas de la proteína recombinante perteneciente a la familia TCP de factores de transcripción (fig. 30A, calle 4). Estos resultados, obtenidos mediante ensayos *in vitro*, sugerirían que miembros de esta familia TCP de factores de transcripción, dentro de los que la proteína TCP20 podría ser un buen candidato, actuarían como posibles reguladores de la expresión del gen *cytc-1*.

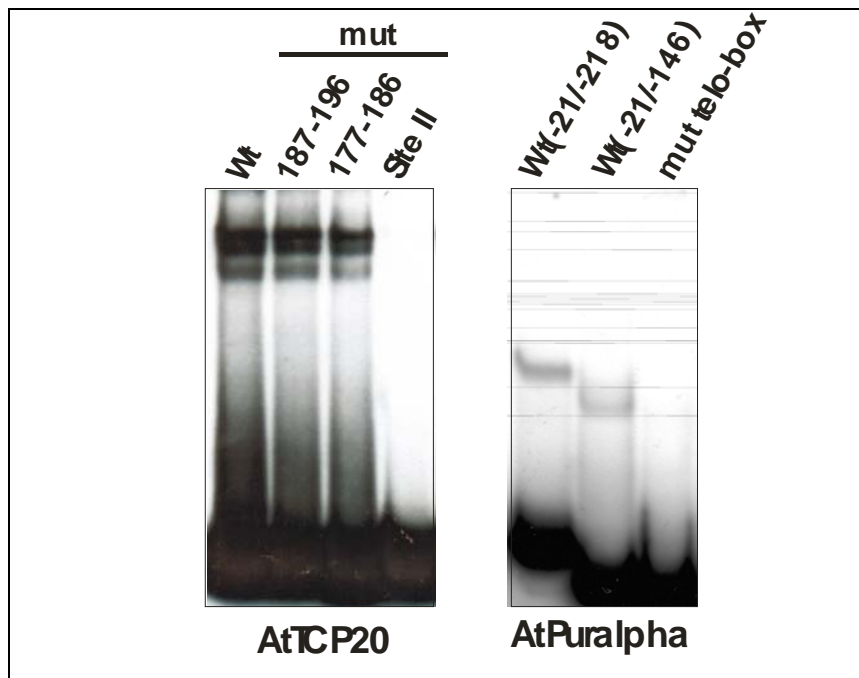


Figura 30: Ensayos de unión de las proteínas recombinantes AtTCP20 y AtPur $\alpha$  con el promotor *cytc-1*.

(A) Análisis de la unión de una alícuota (200 ng) de la proteína recombinante AtTCP20 con el promotor *cytc-1* mediante EMSA. Los fragmentos utilizados para los ensayos comprenden los nucleótidos -126 a -218, tanto sin modificar (calle 1), como mutagenizado entre las posiciones -187/-198 (calle 2), -177/-186 (calle 3) o en los elementos *site II* (calle 4).

(B) Ensayos de unión de la proteína recombinante AtPur $\alpha$  (200 ng) con fragmentos del promotor *cytc-1* comprendiendo los nucleótidos -21 a -218 (calle 1), -21 a -146 (calle 2), o -21 a -146 mutagenizado en el elemento *telo box* (calle 3).

Continuando con el análisis del promotor del gen *cytc-1*, se analizó la capacidad de una región de este promotor que contiene el elemento *telo box* de unir específicamente a la proteína recombinante de *Arabidopsis* AtPur $\alpha$ . En este sentido, existen datos previos que indican que esta proteína interaccionaría *in vitro* con este elemento (Trémousaygue et al., 1999). Ensayos de retardo en geles con fragmentos salvajes del promotor abarcando las posiciones -21 a -218 ó -21 a -146 mostraron una banda de retardo específica que no fue observada cuando fue utilizado un fragmento del promotor previamente mutagenizado en el elemento *telo box* (fig. 30B). Estos resultados indicarían la existencia dentro del promotor del gen *cytc-1* de un sitio de unión específico, el motivo *telo box*, que sería unido específicamente por la proteína recombinante AtPur $\alpha$ .

### 5.2.9 El elemento regulador *site II* está presente en numerosos genes codificantes para proteínas que participan en la vía respiratoria dependiente del citocromo *c*.

Teniendo en cuenta la potencial relevancia del elemento *site II* en la regulación de la expresión del gen *cytc-1* de Arabidopsis, y la hipótesis acerca de la existencia de mecanismos de control que regulen en forma coordinada la expresión de los genes nucleares implicados en la respiración mitocondrial, ya sea en condiciones fisiológicas normales o ante situaciones de estrés, se emprendió la búsqueda de este elemento regulador *site II* en genes de otros componentes de la vía respiratoria dependiente del citocromo *c* y en genes de citocromo *c* de otras especies vegetales.

Mediante la búsqueda en bases de datos de secuencias promotoras para el citocromo *c* en otras especies de plantas se encontraron cuatro secuencias, dos pertenecientes a arroz (*Oryza sativa*) y una cada una de *Brassica rapa* y *Medicago truncatula*. Al analizar la secuencia de *B. rapa* (n° de acceso AC155340), se identificaron cuatro motivos *site II* ubicados en las posiciones -359, -250, -160 y -133 a partir del sitio de inicio de la traducción. En este promotor de *Brassica* también se identificó un elemento *telobox*, pero a diferencia de lo observado en Arabidopsis, en este caso el mismo se ubica corriente arriba de los elementos *site II*, en la posición -381. Por otra parte, en *Medicago* (n° de acceso AC142095) se encontraron tres motivos presentes en las posiciones -925, -908 y -136. En arroz, el análisis de la región promotora del gen localizado en el cromosoma 5 (AC137623) reveló la existencia de dos elementos *site II* en las posiciones -295 y -81, mientras que el otro gen (AP003379) tiene cuatro copias de este elemento en las posiciones -641, -211, -93 y -84. Este gen contiene además una copia del motivo *telobox* en la posición -27, presentando en este caso un arreglo similar al observado en el promotor *cytc-1* de Arabidopsis.

Por otro lado, se analizaron 17 genes codificantes para proteínas que constituyen diferentes subunidades de la citocromo *c* oxidasa o proteínas supuestamente involucradas en la biogénesis del complejo. En la tabla 5.1 se ve que en 12 de los promotores analizados fue posible detectar la presencia de dos o más copias de este elemento regulador dentro de la región proximal comprendida entre el sitio de inicio de la traducción y la posición -350. Además, al realizar este análisis sobre regiones promotoras de genes codificantes para componentes del complejo III de la



cadena respiratoria, se vio que en 10 de un total de 15 genes analizados (67%) existe un arreglo similar al observado para genes del complejo IV.

Se debe mencionar, además, que existen dos elementos *site II* ubicados en la región promotora del otro gen codificante para citocromo *c* (*cytc-2*) de Arabidopsis.

Al realizar un análisis de la presencia de elementos *site II* en regiones comprendidas entre las posiciones -1 a -500 de 93 genes tomados al azar, se vio que solamente el 17% de los mismos contenían más de uno de estos motivos. Este resultado permitiría sugerir que el motivo *site II*, en el entorno de cada promotor en particular, podría ser un elemento implicado en la regulación de la expresión y en la coordinación de genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. En este sentido, se debería estudiar la relevancia o no de estos elementos mediante experimentos de mutagénesis en cada promotor en particular.

**Tabla 5.1:** Elementos *site II* presentes en los promotores de los genes *cytc*, *cox* y genes del Complejo III de Arabidopsis

| Gen             | Código MIPS | Número de elementos<br><i>site II</i> <sup>a</sup> | Ubicación <sup>b</sup> |
|-----------------|-------------|--|------------------------|
| <i>cytc</i>     | At1g22840   | 2  | -147/-168              |
|                 | At4g10040   | 2  | -259/-271              |
| <i>cox5b</i>    | At1g80230   | 1  | -145                   |
|                 | At3g15640   | --   | --                     |
| <i>cox5c</i>    | At2g47380   | 3  | -151/-170/-383c        |
|                 | At3g62400   | 2  | -128/-141c             |
|                 | At5g61310   | --   | --                     |
| <i>cox6a</i>    | At4g37830   | 3  | -116/-127/-138         |
| <i>cox6b</i>    | At1g22450   | 2  | -190/-217              |
|                 | At4g28060   | 2  | -157/-173              |
|                 | At5g57815   | 3  | -128/-140/-151         |
| <i>cox10</i>    | At2g44520   | 2  | -210/-267              |
| <i>cox11</i>    | At1g02410   | 3  | -294/-308/-318c        |
| <i>cox15</i>    | At5g56090   | --   | --                     |
| <i>cox17</i>    | At1g53030   | 4  | -120/-131/-142/-453c   |
|                 | At3g15352   | 3  | -206/-228/-235c        |
| <i>cox19</i>    | At1g66590   | 2  | -154/-164              |
|                 | At1g69750   | 2  | -154/-164              |
| <i>sco1</i>     | At3g08950   | 1  | -232                   |
| <i>cyc1</i>     | At3g27240   | 3  | -169/-179/-201c        |
|                 | At5g40810   | 2  | -199/-222c             |
| <i>mppalpha</i> | At1g51980   | 3  | -179/-220/-227         |
|                 | At3g16480   | 3  | -172/-195/-231         |
| <i>mppbeta</i>  | At3g02090   | 2  | -266/-278              |
| <i>qcr6</i>     | At1g15120   | 3  | -156/-183/-228c        |
|                 | At2g01090   | 2  | -147/-201c             |
| <i>qcr7</i>     | At4g32470   | 4  | -133/-145/-206/-241    |
|                 | At5g25450   | --   | --                     |
| <i>qcr9</i>     | At3g52730   | 4  | -164/-188/-230/-304    |
| <i>ucr1</i>     | At5g13430   | --   | --                     |
|                 | At5g13440   | 1  | -314                   |
| <i>ucrq</i>     | At3g10860   | --   | --                     |
|                 | At5g05370   | 2  | -129/-147              |
| <i>ucry</i>     | At2g40765   | --   | --                     |

**Tabla 5.1 (continuación): Elementos *site //* presentes en los promotores de los genes *cytc*, *cox* y genes del Complejo III de Arabidopsis.**

<sup>a</sup> Número de motivos *site //* presentes entre las posiciones -1 y -500 desde el sitio de inicio de la traducción.

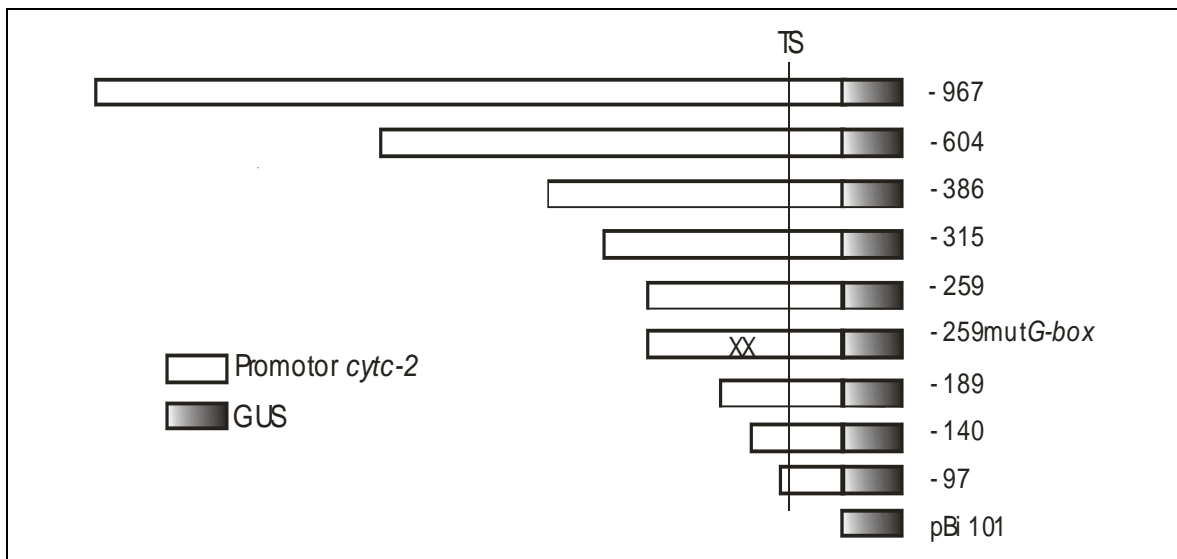
<sup>b</sup> Respecto del sitio de inicio de la traducción.

<sup>c</sup> Estos genes contienen intrones en la región no codificante 5'. La ubicación del motivo *site //* está referida al sitio de inicio de la traducción, no teniendo en cuenta las secuencias intrónicas.

### 5.2.10 Análisis de la región promotora del gen *cytc-2*:

Retomando el análisis de la región promotora del gen codificante para la isoforma 2 del citocromo *c* (*cytc-2*), con la finalidad de profundizar el estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan la expresión de este gen, se realizaron construcciones conteniendo deleciones sucesivas de la región 5' del mismo, partiendo del fragmento de 1021 pb (-967 a +54) utilizado para el análisis en el punto 5.2.2. En la figura 31 puede observarse un esquema de las distintas construcciones realizadas. Como en los análisis previos, los distintos fragmentos del promotor *cytc-2* fueron clonados en fase en el vector binario pBI101.3 y luego estas construcciones fueron introducidas en plantas de Arabidopsis a fin de obtener transformantes estables cuya expresión GUS permita evaluar la actividad promotora de cada fragmento analizado.

De manera preliminar, se realizó un análisis de numerosas líneas de Arabidopsis transformadas con deleciones sucesivas que abarcaron fragmentos del promotor hasta las posiciones -604, -386, -315, -259, -189, -140 y -97, tomadas siempre desde el inicio de la traducción (ver figura 31). Además se realizó una construcción en la cual se mutagenizó un elemento de tipo "*G-box*" (-259 mut*G-box*), identificado en la posición -172, dentro de este fragmento del promotor *cytc-2*. La mutación incluyó el cambio de CACGTG por CAATGG, en el contexto del fragmento que abarca hasta la posición -259. Como control se utilizaron plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (pBI101.3).



**Figura 31:** Esquema de las distintas construcciones generadas por delección del promotor *cytc-2*. Los números indican la posición del extremo 5' del promotor presente en cada una de las construcciones, tomadas con respecto al sitio de inicio de la traducción. El extremo 3' corresponde a la posición +54 para todas las construcciones. TS indica el sitio putativo de inicio de la transcripción deducido a partir de los ADNc disponibles. La construcción -259 mutG-box corresponde a una mutación puntual en el elemento *G-box*, en el contexto de un fragmento del promotor que abarca hasta la posición -259. Como control se utilizaron plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor (pBI101.3).

#### 5.2.10.1 Análisis de la región promotora del gen *cytc-2* por histoquímica:

Mediante el análisis de las plantas transformadas con las distintas delecciones por la técnica histoquímica se observó el patrón de expresión GUS característico para este promotor, descrito en el punto 5.2.2 (ver figura 23). Esta expresión del gen reportero en el tejido vascular de raíces, hipocotilos, cotiledones y hojas y en los órganos reproductivos, fue evidenciada en todas las plantas transformadas con las construcciones del promotor *cytc-2* hasta aquella que finaliza en la posición -189 inclusive. A su vez, como puede observarse en la figura 32, existiría una importante disminución en los niveles de expresión detectados entre las plantas transformadas con la construcción que incluye hasta la posición -259 del promotor *cytc-2*, con respecto de las transformantes hasta la posición -315 (fig. 32 A-B, E-F, M-N). Si bien los patrones de localización histoquímica resultaron coincidentes, los niveles de tinción observados para la construcción -259

fueron significativamente menores. Esta disminución en la expresión GUS detectada se mantuvo en las plantas transformadas con la siguiente delección generada hasta la posición -189 (fig. 32 I-J). En plantas de *Arabidopsis* transformadas con las construcciones que contenían los fragmentos del promotor hasta las posiciones -140 y -97 no fue posible detectar expresión del gen reportero *gus*.

Es importante destacar en este punto que la construcción que abarca posibles secuencias reguladoras de la expresión del gen *cytc-2* hasta la posición -315, incluye dos copias del elemento regulador *site II*, mientras que en la delección hasta la posición -259 este motivo se encuentra ausente. En este sentido, en el momento de diseñar las construcciones para efectuar el análisis de esta región promotora, la presencia de estas dos copias del motivo *site II* fue tomada en cuenta a fin de evaluar la importancia o no de este elemento en la regulación de la expresión de la isoforma 2 codificante para el citocromo *c*. En base a estos ensayos preliminares podríamos decir que este motivo *site II* estaría implicado en la determinación de los niveles de expresión de *cytc-2*, actuando en combinación con otro/s elemento/s reguladores no identificados hasta el momento.

Por otra parte, una vez delimitada la región mínima del promotor *cytc-2* capaz de dirigir la expresión del gen reportero *gus*, se decidió profundizar el análisis de este fragmento comprendido entre las posiciones -189 a -140 a fin de identificar los posibles elementos que solos o en combinación con otros motivos presentes, como por ejemplo los elementos *site II*, serían los responsables de establecer los patrones de expresión observados. Para comenzar con este análisis, se realizó una búsqueda de elementos reguladores en *cis* presentes en este fragmento del promotor que fueran descritos previamente en la bibliografía y de esta manera se generó una construcción en la que se mutagenizó el motivo *G-box* (CACGTG) en el contexto del promotor que abarca hasta la posición -259. El análisis de las plantas de *Arabidopsis* transformadas con esta construcción (-259mut*G-box*) permitió evidenciar una marcada disminución de la expresión GUS en todos los órganos en los que fue posible detectarla: hipocotilos, cotiledones, raíces, hojas y flores (ver fig. 32 C, G, K, O).

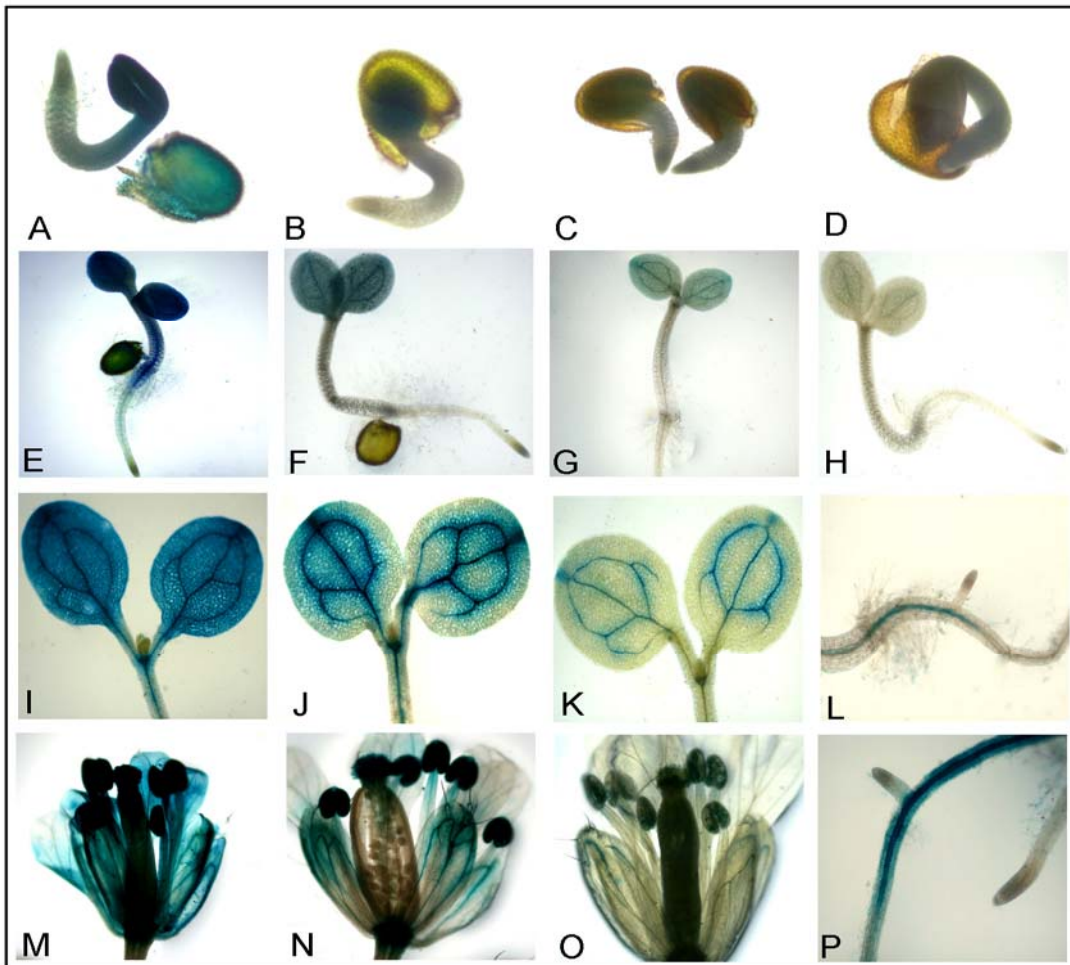


Figura 32: Análisis por histoquímica de la actividad GUS en plantas de *Arabidopsis* transformadas con delecciones del promotor *cytc-2* y una mutante puntual en el elemento *G-box* fusionadas al gen reportero *gus*. (A-D) plántulas de 1 día. Fragmentos del promotor *cytc-2* fusionados a *gus*: (A) -967, (B) -259, (C) -259mut*G-box*, (D) wt. (E-H) plántulas de 2 a 4 días. Fragmentos del promotor *cytc-2* fusionados a *gus*: (E) -315, (F) -259, (G) -259mut*G-box*, (H) wt. (I-K) plántulas de 6 días. Fragmentos del promotor *cytc-2* fusionados a *gus*: (I) -967, (J) -189, (K) -259mut*G-box*. (L, P) raíces de plántulas de 6 días. Fragmentos del promotor *cytc-2* fusionados a *gus*: (L) -259mut*G-box*, (P) -315. (M-O) flores. Fragmentos del promotor *cytc-2* fusionados a *gus*: (M) -967, (N) -259, (O) -259mut*G-box*.

Este elemento *G-box* ha sido descrito por otros autores como un elemento regulador en *cis* positivo, implicado en respuestas a numerosos efectores ambientales o fisiológicos como lo son la luz, la anaerobiosis, el ácido abscísico o el metiljasmonato (Block y col., 1990; Guiltinan y col., 1990; Menkens y col., 1995; Nagao y col., 1993; de Vetten y col., 1994). El mismo ha sido identificado en regiones 5' de numerosos genes de plantas, entre los que se destacan los promotores de los genes *rbc*s (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa) en *Arabidopsis* y soja, y los genes codificantes para la proteína patatina en papa (Williams y col., 1992). Además, este elemento y otros motivos relacionados que poseen la secuencia central ACGT están ampliamente distribuidos en regiones promotoras en la mayoría de los organismos eucariotas. En vista de los resultados preliminares obtenidos podríamos especular con la idea de que este motivo también estaría implicado en la regulación de la expresión del gen *cytc-2* en *Arabidopsis*, al menos en el control de los niveles basales de expresión. Serán necesarios otros análisis a fin de determinar la implicancia real de este elemento en la regulación de la expresión de este gen frente a cambios en las condiciones fisiológicas o ambientales del entorno celular.

Aunque se trata de resultados preliminares, podríamos decir que en la región promotora del gen *cytc-2* existirían numerosos elementos reguladores en *cis* responsables de ajustar los patrones y niveles de expresión de este gen. Si bien no son mostrados los resultados obtenidos con todas las deleciones generadas (-967, -604, -386, -315, -259, -189, -149, -97), podríamos decir que hasta la posición -315 de este promotor tanto los niveles como los patrones de expresión parecerían ser comparables. Al eliminar las copias del elemento regulador *site II* en la siguiente deleción hasta la posición -259, los niveles de expresión se verían disminuidos. Este descenso se haría más marcado aun cuando sobre esta construcción se elimina al elemento regulador en *cis* *G-box*. Además, existirían otros motivos responsables de los patrones de expresión observados, ya que cuando se realiza una deleción hasta la posición -140 la expresión GUS se vuelve indetectable. Será necesario profundizar el análisis mutagenizando otros fragmentos dentro de la región promotora y efectuando ensayos frente a diferentes condiciones metabólicas a fin de establecer con más detalle los mecanismos que regulan la expresión de este gen a nivel transcripcional.

### 5.3 Discusión:

Con el propósito de dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión de los genes codificantes para el citocromo *c* (*cytc-1* y *cytc-2*) en *Arabidopsis thaliana*, se procedió al estudio de las regiones promotoras de los mismos. Mediante el análisis de plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con distintas delecciones de los promotores de ambos genes se identificaron algunos de los elementos reguladores en *cis*, probablemente implicados en el control de la expresión de los mismos, lográndose establecer los patrones de expresión diferenciales de ambas isoformas codificantes para el citocromo *c* en *Arabidopsis*.

El análisis por histoquímica de la expresión GUS en los distintos órganos de plantas transformantes de *Arabidopsis* indicó que ambos fragmentos de aproximadamente 1 kpb correspondientes a las regiones 5' de cada gen fueron capaces de dirigir la expresión del gen reportero en anteras, específicamente en los granos de polen. En el resto de los órganos donde la expresión GUS fue analizada se observó un patrón de expresión completamente diferencial para ambos genes en estudio. Por un lado, se observó que la región promotora del gen *cytc-1* fue capaz de dirigir una expresión GUS activa en tejidos de alta proliferación celular como lo son las células presentes en las regiones meristemáticas de la planta. En este sentido, se detectó una tinción fuerte en las células del meristema apical del vástago, en el meristema de raíces primarias y secundarias, y en las células del ápice de cotiledones y hojas jóvenes. Por el contrario, la expresión del gen *gus* conferida por un fragmento de 1021 pb correspondiente a la región promotora del gen *cytc-2* fue observada en tejidos vasculares de hipocotilos, cotiledones, hojas y raíces, no pudiendo ser detectada en los primordios de hojas o las regiones meristemáticas en general. Además, en el promotor *cytc-2* se observó una fuerte expresión GUS en flores, no sólo en granos de polen como se vio con el promotor *cytc-1*, sino también en las venas de los pétalos y en la zona de unión de las flores y vainas con el pedicelo. En las vainas, también pudo detectarse expresión GUS específicamente en las células del séptum y del funículo.

Mediante la realización de ensayos fluorométricos fue posible cuantificar la actividad enzimática  $\beta$ -glucuronidasa en los diferentes órganos de estas plantas de *Arabidopsis* transformantes. Como era de esperarse, los resultados fueron coincidentes con los patrones de expresión observados por histoquímica. Para el promotor *cytc-1* la mayor actividad GUS fue



medida en extractos proteicos preparados a partir de flores, mientras que para el promotor *cytc-2* los niveles de actividad  $\beta$ -glucuronidasa fueron significativamente más altos en todos los órganos donde la misma fue medida (hojas, raíces, vainas y flores). Además, los niveles de actividad enzimática más altos fueron obtenidos en extractos de hojas.

Al efectuar un análisis de los patrones de expresión GUS conferidos por las regiones promotoras de ambos genes codificantes para el citocromo *c* podríamos decir que los fragmentos de aproximadamente 1 kpb tomados como punto de partida para efectuar este estudio permitieron establecer patrones de expresión en localizaciones diferentes. De esta manera, la expresión de las isoformas codificantes para el citocromo *c* parecería complementarse, excepto en granos de polen en los que se observó una fuerte expresión GUS dirigida por ambos promotores, por lo que existiría un solapamiento en estos tejidos. Si bien poco es lo conocido acerca de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial en plantas, se ha establecido que numerosos genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales tienen su expresión aumentada en flores (Huang y col., 1994; Felitti y col., 1997; Heiser y col., 1997). Además, el análisis de la expresión de otros genes codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial mediante hibridización *in situ* y estudios de las regiones promotoras fusionadas a *gus* han permitido observar que la expresión localizada a nivel de las anteras sería una característica común de la mayoría de los genes codificantes para componentes de la cadena de transporte de electrones (Zabaleta y col., 1998; Ribichich y col., 2001; Thirkettle-Watts y col., 2003; Elorza y col., 2004; Curi y col., 2005; resultados de nuestro laboratorio aún no publicados), mientras que la expresión en otros órganos de la planta diferiría según el gen en particular. Esta localización general de la expresión en anteras para la gran mayoría de genes nucleares codificantes para componentes de la cadena respiratoria mitocondrial estudiados hasta el momento, 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). Una vez más, estos resultados obtenidos para el control de la expresión de ambas isoformas codificantes para el citocromo *c* en *Arabidopsis* contribuirían a la idea de la existencia de una regulación coordinada de la expresión de los genes durante la biogénesis mitocondrial en estos tejidos.

Con el objetivo de realizar un examen más profundo y de identificar los elementos responsables de dirigir la expresión de los genes codificantes para el citocromo *c*, se realizaron una serie de deleciones sucesivas de ambas regiones promotoras y se estudió la capacidad de las mismas de dirigir la expresión GUS en los diferentes tejidos de plantas transformantes de *Arabidopsis*. Mediante un exhaustivo análisis sobre líneas independientes de plantas transformadas con las construcciones generadas a partir del fragmento de 1,23 Kpb del promotor *cytc-1*, se estableció que la región mínima necesaria para dirigir la expresión del gen reportero comprendía un fragmento proximal de 272 pb. Dentro de este fragmento, delimitado por las posiciones -218 a +54, se encontrarían presentes los elementos responsables de dirigir la expresión tejido específica y de regular la respuesta a carbohidratos y hormonas que evidenciaron las plantas transformadas con las diferentes deleciones del promotor *cytc-1*. Mediante la mutagénesis puntual de esta región esencial y el análisis de las transformantes tanto por histoquímica como por fluorimetría se logró identificar un motivo, informado previamente en la bibliografía como elemento *site II* (TGGGCC/T) (Kosugi y col., 1995; Kosugi y Ohashi, 1997; Trémousaygue y col., 2003), que sería el responsable de dirigir la expresión de este gen *cytc-1*. En este sentido, en las plantas de *Arabidopsis* transformadas con el fragmento proximal de 272 pb mutagenizado en dos copias del elemento *site II* presentes dentro del mismo no fue posible detectar expresión GUS en ningún tejido. Además, los niveles de actividad enzimática de extractos de plantas controles o crecidas en soluciones conteniendo azúcares u hormonas fueron comparables con los obtenidos con plantas salvajes o con plantas transformadas con el gen *gus* sin promotor. Las plantas transformadas con un fragmento del promotor en el que sólo se mutagenizó uno de los dos elementos *site II* presentes (mutante -157/-166) mostraron una disminución de los niveles de expresión tanto por histoquímica como por fluorimetría. Por esto, de acuerdo con estos experimentos de mutagénesis puntual en las copias del motivo *site II* presentes en esta región mínima del promotor *cytc-1*, sólo la copia que se encuentra más próxima al codón ATG sería realmente esencial para la expresión del mismo, mientras que la mutagénesis de la otra sólo permitiría observar una disminución en los niveles de expresión.

De acuerdo con reportes disponibles en la bibliografía, este motivo *site II* (TGGGCC/T) fue identificado por primera vez en la región promotora del gen codificante para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) de arroz (Kosugi y col., 1995). Esta proteína auxiliar de la ADN polimerasa  $\gamma$  está ampliamente conservada entre los eucariotas y se encuentra fuertemente expresada durante la transición de las fases  $G_0(G_1)$ -S del ciclo celular. La expresión de esta

proteína se encuentra regulada a nivel transcripcional, siendo detectada en tejidos de alta división y proliferación celular como lo son el meristema apical de tallos y raíces, en hojas inmaduras, y en hojas maduras luego de la inducción por fitohormonas (Kosugi y col., 1991). Mediante la mutagénesis puntual de dos elementos denominados *site IIa* (TGGGCCCGT) y *IIb* (TGGTCCCAC) ubicados dentro de un fragmento truncado hasta la posición -263 del promotor de este gen, Kosugi y colaboradores (1995) demostraron que estos elementos tendrían un papel fundamental en la expresión de este gen *pcna* en el tejido meristemático de plantas transformantes de tabaco. Más tarde, se observó que este elemento *site II* era capaz de conferir una expresión meristemática del gen *gus* aún actuando dentro de un promotor mínimo y se encontraría sobrerrepresentado en las regiones promotoras de numerosos genes relacionados con el control del ciclo celular, sobre todo aquellos sobreexpresados en la transición de las fases G<sub>1</sub> a S en promotores de genes regulados por auxinas en arroz (Kosugi y col., 1991), y en genes codificantes para proteínas ribosomales y para proteínas relacionadas con la síntesis de ADN, en Arabidopsis. (Trémouysague y col., 2003).

Además, este elemento regulador *site II* actuaría en combinación con otro motivo denominado *telo box*. Este elemento regulatorio lleva su nombre (*internal telomeric repeat*) debido a que su secuencia (AAACCCTAA) se asemeja a la secuencia de ADN repetitiva de las regiones teloméricas de los cromosomas de plantas ((AAACCCT)n). Este motivo *telo box*, que también estaría sobrerrepresentado en el genoma de Arabidopsis, fue identificado primeramente en las regiones 5' de todos los genes codificantes para proteínas implicadas en la maquinaria traduccional, ya sea corriente arriba o después del sitio de inicio de la transcripción (Trémouysague y col., 1999). Más tarde, su presencia se asoció con la de otros motivos presentes en las regiones regulatorias de genes que se encontraban sobreexpresados durante la fase G<sub>1</sub> a S del ciclo celular (Manevski y col., 2000). Se comprobó que este elemento *telo box* aumentaría los niveles de expresión GUS en las células presentes en las regiones meristemáticas de raíces, tallos y en hojas inmaduras, actuando sinérgicamente con otros motivos reguladores. Además de la asociación estudiada con los elementos *site II* en promotores de genes de Arabidopsis (Trémouysague y col., 2003), otros estudios realizados previamente demostraron una relación sinérgica con otras cajas regulatorias: (i) el elemento *tef box* (ARGGRYANNNGT), en el promotor del gen *eEF1a* codificante para un factor de elongación de la traducción en Arabidopsis; (ii) el elemento *trap40 box* (GGGGGTAGAATAG), en el promotor del gen codificante para la proteína ribosomal Ap40 de Arabidopsis; (iii) los elementos *site IIa* (TGGGCCCGT) y *IIb* (TGGTCCCAC) en el promotor del gen *pcna* de arroz (Manevski y col., 2000). De forma

interesante, este motivo *telo box* también se encontró presente en la región promotora del gen *cytc-1*, conservando además la misma asociación topológica que mantendría con otros elementos reguladores en *cis* en el resto de los promotores en los que se lo ha encontrado. Mediante el análisis de las transformantes de *Arabidopsis* conteniendo la región mínima del promotor *cytc-1* mutagenizada en este motivo *telo box*, pudimos observar tanto por histoquímica como por fluorimetría una fuerte disminución en la expresión GUS. De esta manera sólo fue posible detectar expresión del reportero en flores abiertas, a nivel de los granos de polen, siendo imposible observar tinción en las células de las regiones meristemáticas de raíces, primordios de hojas o en las células del ápice de cotiledones u hojas jóvenes.

Tanto los patrones de expresión observados, como los resultados obtenidos mediante mutagénesis puntual de los elementos reguladores *site II* y *telo box* identificados dentro del fragmento del promotor *cytc-1* requerido para la expresión del gen reportero GUS, coincidirían con los resultados previos reportados para los promotores de los genes *pcna* de arroz (Kosugi y Ohashi, 1995; 2002) y *Arabidopsis* (Trémouysague y col., 2003). Además, esta asociación (*site II* +*telo box*) fue identificada en las regiones promotoras de un gran número de genes que se encontrarían sobreexpresados durante la proliferación celular activa en respuesta a señales que promoverían el crecimiento axilar en plantas de *Arabidopsis* (Tatematsu y col., 2005).

Por otro lado, mediante experimentos de retardo en gel (EMSA), se observó que la región mínima del promotor *cytc-1* conteniendo los elementos *site II* era capaz de unir proteínas presentes en extractos nucleares preparados a partir de inflorescencias de coliflor. Además, tanto por ensayos de competencia como de unión de los extractos con formas del promotor mutagenizado en ambos motivos *site II*, se demostró que las bandas de retardo observadas se debían específicamente al reconocimiento de la secuencia TGGGCC/T por parte de la/s proteína/s presentes en los extractos nucleares.

Al respecto, existen datos en la bibliografía que establecen que los elementos *site II* constituyen secuencias "blanco" de reconocimiento de proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción específica de plantas denominada TCP (*Teosinte branched1*, *Cycloidea*,

*PCFs*) (Riechmann y col., 2000). Esta familia de reguladores de la transcripción se caracteriza por poseer un dominio básico hélice-vuelta-hélice (bHLH) no canónico dentro de su estructura (Cubas y col., 1999). Dentro de los integrantes de esta familia, que además le dan su nombre, se encuentran los genes *cycloidea* (*cyc*) y *dichotoma* (*dich*), responsables de la asimetría dorsoventral de las flores de *Antirrhinum*, el gen *tb1* que controla la formación de los meristemas axilares en maíz (Cubas y col., 1999) y los genes *pcf1* y *pcf2* que fueron identificados por primera vez en arroz y codifican proteínas implicadas en el reconocimiento y unión de los elementos *site II* presentes en el promotor *pcna* de arroz (Kosugi y Ohashi, 1997). Las características comunes de los integrantes de esta familia (*cyc* controla el crecimiento de primordios y meristemas florales, *tb1* afecta el desarrollo de meristemas axilares y las proteínas PCF1 y PCF2 unen el promotor de un gen (*pcna*) fuertemente expresado en regiones meristemáticas) sugieren un importante papel de los miembros de esta familia en la regulación de los procesos de crecimiento y división celular (Cubas y col., 1999; Kosugi y Ohashi, 1997; 2002). Esta familia de proteínas está compuesta a su vez por dos subfamilias, las proteínas de clase I (subfamilia PCF) y las de clase II (subfamilia CYC/TB1). Las secuencias de ADN reconocidas por las proteínas de clase I (GGNCCCAC) y clase II (GTGGNCCC) presentan características comunes (Kosugi y Ohashi, 2002). Sin embargo, las proteínas de clase I han sido identificadas como reguladores positivos, ejerciendo una estimulación de la proliferación celular tanto en primordios laterales como en meristemas de raíces, mientras las TCP de clase II actuarían como reguladores negativos en los mismos procesos. De esta manera, se ha propuesto un modelo para explicar el crecimiento de los órganos a partir de la diferenciación de las células en la región meristemática, regulado por un balance de las actividades antagónicas de las proteínas TCP de clase I y II (Li y col., 2005).

A fin de profundizar en el estudio del papel de los elementos *site II* en la regulación de la expresión del gen *cytc-1*, se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando uno de los miembros pertenecientes a esta familia TCP de factores de transcripción expresado en forma recombinante. Al ensayar la proteína AtTCP20 observamos bandas de retardo correspondientes al reconocimiento y unión de la misma a la región mínima del promotor *cytc-1* conteniendo la secuencia TGGGCC/T salvaje, y no así a la forma mutagenizada. Previamente, Trémouysague y colaboradores (2003), demostraron que la proteína AtTCP20 fue capaz de reconocer y unir los elementos *site IIa* y *IIb* presentes en la región promotora del gen *pcna* de Arabidopsis. Además,

mediante experimentos de doble-híbrido en levaduras demostraron la existencia de una interacción física entre esta proteína AtTCP20 y el factor de transcripción AtPur $\alpha$ . La proteína AtPur $\alpha$ , relacionada en estructura y función con la proteína Pur $\alpha$  de humanos, había sido aislada previamente mediante experimentos de south-western utilizando una biblioteca de expresión y la secuencia característica de los motivos *telo box* (AAACCCT) (Trémouysague y col., 1999). De esta manera se postuló que esta proteína At-Pur $\alpha$ , que también es capaz de reconocer y unir el motivo *telo box* presente en el promotor *cytc-1*, estaría implicada a través de su interacción con el elemento regulador en *cis* AAACCCTAA y con proteínas de la familia TCP, en el control de la transcripción y la regulación de genes sobreexpresados durante la transición G<sub>1</sub>-S del ciclo celular (Manevski y col., 2000; Trémouysague y col., 1999; 2003).

De esta manera puede concluirse que los motivos *site II* (TGGGCC/T) y *telo box* (AAACCCTAA) presentes en la región promotora putativa del gen *cytc1*, han sido identificados en regiones 5' de un gran número de genes dentro del genoma de *Arabidopsis* y de otras especies de plantas, conservando la misma asociación topológica en la mayoría de los casos. Además, la presencia de los mismos ha sido relacionada con la expresión de genes involucrados en la regulación del ciclo celular (Li y col., 2005) y con numerosos genes codificantes para proteínas ribosomales de *Arabidopsis* (Trémouysague y col., 2003), así como con la expresión de genes en células en activa proliferación (Kosugi y col., 1991; 1995; Kosugi y Ohashi, 1997; Tatematsu y col., 2005). Notoriamente, los elementos *site II* también se encuentran sobrerrepresentados en regiones promotoras de genes codificantes para componentes de los complejos I, III, IV y V de *Arabidopsis* y de arroz, existiendo en la mayoría de los promotores más de una copia, generalmente ubicadas entre las posiciones -50 a -300 del sitio de inicio de la transcripción (resultados no publicados). Esta observación, sumada a los resultados obtenidos en este capítulo y a los datos disponibles en la bibliografía, sugeriría la existencia de una posible intercomunicación entre los mecanismos de proliferación celular y la biogénesis de un número importante de componentes de la vía de transporte de electrones mitocondrial.

Por otro lado, al efectuar un análisis más detallado de la región promotora del gen *cytc-2*, se identificó la presencia de dos copias del elemento *site II* dentro del fragmento 5' requerido para

la expresión GUS. Al parecer, este elemento también estaría implicado en la expresión del gen *cytc-2* en los tejidos en los que este se expresa. Una explicación probable para justificar la importancia que se le otorga a la existencia de este elemento *site II* en dos promotores que dirigen la expresión en diferentes tejidos sería que este motivo actuaría en combinación con otro/s motivo/s regulador/es en *cis* a fin de ajustar la expresión de los genes de acuerdo a los requerimientos celulares y las etapas específicas del ciclo celular.

Otra posible explicación podría fundamentarse en las hipótesis planteadas por el modelo DDC (duplicación-degeneración-complementación) (Harberer y col., 2004). A la luz de estos resultados, podría especularse con la idea de que luego del evento de duplicación ambos genes habrían divergido de manera de especializarse en alguna función en particular. Esta especialización podría haber tenido lugar mediante la modificación de los elementos presentes en las regiones promotoras de los mismos (Vision y col., 2002; Harberer y col., 2004). De esta manera estos genes habrían evolucionado modificando y/o incorporando otras secuencias reguladoras que, junto al motivo *site II*, permitieron el mantenimiento de ambas copias del gen. Ambos genes habrían modificado sus patrones y niveles de expresión en los diferentes órganos de la planta de acuerdo con requerimientos celulares específicos, y según la función de cada uno en particular.

Otra secuencia reguladora identificada dentro del promotor *cytc-2* fue la correspondiente al motivo *G-box*, cuya secuencia consenso es CCACGTGG. Este elemento regulador ha sido ampliamente estudiado en regiones promotoras de otros genes (Williams y col., 1992; Hong y col., 1995; de Vetten y col., 1994) y su presencia se relaciona con la regulación de la expresión de los mismos en respuesta a condiciones de iluminación, al ácido absísico y al metiljasmonato, entre otros (Block y col., 1990; Guiltinan y col., 1990; Menkens y col., 1995; Nagao y col., 1993). En este sentido, Kosugi y colaboradores (1995) identificaron un motivo similar CAGGTGG, denominado *site I*, que diferiría sólo en 1 pb con respecto a la secuencia consenso del elemento *G-box*, encontrado entre las posiciones -205 y -165 de la región promotora del gen *pcna* de arroz. Este motivo *site I* sería reconocido por proteínas recombinantes de la familia de factores de transcripción bZIP que también se unirían a los motivos *G-box*. En *pcna*, el elemento *site I* actuaría

en combinación con los motivos *site Ila* y *Ilb* ejerciendo las funciones de un regulador transcripcional positivo (Kosugi y col., 1995).

Estableciendo un paralelismo con los resultados descritos más arriba para el promotor *cytc-1*, en el que el elemento regulador *site II* actuaría coordinadamente con el motivo *telobox* para regular la expresión en regiones meristemáticas y en tejidos de proliferación celular activa en el promotor *cytc-2* este mismo elemento *site II* actuaría en combinación con el motivo *G-box* y con otro/s elemento/s regulador/es en *cis* a fin de ajustar la localización de la expresión de este gen principalmente a nivel del tejido vascular de plantas de *Arabidopsis*. Nuevamente, los resultados mostrados para el promotor *cytc-2* constituyen datos preliminares. Será necesario profundizar el análisis mutagenizando otros fragmentos dentro de la región promotora y efectuando ensayos frente a diferentes condiciones metabólicas a fin de establecer los mecanismos que regulan la expresión de este gen a nivel transcripcional.

En conclusión, en este capítulo se describe el estudio de las regiones promotoras de los genes *cytc-1* y *cytc-2* de *Arabidopsis thaliana*. Mediante el análisis de la expresión del gen reportero *gus* dirigida por distintas deleciones y/o mutaciones puntuales de los elementos reguladores presentes en las regiones promotoras de estos genes se establecieron patrones diferenciales de expresión. Además, se plantea que la expresión del gen codificante para la isoforma 1 del citocromo *c* estaría regulada por los elementos *site II* y *telobox*. Estos motivos reguladores actuarían conjuntamente para dirigir la expresión en tejidos de proliferación celular activa. Para el gen *cytc-2*, resultados preliminares indicarían que los mecanismos que regulan su expresión serían más complejos, e involucrarían nuevamente a los elementos *site II* actuando en combinación con el elemento *G-box* y con otro/s motivo/s aun no identificado/s hasta el momento.



## 6. Conclusiones

## 6. Conclusiones:

La biogénesis mitocondrial puede ser definida como un incremento en el número y/o en la masa de mitocondrias. Este proceso está ocurriendo constantemente durante el desarrollo normal de una célula eucariota y, debido al papel central de la mitocondria en la viabilidad celular, es esencial comprender los mecanismos que regulan su biogénesis y cómo este proceso es coordinado en el tiempo con el resto de las organelas.

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. Numerosos grupos de investigadores han utilizado a los complejos respiratorios mitocondriales como modelo para intentar 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 (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).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis intentan ser un aporte al conocimiento y a la comprensión general de estos procesos de biogénesis de complejos respiratorios en plantas. Los mismos nos permiten elaborar las siguientes conclusiones:

### **Análisis de la expresión de los genes *cytc* y *cox5b* de *Arabidopsis thaliana*:**

✓ Se identificaron dos genes codificantes para el citocromo *c* en *Arabidopsis* ubicados en los cromosomas I y IV. Los mismos fueron nombrados como *cytc-1* (At1g22840) y *cytc-2* (At4g10040) respectivamente.

- ✓ Estos genes *cytc* presentan una estructura conservada en cuanto a la composición de exones e intrones. Ambos intrones se localizan en la misma posición con respecto al segundo y tercer intrón del gen de *Chlamydomonas reinhardtii*, sugiriendo que los mismos estaban presentes en el ancestro común tanto de algas como de plantas de tierra.
- ✓ Para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa de *Arabidopsis* se observó la presencia de dos genes localizados en los cromosomas I y III, y de un posible pseudogén ubicado en el cromosoma I. Se le asignaron los nombres *cox5b-1* y *cox5b-2* a los genes ubicados en los cromosomas III y I, respectivamente.
- ✓ Los genes *cox5b* identificados presentaron una alta homología de secuencia con subunidades 5b de otros organismos. En *Arabidopsis*, ambos genes tienen una estructura muy conservada en cuanto a la presencia y posición de las regiones intrónicas y los exones, con cinco intrones localizados en la misma posición dentro de la secuencia codificante. Por otra parte, el pseudogén presenta la misma estructura, excepto por el hecho de que los dos primeros exones no están presentes en la secuencia.
- ✓ Mediante el alineamiento de las secuencias de proteína disponibles para la subunidad 5b de plantas concluimos que en la porción C-terminal de estas proteínas existirían residuos de aminoácidos altamente conservados, incluyendo tres cisteínas que estarían involucradas en una posible coordinación con Zn. En el tercio amino terminal, que contiene las señales de direccionamiento e importación a la mitocondria, no existiría una alta homología de secuencia. El análisis de un árbol filogenético elaborado con las secuencias proteicas indica que la presencia de dos genes codificantes para la subunidad 5b, tanto en *Arabidopsis* como en arroz, algodón y papa, se debería a eventos de duplicación recientes en los genomas de las especies analizadas.

#### **Los genes *cytc* y *cox5b* son inducidos por hidratos de carbono metabolizables:**

- ✓ Se observó un marcado aumento en los niveles de transcripto de genes *cytc* y *cox5b* debido a la presencia de hidratos de carbono metabolizables. Los niveles de mensajero no aumentaron en presencia de manitol o manosa, descartándose un aumento de la expresión debido a efectos osmóticos. Estos resultados permitieron concluir que el efecto inductor de los hidratos de carbono se debe fundamentalmente al papel fisiológico que tienen los mismos en la

célula vegetal.

- ✓ Todas las soluciones ensayadas conteniendo entre 1% (P/V) y 5% (P/V) de sacarosa produjeron un aumento en los niveles de mensajero, con un efecto máximo a una concentración de 3% (P/V).
- ✓ Al analizar el efecto de la iluminación en la expresión de genes *cytc* y *cox5b* se observó un leve incremento de los niveles de transcripción luego de 12 h de iluminación.
- ✓ Cuando se evaluó el efecto combinado de la iluminación y los azúcares se vio que (i) el pasaje de las plantas de la oscuridad a la luz durante un período de 12 h produce un aumento en los niveles de transcripción, (ii) los azúcares producen un mayor aumento relativo en los niveles de mensajero, comparado con el efecto de la iluminación, (iii) en presencia de azúcares el efecto de la iluminación se vería disminuido o completamente abolido.

**La expresión de los genes *cytc* y *cox5b* está regulada por compuestos de nitrógeno inorgánico:**

- ✓ El tratamiento de plantas con sales de amonio 5 mM produjo un incremento en los niveles de transcripción para los cuatro genes en estudio, mientras que una concentración de 0,5 mM no produjo efecto alguno sobre la expresión de los mismos. Por otra parte, el nitrato de potasio a una concentración 5 mM produjo una leve disminución en los niveles de transcripción para *cox5b-1* y revirtió el efecto de la sal de amonio 5 mM en la expresión de todos los genes analizados cuando ambos compuestos fueron incluidos en la misma solución de incubación.
- ✓ Al analizar el efecto de las fuentes de C y N se vio que, en presencia de azúcares, el amonio produjo un leve aumento en los niveles de transcripción. Además, el efecto negativo del nitrato resultó ser más notorio en estas condiciones.

### **Análisis de la región promotora del gen *cox5b-1*:**

- ✓ Mediante el análisis de plantas de *Arabidopsis* transformadas con un fragmento de 2 kpb correspondiente al promotor del gen *cox5b-1* fusionado al gen reportero *gus*, se observó que en estadios tempranos de desarrollo la actividad GUS es detectada principalmente en cotiledones y en la región del meristema de la raíz. 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.
- ✓ La expresión GUS estaría relacionada con el estadio de desarrollo de este tejido fotosintético. De esta manera, la tinción en el tejido vascular no fue detectable en hojas jóvenes y sólo comenzó a ser observable cuando las mismas alcanzaban cierto grado de madurez. En plantas adultas, la expresión GUS se localizó en el tejido vascular y en granos de polen. La expresión del gen reportero resultó evidente también a nivel de la región meristemática de la raíz, en el pedicelo a nivel de la unión con las vainas y en la región del funículo.
- ✓ Los valores de actividad enzimática GUS en hojas se incrementaron al crecer las plantas en soluciones conteniendo azúcares metabolizables o citoquininas como la 6-benzilaminopurina (BAP). El efecto inductor de estos compuestos sobre la expresión del gen *cox5b-1* se ejercería a nivel transcripcional, a través de componentes o elementos regulatorios que actuarían por vías comunes.

### **Estudio de regiones acotadas del promotor *cox5b-1*:**

- ✓ Mediante el análisis de plantas transformadas con regiones acotadas del promotor *cox5b-1* se concluye que los elementos presentes en la región comprendida entre las posiciones -387 y -195 con respecto al codón ATG serían indispensables para la transcripción del gen *cox5b-1*. En las plantas transformadas con las construcciones que llevan el fragmento proximal hasta las posiciones -195 y -96 no fue posible detectar actividad  $\beta$ -glucuronidasa.
- ✓ Las plantas transformantes que mostraron previamente actividad GUS tanto por fluorimetría como por histoquímica, también presentaron inducción por azúcares y hormonas.

Además, el incremento relativo de actividad GUS obtenido con las construcciones -609 y -387 fue similar al observado al analizar el fragmento más grande de 2 kpb.

✓ Los elementos implicados en la inducción debida a la presencia de azúcares metabolizables o citoquininas se localizarían en la región requerida para la expresión basal del gen, comprendida entre las posiciones -387 y -195. Por otra parte, no puede excluirse la presencia de otros elementos necesarios, pero no suficientes, para la expresión en la región promotora que abarca hasta la posición -195.

#### **El promotor *cox5b-1* contiene elementos regulatorios positivos y negativos:**

✓ Las plantas transformadas con las construcciones -2000 y -609 mostraron valores de actividad enzimática mayor en raíces que en hojas, invirtiéndose la relación observada con la delección -387, en la que se obtuvo un mayor nivel de expresión en hojas. Este resultado sugeriría la presencia de elementos que actuarían regulando en forma negativa la expresión del gen, específicamente a nivel de las hojas. Además, podría especularse acerca de la existencia de un elemento regulador positivo ubicado más arriba de la posición -609, ya que las plantas transformadas con la construcción -2000 presentaron valores de actividad GUS superiores a los de la construcción -609.

✓ Debido a que el sitio de inicio de la transcripción putativo estaría ubicado en la posición -163 con respecto al codón ATG inicial, la mayoría de los elementos en *c/s* 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 las posiciones -387 y -609).

✓ El promotor *cox5b-1* carece de cajas TATA regulatorias cercanas al sitio de inicio de la transcripción. Esto es frecuente en genes nucleares codificantes para subunidades COX en mamíferos.

✓ Entre las posiciones -387 y -1 con respecto al sitio de inicio de la traducción, se identificaron 10 motivos relacionados previamente con la expresión específica de genes en

polen, y una región que coincide con el elemento cuantitativo de expresión en polen del gen *ZM13*. Otros motivos identificados en esta región del promotor fueron dos elementos ACGT, ubicados entre las posiciones -200 y -230. El primero de ellos forma parte de una secuencia idéntica al elemento *G-box* (CACGTG). También se observó que la secuencia ACGTGTC, que rodea al motivo *G-box*, constituye la secuencia consenso para el motivo *ABRE* encontrado en genes regulados por el ácido abscísico. Por otra parte, el segundo de los motivos ACGT identificados forma parte de la secuencia regulatoria GTACGTG. Esta secuencia fue previamente relacionada con la regulación de la expresión del gen *glub-1*, codificante para la glutelina, una proteína del endosperma en arroz.

#### **Análisis de la región promotora del gen *cytc-1*:**

- ✓ Se determinaron los patrones de expresión GUS de plantas de *Arabidopsis* transformadas con un fragmento de 1236 pb (-1182 a +54) del promotor *cytc-1* fusionado al gen reportero. Mediante histoquímica se vio que la región promotora del gen *cytc-1* posee motivos capaces de dirigir la expresión específicamente en tejidos de intensa proliferación celular como lo son los meristemas de raíces, el meristema apical del vástago, y las células del ápice de hojas y cotiledones. En plantas adultas, la expresión fue observada sólo en anteras.
- ✓ El análisis de plantas transformadas con construcciones que contienen deleciones distales del promotor permitió observar que un fragmento localizado entre las posiciones -147 y -218 con respecto al codón ATG sería absolutamente requerido para la transcripción del gen *cytc-1*.
- ✓ En plantas transformadas con la región esencial para la expresión de *cytc-1* en el contexto del promotor mínimo -90 35SCaMV no se detectó actividad GUS, por lo que para completar la actividad promotora del este fragmento de 72 pb serían requeridas secuencias adicionales contenidas por debajo de la posición -147.
- ✓ Mediante ensayos fluorométricos de plantas transformadas con fragmentos del promotor mutagenizados puntualmente en la región mínima de 72 pb (-218 a -147) se vio que una mutación entre las posiciones -147 y -156 producía una disminución de la actividad GUS a niveles comparables con los obtenidos al analizar la actividad enzimática de plantas

transformadas con el gen *gus* sin promotor. Además, la introducción de mutaciones entre las posiciones -157 y -166 produjo una disminución moderada en los niveles de expresión.

✓ Mediante ensayos de mutagénesis puntual de la región promotora se vio que el elemento *site II* presente en la región mínima de 72 pb requerida para la expresión GUS sería esencial para la expresión del gen *cytc-1* en Arabidopsis.

✓ Al estudiar por mutagénesis puntual la función del elemento *telo box* (AAACCCTAA), ubicado entre las posiciones -86 y -94, se observó una disminución sensible en los niveles de expresión GUS, volviéndose sólo detectable a nivel de las anteras. Este motivo actuaría como un elemento estimulador, acoplado su actividad con la de otros motivos, como el *site II*.

✓ Al analizar plantas de Arabidopsis transformadas con el promotor mutagenizado en la secuencia AGGTCA (-109 a -114, mut *pollenQ*), descrita previamente en la bibliografía como un elemento cuantitativo requerido para incrementar los niveles de expresión en polen del gen *ZM13* de maíz, las mismas mostraron valores más bajos de actividad específica  $\beta$ -glucuronidasa en vainas. Dentro del contexto del promotor *cytc-1*, este elemento podría actuar incrementando los niveles de expresión fundamentalmente en tejidos reproductivos.

✓ Las plantas de Arabidopsis transformadas con diferentes deleciones del promotor *cytc-1* que presentaron niveles detectables de actividad GUS también mostraron un incremento de la expresión GUS debido a la presencia de azúcares o de BAP en el medio de cultivo.

✓ En plántulas transformadas con el fragmento que comprendía la mutación en las posiciones -157 a -166 disminuía notoriamente el efecto inductor de los azúcares. Debido a que estas plantas también mostraron niveles bajos de expresión, sobre todo en flores, se podría especular con la existencia de un mecanismo de regulación común, que involucre a los mismos elementos regulatorios presentes en esta región del promotor *cytc-1*.

**Proteínas presentes en extractos nucleares de coliflor unen específicamente la región del promotor *cytc-1* requerida para la transcripción:**



- ✓ En extractos de proteínas nucleares preparados a partir de inflorescencias de coliflor existen proteínas con capacidad de reconocer específicamente la región del promotor *cytc-1* requerida para la expresión del gen reportero.
- ✓ Al utilizar para el ensayo de unión un fragmento del promotor mutagenizado en el elemento *site II* no se observaron bandas de retardo en los geles. Se podría especular con la existencia de proteínas presentes en el extracto nuclear de coliflor que reconocerían y se unirían a los motivos *site II* (TGGGCC/T), esenciales para la expresión del gen *cytc-1*.

### **Proteínas de la familia TCP unen la región mínima requerida para la expresión de *cytc-1***

- ✓ En región mínima del promotor *cytc-1* comprendida entre los nucleótidos -126 a -218 existirían secuencias de unión reconocidas por proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción con motivos TCP de Arabidopsis.
- ✓ Al utilizar el mismo fragmento pero mutagenizado en los elementos *site II* presentes, no fue posible observar bandas de unión con la proteína AtTCP20. Se podría concluir que miembros de esta familia TCP de factores de transcripción, dentro de los que la proteína TCP20 podría ser un buen candidato, actuarían como posibles reguladores de la expresión del gen *cytc-1*.
- ✓ Mediante la misma estrategia se determinó la existencia dentro del promotor del gen *cytc-1* de un sitio de unión específico, el motivo *telobox*, que sería unido específicamente por la proteína recombinante AtPur $\alpha$ .

### **El elemento regulador *site II* está presente en numerosos genes codificantes para proteínas que participan en la vía respiratoria dependiente del citocromo *c*:**

- ✓ Al analizar la secuencia de los promotores de 17 genes codificantes para proteínas que constituyen diferentes subunidades de la citocromo *c* oxidasa o proteínas involucradas en la biogénesis del complejo fue posible detectar la presencia de dos o más copias de este elemento regulador dentro de la región proximal comprendida entre el sitio de inicio de la traducción y la posición -350. Además, al realizar este análisis sobre regiones promotoras de genes codificantes

para componentes del complejo III de la cadena respiratoria, se vio que en 10 de un total de 15 genes analizados (67%) existe un arreglo similar al observado para genes del complejo IV.

### **Análisis de la región promotora del gen *cytc-2*:**

- ✓ La región promotora del gen *cytc-2* de Arabidopsis comprendida entre los nucleótidos -967 y +54 fue utilizada para dirigir la expresión del gen reportero *gus* en plantas transgénicas de Arabidopsis.
- ✓ Mediante histoquímica se detectó actividad GUS en tejidos vasculares de raíces, hipocotilos, cotiledones y hojas. En órganos reproductivos, la expresión fue evidente en anteras y en granos de polen, en venas de los pétalos y en las células de la región de unión entre las flores y vainas con el pedicelo. La expresión fue también detectada dentro de las vainas, específicamente en el séptum y en el funículo.
- ✓ El análisis de plantas transformadas con construcciones que contienen deleciones sucesivas de la región distal del promotor *cytc-2* indicó que un fragmento ubicado entre las posiciones -140 y -189 sería esencial para la transcripción
- ✓ Un análisis similar permitió determinar que la delección de la región comprendida entre los nucleótidos -259 y -315 produce una disminución en los niveles de expresión. Esta región incluye dos copias del elemento *site II*.
- ✓ El análisis de las plantas de Arabidopsis transformadas con una construcción en la que se mutagenizó el motivo *G-box* (CACGTG) en el contexto del promotor que abarca hasta la posición -259 permitió evidenciar una marcada disminución de la expresión GUS en todos los órganos en los que fue posible detectarla: hipocotilos, cotiledones, raíces, hojas y flores
- ✓ Tanto el motivo *site II* como el *G-box* estarían implicados, junto con otros elementos no identificados hasta el momento, en la regulación de la expresión del gen *cytc-2* en Arabidopsis, al menos en el control de los niveles basales de expresión. Serán necesarios otros análisis a fin de determinar la implicancia real de estos elementos en la regulación de la expresión de este gen frente a cambios en las condiciones fisiológicas o ambientales del entorno celular.

## 7. Resumen

## 7. Resumen:

La biogénesis mitocondrial implica la expresión coordinada de genes presentes en genomas separados. Esto es especialmente válido para los componentes de la cadena respiratoria que participan en el proceso de transferencia de electrones y forman parte, en la mayoría de los casos, de complejos constituidos por múltiples subunidades. Está bien establecido que la mayoría de los componentes mitocondriales tienen una expresión aumentada en flores. Esta observación está de acuerdo con el hecho de que el número de mitocondrias por célula aumenta considerablemente durante el desarrollo de las flores. En este trabajo de tesis caracterizamos la expresión de cuatro genes nucleares de *Arabidopsis* que codifican componentes de la vía respiratoria mitocondrial sensible a CN: dos genes codificantes para la subunidad 5b de la citocromo *c* oxidasa (COX5b) (*cox5b-1*, At3g15640; *cox5b-2*, At1g80230), y dos genes codificantes para el citocromo *c* (*cytc-1*, At1g22840; *cytc-2*, At4g10040). Análisis de la expresión de estos genes mediante northern blot permitieron observar que estos genes se expresan en numerosos órganos en plantas de *Arabidopsis*. La incubación de plantas en soluciones conteniendo azúcares metabolizables produjo un incremento en los niveles de transcripto. Así mismo, el efecto de los carbohidratos mostró la misma dependencia de tiempo y concentración para los cuatro genes analizados, sugiriendo la operación de mecanismos comunes de regulación. La incubación en condiciones de iluminación produjo un incremento en los niveles de transcripto, si bien la magnitud del efecto fue menor a la producida por los azúcares. La incubación de plantas en soluciones conteniendo diferentes fuentes de nitrógeno también produjo cambios en la expresión. En presencia de amonio, se obtuvieron niveles de transcriptos más altos con respecto a las plantas incubadas en medios de cultivo libres de compuestos nitrogenados o en soluciones conteniendo nitrato. Por otro lado, el nitrato produjo una ligera disminución en los niveles de transcripto y contrarrestó el efecto inductor del amonio cuando ambas fuentes de nitrógeno inorgánico fueron analizadas en forma conjunta.

En el segundo capítulo de resultados fue analizado el promotor del gen nuclear *cox5b-1* de *Arabidopsis thaliana*. Plantas de *Arabidopsis* transformadas en forma estable con diferentes fragmentos del promotor fusionados al gen reportero codificante para la  $\beta$ -glucuronidasa fueron exhaustivamente analizadas mediante histoquímica y ensayos cuantitativos de medición de la actividad enzimática por fluorimetría. Los patrones de tinción histoquímica indicaron que el promotor *cox5b-1* dirige la expresión en meristemas y tejidos vasculares de cotiledones, raíces e hipocotilos, además de observarse expresión GUS en anteras, granos de polen y en la vena central

de las hojas. La medición cuantitativa de la actividad en extractos preparados a partir de diferentes órganos sugirió una expresión alta en raíces. El análisis de delecciones progresivas de las regiones 5' distales del promotor sugirió la presencia de elementos reguladores negativos, activos preferencialmente a nivel de las hojas, entre los nucleótidos -609 y -387 desde el sitio de inicio de la traducción. Una delección por debajo del nucleótido -195 eliminó completamente la expresión GUS. La inclusión de sacarosa y la citoquinina 6-benzilaminopurina en el medio de cultivo produjo un aumento en los niveles de expresión. Esta inducción fue observada con todas las construcciones que produjeron una actividad  $\beta$ -glucuronidasa observable previamente. Elementos regulatorios putativos involucrados en la regulación de la expresión de otros genes fueron detectados en el fragmento del promotor *cox5b-1* requerido para su expresión. Un análisis detallado de estos elementos contribuirá a dilucidar los mecanismos moleculares que participan en la expresión de este y otros componentes de la vía respiratoria dependiente del citocromo *c*.

En el último capítulo, los promotores de los genes codificantes para el citocromo *c* en *Arabidopsis thaliana*, *cytc-1* y *cytc-2*, fueron analizados usando plantas transformadas con fusiones de distintos fragmentos de los mismos a la secuencia codificante para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Los patrones de tinción histoquímica de plantas de diferentes estadios indicaron que el promotor *cytc-1* dirige la expresión en la región meristemática de raíces, en el meristema apical de vástago y en anteras. Por el contrario, plantas transformadas con fusiones del promotor *cytc-2* mostraron expresión en el tejido vascular de raíces, cotiledones, hojas e hipocotilos, así como también en anteras. La medición cuantitativa en extractos preparados a partir de diferentes órganos sugirió que la expresión de *cytc-1* es alta en flores, mientras que los niveles de expresión de *cytc-2* serían mayores en hojas. El análisis de una serie de delecciones y mutaciones puntuales en el promotor *cytc-1* permitió concluir que un segmento ubicado entre las posiciones -147 a -156, tomadas desde el sitio de inicio de la traducción, es requerida para la expresión. Además se vio que el elemento *site II* (TGGGCC/T) ubicado en esta región, acoplado al motivo *telo box* (internal telomeric repeat) (AAACCCTAA) ubicado corriente abajo del mismo, son los responsables de los patrones de expresión observados para el gen *cytc-1*. Una mutación en el elemento *pollenQ* (AGGTCA) presente entre las posiciones -109 a -114 produjo una disminución en la expresión GUS en tejidos reproductivos. Por otra parte, proteínas presentes en extractos nucleares de inflorescencias de coliflor, así como proteínas recombinantes pertenecientes a la familia de proteínas con dominio TCP, fueron capaces de unir de manera específica la región mínima requerida para la expresión en el promotor *cytc-1*. De esta manera proponemos que la expresión del gen *cytc-1* estaría

estrechamente relacionada con el proceso de proliferación celular a través de los elementos regulatorios descritos arriba. Por otro lado, el análisis de deleciones progresivas del promotor *cytc-2* permitió observar que una deleción por debajo del nucleótido -256, en la cual se excluyen dos copias del elemento *site II*, produjo un descenso general en los niveles de expresión GUS en todos los tejidos donde la misma fue inicialmente detectada. Una deleción aun mayor por debajo de la posición -140 elimina por completo la expresión GUS. Mediante la mutagénesis puntual de un elemento *G-box* presente en la posición -172 del promotor *cytc-2* produce una disminución aun mayor en la expresión del gen reportero en todos los órganos. Estas observaciones sugieren que los elementos *site II* y *G-box* están implicados, junto con elementos adicionales aun no identificados, en la regulación de la expresión del gen *cytc-2*.

Si bien se asume que la expresión de genes que codifican componentes mitocondriales debe estar coordinada, es también cierto que esto puede ocurrir fundamentalmente en respuesta a señales o factores específicos, tanto internos como externos. El hecho de que los motivos *site II* se encuentren ubicados en posiciones tan cercanas en un gran número de regiones promotoras de otros genes codificantes para componentes de la cadena de transporte de electrones mitocondrial sugiere que este elemento podría ser el sitio blanco de factores que coordinen la expresión de los mismos e indica la posible existencia de un punto de interrelación entre la proliferación celular y la biogénesis de componentes mitocondriales implicados en el metabolismo energético. Además, en el caso del citocromo *c*, el cual es codificado por más de un gen en *Arabidopsis*, es posible que los diferentes genes que codifican el mismo componente muestren patrones de expresión diferenciales. El proceso de duplicación de genes, seguido por mutaciones en las regiones regulatorias pueden ser los fenómenos responsables de haber cambiado los patrones de expresión característicos de los diferentes miembros de las familias multigénicas. Basado en estas observaciones, proponemos un modelo en el cual los promotores de estos genes están compuestos por una mezcla de elementos regulatorios comunes a todos y específicos que mediante su interrelación ajustan los niveles de expresión de estos genes de acuerdo al tipo de célula, y a las condiciones metabólicas, fisiológicas y ambientales.

## 8. Abstract

## 8. Abstract

Mitochondrial biogenesis involves the coordinated expression of genes present in separate genomes. This is specially valid for respiratory chain components, which participate in electron transfer processes sometimes as part of the same multisubunit complex. It is now well established that most mitochondrial components show enhanced expression in flowers. This fits well with the fact that the number of mitochondria per cell increases considerably during flower development. In this thesis we have characterized the expression of four *Arabidopsis* nuclear genes encoding components of the mitochondrial cyanide-sensitive respiratory pathway: two genes encoding cytochrome *c* oxidase subunit Vb (COX5b) (*cox5b-1*, At3g15640; *cox5b-2*, At1g80230), and two genes encoding cytochrome *c* (*cytc-1*, At1g22840; *cytc-2*, At4g10040). Expression analysis by northern blot indicated that these genes are expressed in several organs. Incubation of plants in solutions containing metabolizable sugars produced an increase in transcript levels. The effect of carbohydrates showed the same time and concentration dependence for the four genes, suggesting the operation of a common regulatory mechanism. Light produced an increase in transcript levels, although smaller than that produced by sugars. Incubation of plants in solutions with different nitrogen sources also produced changes in expression. In the presence of ammonium, higher transcript levels were observed with respect to plants treated with either nitrogen-free or nitrate solutions. Nitrate, on the other hand, produced a slight decrease in transcript levels and abolished the inducing effect of ammonium.

The promoter of the *Arabidopsis thaliana* nuclear gene *cox5b-1* was analyzed in the second chapter of results. *Arabidopsis* plants stably transformed with different promoter fragments fused to the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene were exhaustively analyzed by histochemical and quantitative fluorometric assays. Staining patterns indicated that the *cox5b-1* promoter directs expression in meristems and in vascular tissues of cotyledons, roots and hypocotyls, as well as in anthers and pollen and the central leaf vein. Quantitative measurements in extracts prepared from different organs suggested that expression is higher in roots. The analysis of progressive upstream deletions of the promoter suggested the presence of negative regulatory elements, preferentially active in leaves, between nucleotides -609 and -387 from the translation start site. A further deletion down to nucleotide -195 completely abolished expression. The inclusion of sucrose or the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) in the culture medium induced *cox5b-1* promoter-dependent  $\beta$ -glucuronidase expression. This induction was observed with all constructs that produced



$\beta$ -glucuronidase activity. Putative regulatory elements involved in the regulation of other genes were detected in the promoter fragment required for expression. A detailed analysis of these elements will help to elucidate the molecular mechanisms that participate in the expression of this and, possibly, other components of the cytochrome *c*-dependent respiratory pathway.

In the last chapter, the promoters of the *Arabidopsis thaliana* cytochrome *c* genes, *cytc-1* and *cytc-2*, were analyzed using plants transformed with fusions to the  $\beta$ -glucuronidase coding sequence. Histochemical staining of plants indicated that the *cytc-1* promoter directs expression in root and shoot meristems and in anthers. In turn, plants transformed with the *cytc-2* promoter fusions showed expression in vascular tissues of cotyledons, leaves, roots and hypocotyls, and also in anthers. Quantitative measurements in extracts prepared from different organs suggested that expression of *cytc-1* is higher in flowers, while that of *cytc-2* is higher in leaves. The analysis of a set deletions and site-directed mutants of the *cytc-1* promoter indicated that a segment located between -147 and -156 from the translation start site is required for expression and that site II elements (TGGGCC/T) located in this region, coupled with a downstream internal telomeric repeat (telo box, AAACCCTAA), are responsible for the expression pattern of this gene. A mutation in the pollenQ element (AGGTCA) present between -109 and -114 produced a decrease in GUS expression in reproductive tissues. Proteins present in cauliflower nuclear extracts, as well as a recombinant protein from the TCP-domain family, were able to specifically bind to the region required for expression. We propose that expression of the *cytc-1* gene is linked to cell proliferation through the elements described above. On the other hand, the analysis of progressive upstream deletions of the *cytc-2* promoter showed that a deletion down to nucleotide -256, that excludes two copies of the site II element, produces a general decrease in GUS expression levels, while a further deletion down to nucleotide -140 completely abolished expression. A site-directed mutation in a G-box element present at -172 also produced a decrease of expression in all organs. These observations suggest that site II and G-box elements are implicated, with additional elements, in *cytc-2* gene expression.

Although it is assumed that the expression of genes encoding mitochondrial components must be coordinated, it is also true that this coordination may only occur in response to specific, either internal or external, signals or factors. The fact that closely located site II motifs are present in similar locations in several other nuclear genes encoding components of the electron transport chain suggests that these elements may be the target of factors that coordinate the expression these genes and indicates the possible existence of a link between cell proliferation and the biogenesis of

the mitochondrial components involved in energy metabolism. In addition, as in the case of cytochrome *c*, which is encoded by more than one gene, it is possible that the different genes encoding the same component show differential expression patterns. Gene duplication followed by mutations in regulatory regions may have changed the expression characteristics of different members of gene families. Based on this, we propose a model in which the promoters of these genes are composed of a mix of common and gene-specific regulatory elements that adjust gene expression levels according to cell-specific, metabolic, physiological and environmental conditions.

## 9. Bibliografía

## 9. BIBLIOGRAFÍA:

- 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.
- Allen, JF. (2003). The functions of genomes in bioenergetics organelles. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 308, 19-38.
- 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.
- Altschul, SF.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, EW. and Lipman, DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amati, BB.; Goldshmidt-Clemont, M.; Wallace, CJA. and Rochaix, JD. (1988). cDNA and deduced amino acid sequences of cytochrome *c* from *Chlamydomonas reinhardtii*: unexpected functional and phylogenetic implications. *J. Mol. Evol.* 28, 151-160.
- Andrews, M. (1986). The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell and Environment* 9, 511-519.
- Ausubel, FM.; Brent, R.; Kingston, RE.; Moore, DD.; Seidman, JG.; Smith, JA. and Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley. Interscience. New York.
- Babiychuk, E.; Müller, F.; Eubel, H.; Braun, H-P.; Frentzen, M. and Kushnir, S. (2003). Arabidopsis phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *Plant J* 33, 899-909.
- 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.
- 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.
- Bate, N. and Twell, D. (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol* 37, 859-869.
- Beardslee, TA.; Roy-Chowdhury, S.; Jaiswal, P.; Buhot, L.; Lerbs-Mache, S.; Stern, DB. and Allison, LA. (2002). A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts. *Plant J.* 31,199-209.
- Binder, S. and Brennicke, A. (2003). Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 358, 181-188.
- Binder, S.; Marchfelder, A. and Brennicke, A. (1996): Regulation of gene expression in plant mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 32, 303-314
- Birnboim, H. and Dolly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acids. Res.* 7, 1513-1515.

**Eliminado:** The Plant Cell, Vol. 4, 485-496, April 1992 O 1992 American Society of Plant Physiologists¶ Sequences Flanking the Hexameric G-Box Core CACGTG¶ Affect the Specificity of Protein Binding¶ Mary E. Williams, Randy Foster, and Nam-Hai Chua2¶

- Blanc, G.; Barakat, A.; Guyot, R.; Cooke, R. and Delseny, M. (2000). Extensive duplication and reshuffling in the Arabidopsis genome. *Plant Cell* 12, 1093-1101.
- Blanchard, J. and Lynch, M. (2000). Organelar genes: why do they end up in the nucleus?. *Trends Genet.* 16(7), 315-320.
- Block, A.; Dangl, J.L.; Hahlbrock, K.; Schuze-Lefert, P. (1990). Functional borders, genetic fine structure, and distance requirements of cis elements mediating light responsiveness of the parsley chalcone synthase promoter. *Proc Natl Acad Sci.* 87(14), 5387-5391
- Bloom, A.J.; Sukrapanna, S.S. and Warner, R.L. (1992). Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* 99, 1249-1301.
- Bogoard, L. (1975). Evolution of organelles and eukaryotic genomes. *Science* 188, 891-898.
- Bonnard, G.; Gualberto, J.M.; Lamattina, L. and Grienerberger, J.M. (1992). RNA editing in plant mitochondria. *Rev. Plan Sci.* 10, 503-521.
- Bowsher, C.G.; Hucklesby, D.P. and Emes, M.J. (1993). Induction of ferredoxin-NADP+ oxidoreductase and ferredoxin synthesis in pea root plastids during nitrate assimilation. *Plant J.* 3, 463-467.
- Braun, H-P. and Schmitz, U.K. (1999). The protein-import apparatus of plant mitochondria. *Planta* 209, 267-274.
- Brenner, S.; Johnson, M.; Bridgham, J.; Golda, G.; Lloyd, D.H.; 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.
- Brownleader, M.D.; Harborne, J.B. and Dey, P.M. (1997). Carbohydrate metabolism: primary metabolism of monosaccharides. In *Plant Biochemistry* (eds P.M. Dey & J.B. Harborne), pp. 111-141. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Capaldi, R.A. (1990). Structure and Function of Cytochrome *c* Oxidase. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 569-596.
- Carpenter, C.D. and Simon, A.E. (1998). *Methods in Molecular Biology. Arabidopsis Protocols. Preparation of RNA.* (José M. Martínez-Zapater and Julio Salinas). Humana Press. U.S.A. 82, 85-89.
- Chen, M.H.; Liu, L.F.; Chen, Y.R.; Wu, H.K. and Yu, S.M. (1994). Expression of  $\alpha$ -amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient. *Plant J.* 6, 625-636.
- Cramer, M.D. and Lewis, O.A.M. (1993). The influence of nitrate and ammonium on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. *Annals of Botany* 72, 359-365.
- 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, G.C.; Chan, R.L. and Gonzalez, D.H. (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.; 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.
- Curi, GC.; Welchen, E.; Chan, RL. and 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.
- D'Agostino, IB. and Kieber, JJ. (1999). Molecular mechanisms of cytokinin action. *Current Opin. In Plant Biol* 2, 359-364.
- 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.
- 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. *BMC Bioinformatics*, 23, 4(1): 25.
- de Vetten, NC. and Ferl, RJ. (1994). Transcriptional regulation of environmentally inducible gene in plants by an evolutionary conserved family of *G-box* binding factors. *Int. J. Biochem.* 26(9), 1055-68.
- Dean, C. and Schmidt, R. (1995). PLANT GENOMES: A current molecular description. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 395-418.
- 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.
- Dietrich, AJ.; Weil, JH. and Marechal-Drouard, L. (1992). Nuclear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 115-131.
- Dombrowski, S.; Hoffmann, M.; Kohn, J.; Brennicke, A. and Binder, S. (1998). On mitochondrial promoters in *Arabidopsis thaliana* and other flowering plants. In *Plant mitochondria: from gene to function.* (ed I.M. Moller, P. Gardestrom, K. Glimelius & E. Glaser), pp. 165-170.
- 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.
- 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.
- Dudley, P.; Wood, CK.; Pratt, JR. and Moore, AL. (1997). Developmental regulation of the plant mitochondrial matrix located HSP70 chaperone and its role in protein import. *FEBS Lett.* 417, 321-324.
- Dutilleul, C.; Garmier, M.; Noctor, G.; Mathieu, C.; Chetrit, P.; Foyer, CH. and de Paepe, R. (2003). Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* 15, 1212-1226.

Con formato: Sangría:  
Izquierda: 0 cm, Sangría  
francesa: 0,63 cm, Espacio  
Antes: 0 pto, Interlineado:  
Exacto 12 pto

- 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
- 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.
- Farré, J-C. and Araya, A. (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.
- Feinberg, A. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*. 132:6-13.
- Feinberg, A. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*. 132:6-13.
- 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. and Gonzalez DH (1997). Expression of sunflower cytochrome *c* mRNA is tissue-specific and controlled by nitrate and light. *Physiol. Plant*. 99, 342-347.
- Felitti SA.; Chan RL.; Gonzalez Sierra M. and Gonzalez DH (2000). The cytochrome *c* gene from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Structure and *expression* in wild-type cells and in obligate photoautotrophic (*dk*) mutants. *Plant Cell Physiol*. 41, 1149-1156.
- Figuroa Figueroa, P., Leon, G., Elorza, A., Holuigue, L., and Jordana, X. (2001). Three different genes encode the iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 46, 241-250.
- Figuroa, 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.
- Finnegan, PM.; Whelan, J.; Millar, AH.; Zhang, Q.; Smith, MK.; Wiskich, JT. and Day, DA. (1997). Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiol*. 114, 455-466.
- Frey, TG. and Mannella, CA. (2000). The internal structure of mitochondria. *TIBS* 25, 319-324.
- Fujiki, Y., Ito, M., Itoh, T., Nishida, I., and Watanabe, A. (2002). Activation of the promoters of *Arabidopsis* genes for the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex in transgenic tobacco BY-2 cells under sugar starvation. *Plant Cell Physiol*. 43, 275-280.
- Gagliardi, D.; Kuhn, J.; Spadinger, U.; Brennicke, A.; Leaver, C.J. and Binder, S. (1999). An RNA helicase (AtSUV3) is present in *Arabidopsis thaliana* mitochondria. *FEBS Lett.* 458, 337-342.

- Gamborg, OL.; Miller, RA. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50,151-158.
- Gemel, J. and Randall, DD. (1992). Light regulation of leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Plant Physiol.* 100, 908-914.
- Giegé, P. and Brennicke, A. (1999). RNA editing in Arabidopsis mitochondria. Effects 441 C to U changes in open reading frames. *Proc. Nac.Acad. Sci. USA* 96, 15324-15329.
- 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*, Vol. 17, 1497–1512.
- Giegé, P.; Rayapuram, N.; Meyer, EH.; Grienenberger, JM. and Bonnard, G. (2004). CcmFc involved in cytochrome *c* maturation is present in a large sized complex in wheat mitochondria. *FEBS* 563, 165-169.
- 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. and Neupert, W. (1990). Biogenesis of mitochondrial *c*-type cytochromes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 22, 753-768.
- Gonzalez, DH.; Bonnard, G. and Grienenberger, JM. (1993) A gene involved in the biogenesis of cytochromes is co-transcribed with a ribosomal protein gene in wheat mitochondria. *Curr Genet* 24: 248–255
- Graham, IA.; Denby, KJ. and Leaver, CJ. (1994). Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell* 6, 761-772.
- 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, 1476-1481.
- Gray, MW.; Burger, G. and Lang, BF. (2001).The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology* 2(6) reviews 1018.1-1018.5.
- 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.
- Grossman, LI. and 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.



- Gueguen, V.; Macherel, D.; Jaquinod, M.; Douce, R. and Bourguignon, J. (2000). Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* 275, 5016-5025.
- Guillipan, MJ.; Marcotte, WR. and Quatrano, R.S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250, 267-271.
- 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.
- Hamilton, DA.; Schwarz, YH. and Mascarenhas, JP (1998) A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol Biol* 38: 663-669
- Hanson, JB. and Day, DA. (1980). Plant Mitochondria. In the *Biochemistry of Plants*. Vol.1 (N.E. Tolbert, ed), pp. 315-358. Academic Press, New York, NY. ISBN 0-12-675401-2.
- Harberer, G.; Hindemitt, T.; Meyers, BC. and Mayer, KFX. (2004) Transcriptional similarities, dissimilarities, and conservation of cis-elements in duplicated genes of Arabidopsis. *Plant Physiol* 136, 3009-3022.
- 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.
- Heazlewood, JA.; Howell, KA. and Millar, AH. (2003a). 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.; Howell, KA.; Whelan, J. and Millar, AH. (2003). Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol* 132, 230-242.
- 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.
- Hedtke, B.; Borner, T. & Weihe, A. (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.* 1, 453-440.
- 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.
- Higo, K.; Ugawa, Y.; Iwamoto, M. and Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* 27, 297-300.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16, 9977.
- Hong, JC.; Cheong, YH.; Nagao, RT.; Bahlk, JD.; Rey, JL. and Cho, MS. (1995). Isolation of two soybean *G-box* which interact with a *G-box* sequence of an auxin-responsive gene. *Plant J.* 8(2), 199-211.

- Horn, R.; Hustedt, JEG.; Horstmeyer, A.; Hahnen, J.; Zetsche, K. and Friedt, W. (1996). The CMS-associated 16 kDa protein encoded by orfH522 in the PET1 cytoplasm is also present in other male-sterile cytoplasm of sunflower. *Plant Mol. Biol.* 30, 523-538.
- 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
- Husted, S. and Schjoerring, JK. (1995). Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiol* 109, 1453-1460.
- Jan, JC. and Sheen, J. (1994). Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6, 1665-1679.
- Jang, IC.; Choi, WB.; Lee, KH.; Song, SI.; Nahm, BH. and Kim, JK (2002) High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome *c* gene *OsCc1* and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots. *Plant Physiol* 129: 1473-1481
- 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:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal.* 6, 3901-3907.
- 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.
- 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.
- Kemmerer, EC.; Lei, M. and Wu, R. (1991). Isolation and molecular evolutionary analysis of a cytochrome *c* gene from *Oryza sativa* (rice). *Molecular Biology and Evolution* 8, 212-226.
- Klein, M. (1994). Physical mapping of the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* by cosmid and YAC clones. *Plant J.* 6, 447-455.
- Kluck, RM.; Bossy-Wetzel, E.; Green, DR. and Newmeyer, DD. (1997) The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275 (5303),1132-6.
- Koch, KE. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 509-540.

- Koch, KE.; Nolte, KD.; Duke, ER.; McCarty, DR. and Avigne, WT. (1992). Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* 4, 59-69.
- 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
- 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.; Suzuka, I.; Ohashi, Y.; Murakami, T. and Arai, Y. (1991) Upstream sequences of rice proliferating cell nuclear antigen (PCNA) gene mediate expression of PCNA-GUS chimeric gene in meristems of transgenic tobacco plants. *Nucleic Acids Res* 19, 1571-1576
- Kranz, R.; Lill, R.; Goldman, B.; Bonnard, G. and Merchant, S. (1998) Molecular mechanisms of cytochrome *c* biogenesis: three distinct systems. *Mol. Microbiol.* 29(2), 383-396.
- Krapp, A.; Hofmann, B.; Schäfer, C. and Stitt, M. (1993). Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the sink regulation of photosynthesis?. *Plant J.* 3, 817-828.
- Krömer, S. (1995). Respiration during photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 45-70.
- Krömer, S.; Stitt, M. and Heldt, W. (1988). Mitochondrial oxidative phosphorylation in photosynthetic metabolism of a leaf cell. *FEBS Lett.* 226, 352-356.
- 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.
- Kurland, CG. and Andersson, SGE. (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 786-820.
- Kushner, H. (1978). An improved method of transformation of *E. coli* with col E1-derived plasmids. *En Genetic Engineering*. Elsevier/North-Holland. Amsterdam.
- 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* Vol. 279, No. 20, 14, pp. 20672-20677.
- Laemli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 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.
- Lee, B. H., Lee, H., Xiong, L., and Zhu, J. K. (2002). A mitochondrial complex I defect impairs cold-regulated nuclear gene expression. *Plant Cell* 14, 1235-1251.
- Lee, SLJ. and Warmke, HE. (1979) Organelle size and number in fertile and T-cytoplasmic male-sterile corn. *Am J Bot* 60, 141-148
- Li, C.; Potuschak, T.; Colón-Carmona, A.; Gutiérrez, RA. and Doerner, P. (2005) Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 102; 12978-12983
- Li, J. and Chory, J. (1998). *Methods in Molecular Biology. Arabidopsis Protocols. Preparation of DNA from Arabidopsis.* (José M. Martínez-Zapater and Julio Salinas). Humana Press. U.S.A. 82, 55-60.
- Lin, X. (2000). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402, 761-768.
- 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.; Murcha, MW. and Whelan, J. (2003). The mitochondrial protein import machinery of plants (MPIMP) database. *Nucleic. Acids Res.* 31, 325-327.
- Lister, R.; Murcha, MW. and Whelan, J. (2003). The mitochondrial protein import machinery of plants (MPIMP) database. *Nuc. Acids Res.* 31, 325-327.
- Liu, F.; Cui, X.; Horner, HT.; Weimer, H. and Schmable, PS: (2001). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. *Plant Cell* 13, 1063-1078.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. and Darnell, J. (2002). *Biología Celular y Molecular. Energética celular: glucólisis, oxidación aeróbica y fotosíntesis.* Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 616-674.
- Logan, DC; Millar, AH; Sweetlove, LJ; Hill, SA. and Leaver, CJ. (2001). Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol.* 125, 662-672.
- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Baurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schafer, E., Kudla, J. and Harter, K. (2001). The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in Arabidopsis. *Mol. Genet. Genomics* 265, 2-13.
- Mackenzie, S. and McIntosh, L. (1999). Higher Plant Mitochondria. *Plant Cell.* 11, 571-585.
- Mackenzie, S.; He, S. and Lyznik, A. (1994). The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol.* 105, 775-780.
- Mackenzie, S.; Shichuan, H. and Lyznik, A. (1994). The elusive plant mitochondrion as a genetic system. *Plant Physiol.* 105, 775-780.
- Maeshima, M. and Asahi, T. (1978). Purification and characterization of sweet potato cytochrome *c* oxidase. *Archives of Biochem. and Biophys.* 187(2), 423-430.

- Maeshima, M. and Asahi, T. (1978). Purification and characterization of sweet potato cytochrome *c* oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 423-430.
- Maliga, P.; Klessig, DF.; Cashmore, AR.; Grissem, W. and Varner, JE. (1995). Identification of promoter sequences that interact with DNA-binding proteins. *In* *Methods in Plant Molecular Biology. A Laboratory Course Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 233-260.
- 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 meristems. *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.
- Marechal-Drouard, L.; Kumar, R.; Remacle, C. & Small, L. (1996). RNA editing of larch mitochondrial tRNAPhe precursors is a prerequisite for processing. *Nucleic Acids Res.* 24, 3229-3234.
- Marechal-Drouard, L.; Ramamonjisoa, D.; Cosset, A.; Weil, JH; Dietrich, A. (1993). Transfer RNAs and transfer RNA genes in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 44, 13-32.
- 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.
- Mary E. Williams, Randy Foster, and Nam-Hai Chua. Sequences Flanking the Hexameric G-Box Core CACGTG Affect the Specificity of Protein Binding. *American Society of Plant Physiologists. Plant Cell*, Vol. 4, 485-496
- Menkens AE, Schindler U, 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.
- Meyerowitz, EM. & Somerville, CR. (2004). *Arabidopsis.* Cold Spring Laboratory Press, New York.
- Michalecka, AM., Svensson, AS., Johansson, FI., Agius, SC., Johanson, U., Brennicke, A., Binder, S., and Rasmusson, AG. (2003). *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.* 133, 642-652.
- Millar, AH.; Day, D. and Whelan, J. (2004). Mitochondrial biogenesis and function in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 1-36. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, eds. (Rockville, MD: American Society of Plant Biologist). <http://www.Aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Millar, AH.; Eubel, H.; Jansch, L.; Kruff, V.; Heazlewood, JL. And Braun H-P. (2004a). Mitochondrial cytochrome *c* oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Mol. Biol.* 56, 77-90.
- Millar, AH.; Mittova, V.; Kiddle, G.; Heazlewoods, JL.; Bartoli, CG.; Theodolou, FL. And Foyer, CH. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol* 133, 443-447.

- Millenaar, FF.; Gonzalez-Meler, MA.; Siedow, JN.; Wagner, AM. and Lambers, H. (2002). Role of sugars and organic acids in regulating the concentration and activity of the alternative oxidase in *Poa annua* roots. *J. of Exp. Botany*. 53(371), 1081-1088.
- Mills, D. A. and 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.
- Mita, S.; Suzuki-Fujii, K. and Nakamura, K. (1995). Sugar-inducible expression of a gene for  $\beta$ -amylase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*. 107, 895-904.
- 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.
- 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, CS.; Cook-Johnson, RJ.; Rudhe, C.; Whelan, J.; Day, DA.; Wiskich, JT. and Soole, KL. (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.
- Mori, E. and Morita, Y. (1980). Amino acid sequence of cytochrome *c* from rice. *J. Biochem.* 87, 249-266.
- 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.
- 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.
- Nagao, RT.; Goekjan, VH.; Hong, JC.; Key, JL. (1993). Identification of protein-binding DNA sequence in an auxin-regulated gene of soybean. *Plant Mol. Biol.* 1147-1162.
- Newton, KJ; Wimberg, B.; Yamato, K.; Lupold, S. and Stern, D. (1995). Evidence for a novel mitochondrial promoter preceding the *cox2* gene in perennial teosintes. *EMBO J.* 14, 585-593.
- 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.

- Oaks, A. and Hirel, B. (1985). Nitrogen metabolism in roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36, 345-365.
- 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.
- Ohtsu, K.; Hamanaka, S.; Yamazaki, K. and Hirai, A. (1999). Characterization of a cDNA encoding a novel subunit for cytochrome c oxidase (COX6b) from rice. *Breeding Science.* 49:211-215.
- Oliviera, IC. And Coruzzi, GM. (1999). Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 121, 301-309.
- 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.
- Peeters, N. and Small, I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1541, 54-63.
- Piechulla B, Merforth N, Rudolph B. 1998. Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol. Biol.* 38, 655-662.
- Poyton, RO. and McEwen, JE. (1996). Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 563-607.
- Prince, VE. and Pickett, FB. (2002). Splitting Pairs: The diverging fates of duplicated genes. *Nature Reviews Genetics* 3, 827-836.
- 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.
- Rasmusson, AG.; Mendel-Hartvig, J.; Moller, IM. and Wiskich, JT. (1994). Isolation of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone reductase (complex I) from red beef mitochondria. *Physiol. Plant.* 90, 607-615.
- 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, 209- 209.5.
- Rebeille, F.; Macherel, D.; Mouillon, JM.; Garin, J. and Douce, R. (1997). Folate biosynthesis in higher plants. Purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7-8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropterate synthase localized in mitochondria. *EMBO J.* 16, 947-957.
- Reynolds, SJ. and Smith, SM. (1995). Regulation of expression of the cucumber isocitrate lyase gene in cotyledons upon seed germination and by sucrose. *Plant Mol. Biol.* 29, 885-896.

- Rhoads, DM. and McIntosh, L. (1992). Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell* 4, 1131-1139.
- Ribichich, KF.; Tioni, MF.; Chan, RL. and Gonzalez, DH (2001). Cell-type specific expression of plant cytochrome c mRNA in developing flowers and roots. *Plant Physiol.* 125, 1603-1610.
- 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.
- Rizzuto, R.; Sandona, D.; Brini, M.; Capaldi, R. and 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.
- Rogers, HJ.; Bate, N.; Combe, J.; Sullivan, J.; Sweetman, J.; Swan, C.; Lonsdale, DM. and Twell, D. (2001). Functional analysis of *cis* regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene g10. *Plant Mol. Biol.* 45, 577-585.
- Saccone, C.; Gissi, C.; Lanave, C.; Larizaa, A.; Pesole, G. and Reyes, A. (2000). Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene* 261, 153-159.
- 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.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS. USA.* 74, 5463-5467.
- Scheible, WR.; Gonzalez-Fontes, A.; Lauerer, M.; Müller-Röber, B.; Caboche, M. and Stitt, M. (1997). Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *Plant Cell* 6, 811-825.
- Schuster, W. and Brennicke, A. (1994). THE PLANT MITOCHONDRIAL GENOME: Physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 61-78.
- Sedmak, J. and 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. and Ruberti, I. (1993). The Athb-1 and HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J.* 12, 3507-3517.
- Sharma, YK. and Davis, KR. (1995). Isolation of a novel Arabidopsis ozone-induced cDNA by differential display. *Plant. Mol. Biol.* 29, 91-98.
- 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.
- Silva-Filho, MC. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 1-7.
- Silver, J.; Limjoco, T.; Feinstone, S. (1995). Site-specific mutagenesis using the polymerase chain reaction, 179-188. En: *PCR Strategies*. Innis MA.; Gelfand, DH.; Snisky, JJ., editors. Academic Press, San Diego.
- Simillion, C.; Vandepoele, K.; Van Montagu, MCE.; 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.
- Sjöling, S. and Glaser, E. (1998). Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends in Plant Science.* 3(4), 136-140.
- Small, I.; Wintz, H.; Akashi, K. and Mireau, H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol. Biol.* 38, 265-277.
- 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.
- Sokolov, LN.; Déjardin, A. and Kleczkowski, LA. (1998). Sugar and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (*thale cress*). *Biochem. J.* 336, 681-687.
- Spielewoy, N.; Schulz, H.; Grienerberger, JM.; Thony-Meyer, L. and Bonnard G. (2001). CCME, a nuclear-encoded heme-binding protein involved in cytochrome *c* maturation in plant mitochondria. *The Journal of Biochem. Chem.* 276(3), 5491-5497.
- 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.
- Taanman, JW. and Capaldi, RA. (1993). Subunit VIa of yeast cytochrome *c* oxidase is not necessary for the assembly of the enzyme complex but modulates the enzyme activity. Isolation and characterization of the nuclear-coded gene. *J. Biol. Chem.* 268(25), 18754-18761.
- Tatematsu, K.; Ward, S.; Leyser, O.; Kamiya, Y. and Nambara, E. (2005). Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138, 757-766
- 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. (2002). Environmental Stress Causes Oxidative Damage to Plant Mitochondria Leading to Inhibition of Glycine Decarboxylase. *JBC* 277(45), 42663-42668.
- 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.

- 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.
- Thompson, JD.; Higgins, DG. and Gibson, TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Thompson, P.; Bowsher, CG. and Tobin, AK. (1998). Heterogeneity of Mitochondrial Protein Biogenesis during Primary Leaf Development in Barley. *Plant Physiol.* 118, 1089-1099.
- 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.
- Trémoussaygue, 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
- Trémoussaygue, D.; Manevski, A.; Bardet, C.; Lescure, N. and Lescure B (1999). Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems. *Plant J* 20, 553–561
- Tsuji, H.; Nakazono, M.; Saisho, D.; Tsutsumi, N. and Hirai, A. (2000). Transcript levels of the nuclear-encoded respiratory genes in rice decrease by oxygen deprivation: evidence for involvement of calcium in expression of the alternative oxidase 1a gene. *FEBS letters.* 471, 201-204.
- Twell, D.; Yamaguchi, J.; Wing, RA.; Ushiba, J. and McCormick, S. (1991). Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes Dev.* 5, 496-507.
- Unsold, M.; Marienfeld, J. R.; Brandt, P. and Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366.924 nucleotides. *Nat. Genet.* 15, 57-61.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K. 1993. An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5, 1529–1539.
- 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.
- Villain, P.; Mache, R. and Zhou, DX. (1996). The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *JBC* 271, 32593–32598.
- Vincentz, M.; Moreaux, T.; Leydecker, MT.; Vaucheret, H. and Caboche, M. (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana Plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* 3, 315-324.

- Vision, T.J.; Brown, D.G. and Tanksley, S.D. (2000). The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* 290, 2114-2116.
- Voytas, D.F.; Konieczny, A.; Cumming, M.P. and Ausubel, F.M. (1990). The structure, distribution and evolution of the Ta1 retrotransposable element family of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 126, 713-721.
- Wagner, A.M. and Moore, A.L. (1997). Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defense mechanism. *Biosci. Rep.* 17, 319-333.
- Wagner, A.M. (1995). A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *petunia hybrida* cells. *FEBS Letters* 368, 339-342.
- Wagner, A.M. and Krab, K. (1995). The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Physiologia Plantarum* 95, 318-325.
- Walch-Liu, P.; Neumann, G.; Bangerth, F. and Engels, C. (2000). Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Exp. Bot.* 51, 227-237.
- Washida, H.; Wu, C.Y.; Suzuki, A.; Yamanouchi, U.; Akihama, T.; Harada, K. and Takaiwa, F. (1999). Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1. *Plant Mol. Biol.* 40, 1-12.
- Weigel, D.; Alvarez, J.; Smyth, D.R.; Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M. (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69, 843-859.
- Wichmann, C. and Schuster, W. (1995). Transfer of rps10 from the mitochondrion to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*. Evidence for RNA-mediated transfer and exon shuffling at the integration site. *FEBS Lett.* 374, 152-156.
- Wiedemann, N.; Frazier, A.E. and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* 279(15), 14473- 14476.
- Williams, M.E.; Foster, R. and Chua, N.H. (1992). Sequences flanking the hexameric *G-box* core CACGTG affect the specificity of protein binding. *Plant Cell* 4, 485-496.
- Wishmann, C. and Schuster, W. (1995). Transfer of rps 10 from the mitochondrion to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*: evidence for RNA mediated transfer and exon shuffling at the integration site. *FEBS Lett.* 374, 152-156.
- Wu, C.; Washida, H.; Onodera, Y.; Harada, K. and Takaiwa, F. (2000). Quantitative nature of the prolamina-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J* 23, 415-421.
- Xiu-Qing, L.; Zhang, M. and Brown, G.G. (1996). Cell-Specific expression of mitochondrial transcripts in maize seedlings. *Plant Cell* 8, 1961-1975.
- Yu, J.; Nickels, R. and McIntosh, L. (2001). A genome approach to mitochondrial-nuclear communication in *Arabidopsis*. *Plant Physiol and Biochem* 39, 345-353.
- Yuh, C.H., Bolouri, H. and Davidson, E.H. (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.